



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110505885 A

(43)申请公布日 2019.11.26

(21)申请号 201880023755.X

(22)申请日 2018.04.04

(30)优先权数据

17164950.2 2017.04.05 EP

17208780.1 2017.12.20 EP

18151228.6 2018.01.11 EP

(66)本国优先权数据

201810276163.0 2018.03.30 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/058550 2018.04.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/185131 EN 2018.10.11

(71)申请人 诺和诺德股份有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 T.M.塔格莫斯 P.玛德森

T.B.克尔森 L.普利达尔

L.德玛利亚 林兆生 万哲

张媛媛 L.利克 M.W.B.蒙泽尔

J.T.柯德拉

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 罗文锋 黄登高

(51)Int.Cl.

A61K 47/68(2006.01)

A61K 47/64(2006.01)

A61P 5/50(2006.01)

A61K 38/28(2006.01)

权利要求书6页 说明书124页

序列表54页 附图7页

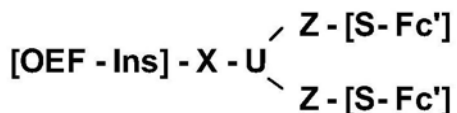
(54)发明名称

寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物

(57)摘要

本发明属于蛋白质缀合物领域。更具体地，本发明涉及用于治疗代谢障碍或病况的共价连接有Fc单体多肽的寡聚体延伸的胰岛素，并且涉及产生这类寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物的方法。本发明还涉及新型Fc片段、中间产物，并且涉及这类中间产物在合成本发明的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物的方法中的用途。最后，本发明提供了包含本发明的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物的药物组合物，并且涉及这类组合物在治疗或预防与代谢障碍或病况相关的医学状况中的用途。

1. 由式I' 表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物:



其中

Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物为包含A链和B链的双链胰岛素分子;

OEF表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K) 残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

所述[OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K) 残基的ε氨基连接至三价连接基团X-U(-Z)₂;

X代表连接[OEF-Ins]与U的共价键或二价连接基团;

U代表将两个Z-[S-Fc'] 基团连接至X的中央三价连接单元;或者,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc'] 基团连接至所述[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基;

Z不存在或代表将中央连接单元(U) 连接至单体Fc多肽(Fc') 或其片段的巯基部分(S) 的二价连接基团;或者,在Z不存在的情况下,U直接连接至[S-Fc'];并且

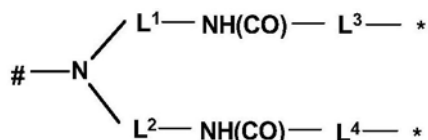
[S-Fc'] 代表Fc' 组分(即单体Fc多肽或其片段),其中S代表源自包含于该Fc' 组分内的半胱氨酸(C) 残基的硫原子。

2. 根据权利要求1所述的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中X代表共价键;

结构-C(O)-(CH₂)₁-C(O)-的二价连接体,其中1代表1至20范围内的整数;或

结构-C(O)-(CH₂)_o-NH-C(O)-的二价连接体;其中o代表1至20范围内的整数。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中所述中央三价连接单元(U) 和二价连接基团(Z) 由式IV' 表示



其中,

N是氮原子并且代表根据式I' 的中央连接单元(U);

L₁-NH(CO)-L₃和L₂-NH(CO)-L₄分别代表根据式I' 的二价连接基团(Z);

*表示与源自Fc的二硫键(即根据式I' 的[S-Fc'] 部分)的硫原子的连接点;

#表示与X的连接点;并且

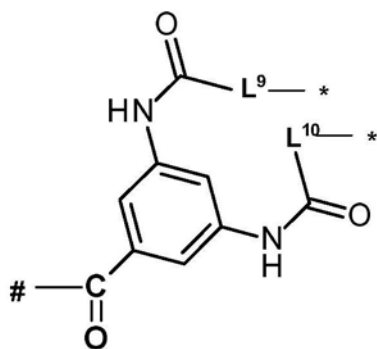
L¹和L²彼此独立地代表-(CH₂)_{m1}-;其中

m1代表1至6范围内的整数;并且

L³和L⁴彼此独立地代表-(CH₂)_{n1}-;

其中n1代表1至6范围内的整数。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中X代表共价键并且其中U-(-Z)₂代表如式VII所示的3,5-二取代的苯甲酰基部分:



其中

*表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分的)的硫原子的连接点;

#表示与所述[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基的连接点;并且

L^9 和 L^{10} 彼此独立地代表 $-(\text{CH}_2)_{n3}-$;其中

$n3$ 代表1至6范围内的整数。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中

Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14A或A14E、A21G或A21Q、B3Q、B16E或B16H、B25H、B29R和desB30。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中

OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组OEF延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala(A)、Glu(E)、Gly(G)、Pro(P)和Gln(Q),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体,该OEF的氨基酸残基总数在15至110的范围内。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG4 Fc多肽的单体或其片段。

8. 根据权利要求1所述的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其为

(A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, B(-78K[^]), B(-77P), B(-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, B(-78K[^]), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A,

235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K[^], A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K[^], A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, B(-78K[^]), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

(A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

(A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

(A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 6-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-6-氧代-己酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, B(-78K[^]), B(-77P), B(-1) (GQAP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A122K[^], A123P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21Q, A22 (G)₁₈, A40K[^], B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

(A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3, 5-双[(2-乙酰基) 氨基] 苯甲酰基缀合物;

(A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基甲酰基氨基] 丁酰基缀合物;

(A14A, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

(A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

(A1 (N(α) 乙酰基), A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K[^], A99P, B1 (N(α) 乙酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

(A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

(A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3, 5-双[(2-乙酰基) 氨基] 苯甲酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3, 5-双[(2-乙酰基) 氨基] 苯甲酰基缀合物;

(A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K[^], A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物; 或

(A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, 98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (226A, 227G,

228P, 234A, 235K, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物。

9. 式II的中间体化合物

[OEF-Ins]

其中,

OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K) 残基组合;并且

Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物为包含A链和B链的双链胰岛素分子。

10. 中间体化合物,其特征在于是单体Fc多肽(Fc')或其片段,其特征在于是

(i) hIgG1-Fc (228-447) 多肽,其含有一个或多个选自228S、234A、235K、237A、315Q、330S、331S和384Q的置换和/或缺失;和/或由一个或两个选自226A、227A或227S的氨基酸残基组成的延伸;或

(ii) hIgG4衍生的Fc序列的片段,其始于位置228并且止于位置447,该序列含有一个或多个选自228P、234A、235A或235K、N297E或297Q、315Q、384Q和des447的置换和/或缺失;和/或由一个或两个选自226A或226G、227A或227G的氨基酸残基组成的延伸。

11. 以通式V' 表征的中间体化合物:

M-X-U (-Z-LG)₂

其中

M(其也可称为Lys反应性末端)代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

X不存在(即代表共价键),或者X代表如以上针对式I' 所定义的二价连接基团;

U代表如以上针对式I' 所定义的中央三价连接单元;

Z代表将中央连接单元(U) 连接至离去基团(LG)的二价连接基团;并且

LG(其也可称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

12. 以通式VI' 表征的中间体化合物:

[OEF-Ins]-X-U (-Z-LG)₂

其中,

OEF如以上针对式I' 所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K) 残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I' 所定义,并且经由赖氨酸(K) 残基连接至二价连接基团X;

X代表如以上针对式I' 所定义的二价连接基团;并且U代表将两个二价连接基团(Z) 连接至X的如以上针对式I' 所定义的中央三价连接单元;或者

X代表共价键;并且U代表将两个二价连接基团(Z) 连接至所述[OEF-Ins]构建体的如以上针对式I' 所定义的中央三价连接单元;并且

LG代表巯基反应性基团的离去基团。

13. 药物组合物,其包含根据权利要求1-8中任一项所述的胰岛素-Fc缀合物和一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。

14. 根据权利要求1-8中任一项所述的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其用作药物。

15. 治疗、预防或减轻包括人在内的活动物体的代谢疾病或病症或病况的方法,所述方法包括向这类有需要的活动物体施用治疗有效量的根据权利要求1-8中任一项所述的胰岛素-Fc缀合物的步骤。

寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质缀合物领域。更具体地,本发明涉及用于治疗代谢障碍或病况的共价连接有Fc单体多肽的寡聚体延伸的胰岛素,并且涉及产生这类寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物的方法。

[0002] 本发明还涉及新型Fc片段、中间产物,并且涉及这类中间产物在合成本发明的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物的方法中的用途。

[0003] 最后,本发明提供了包含本发明的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物的药物组合物,并且涉及这类组合物在治疗或预防与代谢障碍或病况相关的医学状况中的用途。

背景技术

[0004] 寡聚体延伸的胰岛素是通过用寡聚体(由氨基酸残基组成)延伸胰岛素的A链和/或B链而产生的胰岛素。

[0005] Fc融合蛋白(有时被称为肽体)是通常通过融合(即,连接原本编码单独蛋白质的两个或更多个基因)生物活性多肽与免疫球蛋白G的片段可结晶区(Fc结构域)而生成的嵌合蛋白,并且融合蛋白通常组合其组成部分的性质,例如,凭借与新生Fc受体FcRn结合而具有长血清半衰期的IgG样性质。

[0006] 另一方面,蛋白质缀合物是具有“大的”、通常为重组的效应分子(例如IgG-Fc或白蛋白)的化合物,该效应分子经由合成连接体(例如PEG连接体)与治疗性多肽共价结合。蛋白质缀合物可用于多种情况,并且复杂性增加的生物治疗性化合物的鉴定和开发已提高了对用于制备这类化合物的有吸引力的方法的关注。由于蛋白质不像传统化学部分那样稳定,因此连接两个或更多个蛋白质出现了困难,并且传统反应化学可能无法在不损害蛋白质的情况下应用。此外,选择性问题的连接两个或更多个蛋白质变得复杂。

[0007] 蛋白质和肽的半衰期可以通过与Fc融合而延长。然而,由于胰岛素是双链多肽,其被表达为单链类似物,随后通过酶处理而获得双链多肽,这对于蛋白质融合而言并非理想的。此外,融合仅限于N-端和/或C-端。因此,例如为了通过Fc的作用而延长胰岛素的半衰期,就需要化学缀合。

[0008] 当缀合两个蛋白质时,连接体的性质至关重要。短连接体可能会影响各自蛋白质的活性。使两个蛋白质过于接近可能会影响分子的生物物理稳定性。可以影响这一点的连接体性质可以是,例如,第二分子上的缀合位置、连接体的长度、连接体的柔性、连接体的极性。在一些情况下,优选柔性连接体,而在其它情况下,需要刚性的连接体。将分子/蛋白质与第二分子缀合可能对缀合物的生物物理性质具有负面影响,这可以通过连接体性质来解决。

[0009] WO 2011/122921描述了具有改善的体内持续时间的胰岛素缀合物,该缀合物通过经由亲水性非肽基(例如PEG)连接体共价连接胰岛素与免疫球蛋白Fc区来制备,该连接体在两端具有反应性基团(例如,作为丙醛的醛官能团),即所谓的同双官能连接体。所用的PEG连接体是多分散性的,其大小为3.4KDa至10KDa,并且多分散性连接体的使用对最终产

物的合成和分析造成挑战。

[0010] WO 2016/178905描述了融合蛋白,其包含通过使用肽连接体与人IgG Fc区融合的胰岛素受体激动剂。

[0011] WO 2016/193380描述了新型胰岛素或胰岛素类似物,其延伸出主要为极性的氨基酸残基的序列,以便改善药物物质的半衰期和稳定性。

[0012] 获得蛋白质与肽、小分子或延长体(protractor)聚合物之间的位点特异性缀合物的最常见方式为利用Cys的巯基和N-端氨基酸的伯氨基的独特亲核性质,以及Lys侧链的 ϵ -NH₂作为反应性处理点。赖氨酸通常富含于蛋白质中(Fc含有超过30个赖氨酸残基),这限制了赖氨酸作为化学处理点的应用。但是,在胰岛素的情况下,仅存在一个赖氨酸(即在位置B29处)。另一方面,半胱氨酸在蛋白质中不常见,并且通常参与形成二硫键。半胱氨酸可以通过遗传工程而引入。然而,就胰岛素而言,这种修饰已被证明是困难的,特别是由于低表达产率和各种折叠问题。

[0013] 将两个蛋白质通过它们各自的Cys、N-端氨基或Lys残基而位点特异性地缀合在一起同样具有挑战性。异双官能连接体的使用可以用于该目的。另外,更具挑战性的是缀合如下两个蛋白质的任务,其中一个蛋白质通过源自还原的二硫键的两个硫原子而被连接。

发明内容

[0014] 我们已经开发并在此提供三触角连接体,其中至多两个末端是相同的,并且能够与蛋白质的还原的巯基部分形成稳定的共价键,而其余的末端不受该蛋白质内的巯基或其它任何残基的影响。这种方法特别适用于通过桥接两个感兴趣的蛋白质的天然二硫键(当它们还原为游离巯基时)来缀合它们。

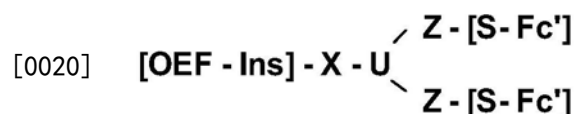
[0015] 与相似的非缀合的和非延伸的类似物相比,本发明的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物显示出胰岛素受体亲和力降低。胰岛素受体亲和力的这种降低有助于胰岛素-Fc缀合物在循环中的作用延长,因为胰岛素在受体活化后内化并降解。因此,本发明的胰岛素-Fc缀合物的清除率降低。胰岛素受体亲和力的这种降低可能不会导致效力的丧失,例如,如在标准高胰岛素血症血糖钳夹试验中所测量的,并且高FcRn结合和低胰岛素受体亲和力的组合被认为对于获得本发明胰岛素-Fc缀合物的长时间持续作用是有益的。

[0016] 因此,在其第一方面,本发明提供了由式I表示的新型寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物:



[0018] 其中,OEF、Ins、X、Y和Fc'如下文所定义。

[0019] 在另一方面,本发明提供了由式I'表示的新型寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物:



[0021] 其中,OEF、Ins、X、U、Z和S-Fc'如下文所定义。

[0022] 本发明的胰岛素-Fc缀合物显示出改善的药代动力学和/或药效学谱。

[0023] 在本发明的一方面,本发明的化合物显示出增加的药效学效力。

[0024] 在本发明的另一方面,与目前销售的长效胰岛素相比,本发明的化合物显示出至少两倍增加的药效学效力。

[0025] 在本发明的又一方面,本发明的化合物在生理pH下具有增加的溶解度。

[0026] 在本发明的另一方面,本发明的化合物具有延长的体内半衰期。

[0027] 在进一步的方面,本发明提供了新型中间体化合物,并且涉及这类产物在制备本发明胰岛素-Fc缀合物的方法中的用途。

[0028] 一方面,本发明提供了用作中间体的新型[OEF-胰岛素]构建体,即式II的中间体化合物:

[0029] [OEF-Ins]

[0030] 其中,

[0031] OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),与赖氨酸(K) 残基组合;并且

[0032] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物为包含A链和B链的双链胰岛素分子。

[0033] 另一方面,本发明提供了用于制备本发明胰岛素-Fc缀合物的新型Fc片段。

[0034] 在第三方面,本发明提供了用于制备本发明的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物的新型中间体。该中间体化合物可以用通式V来表征:

[0035] $M-X-Y(-LG)_2$

[0036] 其中,

[0037] M代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

[0038] X如以下针对式I所定义,并且代表二价连接基团;并且

[0039] Y如以下针对式I所定义,并且代表中央三价连接单元,其将两个离去基团(LG)₂连接至X;或者

[0040] X代表共价键,并且Y代表将两个离去基团(LG)₂连接至离去基团M的中央三价连接单元;并且

[0041] LG(其也可被称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

[0042] 在第四方面,本发明提供了在制备本发明的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物中用作中间体的新型[OEF-Ins-X-Y(-LG)₂]构建体。根据本发明的中间体化合物可以用通式VI来表征:

[0043] [OEF-Ins]-X-Y(-LG)₂

[0044] 其中,

[0045] OEF如以下针对式I所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K) 残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0046] 该[OEF-Ins]构建体如以下针对式I所定义,并且经由赖氨酸(K) 残基连接至二价连接基团X;

[0047] X不存在(即代表共价键),或者X代表如以下针对式I所定义的二价连接基团;

[0048] Y代表如以下针对式I所定义的中央三价连接单元；并且

[0049] LG代表如上定义的巯基反应性基团的离去基团。

[0050] 在第五方面，本发明提供了在制备本发明的胰岛素-Fc缀合物中用作中间体化合物的Fc'多肽。

[0051] 最后，本发明提供了包含本发明的胰岛素-Fc缀合物的药物组合物，并且涉及这类缀合物在治疗或预防与糖尿病有关的医学状况中的用途。

附图说明

[0052] 图1。图1显示了实施例5.1、5.5、5.7和5.21的化合物的血糖降低作用。将这些化合物以30nmol/kg的剂量(除非另有说明)施用(皮下)于饲养的Sprague-Dawley大鼠。

[0053] 图2。图2显示了实施例5.6、5.8、5.12和5.13的化合物的血糖降低作用。将这些化合物以30nmol/kg的剂量施用(皮下)于饲养的Sprague-Dawley大鼠。

[0054] 图3。图3显示了实施例5.9、5.14、5.15和5.16的化合物的血糖降低作用。将这些化合物以30nmol/kg的剂量施用(皮下)于饲养的Sprague-Dawley大鼠。

[0055] 图4。图4显示了实施例5.2、5.17和5.19的化合物的血糖降低作用。将这些化合物以30nmol/kg的剂量施用(皮下)于饲养的Sprague-Dawley大鼠。

[0056] 图5。图5显示了实施例5.26、5.23和5.27的化合物的血糖降低作用。将这些化合物以30nmol/kg的剂量施用(皮下)于饲养的Sprague-Dawley大鼠。

[0057] 图6。图6显示了实施例5.24、5.25、5.33的化合物和媒介物的血糖降低作用。将这些化合物以30nmol/kg的剂量施用(皮下)于饲养的Sprague-Dawley大鼠。

[0058] 图7。图7显示了实施例5.12的化合物和德谷胰岛素(insulin deludec)的血糖降低作用。将该化合物以30nmol/kg的剂量(除非另有说明)施用(皮下)于饲养的Sprague-Dawley大鼠。

[0059] 发明详述

[0060] 蛋白质缀合物

[0061] 在本发明的背景下，蛋白质缀合物代表包含通过化学反应共价连接的两个或更多个多肽(在此分别为胰岛素或胰岛素类似物，以及Fc结构域或Fc结构域类似物)的化合物。

[0062] 胰岛素类似物

[0063] 人胰岛素由通过两个半胱氨酸二硫键相互连接的两条多肽链组成，即分别为A链(21个氨基酸的肽)和B链(30个氨基酸的肽)。在A链中存在第三链内二硫键。

[0064] 本文中，术语胰岛素涵盖天然存在的胰岛素，例如人胰岛素，及其类似物。胰岛素类似物、胰岛素以及A链和B链中的氨基酸位置的编号是相对于人胰岛素进行的。

[0065] 本文中，术语胰岛素类似物涵盖经修饰的人胰岛素多肽，其通过删除和/或置换(替换)天然胰岛素中存在的一个或多个氨基酸残基，和/或通过向胰岛素上添加(延伸)一个或多个氨基酸残基，而具有在形式上可源自天然存在的胰岛素(例如人胰岛素)的结构的分子结构。

[0066] 本文中，如A1、A2、A3等术语分别表示当从N-末端计数时在胰岛素A链中的位置1、2和3。类似地，如B1、B2、B3等术语分别表示当从N-末端计数时在胰岛素B链中的位置1、2和3。使用针对氨基酸确立的单字母代码，如A21A、A21G和A21Q的术语分别表示在位置A21处的氨

氨酸是A、G和Q。使用针对氨基酸确立的三字母代码,其相应的表示分别是AlaA21、GlyA21和GlnA21。

[0067] 本文中,如desB29和desB30的术语分别表示缺乏B29或B30氨基酸残基的胰岛素类似物。

[0068] 本文中,术语“A(-1)”或“B(-1)”分别表示处于A1或B1的N端侧的氨基酸的位置。以这种方式,术语A(-2)和B(-2)分别表示处于(A-1)和B(-1)的N端侧的第一个氨基酸的位置。因此,A(-3)和B(-3)分别表示处于A(-2)和B(-2)的N端侧的氨基酸的位置,而A(-4)和B(-4)分别表示处于A(-3)和B(-3)的N端侧的氨基酸的位置,以此类推。

[0069] 术语A22和B31分别表示处于A21和B30的C端侧的氨基酸的位置。以这种方式,术语A23和B32分别表示处于A22和B31的C端侧的第一个氨基酸的位置。因此,A24和B33分别表示处于A23和B32的C端侧的氨基酸的位置,以此类推。以这种方式,A22G,A23G表示A链的C-端已经在位置A21的C端侧延伸了甘氨酸(G)残基,随后是位于位置A22的甘氨酸(G)残基(A22G)的C端侧的甘氨酸(G)残基。

[0070] 寡聚体延伸的融合胰岛素类似物的命名

[0071] 在本发明的背景下,寡聚体延伸的胰岛素类似物[OEF-Ins]通过说明氨基酸缺失、置换、插入和延伸相对于人胰岛素来命名。

[0072] 以这种方式,实施例1的化合物(OEF-Ins-1)表示人胰岛素的类似物(A14E,A21G,B25H,B29R,desB30),其中位于A链的位置A14和A21的天然存在的氨基酸残基已经分别被谷氨酸(E)和谷氨酰胺(Q)所置换,并且其中位于位置B25和B29的天然存在的氨基酸残基已经分别被组氨酸(H)和精氨酸(R)所置换,并且位置B30已经被删除,并且该类似物从氨基酸位置A22开始从A链C-端延伸出由四种氨基酸残基按指定顺序(GQEP)的重复组成的延伸体,以构成由总共76个氨基酸残基组成的延伸体(命名为(GQEP)₁₉),随后为KP。完整的延伸体可以被表示为(GQEP)₁₉-KP(因此赖氨酸被称为A98K)。

[0073] 这种类似物也可以被表示为A14E,A21G,A22(GQEP)₁₉,A98K,A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素,并且该化合物在以下化学式1中示出。A22(GQEP)₁₉因此表示连接至A21的(GQEP)₁₉延伸体,其中该延伸体的第一个氨基酸(即连接至A21的氨基酸,在该实例中为G)对应于位置A22,即在该实例中为A22G。

[0074]



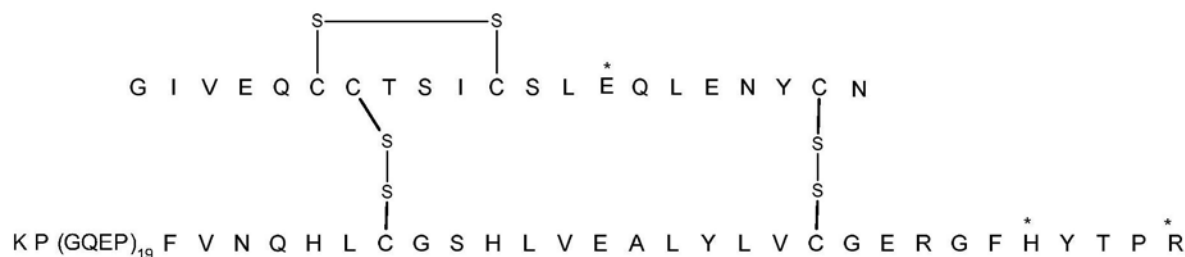
化学式 1

[0075] 在N-端B链延伸体的情况下,例如实施例1的化合物(OEF-Ins-4)代表人胰岛素的类似物(A14E,B25H,B29R,desB30),其中位于A链位置A14的天然存在的氨基酸残基已被谷氨酸(E)置换,并且其中位于位置B25和B29的天然存在的氨基酸残基分别被组氨酸(H)和精

氨酸(R)置换,并且位置B30已被删除,并且该类似物从氨基酸位置B1的N-端开始延伸出由四种氨基酸残基按指定顺序(GQEP)的重复组成的延伸体,以构成以KP开始的由总共76个氨基酸残基组成的延伸体(其也可被命名为(GQEP)₁₉)。完整的延伸体可以被表示为KP-(GQEP)₁₉。该赖氨酸残基因此被称为B(-78K)。

[0076] 该类似物也可以被表示为A14E,B(-78K),B(-77P),B(-1)(GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素,并且该化合物在以下化学式2中示出。B(-1)(GQEP)₁₉因此表示连接至B链N-端的(GQEP)₁₉延伸体,其中该延伸体的最后一个氨基酸(即连接至B1的氨基酸,在该实例中为P)对应于位置B(-1),即在该实例中为B(-1P)。

[0077]



化学式 2

[0078] 抗体和Fc结构域

[0079] Fc区是IgG重链的C-端区,其负责与Fc受体结合,其行使各种功能的,包括再循环,这导致延长的半衰期。Fc部分通常源自IgG,并且缀合物部分通常包括含有FcRn结合位点的免疫球蛋白序列的部分。补救受体FcRn负责免疫球蛋白的再循环及其返回血液循环。通常引入免疫球蛋白Fc区的突变以改变某些性质,例如,获得增加的FcRn亲和力,获得延长的半衰期,或减少或增加与其它受体的结合,获得降低的或增加的免疫效应物功能。

[0080] 基于抗体同种型IgG的氨基酸重链序列的其它小差异,将它们进一步分组为亚类(例如,人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。

[0081] 根据本发明使用的Fc结构域可以源自任意IgG Fc或其片段。在本发明的背景下,术语“Fc区”、“Fc片段”或“Fc结构域”是指抗体的可结晶片段。Fc区是抗体的尾部。对于IgG抗体,Fc区包含两个相同的多肽(即为同型二聚体),两者均包含重链的第二和第三恒定域(CH2和CH3)。Fc结构域也可以被称为二聚体,因为这两个Fc多肽非共价相互作用并且也可能共价相互作用,因为铰链半胱氨酸可以形成二硫键。在本发明的背景下,Fc结构域的一个Fc(单体)多肽被称为“Fc'”或Fc'多肽(即单体Fc分子,因为Fc=(Fc')₂)。同样在本发明的背景下,Fc结构域的蛋白质序列被称为“Fc'多肽”,并且至少包含CH2和CH3结构域。

[0082] 铰链区是抗体恒定区的CH1与CH2之间的蛋白质区段。

[0083] 人抗体的Fc区被糖基化,并且糖基化被认为与C1q相互作用有关,因此通过去除糖基化可以降低C1q结合。此外,非糖基化的Fc与Fc γ 受体I、IIa、IIb和IIIa的结合分别减小或弱化,这又允许低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0084] 糖基化可以酶促去除。在大肠杆菌中产生Fc导致非糖基化的Fc。用于制备免疫球蛋白Fc区的这类序列衍生物的技术在本领域中是公知的,并且例如在WO 97/34631和WO 96/32478中公开。

[0085] 本发明的IgG衍生的Fc可以是非糖基化的。IgG衍生的Fc片段尤其可以是非糖基化的hIgG4 Fc片段,其天然地与Fc γ 受体III弱结合。

[0086] Kabat的EU索引

[0087] (Kabat) EU编号方案是基于序列比对开发的、以一致的方式对抗体中的残基进行编号的广泛采用的标准。在本申请的上下文中,根据Kabat的EU索引对Fc链中的残基进行编号(如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)所述)。

[0088] 根据本发明,始于位置228并且止于位置447的人IgG1-Fc的天然序列被表示为hIgG1-Fc (228-447)。由于Fc由两个相同的多肽组成,因此仅给出一个多肽的序列(参见SEQ ID NO:1)。如果位置228处的脯氨酸(P)被突变为丝氨酸(S),则该类似物被表示为228S hIgG1-Fc (228-447)。在天然序列hIgG1-Fc (228-447)的N端延伸(例如延伸丙氨酸(A)和丝氨酸(S))的情况下,该产物被表示为226A,227S hIgG1-Fc (228-447)。

[0089] 类似地,始于位置228并且止于位置447的人IgG4-Fc的天然序列被表示为hIgG4-Fc (228-447),并且得到单体多肽的序列(参见SEQ ID NO:3)。

[0090] 连接体

[0091] 在本发明的背景下,连接体是用来共价连接所讨论的蛋白质的化学部分或残基。当连接体与蛋白质反应时,形成连接体基团。因此,术语“-连接体-”旨在表示胰岛素-Fc缀合物的化学单元,其与蛋白质缀合物的每个多肽的氨基酸残基共价连接。

[0092] 根据连接点,连接体末端的反应性可能会有所不同。连接体可具有各种形式,这取决于所讨论的产物。在本发明的一个实施方案中,该概念涉及有序缀合,以确保不同的蛋白质在连接体的每个末端连接。

[0093] 连接体的末端官能团可与免疫球蛋白Fc结构域或生理活性多肽的N-端赖氨酸、组氨酸或半胱氨酸残基结合。

[0094] 反应性末端是可用于将连接体与蛋白质的氨基酸残基缀合的化学部分。反应性末端可适合于连接至N-端、C-端或内部的氨基酸残基。本领域已知各种形式,包括氨基酸残基特异性的化学部分,以及氨基酸残基非特异性的部分。根据所讨论的靶蛋白质,可能需要使用靶标特异性的氨基酸残基以获得高产率和高同质性的所需最终产物。

[0095] 反应性末端(或基团)可以根据其预期靶向哪个氨基酸残基而不同。N-端氨基酸或赖氨酸侧链的伯氨基可以例如被醛、酮或活化的羧酸所靶向。这些反应性末端被称为氨基反应性末端。在一个实施方案中,伯氨基反应性末端包含醛基(CH(=O))或活化的羧基(活性酯)。

[0096] 使用各种半胱氨酸或巯基反应性末端可以实现与巯基的缀合。根据本发明所使用的连接体可包含被间隔区隔开的一个或多个巯基或Cys反应性末端。该连接体的反应性末端可以被称为Cys或巯基反应性末端。此外,该连接体包括氨基反应性末端。在一个实施方案中,巯基反应性末端包含卤代乙酰胺或Michael受体。

[0097] 本文中,术语巯基反应性基团涵盖但不限于卤代乙酰胺,如氯乙酰胺、碘乙酰胺和溴乙酰胺基团,Michael受体,卤代芳基,和非对称二硫化物,其中异官能连接体提供不对称二硫化物中的巯基官能团之一,并且提供作为离去基团的其它官能团。这类不对称二硫化物的实例包括吡啶基二硫化物、(甲氧基-或乙氧羰基-)二硫化物和(邻硝基苯基)二硫化

物。

[0098] 根据本发明,连接体用于将胰岛素或胰岛素类似物连接至Fc结构域。Fc结构域由通常通过共价键和/或非共价键(包括多肽间二硫键)保持在一起的两个多肽组成。使用常规二价连接体的共价连接将蛋白质仅连接至一个Fc多肽。然而,使用根据本发明的三价连接体(也称为三触角连接体),获得两个Fc多肽链均与胰岛素类似物连接的蛋白质缀合物。

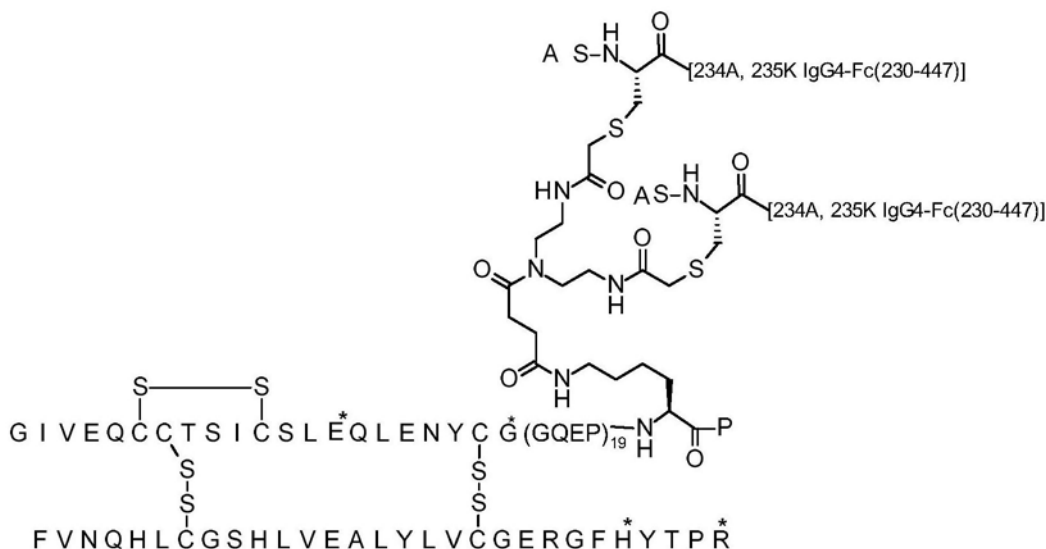
[0099] 本发明的胰岛素-Fc缀合物的命名

[0100] 在本发明的背景下,为了便于参考,根据构成本发明缀合物的肽组成部分(即胰岛素组分和免疫球蛋白Fc组分)以及(-X-Y-)连接基团的说明来表示本发明的胰岛素-Fc缀合物。

[0101] 以这种方式,实施例5.1的胰岛素-Fc缀合物(以下表示为化学式3)(其表示通过A链C-端延伸体连接的缀合物)可被表示为(A14E,A21G,A22(GQEP)₁₉,A98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))₄-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物,表明该化合物由经由三价连接基团4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基(即-X-Y-连接基团,其中X代表连接体-C(O)-(CH₂)₂-C(O)-,并且Y代表式IV化合物,其中L₁=L₂=(CH₂)₂-,并且L₃=L₄=(CH₂)₂-,对应于-C(O)-(CH₂)₂-C(O)-N(-(CH₂)₂-NH-C(O)-CH₂-)₂)缀合的胰岛素组分(即A14E,A21G,A22(GQEP)₁₉,A98K A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)和Fc组分(即227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))组成,并且该连接体将胰岛素组分的赖氨酸A98K的ε氨基桥接至-C(O)-,并且将Fc组分多肽的Cys229的每一个巯基桥接至-C(O)-CH₂-。

[0102] 应当指出,A98K[^]表示X-Y-或X-U(Z)₂与胰岛素的连接点。因此,[^]表示二价连接基团X(式I和式I')所连接的[OEF-Ins]中的位置,或者在X是共价键的情况下,[^]表示三价连接基团Y(式I)或三价连接基团U(式I')分别连接的[OEF-Ins]中的位置。

[0103]



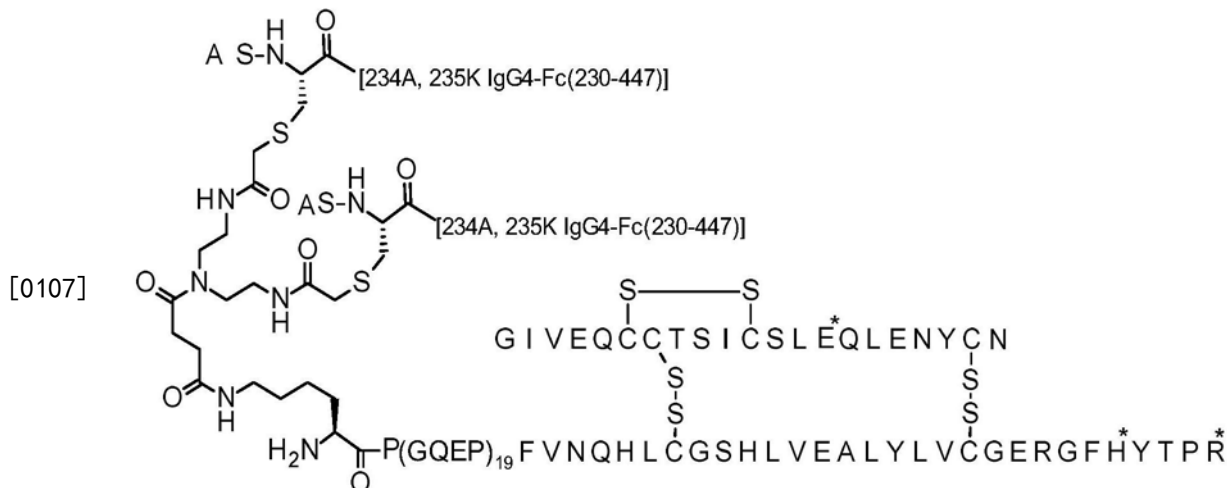
化学式 3

[0104] 在化学式3中,显示了两个Fc'多肽序列的前三个氨基酸(即A-S-C),并且放大显示了第三个氨基酸(即Cys)。该Fc'多肽的剩余部分(即位置230至447)中的突变在方括号中示出[例如234A,235K]。

[0105] 同样,通过B链N-端延伸体连接的缀合物(例如,如以下化学式4所示)可以被表示

为(A14E,B(-78K⁺),B(-77P),B(-1)(GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物(实施例5.4的胰岛素-Fc缀合物),表明该化合物由经由连接基团4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基(即-X-Y-连接基团,其中X代表连接体-C(O)-(CH₂)₂-C(O)-,并且Y代表式IV化合物,其中L3=L4=-CH₂-,并且L1=L2=-(CH₂)₂-,对应于-C(O)-(CH₂)₂-C(O)-N(-(CH₂)₂-NH-C(O)-CH₂-)₂)缀合的胰岛素组分(即A14E,B(-78K⁺),B(-77P),B(-1)(GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30胰岛素)和Fc组分(即227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))组成,并且该连接体将胰岛素组分的B(-78K⁺)和Fc组分多肽的Cys229的巯基桥接起来。

[0106] 应当指出,B(-78K[^])表示X-Y-或X-U(Z)₂与胰岛素的连接点。



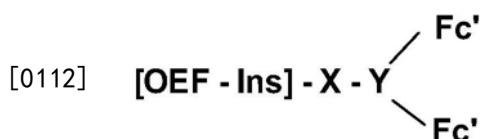
化学式 4

[0108] 在化学式4中,显示了两个Fc'多肽序列的前三个氨基酸(即A-S-C),并且放大显示了第三个氨基酸(即Cys)。该Fc'多肽的剩余部分(即位置230至447)中的突变在方括号中示出[例如234A,235K]。

[0109] 本发明的胰岛素-Fc缀合物

[0110] 在其第一方面,本发明提供了经由连接体与胰岛素共价结合的两个单体Fc多肽。

[0111] 更具体地,本发明提供了由式I表示的新型胰岛素-Fc缀合物:



[0113] 其中，

[0114] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物是包含A链和B链的双链胰岛素分子;

[0115] OEF表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]ⁿ构建体;

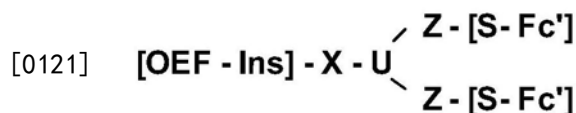
[0116] 该[0EF-Ins]构建体经由赖氨酸(K)残基连接至三价连接基团X-Y;或者更具体地,该[0EF-Ins]构建体经由赖氨酸(K)残基的ε氨基连接至三价连接基团X-Y;

[0117] X代表连接[0EF-Ins]与Y的共价键或二价连接基团;

[0118] Y代表经由源自Fc的二硫键的两个硫原子将两个Fc'连接至X的三价连接基团;或者,在X代表共价键的情况下,Y经由两个硫原子将两个Fc'连接至该[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基(或者更具体地,Y经由两个硫原子将两个Fc'连接至该[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基);并且

[0119] Fc'代表单体Fc多肽或其片段。

[0120] 在另一个实施方案中,本发明提供了由式I'表示的新型胰岛素-Fc缀合物:



[0122] 其中,

[0123] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物是包含A链和B链的双链胰岛素分子;

[0124] OEF表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0125] 该[OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K)残基连接至三价连接基团X-U(-Z)₂;或者更具体地,该[OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K)残基的ε氨基连接至三价连接基团X-U(-Z)₂;

[0126] X代表连接[OEF-Ins]与U的共价键或二价连接基团;

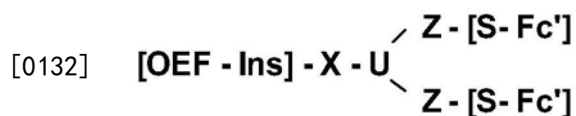
[0127] U代表将两个Z-[S-Fc']基团连接至X的中央三价连接单元;

[0128] 或者,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc']基团连接至该[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基;或者更具体地,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc']基团连接至该[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基;

[0129] Z代表将中央连接单元(U)连接至单体Fc多肽(Fc')或其片段的巯基部分(S)的二价连接基团;并且

[0130] [S-Fc']代表源自包含在Fc'组分内的半胱氨酸(C)残基的硫原子;或者更具体地,[S-Fc']代表Fc'组分(即单体Fc多肽或其片段),其中S代表源自包含在Fc'组分内的半胱氨酸(C)残基的硫原子。

[0131] 在进一步的实施方案中,本发明提供了由式I'表示的新型胰岛素-Fc缀合物:



[0133] 其中,

[0134] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物是包含A链和B链的双链胰岛素分子;

[0135] OEF表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0136] 该[OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K)残基的ε氨基连接至三价连接基团X-U(-Z)₂;

[0137] X代表连接[OEF-Ins]与U的共价键或二价连接基团;

[0138] U代表将两个Z-[S-Fc']基团连接至X的中央三价连接单元;

[0139] 或者,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc']基团连接至该[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基;

[0140] Z不存在或代表将中央连接单元(U)连接至单体Fc多肽(Fc')或其片段的巯基部分(S)的二价连接基团;并且

[0141] [S-Fc']代表Fc'组分(即单体Fc多肽或其片段),其中S代表源自包含在Fc'组分内的半胱氨酸(C)残基的硫原子。

[0142] 根据本发明,Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14A或A14E、A21G或A21Q、B3E或B3Q、B16E或B16H、B25H、desB27、B29R和/或desB30。在本申请全文中,当用来描述胰岛素类似物时,“含有”的含义与“包含”相同。

[0143] 在一个实施方案中,Ins代表任选地含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14A或A14E、A21G或A21Q、B3E或B3Q、B16E或B16H、B25H、desB27、B29R和/或desB30。

[0144] 在一个实施方案中,Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14A或A14E、A21G或A21Q、B3Q、B25H、B29R和/或desB30。

[0145] 在又一个实施方案中,Ins代表包含desB30缺失的人胰岛素类似物。

[0146] 在第三个实施方案中,Ins代表包含B29R置换的人胰岛素类似物。

[0147] 在第四个实施方案中,Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G或A21Q、B3Q、B25H、B29R和/或desB30。

[0148] 在第五个实施方案中,Ins代表含有B29R并且含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G或A21Q、B3Q、B25H和/或desB30。

[0149] 在第六个实施方案中,Ins代表含有B29R且为desB30并且含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G或A21Q、B3Q和/或B25H。

[0150] 在第七个实施方案中,Ins代表含有A21G或A21Q、B29R且为desB30并且含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14E、B3Q和/或B25H。

[0151] 在第八个实施方案中,所述胰岛素类似物选自:

[0152] A14A,A21G,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:52的A链;SEQ ID NO:26的B链);

[0153] A14E,A21G,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:23的B链);

[0154] A14E,A21G,B3Q,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:48的B链);

[0155] A14E,A21G,B25H,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:21的B链);

[0156] A14E,A21G,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:26的B链);

[0157] A14E,A21Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:49的A链;SEQ ID NO:21的B链);

[0158] A14E,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:23的B链);

[0159] A14E,B3Q,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:48的B链);

[0160] A14E,B25H,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:21的B链);

[0161] A14E,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:26的B链);

[0162] A21G,B3Q,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:76的A链;SEQ ID NO:48的B链);

[0163] A21G,B29R,desB30人胰岛素(SEQ ID NO:76的A链;SEQ ID NO:26的B链);

- [0164] B3Q,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:50的A链;SEQ ID NO:48的B链);和
- [0165] B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:50的A链;SEQ ID NO:26的B链)。
- [0166] 在第九个实施方案中,所述胰岛素类似物选自
- [0167] A14A,A21G,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:52的A链;SEQ ID NO:26的B链);
- [0168] A14E,A21G,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:23的B链);
- [0169] A14E,A21G,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:21的B链);
- [0170] A14E,A21G,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:26的B链);
- [0171] A14E,A21Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:49的A链;SEQ ID NO:21的B链);
- [0172] A14E,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:23的B链);和
- [0173] A14E,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:21的B链)。
- [0174] 在第十个实施方案中,所述胰岛素类似物选自
- [0175] A14A,A21G,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:52的A链;SEQ ID NO:26的B链);
- [0176] A14E,A21G,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:23的B链);
- [0177] A14E,A21G,B3Q,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:48的B链);
- [0178] A14E,A21G,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:21的B链);
- [0179] A14E,A21G,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:26的B链);
- [0180] A14E,A21Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:49的A链;SEQ ID NO:21的B链);
- [0181] A14E,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:23的B链);
- [0182] A14E,B3Q,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:48的B链);
- [0183] A14E,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:21的B链);
- [0184] A14E,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:8的A链;SEQ ID NO:26的B链);
- [0185] A14E,A21G,B16E,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:29的B链);
- [0186] A14E,A21G,B16H,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链;SEQ ID NO:51的B链);
- [0187] A21G,B3Q,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:76的A链;SEQ ID NO:48的B链);
- [0188] A21G,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:76的A链;SEQ ID NO:26的B链);
- [0189] B3Q,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:50的A链;SEQ ID NO:48的B链);
- [0190] B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:50的A链;SEQ ID NO:26的B链);
- [0191] A21G,B29R,desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:76的A链;SEQ ID NO:26的B链);和

[0192] A14E, A21G, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链; SEQ ID NO:29的B链)。

[0193] 在第十一个实施方案中, 所述胰岛素类似物选自

[0194] A14E, A21G, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链; SEQ ID NO:21的B链);

[0195] A14E, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:8的A链; SEQ ID NO:23的B链);

[0196] A14E, A21G, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链; SEQ ID NO:23的B链);

[0197] A14E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:8的A链; SEQ ID NO:21的B链);

[0198] A14E, A21G, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链; SEQ ID NO:26的B链);

[0199] A14A, A21G, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:52的A链; SEQ ID NO:26的B链);

[0200] A21G, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:76的A链; SEQ ID NO:26的B链); 和

[0201] A14E, A21G, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (SEQ ID NO:47的A链; SEQ ID NO:29的B链)。

[0202] OEF-胰岛素构建体

[0203] 根据本发明, OEF-胰岛素构建体的完整序列仅含有一个赖氨酸(K)残基。

[0204] 同样根据本发明, 构建体OEF-Ins经由末端赖氨酸(K)残基(仅在A链延伸的情况下)或经由末端KP序列中的赖氨酸(K)残基(对于A链和B链延伸两者)连接至二价连接基团X。

[0205] 本发明的OEF-Ins构建体可以经由末端赖氨酸(K)残基或经由末端KP序列中的赖氨酸(K)残基连接至根据式I的或根据式I'的二价连接基团X, 该赖氨酸(K)残基在胰岛素A链的C-端或胰岛素A链的任何延伸体的C-端被引入。

[0206] 或者, 当X代表共价键时, 本发明的OEF-Ins构建体经由末端赖氨酸(K)残基或经由末端KP序列中的赖氨酸(K)残基连接至根据式I的三价连接基团-Y或连接至根据式I'的中央三价连接单元U, 该赖氨酸(K)残基在胰岛素A链的C-端或胰岛素A链的任何延伸体的C-端被引入。

[0207] 在一个实施方案中, OEF表示与胰岛素A链在C-端融合的极性重组延伸体, 该延伸体终止于赖氨酸(K)残基或KP序列。

[0208] 在另一个实施方案中, OEF与胰岛素A链在C-端融合, 该延伸体终止于赖氨酸(K)残基。

[0209] 在第三个实施方案中, OEF与胰岛素A链在C-端融合, 该延伸体终止于KP序列(按规定方向添加)。

[0210] 本发明的构建体OEF-Ins还可以经由末端赖氨酸(K)残基或经由KP序列中的赖氨酸(K)残基连接至根据式I的或根据式I'的二价连接基团X, 该赖氨酸(K)残基在胰岛素B链的N-端或胰岛素B链的任何延伸体的N-端被引入。

[0211] 或者, 当X代表共价键时, 本发明的OEF-Ins构建体经由末端赖氨酸(K)残基或经由KP序列中的赖氨酸(K)残基连接至根据式I的三价连接基团Y或连接至根据式I'的中央三价连接单元U, 该赖氨酸(K)残基在胰岛素B链的N-端或胰岛素B链的任何延伸体的N-端被引

入。

[0212] 在一个实施方案中, OEF表示与胰岛素B链在N-端融合的极性重组延伸体, 该延伸体始于赖氨酸(K) 残基或KP序列(按规定方向)。

[0213] 在另一个实施方案中, OEF与胰岛素B链在N-端融合, 该延伸体始于赖氨酸(K) 残基。

[0214] 在第三个实施方案中, 该OEF与胰岛素B链在N-端融合, 该延伸体始于赖氨酸(K) 残基, 随后为脯氨酸(P) 残基。

[0215] 根据本发明, OEF表示极性重组延伸体, 该延伸体由选自丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、脯氨酸(P)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S) 和苏氨酸(T) 的氨基酸残基组成, 并且如上所述, 与赖氨酸(K) 残基(或KP序列) 组合。

[0216] 应当指出, 根据本发明引入的OEF并非用于、也没有显著贡献于对于本发明胰岛素-Fc缀合物所观察到的延长的半衰期, 但在本发明的背景下, OEF碰巧提供了合适的间隔基团/连接体, 从而避免了胰岛素类似物的屏蔽, 并且OEF也引入了更好的(改善的) 溶解度和/或改善的糖动力学效力。

[0217] 在一个实施方案中, 所述极性重组延伸体由选自丙氨酸(A)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、脯氨酸(P)、谷氨酸(Q) 和丝氨酸(S) 的氨基酸残基组成, 并且如上所述, 与赖氨酸(K) 残基(或KP序列) 组合。

[0218] 为了实现其目的, 所述极性重组OEF延伸体不应太大, 目前认为, 根据本发明的OEF的总长度应该在1个至约130个氨基酸残基之间。

[0219] 在一个实施方案中, 根据本发明的OEF的总长度应该在1个至约105个氨基酸残基之间。

[0220] 在另一个实施方案中, 根据本发明的OEF的总长度应该在1个至约90个氨基酸残基之间。

[0221] 在第三个实施方案中, 根据本发明的OEF的总长度应该在1个至约80个氨基酸残基之间。

[0222] 在第四个实施方案中, 根据本发明的OEF的总长度应该在15至110个氨基酸残基之间。

[0223] 所述极性重组OEF延伸体尤其可由选自以下的连续氨基酸残基代表:

[0224] A) 聚甘氨酸序列(Gly)_x (A组), 其中x代表2至约102范围内的整数, 并且如上所述, 与K或KP组合;

[0225] B) [A、G和Q]_x组(B组), 其为随机顺序或任意组合, 其中x代表1至约30范围内的整数, 并且如上所述, 与K或KP组合;

[0226] C) [A、P和S]_x组(C组), 其为随机顺序或任意组合, 其中x代表1至约30范围内的整数, 并且如上所述, 与K或KP组合;

[0227] D) [E、G和Q]_x组(D组), 其为随机顺序或任意组合, 其中x代表1至约30范围内的整数, 并且如上所述, 与K或KP组合;

[0228] E) [A、G、P和Q]_x组(E组), 其为随机顺序或任意组合, 其中x代表1至约25范围内的整数, 并且如上所述, 与K或KP组合;

[0229] F) [A、G、P和S]_x组(F组), 其为随机顺序或任意组合, 其中x代表1至约25范围内的

整数,并且如上所述,与K或KP组合;

[0230] G) [E、G、P和Q]_x组(G组),其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合;

[0231] H) [E、G、P和S]_x组(H组),其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合;

[0232] I) [A、E、G、P和Q]_x组(I组),其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约20范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合;以及

[0233] J) [A、E、G、P、S和T]_x组(J组),其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约20范围内的整数,并且如上所述,其与K或KP组合;

[0234] 和/或A、B、C、D、E、F、G、H、I和J组的任意组合。

[0235] 在一个实施方案中,所述极性重组OEF延伸体由选自B-H组中的任一个的非重复序列(即随机顺序的序列)代表。

[0236] 在另一个实施方案中,所述极性重组OEF延伸体由选自B-H组的氨基酸残基的重复序列或序列基序(即特定基序的序列)代表。

[0237] 在进一步的实施方案中,所述极性重组OEF延伸体由选自B-H组的氨基酸残基的重复基序代表,在该序列中,末端基序可被截短以排除不想要的氨基酸残基(特别是脯氨酸(P)),以变为位于末端位置。

[0238] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体尤其可由选自A组(即聚甘氨酸序列(Gly)_x)的连续氨基酸残基代表,其中x代表2至约102范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合(即,对于A链延伸体为(Gly)_x-KP;而对于B链延伸体为KP-(Gly)_x)。

[0239] 在一个实施方案中,x代表2至约90范围内的整数;或者x代表2至约75范围内的整数;或者x代表2至约50范围内的整数;或者x代表2至约35范围内的整数;或者x代表2至约30范围内的整数;或者x代表2至约25范围内的整数;或者x代表2至约20范围内的整数;或者x代表2至约18范围内的整数。

[0240] 在另一个实施方案中,A组的极性重组OEF延伸体为(Gly)₁₈。

[0241] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自B组(即[A、G和Q]_x)的连续氨基酸残基代表,其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约30范围内的整数,并且如上所述,该B组序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为[A、G、Q]_x-KP;而对于B链延伸体为KP-[A、G、Q]_x)。

[0242] 在一个实施方案中,B组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表:(AGQ)_x、(GAQ)_x、(GQA)_x、(AQG)_x、(QGA)_x和(QAG)_x;其中x代表1至约30范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0243] 在另一个实施方案中,x代表1至约30范围内的整数。

[0244] 在进一步的实施方案中,x代表1至约25范围内的整数;或者x代表1至约20范围内的整数;或者x代表1至约15范围内的整数;或者x代表1至约10范围内的整数。

[0245] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自C组(即[A、P和S]_x)的连续氨基酸残基代表,其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约30范围内的整数,并且如上所述,该C组序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为[A、P、S]_x-KP;而对于B链延伸体为KP-[A、P、S]_x)。

[0246] 在一个实施方案中,C组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表:(APS)_x、(PAS)_x、(PSA)_x、(ASP)_x、(SPA)_x、(SAP)_x;其中x代表1至约30范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0247] 在C组的OEF延伸体由基序(PAS)_x、(PSA)_x或(SAP)_x代表的情况下,该延伸体不终止于脯氨酸(P)残基,即末端基序可被截短(例如SA),从而得到2个氨基酸残基的C-端基序,随后为KP(例如SA-KP)。

[0248] 在另一个实施方案中,x代表1至约30范围内的整数。

[0249] 在进一步的实施方案中,x代表1至约25范围内的整数;或者x代表1至约20范围内的整数;或者x代表1至约15范围内的整数;或者x代表1至约10范围内的整数。

[0250] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自D组(即[E、G和Q]_x)的连续氨基酸残基代表,其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约30范围内的整数,并且如上所述,该D组序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为[E,G,Q]_x-KP;而对于B链延伸体为KP-[E,G,Q]_x)。

[0251] 在一个实施方案中,D组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表:(EGQ)_x、(GEQ)_x、(GQE)_x、(EQG)_x、(QGE)_x和(QEG)_x,其中x代表1至约30范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0252] 在另一个实施方案中,x代表1至约30范围内的整数。

[0253] 在进一步的实施方案中,x代表1至约25范围内的整数;或者x代表1至约20范围内的整数;或者x代表1至约15范围内的整数;或者x代表1至约10范围内的整数。

[0254] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自E组(即[A、G、P和Q]_x组)的连续氨基酸残基代表,其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,该E组序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为[A,G,P,Q]_x-KP;而对于B链延伸体为KP-[A,G,P,Q]_x)。

[0255] 在一个实施方案中,E组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表:(AGPQ)_x、(GAPQ)_x、(GPAQ)_x、(GPQA)_x、(APGQ)_x、(PAGQ)_x、(PGAQ)_x、(PGQA)_x、(AQGP)_x、(QAGP)_x、(QGAP)_x、(QGPA)_x、(APQG)_x、(PAQG)_x、(PQGA)_x、(PQAG)_x、(AGQP)_x、(GAQP)_x、(GQPA)_x、(GQAP)_x,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0256] 在E组的OEF延伸体由基序(PAGQ)_x、(PGAQ)_x、(PGQA)_x、(PAQG)_x、(PQGA)_x、(PQAG)_x、(AQGP)_x、(QAGP)_x、(QGAP)_x、(AGQP)_x、(GAQP)_x或(GQAP)_x代表的情况下,该延伸体不总是终止于脯氨酸(P)残基,即末端基序可被截短(例如AQG、QAG、QGA、AGQ、GAQ和GQA),从而得到3个氨基酸残基的C-端基序,随后为KP(例如GQA-KP)。

[0257] 在另一个实施方案中,E组的极性重组OEF延伸体选自(GQAP)_x、(GQPA)_x、(GPQA)_x、(GPAQ)_x、(GAQP)_x和(GAPQ)_x;其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0258] 在第三个实施方案中,E组的极性重组OEF延伸体为

[0259] 由(GQAP)_x-KP、(GQAP)_x-GQA-KP、(GQPA)_x-KP、(GPQA)_x-KP、(GPAQ)_x-KP、(GAQP)_x-KP、(GAQP)_x-GAQ-KP、(GAPQ)_x-KP、(GQAP)_x-GQA-KP代表的A链延伸体;或

[0260] 由KP-(GQAP)_x、KP-(GQPA)_x、KP-(GPQA)_x、KP-(GPAQ)_x、KP-(GAQP)_x、KP-(GAPQ)_x代表的B链延伸体;

[0261] 其中x代表1至约25范围内的整数。

[0262] 在进一步的实施方案中,x代表1至约25范围内的整数;或者x代表1至约20范围内的整数;或者x代表1至约15范围内的整数;或者x代表1至约10范围内的整数。

[0263] 在更进一步的实施方案中,x代表19。

[0264] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自F组(即[A、G、P和S]_x组)的连续氨基酸残基代表,其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,该F组序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为[A,G,P,S]_x-KP;而对于B链延伸体为KP-[A,G,P,S]_x)。

[0265] 在一个实施方案中,F组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表:(AGPS)_x、(GAPS)_x、(GPAS)_x、(GPSA)_x、(APGS)_x、(PAGS)_x、(PGAS)_x、(PGSA)_x、(ASGP)_x、(SAGP)_x、(SGAP)_x、(SGPA)_x、(APSG)_x、(PASG)_x、(PSGA)_x、(PSAG)_x、(AGSP)_x、(GASP)_x、(GSPA)_x、(GSAP)_x,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0266] 在F组的OEF延伸体由基序(PAGS)_x、(PGAS)_x、(PGSA)_x、(PASG)_x、(PSGA)_x、(PSAG)_x、(ASGP)_x、(SAGP)_x、(SGAP)_x、(AGSP)_x、(GASP)_x、(GSAP)_x代表的情况下,该延伸体不终止于脯氨酸(P)残基,即末端基序可被截短(例如ASG、SAG、SGA、AGS、GAS和GSA),从而得到3个氨基酸残基的C-端基序,随后为KP(例如SAG-KP)。

[0267] 在进一步的实施方案中,x代表1至约25范围内的整数;或者x代表1至约20范围内的整数;或者x代表1至约15范围内的整数;或者x代表1至约10范围内的整数。

[0268] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自G组(即[E、G、P和Q]_x组)的连续氨基酸残基代表,其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,该G组序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为[E,G,P,Q]_x-KP;而对于B链延伸体为KP-[E,G,P,Q]_x)。

[0269] 在一个实施方案中,G组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表:(EGPQ)_x、(GEPQ)_x、(GPEQ)_x、(GPQE)_x、(EPGQ)_x、(PEGQ)_x、(PGEQ)_x、(PGQE)_x、(EQGP)_x、(QEGP)_x、(QGEQ)_x、(EPQG)_x、(PEQG)_x、(PQGE)_x、(PQEG)_x、(EGQP)_x、(GEQP)_x、(GQPE)_x、(GQEP)_x;其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0270] 在G组的OEF延伸体由基序(PEGQ)_x、(PGEQ)_x、(PGQE)_x、(PEQG)_x、(PQGE)_x、(PQEG)_x、(EQGP)_x、(QEGP)_x、(QGEQ)_x、(EGQP)_x、(GEQP)_x或(GQEP)_x代表的情况下,该延伸体不总是终止于脯氨酸(P)残基,即末端基序可被截短(例如EQG、QEG、QGE、EGQ、GEQ和GQE),从而得到3个氨基酸残基的C-端基序,随后为KP(例如GQE-KP)。

[0271] 在另一个实施方案中,G组的极性重组OEF延伸体选自(GQEP)_x、(GQPE)_x、(GPQE)_x、(GPEQ)_x、(GEQP)_x、(GEPQ)_x;其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0272] 在第三个实施方案中,G组的极性重组OEF延伸体为:

[0273] 由(GQEP)_x-KP、(GQEP)_x-GQE-KP、(GQPE)_x-KP、(GPQE)_x-KP、(GPEQ)_x-KP、(GEQP)_x-KP、(GEQP)_x-GEQ-KP、(GEPQ)_x-KP或(GQEP)_x-GQE-KP代表的A链延伸体;或

[0274] 由KP-(GQEP)_x、KP-(GQPE)_x、KP-(GPQE)_x、KP-(GPEQ)_x、KP-(GEQP)_x和KP-(GEPQ)_x代表的B链延伸体;

[0275] 其中x代表1至约25范围内的整数。

[0276] 在进一步的实施方案中,x代表1至约20范围内的整数,或者x代表1至约15范围内

的整数。

[0277] 在更进一步的实施方案中,G组的极性重组OEF延伸体为

[0278] 由 (GQEP)₃-GQE-KP、(GQEP)₆-KP、(GQEP)₁₂-KP或 (GQEP)₁₉-KP代表的A链延伸体;

[0279] 或由KP-(GQEP)₄、KP-(GQEP)₆或KP-(GQEP)₁₉代表的B链延伸体。

[0280] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自H组(即[E、G、P和S]_x组)的连续氨基酸残基代表,其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,该H组序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为[E,G,P,S]_x-KP;而对于B链延伸体为KP-[E,G,P,S]_x)。

[0281] 在一个实施方案中,H组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表:(EGPS)_x、(GEPs)_x、(GPES)_x、(GPSE)_x、(EPGS)_x、(PEGS)_x、(PGES)_x、(PGSE)_x、(ESGP)_x、(SEGP)_x、(SGEP)_x、(SGPE)_x、(EPSG)_x、(PESG)_x、(PSGE)_x、(PSEG)_x、(EGSP)_x、(GESp)_x、(GSPE)_x和(GSEP)_x,其中x代表1至约25范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0282] 在H组的OEF延伸体由基序(PEGS)_x、(PGES)_x、(PGSE)_x、(PESG)_x、(PSGE)_x、(PSEG)_x、(ESGP)_x、(SEGP)_x、(SGEP)_x、(EGSP)_x、(GESp)_x或(GSEP)_x代表的情况下,该延伸体不终止于脯氨酸(P)残基,即末端基序可被截短(例如ESG、SEG、SGE、EGS、GES和GSE),从而得到3个氨基酸残基的C-端基序,随后为KP(例如SEG-KP)。

[0283] 在进一步的实施方案中,x代表1至约20范围内的整数,或者x代表1至约15范围内的整数。

[0284] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自I组(即[A、E、G、P和Q]_x组)的连续氨基酸残基代表,其为随机顺序或任意组合,其中x代表1至约20范围内的整数,并且如上所述,该I组序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为[A,E,G,P,Q]_x-KP;而对于B链延伸体为KP-[A,E,G,P,Q]_x)。

[0285] 在一个实施方案中,I组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表:(AEGPQ)_x、(EAGPQ)_x、(EGAPQ)_x、(EGPAQ)_x、(EGPQA)_x、(AGEPQ)_x、(GAEPQ)_x、(GEAPQ)_x、(GEPQA)_x、(GEPQA)_x、(AEPGQ)_x、(EAPGQ)_x、(EPAGQ)_x、(EPGAQ)_x、(EPGQA)_x、(AEGQP)_x、(EAGQP)_x、(EGAQP)_x、(EGQAP)_x、(GAPEQ)_x、(GAPQE)_x、(GPEAQ)_x、(GPAEQ)_x、(GPAQE)_x、(GPEQA)_x、(GPQEA)_x、(GPQAE)_x、(PQAEG)_x、(QPAEG)_x、(QAPEG)_x、(QAEPG)_x、(QAEGP)_x、(EPQAG)_x、(PEQAG)_x、(PQEAG)_x、(PQAGE)_x、(APQEG)_x、(PAQEG)_x、(PQEAG)_x、(PQEGA)_x、(AQEP)_x、(GAQEP)_x、(GQAEP)_x、(GQEAP)_x、(GQEPA)_x;其中x代表1至约20范围内的整数,并且如上所述,与K或KP组合。

[0286] 在I组的OEF延伸体由基序(PQAEG)、(PEQAG)、(PQEAG)、(PQAGE)、(PAQEG)、(PQEAG)、(PQEGA)、(AEGQP)_x、(EAGQP)_x、(EGAQP)_x、(EGQAP)_x、(QAEP)_x、(AQEP)_x、(GAQEP)_x、(GQAEP)_x或(GQEAP)_x代表的情况下,该延伸体不终止于脯氨酸(P)残基,即末端基序可被截短(例如AEGQ、EAGQ、EGAQ、EGQA、QAEG、AQGE、GAQE、GQAE和GQEA),从而得到4个氨基酸残基的C-端基序,随后为KP(例如EGAQ-KP)。

[0287] 在另一个实施方案中,I组的极性重组OEF延伸体选自(GQAPGQEP)_x、(GQAPGQEP)_x-GQA-KP、(GQAPGQEP)_x-GQE-KP、(GQAPGQAPGQEP)_x、(GQAPGQAPGQEP)_x-GQA-KP、(GQAPGQAPGQEP)_x-GQE-KP、(GQAPGQAPGQAPGQEP)_x和(GQAPGQAPGQAPGQEP)_x-GQA-KP、(GQAPGQAPGQAPGQEP)_x-GQE-KP;其中x代表1至约20范围内的整数。

[0288] 在进一步的实施方案中, x 代表1至约20范围内的整数, 或者 x 代表1至约15范围内的整数。

[0289] 在第三个实施方案中, I组的极性重组OEF延伸体为

[0290] 由 $(\text{GQAPGQEP})_6\text{-KP}$ 、 $(\text{GQAPGQAPGQEP})_6\text{-KP}$ 、 $(\text{GQAPGQAPGQEP})_6\text{-GQA-KP}$ 或 $(\text{GQAPGQAPGQAPGQEP})_6\text{-GQAP-KP}$ 代表的A链延伸体;

[0291] 由 $\text{KP-}(\text{GQAPGQEP})_6$ 或 $\text{KP-}(\text{GQAPGQAPGQEP})_6$ 代表的B链延伸体; 或

[0292] 由 $(\text{GQAPGQAPGQAPGQEP})_6\text{GQAP-KP}$ 或 $(\text{GQAPGQAPGQAPGQEP})_6\text{-GQA-KP}$ 代表的A链延伸体。

[0293] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体还可由选自J组 (即 $[\text{A}, \text{E}, \text{G}, \text{P}, \text{S}, \text{T}]_x$ 组) 的连续氨基酸残基代表, 其为随机顺序或任意组合, 其中 x 代表1至约20范围内的整数, 并且如上所述, 该J组序列进一步与K或KP组合 (即, 对于A链延伸体为 $[\text{A}, \text{E}, \text{G}, \text{P}, \text{S}, \text{T}]_x\text{-KP}$; 而对于B链延伸体为 $\text{KP-}[\text{A}, \text{E}, \text{G}, \text{P}, \text{S}, \text{T}]_x$)。

[0294] 在一个实施方案中, J组的极性重组OEF延伸体可进一步由一个或多个以下基序代表: $(\text{AEGPST})_x$ 、 $(\text{EAGPST})_x$ 、 $(\text{EGAPST})_x$ 、 $(\text{EGPAST})_x$ 、 $(\text{EGPSAT})_x$ 、 $(\text{EGPSTA})_x$ 、 $(\text{AGEPST})_x$ 、 $(\text{AGPEST})_x$ 、 $(\text{AGPSET})_x$ 、 $(\text{AGPSTE})_x$ 、 $(\text{GEAPST})_x$ 、 $(\text{GAEPST})_x$ 、 $(\text{GAPEST})_x$ 、 $(\text{GAPSET})_x$ 、 $(\text{GAPSTE})_x$ 、 $(\text{GEPAST})_x$ 、 $(\text{GPEAST})_x$ 、 $(\text{GPAEST})_x$ 、 $(\text{GPASET})_x$ 、 $(\text{GPASTE})_x$ 、 $(\text{GEPSAT})_x$ 、 $(\text{GPESAT})_x$ 、 $(\text{GPSEAT})_x$ 、 $(\text{GPSAET})_x$ 、 $(\text{GPSATE})_x$ 、 $(\text{GEPSTA})_x$ 、 $(\text{GPESTA})_x$ 、 $(\text{GPSETA})_x$ 、 $(\text{GPSTEA})_x$ 、 $(\text{GPSTAE})_x$ 、 $(\text{PSTAEG})_x$ 、 $(\text{PTSAEG})_x$ 、 $(\text{PTASEG})_x$ 、 $(\text{PTAESG})_x$ 、 $(\text{SPTAEG})_x$ 、 $(\text{STPAEG})_x$ 、 $(\text{STAPEG})_x$ 、 $(\text{STAEPG})_x$ 、 $(\text{STAEGP})_x$ 、 $(\text{TAEGPS})_x$ 、 $(\text{TEAGPS})_x$ 、 $(\text{TEGAPS})_x$ 、 $(\text{TEGPAS})_x$ 、 $(\text{TEGPSA})_x$ 、 $(\text{ATEGPS})_x$ 、 $(\text{AETGPS})_x$ 、 $(\text{AEGTPS})_x$ 、 $(\text{AEGPTS})_x$ 、 $(\text{TEAPGS})_x$ 、 $(\text{TAEPGS})_x$ 、 $(\text{ETAPGS})_x$ 、 $(\text{EATPGS})_x$ 、 $(\text{EAPTGS})_x$ 、 $(\text{EAPGTS})_x$ 、 $(\text{EAPGST})_x$ 、 $(\text{TEPAGS})_x$ 、 $(\text{ETPAGS})_x$ 、 $(\text{EPTAGS})_x$ 、 $(\text{EPATGS})_x$ 、 $(\text{EPAGTS})_x$ 、 $(\text{EPAGST})_x$ 、 $(\text{TEPGAS})_x$ 、 $(\text{ETPGAS})_x$ 、 $(\text{EPTGAS})_x$ 、 $(\text{EPGTAS})_x$ 、 $(\text{EPGATS})_x$ 、 $(\text{EPGAST})_x$ 、 $(\text{TEPGSA})_x$ 、 $(\text{ETPGSA})_x$ 、 $(\text{EPTGSA})_x$ 、 $(\text{EPGTSA})_x$ 、 $(\text{EPGSTA})_x$ 、 $(\text{EPGSAT})_x$ 、 $(\text{TEASGP})_x$ 、 $(\text{ETASGP})_x$ 、 $(\text{EATSGP})_x$ 、 $(\text{EASTGP})_x$ 、 $(\text{EASGTP})_x$ 、 $(\text{EASGPT})_x$ 、 $(\text{TESAGP})_x$ 、 $(\text{ETSAGP})_x$ 、 $(\text{ESTAGP})_x$ 、 $(\text{ESATGP})_x$ 、 $(\text{ESAGTP})_x$ 、 $(\text{ESAGPT})_x$ 、 $(\text{TESGAP})_x$ 、 $(\text{ETSGAP})_x$ 、 $(\text{ESTGAP})_x$ 、 $(\text{ESGTAP})_x$ 、 $(\text{ESGATP})_x$ 、 $(\text{ESGAPT})_x$ 、 $(\text{TESGPA})_x$ 、 $(\text{ETSGPA})_x$ 、 $(\text{ESTGPA})_x$ 、 $(\text{ESGTPA})_x$ 、 $(\text{ESGPTA})_x$ 、 $(\text{ESGPAT})_x$ 、 $(\text{TEAPSG})_x$ 、 $(\text{ETAPSG})_x$ 、 $(\text{EATPSG})_x$ 、 $(\text{EAPTSG})_x$ 、 $(\text{EAPSTG})_x$ 、 $(\text{EAPSGT})_x$ 、 $(\text{TEPASG})_x$ 、 $(\text{ETPASG})_x$ 、 $(\text{EPTASG})_x$ 、 $(\text{EPATSG})_x$ 、 $(\text{EPASTG})_x$ 、 $(\text{EPASGT})_x$ 、 $(\text{TEPSGA})_x$ 、 $(\text{EPTSGA})_x$ 、 $(\text{EPSTGA})_x$ 、 $(\text{EPSGTA})_x$ 、 $(\text{EPSGAT})_x$ 、 $(\text{TEPSAG})_x$ 、 $(\text{ETPSAG})_x$ 、 $(\text{EPTSAG})_x$ 、 $(\text{EPSTAG})_x$ 、 $(\text{EPSATG})_x$ 、 $(\text{EPSAGT})_x$ 、 $(\text{TEAGSP})_x$ 、 $(\text{ETAGSP})_x$ 、 $(\text{EATGSP})_x$ 、 $(\text{EAGTSP})_x$ 、 $(\text{EAGSTP})_x$ 、 $(\text{EAGSPT})_x$ 、 $(\text{TEGASP})_x$ 、 $(\text{ETGASP})_x$ 、 $(\text{EGTASP})_x$ 、 $(\text{EGATSP})_x$ 、 $(\text{EGASTP})_x$ 、 $(\text{EGASPT})_x$ 、 $(\text{TEGSPA})_x$ 、 $(\text{ETGSPA})_x$ 、 $(\text{EGTSPA})_x$ 、 $(\text{EGSTPA})_x$ 、 $(\text{EGSPTA})_x$ 、 $(\text{EGSPAT})_x$ 、 $(\text{TEGSAP})_x$ 、 $(\text{ETGSAP})_x$ 、 $(\text{EGTSAP})_x$ 、 $(\text{EGSTAP})_x$ 、 $(\text{EGSATP})_x$ 、 $(\text{EGSAPT})_x$ 、 $(\text{PAEGST})_x$ 、 $(\text{PEAGST})_x$ 、 $(\text{PEGAST})_x$ 、 $(\text{PEGSAT})_x$ 、 $(\text{PEGSTA})_x$ 、 $(\text{SAEGPT})_x$ 、 $(\text{SEAGPT})_x$ 、 $(\text{SEGAPT})_x$ 、 $(\text{SEGPAT})_x$ 、 $(\text{SEGPTA})_x$, 其中 x 代表1至约20范围内的整数, 并且如上所述, 与K或KP组合。

[0295] 在J组的OEF延伸体由基序 $(\text{PSTAEG})_x$ 、 $(\text{PTSAEG})_x$ 、 $(\text{PTASEG})_x$ 、 $(\text{PTAESG})_x$ 、 $(\text{PTAEGS})_x$ 、 $(\text{STAEGP})_x$ 、 $(\text{TEASGP})_x$ 、 $(\text{ETASGP})_x$ 、 $(\text{EATSGP})_x$ 、 $(\text{EASTGP})_x$ 、 $(\text{EASGTP})_x$ 、 $(\text{TESAGP})_x$ 、 $(\text{ETSAGP})_x$ 、 $(\text{ESTAGP})_x$ 、 $(\text{ESATGP})_x$ 、 $(\text{ESAGTP})_x$ 、 $(\text{TESGAP})_x$ 、 $(\text{ETSGAP})_x$ 、 $(\text{ESTGAP})_x$ 、 $(\text{ESGTAP})_x$ 、 $(\text{ESGATP})_x$ 、 $(\text{TEAGSP})_x$ 、 $(\text{ETAGSP})_x$ 、 $(\text{EATGSP})_x$ 、 $(\text{EAGTSP})_x$ 、 $(\text{EAGSTP})_x$ 、 $(\text{TEGASP})_x$ 、 $(\text{ETGASP})_x$ 、 $(\text{EGTASP})_x$ 、 $(\text{EGATSP})_x$ 、 $(\text{EGASTP})_x$ 、 $(\text{EGASPT})_x$ 、 $(\text{TEGSPA})_x$ 、 $(\text{ETGSPA})_x$ 、 $(\text{EGTSPA})_x$ 、 $(\text{EGSTPA})_x$ 、 $(\text{EGSPTA})_x$ 、 $(\text{EGSPAT})_x$ 、 $(\text{TEGSAP})_x$ 、 $(\text{ETGSAP})_x$ 、 $(\text{EGTSAP})_x$ 、 $(\text{EGSTAP})_x$ 、

(EGSATP)_x代表的情况下,该延伸体不终止于脯氨酸(P)残基,即末端基序可被截短(例如 STAEG、TEASG、ETASG、EATSG、EASTG、EASGT、TESAG、ETSAG、ESTAG、ESATG、ESAGT、TESGA、ETSGA、ESTGA、ESGTA、ESGAT、TEAGS、ETAGS、EATGS、EAGTS、EAGST、TEGAS、ETGAS、EGTAS、EGATS、EGAST、EGASP、TEGSA、ETGSA、EGTSA、EGSTA、EGSAT),从而得到5个氨基酸残基的C-端基序,随后为KP(例如STAEG-KP)。

[0296] 在进一步的实施方案中,x代表1至约20范围内的整数,或者x代表1至约15范围内的整数。

[0297] 根据本发明使用的极性重组OEF延伸体也可由A、B、C、D、E、F、G和H组的任意组合来代表,但是如上所述,该极性重组OEF延伸体不应该太大,目前认为,根据本发明的OEF的总长度应该在1至约150个氨基酸残基之间。

[0298] 在一个实施方案中,根据本发明使用的极性重组OEF延伸体可由C组和E组的组合代表。

[0299] 在另一个实施方案中,根据本发明使用的由C组和E组的组合代表的极性重组OEF延伸体为((GQAP)(GQEP))_x、((GQAP)(GQAP)(GQEP))_x或((GQAP)(GQAP)(GQAP)(GQEP))_x;并且如上所述,该组合的序列进一步与K或KP组合(即,对于A链延伸体为((GQAP)(GQEP))_x-KP、((GQAP)(GQAP)(GQEP))_x-KP或((GQAP)(GQAP)(GQAP)(GQEP))_x-KP;而对于B链延伸体为KP-((GQAP)(GQEP))_x、KP-((GQAP)(GQAP)(GQEP))_x或KP-((GQAP)(GQAP)(GQAP)(GQEP))_x;其中x代表1至7范围内的整数。

[0300] 在第三个实施方案中,由C组和E组的组合代表的极性重组OEF延伸体为

[0301] 由((GQAP)(GQEP))₆-KP或((GQAP)(GQAP)(GQEP))₆-(GQAP)-KP代表的A链延伸体,或

[0302] 由KP-((GQAP)(GQEP))₆或KP-((GQAP)(GQAP)(GQEP))₆-(GQAP)代表的B链延伸体。

[0303] 在进一步的实施方案中,根据本发明使用的极性重组OEF延伸体由选自(GAPQ)、(GEPQ)、(GQAP)、(GQEP)、(PQAG)和(PQEG)的重复基序或这些基序的混合物代表,如上所述,与赖氨酸(K)残基或与KP序列组合。

[0304] 在更进一步的实施方案中,OEF表示与胰岛素A链在C-端融合的极性重组延伸体(即胰岛素A链延伸体),该延伸体选自以下基序和延伸体:

[0305] [G,E,S,T,A,P]_n-KP(即随机顺序的G、E、S、T、A、P)和[G,E,Q,A,P]_n-KP(即随机顺序的G、E、Q、A、P);

[0306] 其中n代表1至约20范围内的整数;以及

[0307] (GAPQ)_x-KP、(GAQP)_x-KP、(GEPQ)_x-KP、(GEQP)_x-KP、(GPAQ)_x-KP、(GPEQ)_x-KP、(GPQA)_x-KP、(GPQE)_x-KP、(GQAP)_x-KP、(GQEP)_x-KP、(GQPA)_x-KP和(GQPE)_x-KP;

[0308] 其中x代表1至约25范围内的整数;以及

[0309] (GQAPGQEP)_y-KP;

[0310] 其中y代表1至约15范围内的整数;以及

[0311] (GQAPGQAPGQEP)_z-KP;

[0312] 其中z代表1至约10范围内的整数;以及

[0313] (GQAPGQAPGQAPGQEP)_v-KP;

[0314] 其中v代表1至约8范围内的整数。

[0315] 在更进一步的实施方案中, OEF表示与胰岛素B链在N-端融合的极性重组延伸体(即胰岛素B链延伸体), 该延伸体选自以下基序和延伸体:

[0316] $KP-[G,E,S,T,A,P]_n$ (即随机顺序的G、E、S、T、A、P) 和 $KP-[G,E,Q,A,P]_n$ (即随机顺序的G、E、Q、A、P);

[0317] 其中n代表1至约20范围内的整数; 以及

[0318] $KP-(GAPQ)_x$ 、 $KP-(GAQP)_x$ 、 $KP-(GEPQ)_x$ 、 $KP-(GEQP)_x$ 、 $KP-(GPAQ)_x$ 、 $KP-(GPEQ)_x$ 、 $KP-(GPQA)_x$ 、 $KP-(GPQE)_x$ 、 $KP-(GQAP)_x$ 、 $KP-(GQEP)_x$ 、 $KP-(GQPA)_x$ 和 $KP-(GQPE)_x$;

[0319] 其中x代表1至约25范围内的整数; 以及

[0320] $KP-(GQAPGQEP)_y$;

[0321] 其中y代表1至15范围内的整数; 以及

[0322] $KP-(GQAPGQAPGQEP)_z$;

[0323] 其中z代表1至10范围内的整数; 以及

[0324] $KP-(GQAPGQAPGQAPGQEP)_v$;

[0325] 其中v代表1至8范围内的整数。

[0326] 在进一步的实施方案中, 根据本发明使用的A链的极性重组OEF延伸体和A链位置21处的氨基酸为

[0327] A21Q, A22 (G)₁₈, A40K* (SEQ ID NO:53);

[0328] A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K*, A98P (SEQ ID NO:54);

[0329] A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K*, A99P (SEQ ID NO:55);

[0330] A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K*, A71P (SEQ ID NO:56);

[0331] A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K*, A99P (SEQ ID NO:57);

[0332] A21G, A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A122K*, A123P (SEQ ID NO:58);

[0333] A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K*, A122P (SEQ ID NO:59);

[0334] A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K*, A38P (SEQ ID NO:60);

[0335] A21G, A22 (GQEP)₆, A46K*, A47P (SEQ ID NO:61);

[0336] A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K*, A71P (SEQ ID NO:62); 或

[0337] A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K*, A99P (SEQ ID NO:63);

[0338] 其中*表示Fc'缀合点。

[0339] 在进一步的实施方案中, 根据本发明使用的B链的极性重组OEF延伸体为:

[0340] B(-78K*), B(-77P), (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP (SEQ ID NO:64);

[0341] B(-78K*), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉ (SEQ ID NO:65);

[0342] B(-78K*), B(-77P), B(-1) (GQAP)₁₉ (SEQ ID NO:66);

[0343] B(-26K*), B(-25P), B(-1) (GQAP)₆ (SEQ ID NO:67);

[0344] 其中*表示Fc'缀合点。

[0345] 连接基团

[0346] 本发明的胰岛素-Fc缀合物可以被表征为由经由连接体与OEF-Ins构建体共价连接的两个单体Fc多肽(Fc')组成。

[0347] 本发明的具体特征为将两个单体Fc组分连接为寡聚体延伸的胰岛素类似物的方式。用于获得这类构建体的连接体可被视为根据式I由X和Y所定义的或根据式I'由X、U和Z

所定义的“三臂”连接体,

[0348] 其中

[0349] X代表连接[OEF-Ins]与Y的共价键或二价连接基团;

[0350] Y代表根据式I的三价连接基团,其经由两个硫原子将两个Fc'连接至X;或者,在X代表共价键的情况下,Y经由两个硫原子将两个Fc'连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基;或者更具体地,Y经由两个硫原子将两个Fc'连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的 ϵ 氨基;并且

[0351] Fc'代表单体Fc多肽或其片段;或者

[0352] U代表根据式I'的中央三价连接单元,其将两个Z-[S-Fc']基团连接至X;或者,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc']基团连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基;或者更具体地,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc']基团连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的 ϵ 氨基;并且

[0353] 根据式I'的Z代表将中央连接单元(U)连接至单体Fc多肽(Fc')或其片段的巯基部分(S)的二价连接基团。

[0354] 在一个具体的实施方案中,根据式I的Y代表将X连接至两个单体Fc多肽(Fc')的两个巯基部分(S)的三价连接基团,该三价连接基团包含 Sp^2 杂化碳原子($-\text{C}(=\text{O})-$)和亚甲基,如式III所示

[0355] $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$

[0356] 在另一个具体的实施方案中,根据式I',Z代表将中央单元(U)连接至单体Fc多肽(Fc')或其片段的巯基部分(S)的二价连接基团,该二价连接基团包含 Sp^2 杂化碳原子($-(\text{C}=\text{O})-$)和亚甲基,如式III'所示

[0357] $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$

[0358] 其中Fc'代表单体Fc多肽或其片段,并且S代表源自包含在Fc'组分内的半胱氨酸(C)残基的硫原子。

[0359] 在一个实施方案中,所述硫原子源自位于Fc铰链区中的半胱氨酸(C)残基,该半胱氨酸残基能够形成二硫键(如以下化学式5所示)。

[0360] 在另一个实施方案中,本发明的胰岛素-Fc缀合物是式I或式I'化合物,其中X不存在(即代表共价键),或者X代表结构 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_1-\text{C}(=\text{O})-$ 的二价连接体;其中1代表1至20范围内的整数。

[0361] 在进一步的实施方案中,1代表1至15范围内的整数;或者1代表1至10范围内的整数;或者1代表1至6范围内的整数;或者1代表1至5范围内的整数;或者1代表1至4范围内的整数。

[0362] 在进一步的实施方案中,1代表2至15范围内的整数;或者1代表2至10范围内的整数;或者1代表2至6范围内的整数;或者1代表2至5范围内的整数;或者1代表2至4范围内的整数。

[0363] 在进一步的实施方案中,1代表2,或者1代表3,或者1代表4,或者1代表5,或者1代表6。

[0364] 在进一步的实施方案中,X代表连接体 $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 。

[0365] 在进一步的实施方案中,X代表连接体-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-。

[0366] 在进一步的实施方案中,X代表结构-C(O)-(CH₂)_o-NH-C(O)-的二价连接体;其中o代表1至20范围内的整数。

[0367] 在进一步的实施方案中,o代表1至15范围内的整数;或者o代表1至10范围内的整数;或者o代表1至5范围内的整数;或者o代表1至3范围内的整数;

[0368] 在进一步的实施方案中,X代表连接体-CO-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CO-。

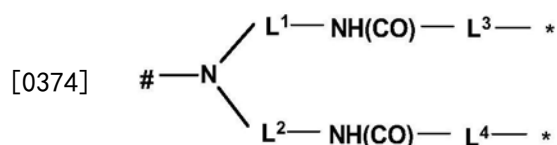
[0369] 在更进一步的实施方案中,X代表共价键。

[0370] 本发明的胰岛素-Fc缀合物可以是式I化合物,其中Y代表三价连接基团,其经由两个硫原子将两个Fc'连接至X;或者,在X代表共价键的情况下,Y经由两个硫原子将两个Fc'连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基,或者更具体地,Y经由两个硫原子将两个Fc'连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基。

[0371] 在另一个实施方案中,本发明的胰岛素-Fc缀合物是式I'化合物,其中U代表中央三价连接单元,其将两个Z-[S-Fc']基团连接至X;或者,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc']基团连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基;或者更具体地,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc']基团连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基。

[0372] 在一个实施方案中,根据式I'的中央连接单元(U)代表氮原子(N)。

[0373] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素-Fc缀合物是式I化合物,其中中央三价连接单元(Y)由式IV表示



[0375] 其中,

[0376] N为氮原子(N);

[0377] *表示与源自Fc(即根据式I的[Fc']部分)的还原二硫键的硫原子的连接点;

[0378] N为氮原子(N);

[0379] #表示与X的连接点;并且

[0380] L¹和L²彼此独立地代表-(CH₂)_{m1}-;其中

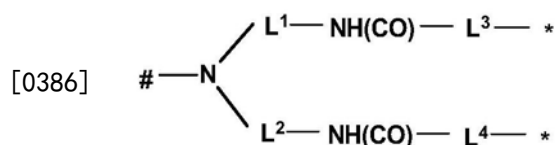
[0381] m1代表1至6范围内的整数;并且

[0382] L³和L⁴彼此独立地代表-(CH₂)_{n1}-;

[0383] 其中n1代表1至6范围内的整数。

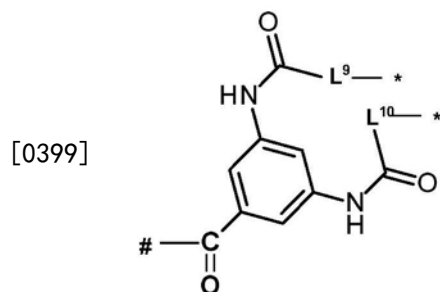
[0384] 在一个实施方案中,L¹和L²中的每一个代表-(CH₂)₂-或-(CH₂)₃-;并且L³和L⁴中的每一个代表-(CH₂)₂-。

[0385] 在另一个实施方案中,本发明的胰岛素-Fc缀合物是式I'化合物,其中中央三价连接单元(U)和二价连接基团(Z)由式IV'代表

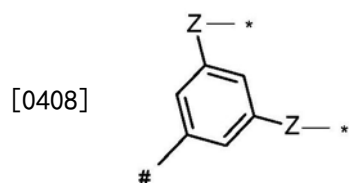


[0387] 其中,

- [0388] N为氮原子(N)并且代表根据式I'的中央连接单元(U)；
- [0389] $L_1-NH(CO)-L_3$ 和 $L_2-NH(CO)-L_4$ 分别代表根据式I'的二价连接基团(Z)；
- [0390] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点；
- [0391] #表示与X的连接点；并且
- [0392] L^1 和 L^2 彼此独立地代表 $-(CH_2)_{m1}-$ ；其中
- [0393] $m1$ 代表1至6范围内的整数；并且
- [0394] L^3 和 L^4 彼此独立地代表 $-(CH_2)_{n1}-$ ；
- [0395] 其中 $n1$ 代表1至6范围内的整数。
- [0396] 在另一个实施方案中,根据式I'的中央连接单元(U)代表苯环。
- [0397] 在进一步的实施方案中,中央连接单元(U)代表3,5-二取代的苯甲酸酯或苯甲酰基部分。
- [0398] 在更进一步的实施方案中,中央连接单元(U)代表如式VII所示的3,5-二取代的苯甲酸酯部分：



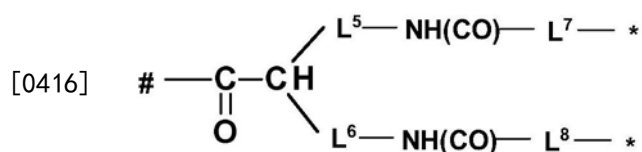
- [0400] 其中，
- [0401] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点；
- [0402] #表示与X的连接点,或者,在X不存在(即代表共价键)的情况下,表示与[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的伯氨基的连接点；并且
- [0403] L^9 和 L^{10} 彼此独立地代表 $-(CH_2)_{n3}-$ ；其中
- [0404] $n3$ 代表1至6范围内的整数；
- [0405] (并且根据式I'的Z不存在)。
- [0406] 在一个实施方案中, L^9 和 L^{10} 中的每一个代表 $-(CH_2)-$ 。
- [0407] 在更进一步的实施方案中,中央连接单元(U)代表3,5-二取代的苯环,并且根据式I'的 $-U(-Z)_2$ 由式VII'表示：



- [0409] 其中
- [0410] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点；
- [0411] #表示与X的连接点；并且
- [0412] Z独立地为 $NH(C=O)-L^9$ 或 $NH(C=O)-L^{10}$, L^9 和 L^{10} 彼此独立地代表 $-(CH_2)_{n3}-$ ；其中
- [0413] $n3$ 代表1至6范围内的整数。

[0414] 在第三个实施方案中,根据式I'的中央连接单元(U)由连接至羰基(C=O)基团的甲基代表,于是式I'的U(-Z)₂成为[-(C=O)-CH(-Z)₂]。

[0415] 在进一步的实施方案中,X不存在(即代表共价键),并且根据式I'的U(-Z)₂由式VIII代表:



[0417] 其中,

[0418] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;

[0419] #表示与X的连接点;或者在X不存在(即代表共价键)的情况下,表示与[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的伯氨基的连接点;并且

[0420] L⁵和L⁶彼此独立地代表-(CH₂)_{m2}-;其中

[0421] m2代表0至6范围内的整数;并且

[0422] L⁷和L⁸彼此独立地代表-(CH₂)_{n2}-;其中n2代表1至6范围内的整数。

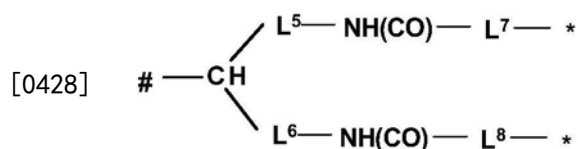
[0423] 在一个实施方案中,L⁵代表共价键(即m2=0),并且L⁶代表-(CH₂)₄(即m2代表4);并且L⁷和L⁸中的每一个代表-(CH₂)₂。

[0424] 在另一个实施方案中,根据式I'的连接基团X-U(-Z)₂代表

[0425] -C(O)-(CH₂)₂-C(O)-N[-(CH₂)₂-NH-C(O)-CH₂-]₂-、-C(O)-((CH₂)₃-NH-C(O)-N[(CH₂)₂-NH-C(O)-CH₂-]₂-、-C(O)-CH(NH-C(O)-CH₂)-(CH₂)₄-NH-C(O)-CH₂-或-C(O)-C₆H₃(NH(CO)-CH₂)₂。

[0426] 在第三个实施方案中,中央连接单元(U)由甲基和式I'的Y(-Z)₂部分代表,并且X如上文所定义。

[0427] 在进一步的实施方案中,U(-Z)₂由式VIII'代表



[0429] 其中,

[0430] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;

[0431] #表示与X的连接点;并且

[0432] L⁵和L⁶彼此独立地代表-(CH₂)_{m2}-;其中

[0433] m2代表0至6范围内的整数;并且

[0434] L⁷和L⁸彼此独立地代表-(CH₂)_{n2}-;其中n2代表1至6范围内的整数。

[0435] 在一个实施方案中,L⁵代表共价键(即m2=0),并且L⁶代表-(CH₂)₄(即m2代表4);并且L⁷和L⁸中的每一个代表-(CH₂)₂。

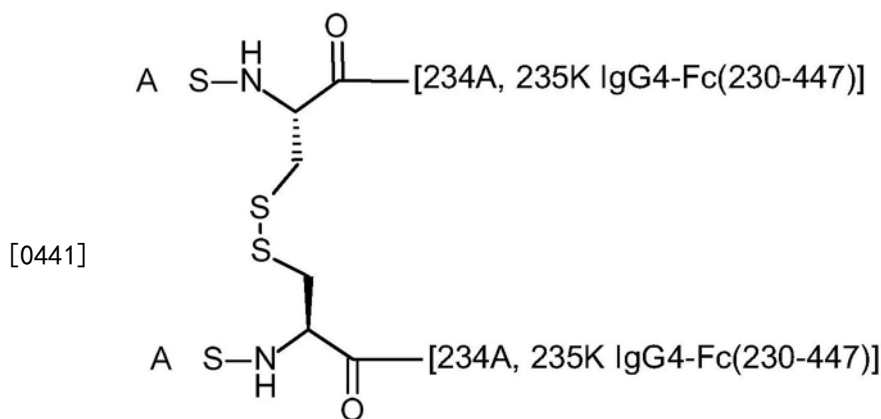
[0436] 在另一个实施方案中,连接基团X-U(-Z)₂代表

[0437] -C(O)-(CH₂)₂-C(O)-N[-(CH₂)₂-NH-C(O)-CH₂-]₂-、-C(O)-((CH₂)₃-NH-C(O)-N[(CH₂)₂-NH-C(O)-CH₂-]₂-、-C(O)-CH(NH-C(O)-CH₂)-(CH₂)₄-NH-C(O)-CH₂-或-C(O)-C₆H₃(NH(CO)-CH₂)₂。

[0438] 抗体Fc组分 (Fc')

[0439] 如上所述,本发明的胰岛素-Fc缀合物可以被描述为经由上述连接体与胰岛素共价结合的两个单体Fc多肽。

[0440] 根据本发明,Fc组分被修饰(即裂解),使得Fc多肽的铰链区仅包含一个(天然的)半胱氨酸(C)残基。第一个Fc单体的半胱氨酸能够与位于原始(同型二聚体)Fc多肽的第二单体上的相似半胱氨酸残基形成二硫键,例如,如以下化学式5所示。



化学式 5

[0442] 如上所述,经由源自Fc多肽中的半胱氨酸残基的硫原子(-S-)发生与本发明的Fc'多肽的连接。

[0443] Fc多肽的铰链区可仅包含天然氨基酸残基。在一个实施方案中,Fc多肽在N-端不包含甲硫氨酸。在另一个实施方案中,Fc铰链的铰链序列衍生自IgG1铰链序列 **PKSCDKTHTCPPCP** (SEQ ID NO:4)。在第三个实施方案中,该铰链序列选自: PKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:4)、AGPCP (SEQ ID NO:68)、**ASPCP** (SEQ ID NO:69)、PPCP (SEQ ID NO:70)、PCP和CP。

[0444] IgG1的恒定区可在天然残基P228(根据EU索引编号,以上以粗体和下划线标记)处通过置换为丝氨酸残基(P228S)而被修饰。

[0445] Fc铰链的铰链序列也可以衍生自IgG4铰链序列SKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:6)。在一个实施方案中,该铰链序列选自: **SKYGPPCPSCP**、**AGSCP** (SEQ ID NO:73)、**AGPCP** (SEQ ID NO:68)、SCP (SEQ ID NO:74)、SCP和CP。

[0446] 可修饰恒定区以稳定分子。在IgG4铰链区中,天然残基S228(根据EU索引编号,以上以粗体和下划线标记)可被脯氨酸残基置换(S228P)。在一个实施方案中,Fc多肽在位置S228处或在IgG1衍生的铰链序列中对应于P228的位置处包含脯氨酸残基。

[0447] Fc多肽各自可具有天然序列的N-端延伸体,该延伸体包含一个或多个选自A、G和S的氨基酸。在本发明的一个实施方案中,该延伸体不始于丝氨酸(S)残基。在另一个实施方案中,IgG1的铰链序列为ASPCP (SEQ ID NO:71)、AGPCP (SEQ ID NO:68)或ASCP (SEQ ID NO:72)。在进一步的实施方案中,IgG4的铰链序列为ASCP (SEQ ID NO:72)、AGSCP (SEQ ID NO:73)、AGPCP (SEQ ID NO:68)或GASCP (SEQ ID NO:75)。

[0448] Fc多肽各自可具有天然序列的C-端缺失。本文中,如des 447这样的术语表示Fc类

似物在位置447处缺少(天然的)C-端氨基酸残基。

[0449] 因此,Fc结构域的Fc多肽可通过二硫键共价连接或非共价连接。

[0450] Fc区也可被工程化为在Fc区内包含修饰,通常用来改变其一种或多种功能性质,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合、蛋白质稳定性和/或抗原依赖性细胞毒性或上述性质的缺乏。此外,Fc结构域可经化学修饰(例如,一个或多个化学部分可连接至Fc部分)以改变其糖基化,从而改变该抗体的一种或多种功能性质。

[0451] 根据本发明使用的IgG1衍生的Fc结构域可包含一个或多个以下氨基酸置换,所述氨基酸置换将会导致对某些Fc受体的亲和力的降低:L234A,L235E或235A或235K,和G237A,和/或导致C1q介导的补体固定的减少:分别为A330S和P331S。

[0452] 根据本发明使用的IgG2衍生的Fc结构域可包含一个或多个以及可能全部的以下氨基酸置换,所述氨基酸置换将会导致对某些Fc受体的亲和力的降低:V234A、A235K和P237A,和/或导致C1q介导的补体固定的减少:分别为A330S和P331S。

[0453] 根据本发明使用的IgG4衍生的Fc结构域可包含一个或多个以及可能全部的以下氨基酸置换,所述氨基酸置换将会导致对某些Fc受体的亲和力的降低:P227A、F234A和L235A或L235K。

[0454] 为了改善对FcRn的结合亲和力,可在Fc中包含置换,以获得IgG1或IgG同种型的Fc结构域中的氨基酸置换,如M428L和/或N434S。在本发明的另一个实施方案中,可以通过在IgG1或IgG4的Fc结构域中包含氨基酸置换如M252Y和/或S254T和/或T256E来获得改善的FcRn结合亲和力。

[0455] 为了改善Fc结构域的化学稳定性,易发生脱酰胺的天冬酰胺可以被谷氨酰胺、天冬氨酸或谷氨酸置换。IgG1和IgG4两者中的这类天冬酰胺的实例为N297、N315和N384。在一个实施方案中,本发明的Fc包含N315Q和N384Q置换。在另一个实施方案中,本发明的Fc包含N297Q或N297E突变。

[0456] 为了改善Fc结构域的物理稳定性,衍生自IgG1或IgG4的Fc的位置235可以被精氨酸或赖氨酸置换。在一个实施方案中,本发明的Fc包含L235K或L235R。在另一个实施方案中,本发明的Fc包含L235K突变。

[0457] 此外,IgG的C-端赖氨酸在人血液中被体内切割,并且从人血液中分离出的内源性IgG含有极低水平的C-端赖氨酸。因此,位置447处的C-端赖氨酸可以被删除,例如,Fc类似物可包括des447。

[0458] 在一个实施方案中,Fc代表IgG衍生的Fc或其片段,并且本发明的Fc'多肽代表这类IgG衍生的Fc的单体或Fc片段。

[0459] 在另一个实施方案中,Fc代表IgG1或IgG4衍生的Fc或它们的片段,并且本发明的Fc'多肽代表这类IgG衍生的Fc的单体或Fc片段。

[0460] 在第三个实施方案中,Fc代表IgG1或IgG4衍生的Fc或它们的片段,其具有仅含有一个二硫键的短铰链,并且本发明的Fc'多肽代表这类IgG衍生的Fc片段的单体。

[0461] 在第四个实施方案中,Fc'单体分子或其片段经由位置229处来源于Fc铰链区中的还原二硫键的半胱氨酸残基(229C)连接至Y。

[0462] 在第五个实施方案中,Fc'代表始于位置228并且止于位置447的人IgG1衍生的Fc序列的片段,并且Fc'代表这类IgG衍生的Fc片段的单体(即hIgG1-Fc(228-447);SEQ ID

NO:1)。

[0463] 根据本发明使用的hIgG1-Fc (228-447) 多肽可含有一个或多个选自226A、227A或227G或227S、228S、234A、235K、235E、235A、237A、330S、331S、297Q、297E、N315Q、N384Q和des447的延伸和/或置换和/或缺失。

[0464] 在一个实施方案中,Fc'代表

[0465] 226A,227S hIgG1-Fc (228-447) (Fc7) ;

[0466] 226A,227S,234A,235E,237A,330S,331S hIgG1-Fc (228-447) (Fc13) ;

[0467] 226A,227S,234A,235K,237A,315Q,330S,331S,384Q hIgG1-Fc (228-447) (Fc12) ;

[0468] 226A,227S,234A,235K,237A,330S,331S hIgG1-Fc (228-447) (Fc11) ;

[0469] 226A,227S,235K,237A,330S,331S hIgG1-Fc (228-447) (Fc10) ;或

[0470] 227A,228S,235K,315Q,384Q hIgG1-Fc (228-447) (Fc4) 。

[0471] 在进一步的实施方案中,Fc'代表始于位置228并且止于位置447的人IgG4衍生的Fc序列的片段,并且Fc'代表这类IgG4衍生的Fc片段的单体(即hIgG4-Fc (228-447) ;SEQ ID NO:3) 。

[0472] 在一个实施方案中,Fc'代表始于位置228并且止于位置447的hIgG4衍生的Fc序列的片段,该序列可含有选自226A或226G、227A或227G、228P、234A、235A、235K、N297Q、N297E、315Q、384Q和des447的一个或多个延伸和/或置换。

[0473] 在一个实施方案中,Fc'代表始于位置228并且止于位置447的hIgG4衍生的Fc序列的片段,该序列可包含选自226A或226G、227A或227G、228P、234A、235A、235K、N297Q、N297E、315Q、384Q和des447的一个或多个延伸和/或置换。

[0474] 在另一个实施方案中,Fc'代表

[0475] 226G,227A hIgG4-Fc (228-447) (Fc3) ;

[0476] 227A hIgG4-Fc (228-447) (Fc1) ;

[0477] 227A,234A,235A hIgG4-Fc (228-447) (Fc6) ;

[0478] 227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) ;

[0479] 227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) ;

[0480] 227A,234A,235K,297E,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc16) ;

[0481] 227A,234A,235K,297Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc14) ;

[0482] 227A,235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc8) ;

[0483] 227A,235K,315Q,384Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc5) ;或

[0484] 227A,315Q,384Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc2) 。

[0485] 在第三个实施方案中,Fc'代表

[0486] 226A,227G,228P,234A,235K,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc17) ;

[0487] 226A,227G,234A,235K,des447 hIgG4-Fc (228-447) ;

[0488] 226G,227A hIgG4-Fc (228-447) (Fc3) ;

[0489] 227A hIgG4-Fc (228-447) (Fc1) ;

[0490] 227A,234A,235A hIgG4-Fc (228-447) (Fc6) ;

[0491] 227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) ;

[0492] 227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) ;

- [0493] 227A, 234A, 235K, 297E, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc16) ;
- [0494] 227A, 234A, 235K, 297Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc14) ;
- [0495] 227A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc8) ;
- [0496] 227A, 235K, 315Q, 384Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc5) ;或
- [0497] 227A, 315Q, 384Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc2) 。
- [0498] 在第四个实施方案中, Fc' 代表
- [0499] 227A, 234A, 235A hIgG4-Fc (228-447) (Fc6) ;或
- [0500] 227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 。
- [0501] 在第五个实施方案中, Fc' 代表
- [0502] 227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) ;
- [0503] 226A, 227G, 228P, 234A, 235K, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc17) ;或
- [0504] 227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 。
- [0505] 本发明的胰岛素-Fc缀合物
- [0506] 在进一步的实施方案中, 本发明的胰岛素-Fc缀合物选自:
- [0507] (A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;
- [0508] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^] A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;
- [0509] A14E, B(-78K[^]) B(-77P), B(-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;
- [0510] A14E, B(-76K[^]), B(-75P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;
- [0511] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;
- [0512] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^] A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;
- [0513] A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K[^], A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;
- [0514] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;
- [0515] A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A,

234A, 235K hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0516] A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K[^], A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0517] A14E, B(-76K[^]), B(-75P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0518] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0519] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0520] A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0521] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98KA99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0522] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-己酰基缀合物;

[0523] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0524] A14E, B(-76K[^]), B(-75P), B(-1) (GQAP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0525] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0526] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A122K[^], A123P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0527] A14E, A21G, A22 (G)₁₇, A40K[^], B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0528] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 3,5-双[(2-乙

酰基)氨基]苯甲酰基缀合物;

[0529] (A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K[^],A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0530] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K[^],A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]-丁酰基缀合物;和

[0531] (A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K[^],A98P,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物。

[0532] 在进一步的实施方案中,本发明的胰岛素-Fc缀合物选自:

[0533] (A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0534] (A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K[^],A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0535] (A14E,B(-78K[^])B(-77P),B(-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0536] (A14E,B(-76K[^]),B(-75P),B(-1) (GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0537] (A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K[^],A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0538] (A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K[^]A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0539] (A14E,A21G,A22 (GQEP)₆,A46K[^],A47P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0540] (A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₂,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0541] A14E,A21G,A22 (GQAPGQEP)₆,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0542] A14E,A21G,A22 (GQEP)₃,A34G,A35Q,A36E,A37K[^],A38P,B25H,B29R,desB30人胰岛

素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0543] A14E,B(-76K[^]),B(-75P),B(-1)(GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0544] A14E,A21G,A22(GQEP)₁₉,A98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0545] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K[^],A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0546] A14E,A21G,A22(GQAPGQEP)₆,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0547] A14E,A21G,A22(GQAP)₁₉,A98KA99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0548] A14E,A21G,A22(GQAP)₁₉,A98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-6-氧代-己酰基缀合物;

[0549] A14E,A21G,A22(GQEP)₁₂,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0550] A14E,B(-76K[^]),B(-75P),B(-1)(GQAP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0551] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K[^],A99P,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0552] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A122K[^],A123P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0553] A14E,A21G,A22(G)₁₈,A40K[^],B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0554] A14E,A21G,A22(GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K[^],A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物;

[0555] (A14E,A21G,A22(GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K[^],A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-

[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0556] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K[^],A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]-丁酰基缀合物;

[0557] (A14A,A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K[^],A98P,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0558] (A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K[^],A98P,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0559] (A1 (N(α) 乙酰基),A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₉,A98K[^],A99P,B1 (N(α) 乙酰基),B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0560] (A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K[^],A98P,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0561] (A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K[^],A122P,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物;

[0562] (A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K[^],A98P,B16E,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物;

[0563] (A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K[^],A98P,B16E,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0564] A14E,A21G,A22 (GQEP)₆,A46K,A47P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;和

[0565] (A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(226A,227G,228P,234A,235K,des447 IgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物。

[0566] 中间产物

[0567] [OEF-Ins]构建体

[0568] 在进一步的方面,本发明提供了用于制备本发明的胰岛素-Fc缀合物的中间体化合物。

[0569] [OEF-Ins]构建体可以通过本领域已知的方法获得,例如,如WO 2016/193380中所述。

[0570] 在一个实施方案中,根据本发明使用的中间体化合物为式II的构建体

[0571] [OEF-Ins]

[0572] 其中,

[0573] OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),与赖氨酸(K) 残基组合;并且

[0574] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物是包含A链和B链的双链胰岛素分子。

[0575] 在进一步的实施方案中,根据本发明使用的式II的中间体化合物选自以下实例。

[0576] 具有A链延伸体的胰岛素类似物

[0577] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K,A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-1);

[0578] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆,A94G,A95Q,A96A,A97P,A98K,A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-3);

[0579] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K,A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-5);

[0580] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₂,A70K,A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-6);

[0581] A14E,A21G,A22 (GQEP)₆,A46K,A47P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-7);

[0582] A14E,A21G,A22 (GQEP)₃-GQE-KP,A38K,A39P,B25H,B29R,desB30人胰岛素;

[0583] A14E,A21G,A22 (GQAPGQEP)₆,A70K,A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-9);

[0584] A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₉,A98K,A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-13);

[0585] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆,A94G,A95Q,A96A,A97P,A98K,A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-14);

[0586] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆,A118G,A119Q,A120A,A121P,A122K,A123P,B25H,B29R,desB30人胰岛素;

[0587] A14A,A21G,A22 (GQAP)₁₈-GQAKP,B29R,desB30 (OEF-Ins-16);

[0588] A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₈-GQAKP,B29R,desB30 (OEF-Ins-17);

[0589] A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₈-GQAKP,B25H,B29R,desB30 (OEF-Ins-18);

[0590] A14E,A21G,A22 (G)₁₇,A40K,B25H,B29R,desB30人胰岛素;和

[0591] A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄-GQAKP,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-20)。

[0592] 具有A链延伸体的胰岛素类似物

[0593] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K,A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-1);

[0594] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆,A94G,A95Q,A96A,A97P,A98K,A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-3);

[0595] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K,A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-5);

[0596] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₂,A70K,A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-6);

[0597] A14E,A21G,A22 (GQEP)₆,A46K,A47P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-7);

[0598] A14E,A21G,A22 (GQEP)₃-GQE-KP,A38K,A39P,B25H,B29R,desB30人胰岛素;

[0599] A14E,A21G,A22 (GQAPGQEP)₆,A70K,A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-9);

[0600] A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₉,A98K,A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-13);

[0601] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆,A94G,A95Q,A96A,A97P,A98K,A99P,B25H,B29R,

desB30人胰岛素 (OEF-Ins-14) ;

[0602] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆, A118G, A119Q, A120A, A121P, A122K, A123P, B25H, B29R, desB30人胰岛素;

[0603] A14A, A21G, A22 (GQAP)₁₈-GQAKP, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-16) ;

[0604] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈-GQAKP, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-17) ;

[0605] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈-GQAKP, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-18) ;

[0606] A14E, A21Q, A22 (G)₁₈, A40K, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-19) ;

[0607] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄-GQAKP, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-20) ;

[0608] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K, A122P, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-21) ;

[0609] A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K, A98P, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-22) ;

[0610] A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K, A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-23) 。

[0611] 具有B链延伸体的胰岛素类似物

[0612] A14E, B(-78K), B(-77P), B(-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-2) ;

[0613] A14E, B(-78K), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-4) ;

[0614] A14E, B(-26K), B(-25P), B(-1) (GQEP)₆, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-10) ;

[0615] A14E, B(-18K), B(-17P), B(-1) (GQEP)₄, B25H, B29R, desB30人胰岛素; 和

[0616] A14E, B(-78K), B(-77P), B(-1) (GQAP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-12) 。

[0617] Fc片段

[0618] 本发明的胰岛素-Fc缀合物涉及使用经由连接体与胰岛素共价连接的两个单体Fc多肽。

[0619] 另一方面, 本发明提供了在制备本发明的胰岛素-Fc缀合物中用作中间体化合物的Fc'多肽。

[0620] 在一个实施方案中, 根据本发明使用的Fc'多肽为含有一个或多个选自226A、227A或227S、228S、234A、235A或235E或235K、237A或297Q、297E、N315Q、330S、331S、N384Q和des447的延伸和/或置换和/或缺失的hIgG1-Fc (228-447) 多肽。

[0621] 在另一个实施方案中, 根据本发明使用的Fc'多肽为含有一个或多个选自226A、227A或227G或227S、228S、234A、235A或235E或235K、237A或297Q、297E、N315Q、330S、331S、N384Q和des447的延伸和/或置换和/或缺失的hIgG1-Fc (228-447) 多肽。

[0622] 在另一个实施方案中, Fc'代表:

[0623] 226A, 227S hIgG1-Fc (228-447) (Fc7) ;

[0624] 226A, 227S, 234A, 235E, 237A, 330S, 331S hIgG1-Fc (228-447) (Fc13) ;

[0625] 226A, 227S, 234A, 235K, 237A, 315Q, 330S, 331S, 384Q hIgG1-Fc (228-447) (Fc12) ;

- [0626] 226A, 227S, 234A, 235K, 237A, 330S, 331S hIgG1-Fc (228-447) (Fc11) ;
- [0627] 226A, 227S, 235K, 237A, 330S, 331S hIgG1-Fc (228-447) (Fc10) ;或
- [0628] 227A, 228S, 235K, 315Q, 384Q hIgG1-Fc (228-447) (Fc4) 。
- [0629] 在进一步的实施方案中,根据本发明使用的Fc'多肽为始于位置228并且止于位置446的hIgG2衍生的Fc序列的片段,该序列含有一个或多个选自227A、L234A、235K和377A的延伸和/或置换。
- [0630] 在进一步的实施方案中,根据本发明使用的Fc'多肽为始于位置228并且止于位置447的hIgG4衍生的Fc序列的片段,该序列含有一个或多个选自226G、227A、234A、235A或235K、N297E或N297Q、315Q、384Q和des447的延伸和/或置换。
- [0631] 在进一步的实施方案中,根据本发明使用的Fc'多肽为始于位置228并且止于位置447的hIgG4衍生的Fc序列的片段,该序列含有一个或多个选自226A或226G、227A或227G、228P、234A、235A或235K、N297E或N297Q、315Q、384Q和des447的延伸和/或置换。
- [0632] 在一个实施方案中,Fc'代表
- [0633] 226G, 227A hIgG4-Fc (228-447) (Fc3) ;
- [0634] 227A hIgG4-Fc (228-447) (Fc1) ;
- [0635] 227A, 234A, 235A hIgG4-Fc (228-447) (Fc6) ;
- [0636] 227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) ;
- [0637] 227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) ;
- [0638] 227A, 234A, 235K, 297E, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc16) ;
- [0639] 227A, 234A, 235K, 297Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc14) ;
- [0640] 227A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc8) ;
- [0641] 227A, 235K, 315Q, 384Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc5) ;或
- [0642] 227A, 315Q, 384Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc2) 。
- [0643] 在另一个实施方案中,Fc'代表
- [0644] 226A, 227G, 228P, 234A, 235K, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc17) ;
- [0645] 226A, 227G, 234A, 235K, des447 hIgG4-Fc (228-447) ;
- [0646] 226G, 227A hIgG4-Fc (228-447) (Fc3) ;
- [0647] 227A hIgG4-Fc (228-447) (Fc1) ;
- [0648] 227A, 234A, 235A hIgG4-Fc (228-447) (Fc6) ;
- [0649] 227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) ;
- [0650] 227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) ;
- [0651] 227A, 234A, 235K, 297E, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc16) ;
- [0652] 227A, 234A, 235K, 297Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc14) ;
- [0653] 227A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc8) ;
- [0654] 227A, 235K, 315Q, 384Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc5) ;或
- [0655] 227A, 315Q, 384Q hIgG4-Fc (228-447) (Fc2) 。
- [0656] 连接基团
- [0657] 另一方面,本发明提供了用于制备本发明的胰岛素-Fc缀合物的中间体化合物。
- [0658] 更具体地,提供了三触角连接体,其中第一个末端能够与式I胰岛素组分(Ins)的

赖氨酸残基的 ϵ 氨基形成稳定的共价键,并且该末端不受巯基或不受蛋白质内其它任何残基的影响。

[0659] 连接体的第二和第三末端是相同的,并且能够与式I的Fc'组分的巯基部分(即-SH)形成稳定的共价键(称为“Cys反应性末端-us/-i”)。在第一次缀合事件发生(即第一末端与赖氨酸缀合)后,该Cys-反应性末端-us/i可直接反应(使用例如溴乙酰胺或碘乙酰胺、Michael受体等),或者可适合于化学转化,这样将使它们对第二蛋白质的巯基具有反应性(例如将氯乙酰胺变为碘乙酰胺),从而以顺序的两步方式提供所需的式I胰岛素-Fc缀合物。

[0660] 本发明连接体的具体设计(含有两个反应性末端,每个反应性末端包含Sp²杂化碳 **C** 原子、CH₂基团和卤素(Hlg)原子(表示为(**C=O**)-CH₂-Hlg))特别适合缀合Fc片段的链间二硫键,因为这些可以容易地且选择性地还原为游离巯基而不干扰其它链内二硫键。

[0661] 本发明的中间产物代表三触角连接体,该连接体允许通过异官能连接体的有效的蛋白质-蛋白质缀合。通过使用不同的离去基团,可以控制反应物的连接,并且该中间体在合成方法中特别有用,以便以有序的方式将两个或更多个蛋白质共价连接,从而确保不同的蛋白质可以在连接体的每一端连接。

[0662] 在一个实施方案中,根据本发明使用的中间体化合物可以由通式V来表征:

[0663] $M-X-Y(-LG)_2$

[0664] 其中

[0665] M(也可称为Lys反应性末端)代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

[0666] X不存在(即代表共价键),或者X代表如以上针对式I所定义的二价连接基团;

[0667] Y代表如以上针对式I所定义的中央三价连接单元;并且

[0668] LG(也可称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

[0669] 在另一个实施方案中,根据本发明使用的中间体化合物可以由通式V'来表征:

[0670] $M-X-U(-Z-LG)_2$

[0671] 其中

[0672] M(也可称为Lys反应性末端)代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

[0673] X不存在(即代表共价键),或者X代表如以上针对式I'所定义的二价连接基团;

[0674] U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元;

[0675] Z代表将中央连接单元(U)连接至离去基团(LG)的二价连接基团;并且

[0676] LG(也可称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

[0677] 在本发明的背景下,M代表对伯氨基具有反应性的离去基团,例如常用的活性酯的离去基团。这类离去基团包括在肽合成中常规使用的活性酯,包括但不限于:N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯、磺基-NHS酯、五氟苯酚(PFP)酯、对硝基苯酚(PNP)酯、羟基苯并三唑(HOBt)酯和(羟基亚氨基)氰基乙酸乙酯(Oxyma)。

[0678] 在一个实施方案中,“Lys反应性末端”(M)由琥珀酰亚胺酯(OSu酯)活化的羧酸部分代表,而“Cys反应性末端”(LG)₂由2x碘乙酰胺、2x溴乙酰胺或2x氯乙酰胺代表。在位于胰岛素延伸体的末端部分(即第一蛋白质)中的Lys的N- ϵ 与OSu酯反应并适当纯化后,所得的缀合物与Fc片段(即第二和第三蛋白质)的巯基(在链间二硫键还原后直接形成,或者在氯乙酰胺的情况下,在暴露于高浓度的碘离子后形成)反应,引起所谓的“Finkelstein反应”,

该反应导致氯交换为碘,从而产生2x碘乙酰胺部分。最终结果为在两个感兴趣的蛋白质之间形成共价的位点特异性缀合物,即式I的胰岛素-Fc缀合物。

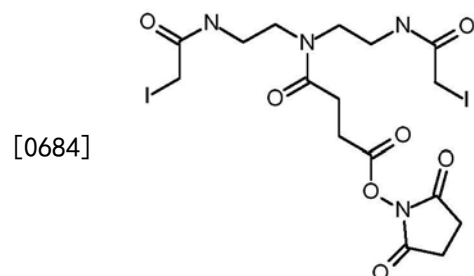
[0679] 在另一个实施方案中,中间产物为式V化合物,其中M代表对Lys具有反应性的离去基团。

[0680] 在第三个实施方案中,M代表HOSu (N-琥珀酰亚胺基氧基或2,5-二氧代吡咯烷-1-基-氧基)、HOAt、HOBt、苯并三唑等常用的活性酯的离去基团。

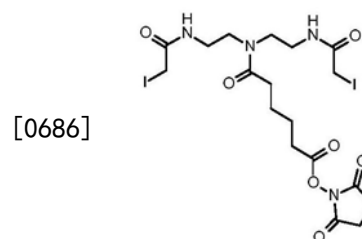
[0681] 在一个实施方案中,中间产物为式V化合物,其中巯基反应性基团(LG)代表选自氯、溴或碘的卤素原子;吡啶基二硫化物;甲氧羰基二硫化物或乙氧羰基二硫化物;或邻硝基苯基二硫化物。

[0682] 在另一个实施方案中,LG代表巯基反应性基团,选自氯、溴和碘的卤素原子。

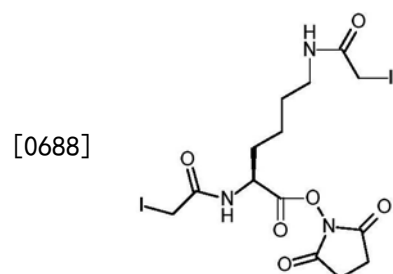
[0683] 在第三个实施方案中,中间产物是本发明的式V化合物,其为(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酸酯(如化学式6所示,参见实施例3.1):



[0685] 在第四个实施方案中,中间产物是本发明的式V化合物,其为(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-6-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-6-氧代-己酸酯(如化学式7所示,参见实施例3.2):

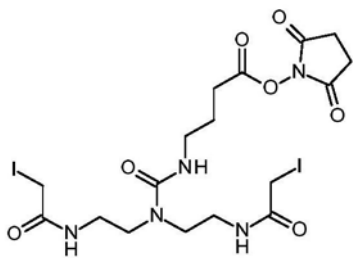


[0687] 在第五个实施方案中,中间产物是本发明的式V'化合物,其为(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-(2S)-2,6-双[(2-碘乙酰基)氨基]-己酸酯(如化学式8所示,参见实施例3.3):



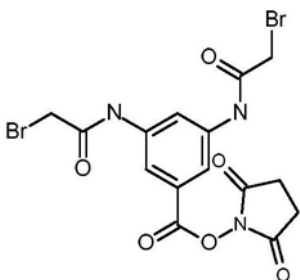
[0689] 在第五个实施方案中,中间产物是本发明的式V化合物,其为4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酸(如化学式9所示,参见实施例3.4):

[0690]



[0691] 在第六个实施方案中,中间产物是本发明的式V'化合物,其为(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯(如化学式10所示,参见实施例3.5):

[0692]



[0693] 在另一个实施方案中,根据本发明的中间体化合物是由通式VI表征的化合物:

[0694] [OEF-Ins]-X-Y(-LG)₂

[0695] 其中,

[0696] OEF如以上针对式I所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala(A)、Asp(D)、Glu(E)、Gly(G)、Pro(P)、Gln(Q)、Ser(S)和Thr(T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0697] 该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I所定义,并经由赖氨酸(K)残基连接至二价连接基团X;或者更具体地,该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I所定义,并经由赖氨酸(K)残基的ε-氨基连接至二价连接基团X;

[0698] X代表如以上针对式I所定义的二价连接基团;

[0699] Y代表如以上针对式I所定义的中央三价连接单元;

[0700] 或者X代表共价键,并且Y代表将两个离去基团(LG)₂连接至[OEF-Ins]的中央三价连接单元;并且

[0701] LG代表巯基反应性基团的离去基团。

[0702] 在另一个实施方案中,根据本发明的中间体化合物是由通式VI'表征的化合物:

[0703] [OEF-Ins]-X-U(-Z-LG)₂

[0704] 其中,

[0705] OEF如以上针对式I'所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala(A)、Asp(D)、Glu(E)、Gly(G)、Pro(P)、Gln(Q)、Ser(S)和Thr(T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0706] 该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I'所定义,并且经由赖氨酸(K)残基连接至二价连接基团X;或者更具体地,该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I'所定义,并且经由赖氨酸(K)残基的ε-氨基连接至二价连接基团X;

[0707] X代表如以上针对式I'所定义的二价连接基团;并且U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元,其将两个二价连接基团(Z)连接至X;或者

[0708] X代表共价键;并且U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元,其将两个二价连接基团(Z)连接至[OEF-Ins]构建体;并且

[0709] LG代表巯基反应性基团的离去基团。

[0710] 在一个实施方案中,中间产物是本发明的式VI化合物,其选自:

[0711] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.1);

[0712] A14E, B(-78K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.2);

[0713] A14E, B(-78K (4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基))), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.3);

[0714] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.4);

[0715] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.5);

[0716] A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.6);

[0717] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.7);

[0718] A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.8);

[0719] A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.9);

[0720] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.10);

[0721] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-己酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.11);

[0722] A14E, B(-78K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-己酰基)), B(-77P), B(-1) (GQAP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.12);

[0723] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.13);

[0724] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A122K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A123P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.14);

[0725] A14E, A21Q, A22 (G)₁₇, A40K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.15);

[0726] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118GA, 119Q, A120A, A121K (N(ε) -3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.16);

[0727] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118GA, 119Q, A120A, A121K (N(ε) -4-[双[(2-乙酰基)氨

基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.17);

[0728] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[2-(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酰基, A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.18); 和

[0729] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-己酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.19)。

[0730] 在另一个实施方案中, 中间产物是本发明的式VI化合物, 其选自

[0731] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.1);

[0732] A14E, B(-78K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.2);

[0733] A14E, B(-78K (4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.3);

[0734] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.4);

[0735] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.5);

[0736] A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.6);

[0737] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.7);

[0738] A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.8);

[0739] A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.9);

[0740] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.10);

[0741] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-己酰基, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.11);

[0742] A14E, B(-78K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-己酰基), B(-77P), B(-1) (GQAP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.12);

[0743] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.13);

[0744] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A122K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A123P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.14);

[0745] A14E, A21Q, A22 (G)₁₈, A40K (N(ε) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.15);

[0746] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K (N(ε) -3, 5-双[2-(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.16);

[0747] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K (N(ε)-4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.17);

[0748] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.18); 和

[0749] A14A, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-己酰基, A98P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.19);

[0750] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.20);

[0751] A1 (N(α) 乙酰基), A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B1 (N(α) 乙酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.21);

[0752] A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.22);

[0753] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K (N(ε) -3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A122P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.23);

[0754] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) -3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A98P, B16E, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.24);

[0755] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B61E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.25);

[0756] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) -3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.26)。

[0757] 在又一个实施方案中,中间产物是本发明的式VI' 化合物,其选自

[0758] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.1);

[0759] A14E, B(-78K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), B(-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.2);

[0760] A14E, B(-78K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.3);

[0761] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.4);

[0762] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.5);

[0763] A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.6);

[0764] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.7);

[0765] A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]

基]-4-氧代-丁酰基), A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.8);

[0766] A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.9);

[0767] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.10);

[0768] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 6-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-6-氧代-己酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.11);

[0769] A14E, B(-78K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), B(-1) (GQAP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.12);

[0770] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.13);

[0771] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A122K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A123P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.14);

[0772] A14E, A21Q, A22 (G)₁₈, A40K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.15);

[0773] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K (N(ε) -3, 5-双[(2-溴乙酰基) 氨基]苯甲酰基), A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.16);

[0774] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.17);

[0775] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.18);

[0776] A14A, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.19);

[0777] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.20);

[0778] A1 (N(α) 乙酰基), A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B1 (N(α) 乙酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.21);

[0779] A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.22);

[0780] A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K (N(ε) -3, 5-双[(2-溴乙酰基) 氨基]苯甲酰基), A122P, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.23);

[0781] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) -3, 5-双[(2-溴乙酰基) 氨基]苯甲酰基), A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例4.24);

[0782] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (参见实施例

4.25) ; 和

[0783] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素(参见实施例4.26)。

[0784] 中间产物的制备方法

[0785] 根据所讨论的胰岛素类似物和待使用的单个连接体,可以应用各种合成方法。根据本发明使用的连接体可以通过标准技术产生,例如,如以下工作实施例所述。

[0786] 可以分别制备并纯化待缀合的蛋白质和连接体。

[0787] 在一个方面,本发明可被认为涉及两个蛋白质的缀合,并且通过使用具有不同反应性末端的连接体来完成顺序反应。

[0788] 在另一个实施方案中,连接体的一个末端为伯氨基反应性基团,而另一个末端具有两个巯基反应性基团。

[0789] 在第三个实施方案中,胰岛素的伯氨基与连接体反应,随后与具有两个游离半胱氨酸的Fc反应。

[0790] 在进一步的实施方案中,Fc通过均来源于还原二硫键的两个硫原子连接。

[0791] 胰岛素-Fc缀合物的制备方法

[0792] 另一方面,本发明提供了制备本发明的胰岛素-Fc缀合物的方法。

[0793] 本发明的方法包括如下(连续的)步骤:

[0794] A) 制备式V的中间体化合物M-X-Y(-LG)₂;或式V'的中间体化合物M-X-U(-Z-LG)₂;

[0795] B) 将[OEF-Ins]构建体偶联至式V的中间体化合物M-X-Y(-LG)₂,或偶联至式V'的中间体化合物M-X-U(-Z-LG)₂,以获得式VI的中间体化合物[OEF-Ins]-X-Y(-LG)₂,或获得式VI'的中间体化合物[OEF-Ins]-X-U(-Z-LG)₂;

[0796] C) 还原Fc的链间二硫键以获得两个Fc',它们各自保持游离的半胱氨酸;以及

[0797] D) 将两个Fc'偶联至式VI的[OEF-Ins]-X-Y(-LG)₂,或偶联至式VI'的[OEF-Ins]-X-U(-Z-LG)₂,以获得式I或式I'的胰岛素-Fc缀合物。

[0798] 通常,分别产生单个组分,即胰岛素组分、OEF-Ins组分、Fc组分和连接体,并在合适的反应条件下将它们偶联在一起。

[0799] 并入根据本发明的胰岛素-Fc缀合物中的胰岛素组分可以通过制备胰岛素、胰岛素类似物和胰岛素衍生物的常规方法获得,例如,如WO 2008/034881或WO 2016/193380中所概述的。

[0800] 可以从分离自人类和其它动物的全长抗体获得Fc结构域,或者可以重组产生以及从经转化的哺乳动物细胞或微生物中获得Fc结构域。在本领域中已知多种获得Fc结构域的技术。

[0801] 可以通过用蛋白水解酶如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化由全长抗体产生Fc结构域。可使用亲和色谱法和DEAE阴离子交换色谱法分离得到的Fab和F(ab')₂与Fc结构域。基于SEC-HPLC分析,可以确定Fc片段的纯度。

[0802] 当使用重组方法时,可以表达所需的多肽并随后纯化Fc结构域。在一个实施方案中,Fc结构域为人来源的Fc结构域,如从经转化的微生物或哺乳动物细胞中获得的人IgG Fc结构域。

[0803] 此外,本发明的Fc片段可以是具有天然糖链、与天然形式相比增加的糖链或与天

然形式相比减少的糖链的形式,或者可以是无糖基化形式。Fc片段的糖链的增加、减少或去除可通过本领域已知的方法如化学法或酶法来实现。另外,在天然糖基化位点位置297的天冬酰胺可以通过分子工程化突变为例如丙氨酸。在重组DNA技术方法是使用微生物大肠杆菌的情况下,所产生的Fc将是无糖基化的。

[0804] 当至少一个待缀合的蛋白质包含游离半胱氨酸时,本文所述的方法适合于制备蛋白质缀合物。游离半胱氨酸(Cys)是可用于经由巯基反应性连接而缀合的半胱氨酸残基。游离Cys通常是不参与蛋白质内二硫键的半胱氨酸残基。游离半胱氨酸常常需要在缀合反应之前释放,因为具有游离Cys的蛋白质可与其它硫分子形成混合二硫化物,所述其它硫分子通常是在蛋白质产生和纯化时存在于细胞提取物中的有机小分子。

[0805] 还可以通过使用还原剂还原现有的二硫键来产生游离半胱氨酸,这将获得两个可用的游离半胱氨酸,所使用的还原剂包括三烷基膦,如TCEP、BSPP等,或硫醇,如DTT、巯基乙醇等。

[0806] 在一个实施方案中,可以通过还原包含二硫键(邻接Fc结构域的两个单体多肽(Fc'))的Fc结构域来生成两个等同的半胱氨酸。

[0807] 在进一步的实施方案中,Fc结构域在Fc结构域的铰链区中(例如在IgG1-Fc'或IgG4-Fc'片段的位置229)包含单个链间二硫键。可使用本文所述方法将这样的片段与三价连接体的两个臂(如式IV中的*所示)连接。所得到的蛋白质缀合物(或缀合物中间体)将具有与Fc结构域(Fc')的双官能(通常但不一定是对称的)连接,以及与胰岛素组分[OEF-Ins]缀合的第三臂。

[0808] 如本文所述,连接体经由赖氨酸的 ϵ 氨基与胰岛素类似物共价结合。赖氨酸通常富含于蛋白质中,因此不适合选择性缀合。然而,根据本发明使用的胰岛素类似物仅具有一个赖氨酸残基。

[0809] 在一个实施方案中,使用位于A链延伸体的C-端序列Lys-Pro (KP)末端的赖氨酸残基作为缀合位点。

[0810] 在另一个实施方案中,使用位于B链N-端延伸体的N-端赖氨酸残基作为缀合位点。

[0811] 药物组合物

[0812] 本发明涉及可用作药物并且特别用于治疗、预防或缓解代谢疾病或病症或病况的胰岛素-Fc缀合物。

[0813] 包含本发明胰岛素-Fc缀合物或其药学上可接受的盐、酰胺或酯和药学上可接受的辅料的药物组合物可以根据本领域已知的方法来制备。

[0814] 因此,在另一方面,本发明提供了新型药物组合物,其包含治疗有效量的本发明的胰岛素-Fc缀合物,以及可选的一种或多种佐剂、赋形剂、载体和/或稀释剂。

[0815] 术语“辅料”宽泛地指除活性治疗成分以外的任何组分。辅料可以是惰性物质、无活性物质和/或非医药活性物质。

[0816] 可注射组合物可以通过使用常规技术来制备,该常规技术通常包括视情况溶解并混合所述成分以得到所需的最终产物,根据需要添加等渗剂、防腐剂和/或缓冲液,并且例如根据需要使用酸如盐酸或碱如氢氧化钠水溶液来调节该溶液的pH值。最后,可以用水调节该溶液的体积以得到所需浓度的成分。

[0817] 组合物可以是稳定化的制剂。术语“稳定化的制剂”是指具有提高的物理和/或化

学稳定性(优选两者兼具)的制剂。通常,制剂在使用和储存(按照推荐的使用和储存条件)期间必须是稳定的,直到达到失效日期。

[0818] 可以通过将本发明的胰岛素-Fc缀合物溶解在水性介质中来制备溶液或悬浮液。

[0819] 在一个实施方案中,所述胰岛素-Fc缀合物以约600至约4200nmol/ml范围内的浓度存在。在另一个实施方案中,所述胰岛素-Fc缀合物以约600至约3600nmol/ml范围内的浓度存在。在第三个实施方案中,所述胰岛素-Fc缀合物以约600至约3000nmol/ml范围内的浓度存在。

[0820] 在另一个实施方案中,所述胰岛素-Fc缀合物以约100至约4200nmol/ml范围内的浓度存在。在另一个实施方案中,所述胰岛素-Fc缀合物以约100至约600nmol/ml范围内的浓度存在。在第三个实施方案中,所述胰岛素-Fc缀合物以约200至约600nmol/ml范围内的浓度存在。

[0821] 在进一步的实施方案中,本发明的药物组合物用于在至少3个月、至少6个月或至少1年的时间段内以频率低于每日一次的间隔时间(即,长于24小时的间隔时间)施用于有需要的受试者。

[0822] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物用于以平均每2日一次至平均每11日一次的频率施用于受试者。

[0823] 在另一个实施方案中,本发明的药物组合物用于以平均每3日一次至平均每10日一次的频率施用于受试者。

[0824] 在第三个实施方案中,本发明的药物组合物用于以平均每4日一次至平均每9日一次的频率施用于受试者。

[0825] 在第四个实施方案中,本发明的药物组合物用于以平均每5日一次至平均每8日一次的频率施用于受试者。

[0826] 在第五个实施方案中,本发明的药物组合物用于以平均每6日一次至平均每7日一次的频率施用于受试者。

[0827] 在第六个实施方案中,本发明的药物组合物用于在至少3个月、至少6个月或至少1年的时间段内平均每周一次(即每7天一次)施用于受试者。

[0828] 治疗方法

[0829] 本发明涉及用于治疗用途的药物。更具体地,本发明涉及本发明的胰岛素-Fc缀合物在治疗或预防包括人在内的活动物体的代谢疾病或病症或病况中的用途,该方法包括向有需要的此类活动物体施用治疗有效量的根据本发明的胰岛素-Fc缀合物的步骤。

[0830] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗或减轻与糖尿病有关的医学状况的方法。

[0831] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于治疗或减轻包括人在内的活动物体的疾病或病症或病况的方法,该疾病、病症或病况可以选自与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症、代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)、高血压、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗死、中风、心血管疾病、冠心病、炎性肠综合征、消化不良或胃溃疡有关的疾病、病症或病况,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的胰岛素-Fc缀合物的步骤。

[0832] 在第三个实施方案中,本发明提供了用于治疗或减轻包括人在内的活动物体的疾病或病症或病况的方法,该疾病、病症或病况可以选自与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡

葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症、代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)、高血压、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗死、中风、心血管疾病、冠心病、炎性肠综合征、消化不良或胃溃疡有关的疾病、病症或病况,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的胰岛素-Fc缀合物。

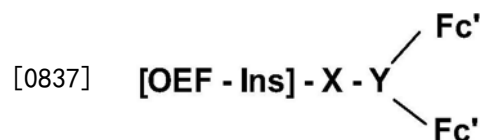
[0833] 在第四个实施方案中,本发明提供了用于治疗或减轻包括人在内的活动物体的疾病或病症或病况的方法,该疾病、病症或病况可以选自与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症或代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)有关的疾病、病症或病况。

[0834] 在第五个实施方案中,本发明提供了用于治疗或减轻包括人在内的活动物体的疾病或病症或病况的方法,该疾病、病症或病况可以选自与糖尿病,特别是与1型糖尿病或2型糖尿病有关的疾病、病症或病况。

具体实施方案

[0835] 通过本发明的以下非限制性实施方案进一步描述本发明:

[0836] 1. 由式I表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物:



[0838] 其中,

[0839] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物为包含A链和B链的双链胰岛素分子;

[0840] OEF表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体。

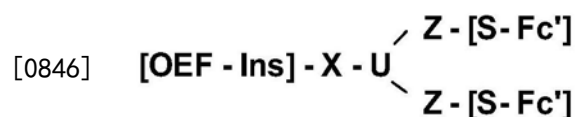
[0841] [OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K)残基连接至三价连接基团X-Y;

[0842] X代表连接[OEF-Ins]与Y的共价键或二价连接基团;

[0843] Y代表三价连接基团,其经由源自Fc的二硫键的两个硫原子将两个Fc'连接至X;或者,在X代表共价键的情况下,Y经由两个硫原子将两个Fc'连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基;并且

[0844] Fc'代表单体Fc多肽或其片段。

[0845] 2. 由式I'表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物:



[0847] 其中

[0848] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物是包含A链和B链的双链胰岛素分子;

[0849] OEF表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0850] 该[OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K)残基连接至三价连接基团X-U(-Z)₂;

[0851] X代表连接[OEF-Ins]与U的共价键或二价连接基团；

[0852] U代表中央三价连接单元，其将两个Z-[S-Fc']基团连接至X；或者，在X代表共价键的情况下，U将两个Z-[S-Fc']基团连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基；

[0853] Z代表将中央连接单元(U)连接至单体Fc多肽(Fc')或其片段的巯基部分(S)的二价连接基团；并且

[0854] [S-Fc']代表源自包含在Fc'组分内的半胱氨酸(C)残基的硫原子。

[0855] 3.实施方案1或实施方案2的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物，其中

[0856] Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物：A14E、A21G或A21Q、B3E或B3Q、B16E或B16H、B25H、desB27或desB29、B29R和/或desB30。

[0857] 4.实施方案1或实施方案2的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物，其中

[0858] 所述极性重组OEF延伸体由选自以下的连续氨基酸残基代表：

[0859] A) 聚甘氨酸序列(Gly)_x(A组)，其中x代表2至约102范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0860] B) [A、G和Q]_x组(B组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约30范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0861] C) [A、P和S]_x组(C组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约30范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0862] D) [E、G和Q]_x组(D组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约30范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0863] E) [A、G、P和Q]_x组(E组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约25范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0864] F) [A、G、P和S]_x组(F组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约25范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0865] G) [E、G、P和Q]_x组(G组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约25范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0866] H) [E、G、P和S]_x组(H组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约25范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0867] I) [A、E、G、P和Q]_x组(I组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约20范围内的整数，并且如上所述，与K或KP组合；

[0868] J) [A、E、G、P、S和T]_x组(J组)，其为随机顺序或任意组合，其中x代表1至约20范围内的整数，并且如上所述，其与K或KP组合；

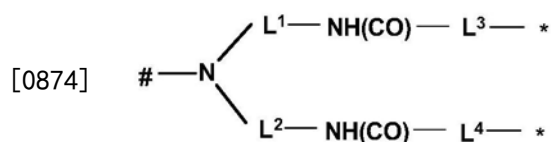
[0869] 和/或A、B、C、D、E、F、G、H、I和J组的任意组合。

[0870] 5.实施方案1或实施方案2的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物，其中X代表以下结构的二价连接体：

[0871] -C(O)-(CH₂)₁-C(O)-

[0872] 其中1代表1至20范围内的整数。

[0873] 6.实施方案1的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物，其中所述三价连接基团(Y)，或实施方案2的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物，其中所述连接基团U(-Z)₂，由式IV代表：



[0875] 其中,

[0876] N代表根据式I'的中央连接单元(U);

[0877] L₁-NH(CO)-L₃和L₂-NH(CO)-L₄分别代表根据式I'的二价连接基团(Z);

[0878] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;

[0879] #表示与X的连接点;并且

[0880] L¹和L²彼此独立地代表-(CH₂)_{m1}-;其中

[0881] m1代表1至6范围内的整数;并且

[0882] L³和L⁴彼此独立地代表-(CH₂)_{n1}-;

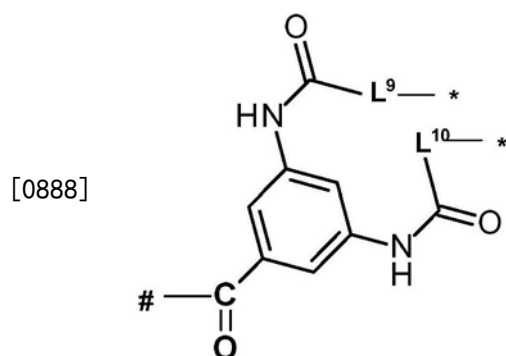
[0883] 其中n1代表1至6范围内的整数。

[0884] 7.实施方案1或实施方案2的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG4 Fc多肽的单体或其片段。

[0885] 8.实施方案7的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表包含一个或多个选自226A、227A或227S、228S、234A、235A或235E或235K、237A或297Q、297E、N315Q、330S、331S、N384Q和des447的延伸和/或置换和/或缺失的hIgG1-Fc(228-447)多肽。

[0886] 9.实施方案7的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表包含一个或多个选自226G、227A、234A、235A或235K、N297E或N297Q、315Q、384Q和des447的延伸和/或置换和/或缺失的hIgG4-Fc(228-447)多肽。

[0887] 10.实施方案2的由式I'表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中所述中央连接单元(U)代表如式VII所示的3,5-二取代的苯甲酸酯部分



[0889] 其中,

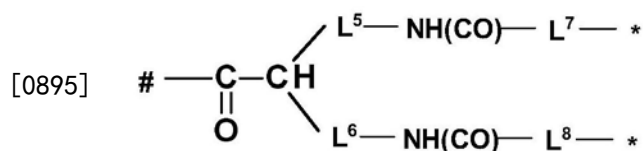
[0890] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;

[0891] #表示与X的连接点,或者,在X不存在(即代表共价键)的情况下,表示与[0EF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的伯氨基的连接点;并且

[0892] L⁹和L¹⁰彼此独立地代表-(CH₂)_{n3}-;其中

[0893] n3代表1至6范围内的整数。

[0894] 11.实施方案2的由式I'表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中X不存在(即代表共价键),并且根据式I'的U(-Z)₂由式VIII代表:



[0896] 其中,

[0897] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;

[0898] #表示与X的连接点;或者在X不存在(即代表共价键)的情况下,表示与[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的伯氨基的连接点;

[0899] L⁵和L⁶彼此独立地代表-(CH₂)_{m2}-;其中

[0900] m2代表0至6范围内的整数;并且

[0901] L⁷和L⁸彼此独立地代表-(CH₂)_{n2}-;其中n2代表1至6范围内的整数。

[0902] 12. 实施方案1或实施方案2的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其为(A14E,A21G,A22(GQEP)₁₉,A98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0903] A14E,A21G,A22(GQEP)₁₉,A98K[^]A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0904] A14E,B(-78K[^])B(-77P),B(-1)(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0905] A14E,B(-76K[^]),B(-75P),B(-1)(GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(227-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0906] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K[^],A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0907] A14E,A21G,A22(GQEP)₁₉,A98K[^]A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0908] A14E,A21G,A22(GQEP)₆,A46K[^],A47P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0909] A14E,A21G,A22(GQEP)₁₂,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0910] A14E,A21G,A22(GQAPGQEP)₆,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc(227-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0911] A14E,A21G,A22(GQEP)₃,A34G,A35Q,A36E,A37K[^],A38P,B25H,B29R,desB30人胰岛

素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0912] A14E,B(-76K[^]),B(-75P),B(-1)(GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0913] A14E,A21G,A22(GQEP)₁₉,A98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0914] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K[^],A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0915] A14E,A21G,A22(GQAPGQEP)₆,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0916] A14E,A21G,A22(GQAP)₁₉,A98KA99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0917] A14E,A21G,A22(GQAP)₁₉,A98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-己酰基缀合物;

[0918] A14E,A21G,A22(GQEP)₁₂,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0919] A14E,B(-76K[^]),B(-75P),B(-1)(GQAP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0920] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K[^],A99P,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0921] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A122K[^],A123P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0922] A14E,A21G,A22(G)₁₇,A40K[^],B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0923] A14E,A21G,A22(GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K[^],A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物;

[0924] (A14E,A21G,A22(GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K[^],A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-

[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[0925] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]-丁酰基缀合物;和

[0926] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B29R, desB30人胰岛素)/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (227-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物。

[0927] 13. 式II的中间体化合物

[0928] [OEF-Ins]

[0929] 其中,

[0930] OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体, 该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T), 其与赖氨酸(K) 残基组合;并且

[0931] Ins代表人胰岛素的类似物, 该胰岛素类似物是包含A链和B链的双链胰岛素分子。

[0932] 14. 中间体化合物, 其特征单在于是单体Fc多肽(F')或其片段, 其特征单在于是

[0933] (i) hIgG1-Fc (228-447) 多肽, 其含有一个或多个选自226A、227A或227S、228S、234A、235A或235E或235K、237A或297Q、297E、N315Q、330S、331S、N384Q和des447的延伸和/或置换和/或缺失;或

[0934] (ii) hIgG2衍生的Fc序列, 其始于位置228并且止于位置446, 该序列含有一个或多个选自227A、L234A、235K和377A的延伸和/或置换;或

[0935] (iii) hIgG4衍生的Fc序列的片段, 其始于位置228并且止于位置447, 该序列含有一个或多个选自226G、227A、234A、235A或235K、N297E或N297Q、315Q、384Q和des447的延伸和/或置换。

[0936] 15. 由通式V表征的中间体化合物

[0937] M-X-Y (-LG)₂

[0938] 其中

[0939] M(也可称为Lys反应性末端)代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

[0940] X不存在(即代表共价键), 或者X代表如以上针对式I所定义的二价连接基团;

[0941] Y代表如以上针对式I所定义的中央三价连接单元;并且

[0942] LG(也可称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

[0943] 16. 由通式V'表征的中间体化合物

[0944] M-X-U (-Z-LG)₂

[0945] 其中

[0946] M(也可称为Lys反应性末端)代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

[0947] X不存在(即代表共价键), 或者X代表如以上针对式I'所定义的二价连接基团;

[0948] U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元;

[0949] Z代表将中央连接单元(U)连接至离去基团(LG)的二价连接基团;并且

[0950] LG(也可称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

[0951] 17. 由通式VI表征的中间体化合物

[0952] [OEF-Ins]-X-Y(-LG)₂

[0953] 其中,

[0954] OEF如以上针对式I所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala(A)、Asp(D)、Glu(E)、Gly(G)、Pro(P)、Gln(Q)、Ser(S)和Thr(T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0955] 该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I所定义,并经由赖氨酸(K)残基连接至二价连接基团X;

[0956] X代表如以上针对式I所定义的二价连接基团;并且Y代表如以上针对式I所定义的中央三价连接单元;或者

[0957] X代表共价键;并且Y代表将两个离去基团(LG)₂连接至[OEF-Ins]的中央三价连接单元;并且

[0958] LG代表巯基反应性基团的离去基团。

[0959] 18.由通式VI'表征的中间体化合物

[0960] [OEF-Ins]-X-U(-Z-LG)₂

[0961] 其中,

[0962] OEF如以上针对式I'所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala(A)、Asp(D)、Glu(E)、Gly(G)、Pro(P)、Gln(Q)、Ser(S)和Thr(T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0963] 该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I'所定义,并且经由赖氨酸(K)残基连接至二价连接基团X;

[0964] X代表如以上针对式I'所定义的二价连接基团;并且U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元,其将两个二价连接基团(Z)连接至X;或者

[0965] X代表共价键;并且U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元,其将两个二价连接基团(Z)连接至[OEF-Ins]构建体;并且

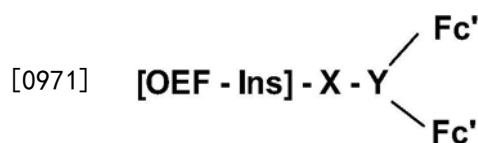
[0966] LG代表巯基反应性基团的离去基团。

[0967] 19.药物组合物,其包含实施方案1-12中任一项的胰岛素-Fc缀合物以及一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。

[0968] 20.治疗、预防或减轻包括人在内的活动物体的代谢疾病或病症或病况的方法,该方法包括向有需要的这类活动物体施用治疗有效量的实施方案1-12中任一项的胰岛素-Fc缀合物的步骤。

[0969] 本发明更进一步地由本发明的以下非限制性实施方案来描述。

[0970] 1.由式I表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物:



[0972] 其中,

[0973] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物为包含A链和B链的双链胰岛素分子;

[0974] OEF表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K) 残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体。

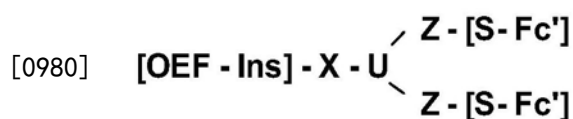
[0975] 该[OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K) 残基的ε氨基连接至三价连接基团X-Y;

[0976] X代表连接[OEF-Ins]与Y的共价键或二价连接基团;

[0977] Y代表三价连接基团,其经由源自Fc的二硫键的两个硫原子将两个Fc'连接至X;或者,在X代表共价键的情况下,Y经由两个硫原子将两个Fc'连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基;并且

[0978] Fc'代表单体Fc多肽或其片段。

[0979] 2.由式I'表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物:



[0981] 其中

[0982] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物是包含A链和B链的双链胰岛素分子;

[0983] OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K) 残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[0984] 该[OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K) 残基的ε氨基连接至三价连接基团X-U(-Z)₂;

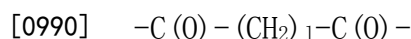
[0985] X代表连接[OEF-Ins]与U的共价键或二价连接基团;

[0986] U代表中央三价连接单元,其将两个Z-[S-Fc']基团连接至X;或者,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc']基团连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基;

[0987] Z代表将中央连接单元(U)连接至单体Fc多肽(Fc')或其片段的巯基部分(S)的二价连接基团;并且

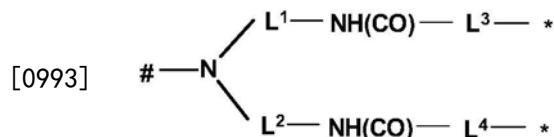
[0988] [S-Fc']代表源自包含在Fc'组分内的半胱氨酸(C) 残基的硫原子。

[0989] 3.实施方案1或实施方案2的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中X代表以下结构的二价连接体:



[0991] 其中1代表1至20范围内的整数。

[0992] 4.实施方案1的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中所述三价连接基团(Y)由式IV代表:



[0994] 其中,

[0995] *表示与源自Fc的还原二硫键(即根据式I的[Fc']部分)的硫原子的连接点;

[0996] #表示与X的连接点;并且

[0997] L¹和L²彼此独立地代表-(CH₂)_{m1}-;其中

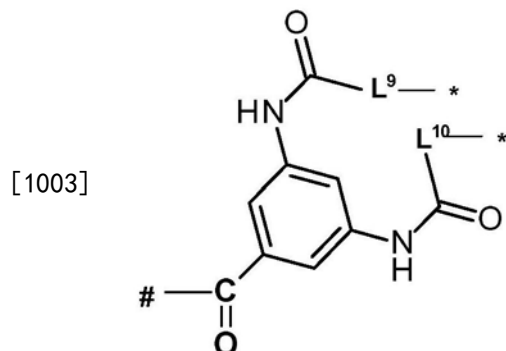
[0998] m1代表1至6范围内的整数;并且

[0999] L^3 和 L^4 彼此独立地代表 $-(CH_2)_{n1}-$;

[1000] 其中 $n1$ 代表1至6范围内的整数。

[1001] 5.实施方案1或实施方案2的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG4 Fc多肽的单体或其片段。

[1002] 6.实施方案2的由式I'表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中X代表共价键,并且其中中央连接单元(U)代表如式VII所示的3,5-二取代的苯甲酰基部分:



[1004] 其中

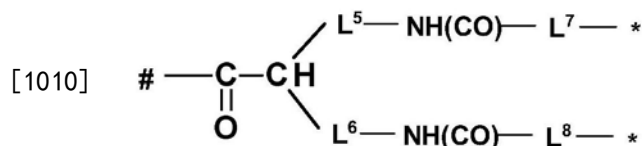
[1005] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;

[1006] #表示与[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的 ϵ 氨基的连接点;并且

[1007] L^9 和 L^{10} 彼此独立地代表 $-(CH_2)_{n3}-$;其中

[1008] $n3$ 代表1至6范围内的整数。

[1009] 7.实施方案2的由式I'表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中X不存在(即代表共价键),并且根据式I'的U(-Z)₂由式VIII代表:



[1011] 其中,

[1012] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;

[1013] #表示与X的连接点;或者在X不存在(即代表共价键)的情况下,表示与[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的 ϵ 氨基的连接点;

[1014] L^5 和 L^6 彼此独立地代表 $-(CH_2)_{m2}-$;其中

[1015] $m2$ 代表0至6范围内的整数;并且

[1016] L^7 和 L^8 彼此独立地代表 $-(CH_2)_{n2}-$;其中 $n2$ 代表1至6范围内的整数。

[1017] 8.式II的中间体化合物

[1018] [OEF-Ins]

[1019] 其中,

[1020] OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala(A)、Asp(D)、Glu(E)、Gly(G)、Pro(P)、Gln(Q)、Ser(S)和Thr(T),其与赖氨酸(K)残基组合;并且

[1021] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物为包含A链和B链的双链胰岛素分子。

[1022] 9.中间体化合物,其特征是单体Fc多肽(Fc')或其片段,其特征是

[1023] (i) hIgG1-Fc (228-447) 多肽,其含有一个或多个选自226A、227A或227S、228S、234A、235A或235E或235K、237A或297Q、297E、N315Q、330S、331S、N384Q和des447的延伸和/或置换和/或缺失;或

[1024] (ii) hIgG2衍生的Fc序列,其始于位置228并且止于位置446,该序列含有一个或多个选自P227A、VL234A、2A35K和P337A的延伸和/或置换;或

[1025] (iii) hIgG4衍生的Fc序列的片段,其始于位置228并且止于位置447,该序列含有一个或多个选自226G、227A、228P、234A、235A或235K、N297E或N297Q、315Q、384Q和des447的延伸和/或置换。

[1026] 10. 由通式V表征的中间体化合物

[1027] $M-X-Y(-LG)_2$

[1028] 其中

[1029] M(也可称为Lys反应性末端)代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

[1030] X不存在(即代表共价键),或者X代表如以上针对式I所定义的二价连接基团;

[1031] Y代表如以上针对式I所定义的中央三价连接单元;并且

[1032] LG(也可称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

[1033] 11. 由通式V'表征的中间体化合物

[1034] $M-X-U(-Z-LG)_2$

[1035] 其中

[1036] M(也可称为Lys反应性末端)代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

[1037] X不存在(即代表共价键),或者X代表如以上针对式I'所定义的二价连接基团;

[1038] U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元;

[1039] Z代表将中央连接单元(U)连接至离去基团(LG)的二价连接基团;并且

[1040] LG(也可称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

[1041] 12. 由通式VI表征的中间体化合物

[1042] $[OEF-Ins]-X-Y(-LG)_2$

[1043] 其中,

[1044] OEF如以上针对式I所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala(A)、Asp(D)、Glu(E)、Gly(G)、Pro(P)、Gln(Q)、Ser(S)和Thr(T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[1045] 该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I所定义,并且经由赖氨酸(K)残基连接至二价连接基团X;

[1046] X代表如以上针对式I所定义的二价连接基团;并且Y代表如以上针对式I所定义的中央三价连接单元;或者

[1047] X代表共价键;并且Y代表将两个离去基团(LG)₂连接至[OEF-Ins]的中央三价连接单元;并且

[1048] LG代表巯基反应性基团的离去基团。

[1049] 13. 由通式VI'表征的中间体化合物

[1050] $[OEF-Ins]-X-U(-Z-LG)_2$

[1051] 其中,

[1052] OEF如以上针对式I'所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K) 残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[1053] 该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I'所定义,并且经由赖氨酸(K) 残基连接至二价连接基团X;

[1054] X代表如以上针对式I'所定义的二价连接基团;并且U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元,其将两个二价连接基团(Z) 连接至X;或者

[1055] X代表共价键;并且U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元,其将两个二价连接基团(Z) 连接至[OEF-Ins]构建体;并且

[1056] LG代表巯基反应性基团的离去基团。

[1057] 14. 药物组合物,其包含实施方案1-12中任一项的胰岛素-Fc缀合物以及一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。

[1058] 15. 治疗、预防或减轻包括人在内的活动物体的代谢疾病或病症或病况的方法,该方法包括向有需要的这类活动物体施用治疗有效量的实施方案1-12中任一项的胰岛素-Fc缀合物的步骤。

[1059] 本发明更进一步地由本发明的以下非限制性实施方案来描述。

[1060] 1. 由式I' 表示的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物:



[1062] 其中

[1063] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物为包含A链和B链的双链胰岛素分子;

[1064] OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K) 残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[1065] 该[OEF-Ins]构建体经由赖氨酸(K) 残基的 ϵ 氨基连接至三价连接基团X-U(-Z)₂;

[1066] X代表连接[OEF-Ins]与U的共价键或二价连接基团;

[1067] U代表将两个Z-[S-Fc'] 基团连接至X的中央三价连接单元;或者,在X代表共价键的情况下,U将两个Z-[S-Fc'] 基团连接至[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的 ϵ 氨基;

[1068] Z不存在或代表将中央连接单元(U) 连接至单体Fc多肽(Fc') 或其片段的巯基部分(S) 的二价连接基团;或者,在Z不存在的情况下,U直接连接至[S-Fc'];并且

[1069] [S-Fc'] 代表Fc' 组分(即单体Fc多肽或其片段),其中S代表源自包含于该Fc' 组分内的半胱氨酸(C) 残基的硫原子。

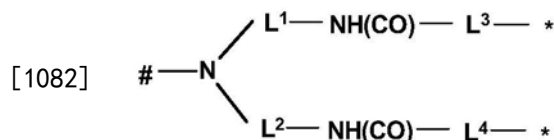
[1070] 2. 实施方案1的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中X代表

[1071] 共价键;

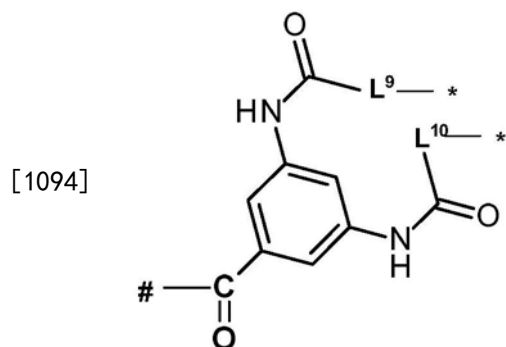
[1072] 结构-C(O)-(CH₂)₁-C(O)-的二价连接体,其中1代表1至20范围内的整数;或

[1073] 结构-C(O)-(CH₂)_o-NH-C(O)-的二价连接体;其中o代表1至20范围内的整数。

- [1074] 3. 实施方案1-2中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物, 其中X代表
- [1075] 结构-C(O)-(CH₂)₁-C(O)-的二价连接体, 其中1代表1至20范围内的整数; 或
- [1076] 结构-C(O)-(CH₂)_o-NH-C(O)-的二价连接体; 其中o代表1至20范围内的整数。
- [1077] 4. 实施方案1-3中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物, 其中1代表2至4范围内的整数; 且o为3。
- [1078] 5. 实施方案1-4中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物, 其中X代表连接体-CO-CH₂-CH₂-CO-。
- [1079] 6. 实施方案1-4中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物, 其中X代表连接体-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-。
- [1080] 7. 实施方案1-4中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物, 其中X代表连接体-CO-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CO-。
- [1081] 8. 实施方案1-7中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物, 其中所述中央三价连接单元(U)和二价连接基团(Z)由式IV'表示



- [1083] 其中,
- [1084] N为氮原子(N)并且代表根据式I'的中央连接单元(U);
- [1085] L₁-NH(CO)-L₃和L₂-NH(CO)-L₄分别代表根据式I'的二价连接基团(Z);
- [1086] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;
- [1087] #表示与X的连接点; 并且
- [1088] L¹和L²彼此独立地代表-(CH₂)_{m1}-; 其中
- [1089] m1代表1至6范围内的整数; 并且
- [1090] L³和L⁴彼此独立地代表-(CH₂)_{n1}-;
- [1091] 其中n1代表1至6范围内的整数。
- [1092] 9. 实施方案8的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物, 其中L¹和L²彼此独立地代表-(CH₂)_{m1}-; 其中m1为2; 并且L³和L⁴彼此独立地代表-(CH₂)_{n1}-; 其中n1为1。
- [1093] 10. 实施方案1-9中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物, 其中X代表共价键, 并且其中U-(-Z)₂代表如式VII所示的3,5-二取代的苯甲酰基部分:



- [1095] 其中
- [1096] *表示与源自Fc的二硫键(即根据式I'的[S-Fc']部分)的硫原子的连接点;

- [1097] #表示与[OEF-Ins]构建体中的赖氨酸残基的ε氨基的连接点;并且
- [1098] L⁹和L¹⁰彼此独立地代表-(CH₂)_{n3}-;其中
- [1099] n3代表1至6范围内的整数。
- [1100] 11.实施方案10的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中n3代表1至3范围内的整数。
- [1101] 12.实施方案11的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中n3为1。
- [1102] 13.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G或A21Q、B3E或B3Q、B16E或B16H、B25H、desB27或desB29、B29R和/或desB30。
- [1103] 14.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14A或A14E、A21G或A21Q、B3Q、B16E或B16H、B25H、B29R和desB30。
- [1104] 15.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G或A21Q、B3Q、B16E或B16H、B25H、B29R和desB30。
- [1105] 16.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G或A21Q、B3Q、B16E、B25H、B29R和desB30。
- [1106] 17.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G、B3Q、B25H、B29R和desB30。
- [1107] 18.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有一个或多个以下置换的人胰岛素类似物:A14A或A14E、A21G或A21Q、B3Q、B16E、B25H、B29R和desB30。
- [1108] 19.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有以下置换的人胰岛素类似物:A14A或A14E、A21G或A21Q、B29R和desB30;并且该类似物任选地具有一个或多个以下置换:B3Q、B16E或B16H和B25H。
- [1109] 20.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G或A21Q、B29R和desB30;并且该类似物任选地具有一个或多个以下置换:B3Q、B16E或B16H和B25H。
- [1110] 21.实施方案1-12中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Ins代表含有以下置换的人胰岛素类似物:A14E、A21G或A21Q、B29R和desB30;并且该类似物任选地具有一个或多个以下置换:B3Q、B16E和B25H。
- [1111] 22.实施方案1-21中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组OEF延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P) 和Gln (Q),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体,OEF的氨基酸残基总数在15至110的范围内。
- [1112] 23.实施方案1-22中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中OEF代表极性重组OEF延伸体,该延伸体为
- [1113] 由(G)_x-K、(GQEP)_x-KP、(GQEP)₃-GQE-KP、(GQAP)_x-KP、(GQAP)_x-GQA-KP、

(GQAPGQEP)₆-KP、(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP-KP或(GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP-KP代表的A链延伸体;或

[1114] 由KP-(GQAP)_x、KP-(GQEP)_x或KP-(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP代表的B链延伸体;

[1115] 其中每个x独立地代表3至约24范围内的整数。

[1116] 24.实施方案23的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中每个x独立地代表6至24范围内的整数。

[1117] 25.实施方案24的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中每个x独立地代表18至24范围内的整数。

[1118] 26.实施方案1-25中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG4 Fc多肽的单体或其片段。

[1119] 27.实施方案26的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表hIgG1-Fc (228-447) 多肽,其包含一个或多个选自228S、234A、235A或235E或235K、237A或297Q、297E、N315Q、330S、331S、N384Q和des447的置换和/或缺失;和/或由一个或两个选自226A、227A或227S的氨基酸残基组成的延伸。

[1120] 28.实施方案26的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表hIgG1-Fc (228-447) 多肽,其包含一个或多个选自228S、234A、235K、237A、315Q、330S、331S和N384Q的置换和/或缺失;和/或由一个或两个选自226A、227A或227S的氨基酸残基组成的延伸。

[1121] 29.实施方案26的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表IgG4 Fc多肽的单体或其片段。

[1122] 30.实施方案29的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表hIgG4-Fc (228-447) 多肽,其包含一个或多个选自234A、235A或235K、N297E或N297Q、315Q、384Q和des447的置换和/或缺失;和/或由一个或两个选自226G和227A的氨基酸残基组成的延伸。

[1123] 31.实施方案29的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表hIgG4-Fc (228-447) 多肽,其包含一个或多个选自228P、234A、235A或235K、N297E或297Q、315Q、384Q和des447的置换和/或缺失;和/或由一个或两个选自226A或226G、227A或227G的氨基酸残基组成的延伸。

[1124] 32.实施方案29的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其中Fc'代表hIgG4-Fc (228-447) 多肽,其包含一个或多个选自228P、234A、235K、N297E、315Q、384Q和des447的置换和/或缺失;和/或由一个或两个选自226A、227A或227G的氨基酸残基组成的延伸。

[1125] 33.实施方案1的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其为(A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K[^],A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1126] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K[^],A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1127] A14E,B(-78K[^]),B(-77P),B(-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1128] A14E,B(-78K[^]),B(-77P),B(-1) (GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,

234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1129] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K⁺, A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1130] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K⁺, A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1131] A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K⁺, A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1132] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K⁺, A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1133] A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K⁺, A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1134] A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K⁺, A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1135] A14E, B(-78K⁺), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1136] (A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K⁺, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素)/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1137] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K⁺, A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1138] A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K⁺, A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1139] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K⁺, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素)/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1140] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K⁺, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素)/(227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 6-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-6-氧代-己酰基缀合物;

[1141] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K⁺, A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A,

235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1142] A14E, B(-78K[^]), B(-77P), B(-1) (GQAP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1143] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1144] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A122K[^], A123P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1145] A14E, A21Q, A22 (G)₁₈, A40K[^], B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1146] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物;

[1147] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1148] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酰基缀合物;

[1149] (A14A, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1150] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1151] (A1 (N(α) 乙酰基), A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K[^], A99P, B1 (N(α) 乙酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1152] (A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1153] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物;

[1154] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-

乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物;

[1155] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;

[1156] A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K[^], A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物;或

[1157] (A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, 98K[^], A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (226A, 227G, 228P, 234A, 235K, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[2-(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物。

[1158] 34. 式II的中间体化合物

[1159] [OEF-Ins]

[1160] 其中,

[1161] OEF代表与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K)残基组合;并且

[1162] Ins代表人胰岛素的类似物,该胰岛素类似物为包含A链和B链的双链胰岛素分子。

[1163] 35. 中间体化合物,其特征在于是单体Fc多肽(Fc')或其片段,其特征在于是

[1164] (i) hIgG1-Fc (228-447) 多肽,其含有一个或多个选自228S、234A、235K、237A、315Q、330S、331S和384Q的置换和/或缺失;和/或由一个或两个选自226A、227A或227S的氨基酸残基组成的延伸;或

[1165] (ii) hIgG4衍生的Fc序列的片段,其始于位置228并且止于位置447,该序列含有一个或多个选自228P、234A、235A或235K、N297E或297Q、315Q、384Q和des447的置换;和/或由一个或两个选自226A或226G、227A或227G的氨基酸残基组成的延伸。

[1166] 36. 以通式V' 表征的中间体化合物:

[1167] M-X-U (-Z-LG)₂

[1168] 其中

[1169] M(其也可称为Lys反应性末端)代表对伯氨基具有反应性的离去基团;

[1170] X不存在(即代表共价键),或者X代表如以上针对式I' 所定义的二价连接基团;

[1171] U代表如以上针对式I' 所定义的中央三价连接单元;

[1172] Z代表将中央连接单元(U)连接至离去基团(LG)的二价连接基团;并且

[1173] LG(其也可称为Cys反应性末端)代表巯基反应性基团的离去基团。

[1174] 37. 以通式VI' 表征的中间体化合物:

[1175] [OEF-Ins]-X-U (-Z-LG)₂

[1176] 其中,

[1177] OEF如以上针对式I' 所定义,并且表示与胰岛素A链C-端融合的或与胰岛素B链N-端融合的极性重组延伸体,该延伸体包括一个或多个以下氨基酸残基:Ala (A)、Asp (D)、Glu (E)、Gly (G)、Pro (P)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T),其与赖氨酸(K)残基组合,以得到[OEF-Ins]构建体;

[1178] 该[OEF-Ins]构建体如以上针对式I' 所定义,并且经由赖氨酸(K)残基连接至二价

连接基团X;

[1179] X代表如以上针对式I'所定义的二价连接基团;并且U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元,其将两个二价连接基团(Z)连接至X;或者

[1180] X代表共价键;并且U代表如以上针对式I'所定义的中央三价连接单元,其将两个二价连接基团(Z)连接至[OEF-Ins]构建体;并且

[1181] LG代表巯基反应性基团的离去基团。

[1182] 38. 药物组合物,其包含实施方案1-33中任一项的胰岛素-Fc缀合物和一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。

[1183] 39. 实施方案1-33中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其用作药物。

[1184] 40. 实施方案1-33中任一项的寡聚体延伸的胰岛素-Fc缀合物,其用于治疗或减轻包括人在内的活动物体的疾病或病症或病况,该疾病、病症或病况可以选自与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症、代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)、高血压、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗死、中风、心血管疾病、冠心病、炎性肠综合征、消化不良或胃溃疡有关的疾病、病症或病况。

[1185] 41. 治疗、预防或减轻包括人在内的活动物体的代谢疾病或病症或病况的方法,该方法包括向这类有需要的活动物体施用治疗有效量的实施方案1-33中任一项的胰岛素-Fc缀合物的步骤。

[1186] 序列信息

[1187] 针对IgG1-Fc (228-447) 和IgG4-Fc (228-447) (对应于根据EU编号的全长重链的AA228-447)的Fc多肽序列在序列表中提供,并且为方便起见而复制于此。

[1188] IgG1-Fc (228-447) (SEQ ID NO:1)

[1189]

PC PAPE**LLGG**PS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP **API**EKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

[1190] 以粗体和下划线标出的氨基酸残基分别对应于L234、L235、G237、A330和P331。

[1191] 以斜体和下划线标出的氨基酸残基表示脱酰胺位点(即N297、N314和N315)。

[1192] 根据本发明,C-端赖氨酸(K447)残基可被删除。

[1193] IgG2-Fc (220-446) (SEQ ID NO:2)

[1194]

RKCCVECPPC PAPP**VAG**PSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK
GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

[1195] 以粗体和下划线标出的氨基酸残基对应于L234和L235。

[1196] 以斜体和下划线标出的氨基酸残基表示脱酰胺位点(即N297、N314和N315)。

[1197] 根据本发明,C-端赖氨酸(K446)残基可被删除。

[1198] IgG4-Fc (228-447) (SEQ ID NO:3)

[1199]

SC PAPE**FLGG**PS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT
KPREEQF**M**ST YRVVSVLTVL HQDWL**NG**KEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWES**NG**QPEN NYKTTPPVLD SDGSFFFLYSR
LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK

[1200] 以粗体和下划线标出的氨基酸残基分别对应于L234、L235和G237。

[1201] 以斜体和下划线标出的氨基酸残基表示脱酰胺位点(即N297、N314和N315)。

[1202] 根据本发明,C-端赖氨酸(K378)残基可被删除。

[1203] IgG1铰链(SEQ ID NO:4)

[1204] **PKSCDKTHTC PPCP**

[1205] 根据EU编号,该序列对应于人IgG1全长重链的AA217-230。

[1206] 以粗体和下划线标出的氨基酸残基对应于天然P228残基。

[1207] IgG2铰链(SEQ ID NO:5)

[1208] RKCCVECPCP P

[1209] 根据EU编号,该序列对应于人IgG2全长重链的AA220-230。

[1210] IgG4铰链(SEQ ID NO:6)

[1211] **ESKYGP**PCPS** CP**

[1212] 根据EU编号,该序列对应于人IgG4全长重链的AA218-229。

[1213] 根据EU编号,用粗体和下划线标出的残基S对应于全长IgG4重链的S228。

[1214] 实施例

[1215] 参照以下实施例进一步说明本发明,这些实施例并非意在以任何方式限制所请求保护的发明的范围。

[1216] 以下实施例和通用程序涉及在本说明书和合成方案中鉴别的中间体化合物和最终产物。使用以下实施例对本发明化合物的制备进行详细描述,但所描述的化学反应是就其对本发明化合物制备的一般适用性而公开的。

[1217] 偶尔,所述反应可能并不如所述的那样适用于包含在本发明公开范围内的每种化合物。本领域技术人员将容易认识到发生这种情况的化合物。在这些情况下,该反应可以通过本领域技术人员已知的常规改动,即通过干扰基团的适当保护、通过更换成其它常规试剂或通过反应条件的常规修改而成功进行。或者,本文公开的或常规的其它反应将可适用于本发明相应化合物的制备。在所有制备方法中,所有起始材料都是已知的或可以从已知的起始材料容易地制备。

[1218] 所有温度均以摄氏度表示,并且除非另有说明,当提及产量时,所有份数(parts)和百分比都按重量计,而当提及溶剂和洗脱液时,所有份数都按体积计。

[1219] 缩写列表

[1220] 乙酸D₄:氘代乙酸

[1221] BSPP:双(对磺酸基苯基)苯基膦二钾盐二水合物

[1222] CTB:羧肽酶B

[1223] CV:柱体积

- [1224] DCM:二氯甲烷
[1225] DTT:二硫苏糖醇
[1226] EDAC: (3-二甲基氨基丙基) 乙基碳二亚胺
[1227] EDTA:乙二胺四乙酸
[1228] DIC:二异丙基碳二亚胺
[1229] DIPEA:二异丙基乙胺
[1230] EtOH:乙醇
[1231] Fmoc:9H-芴-9-基甲氧羰基
[1232] GABA: γ -氨基丁酸
[1233] HATU:2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐
[1234] HBTU:2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐
[1235] HOAT:1-羟基-7-氮杂苯并三唑
[1236] HOBT:羟基苯并三唑
[1237] HPLC:高效液相色谱法
[1238] ivDde: (4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)-3-甲基丁基
[1239] LCMS:液相色谱质谱法
[1240] MeCN:乙腈
[1241] MQ:MiliQ水
[1242] OtBu:叔丁酯
[1243] Rt:保留时间
[1244] RT:室温
[1245] RP:反相
[1246] TATU:0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓四氟硼酸盐
[1247] TBTU:2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐
[1248] TCEP:三(2-羧乙基)膦
[1249] TCTU:0-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓四氟硼酸盐
[1250] TFA:三氟乙酸
[1251] THF:四氢呋喃
[1252] Tris:三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-羟甲基丙烷-1,3-二醇
[1253] UPLC:超高效液相色谱法
[1254] 材料与方法
[1255] 通用检测和表征方法
[1256] LCMS方法1
[1257] 系统:Waters Acquity UPLC
[1258] 柱:Waters Acquity BEH C4柱,1.7 μ m,150x1.0mm
[1259] 柱温:60°C
[1260] 自动进样器温度:8°C
[1261] 检测:Synapt G2仪器&UV215nm
[1262] 洗脱液:溶剂A:MQ水中的0.05% (v/v) TFA;溶剂B:MeCN中的0.05% (v/v) TFA

[1263] 流速:0.12mL/min

[1264] 梯度:0-24min 28-35%B

[1265] 结果:平均质量 (MaxEnt1)

[1266] LCMS方法2

[1267] 系统:Agilent 1290infinity系列UPLC柱:Aeris WIDEPORE 3.6 μ B-C18 2.1 x 50mm检测器:Agilent Technologies LC/MSD TOF 6230 (G6230A);

[1268] 检测器设置:电离方法:Agilent Jet Stream源扫描范围:m/z最小值100,m/z最大值3200线性反射器模式正模式;

[1269] 条件:线性梯度:5%至95%B梯度运行时间:10分钟0-8min5-95%B、8-9min 95%B、9-9.5min 95-5%B 9.5-10min 5%B流速:0.40ml/min固定柱温:40℃;

[1270] 洗脱液:溶剂A:99.90%H₂O,0.02%TFA溶剂B:99.90%CH₃CN,0.02%TFA溶剂C:NA;

[1271] 结果说明和验证:实测质量是对于m<4000的化合物而言的化合物的m/z ((m+z)/z),或者是使用Masshunter Workstation软件版本B.05.00Build 5.0.519.13SP1 (Agilent) 去卷积所得到的质量(平均值);

[1272] 所计算的质量是所需化合物的平均分子量;

[1273] 所计算的m/z是所需化合物的分子量 (m+z)/z。

[1274] LCMS方法3

[1275] 系统:Agilent 1290infinity系列UPLC柱:Phenomenex Aeris widepore 3.6 μ C4 50x2.1 mm;

[1276] 检测器:AgilentTechnologies LC/MSD TOF 6230 (G6230A);

[1277] 检测器设置:电离方法:Agilent Jet Stream源扫描范围:m/z最小值100,m/z最大值3200;线性反射器模式正模式;

[1278] 条件:线性梯度:5%至90%B;梯度运行时间:10分钟:0-1min5-20%B,1-7min 20-90%B,7-8min 90%B,8-8.5min 90-5%B,8.5-10min 5%B,流速:0.40ml/min;固定柱温:40℃;

[1279] 洗脱液溶剂A:99.90%H₂O,0.02%TFA;溶剂B:99.90%CH₃CN,0.02%TFA;溶剂C:NA;

[1280] 结果说明和验证:实测质量是对于m<4000的化合物而言的化合物的m/z ((m+z)/z),或者是使用Masshunter Workstation软件版本B.05.00Build 5.0.519.13SP1 (Agilent) 去卷积所得到的质量(平均值);

[1281] 所计算的质量是所需化合物的平均分子量;

[1282] 所计算的m/z是所需化合物的分子量 (m+z)/z。

[1283] LCMS方法4

[1284] 系统:Waters Acquity UPLC SQD 2000柱:Acquity UPLC BEH 1.7 μ C18100 Å 2.1x50mm;

[1285] 检测器:UV:PDA,SQD 2000;

[1286] 检测器设置:电离方法:ES+扫描范围:500-2000;锥孔电压:60V;扫描时间:0.5;

[1287] 条件:线性梯度:10%至90%B;梯度运行时间:3min;总运行时间:4min流速:0.3ml/min;柱温:40℃;PDA:210-400nm;

- [1288] 洗脱液:溶剂A:99.90% H_2O ,0.1%TFA;溶剂B:99.90% CH_3CN ,0.1%TFA;溶剂C:NA;
- [1289] 结果说明和验证:实测质量是对于化合物测得的质量,实测 M/z 是对于化合物测得的分子离子 $(M+z)/z$;
- [1290] 所计算的质量是所需化合物的分子量;
- [1291] 所计算的 m/z 是所需化合物的分子量 $(m+z)/z$ 。
- [1292] LCMS方法5
- [1293] 系统:Waters Acquity UPLC SQD 2000柱:Acquity UPLC BEH 1.7 μC18 100 Å 2.1x50mm;
- [1294] 检测器:UV:PDA,SQD 2000;
- [1295] 检测器设置:电离方法:ES+扫描范围:100-1500;锥孔电压:25V;扫描时间:0.5;
- [1296] 条件:线性梯度:10%至90%B;梯度运行时间:9min
- [1297] 总运行时间:10min;流速:0.3ml/min;
- [1298] 柱温:40°C PDA:210-400nm;
- [1299] 洗脱液:溶剂A:99.90% H_2O ,0.1%TFA;溶剂B:99.90% CH_3CN ,0.1%TFA;溶剂C:NA;
- [1300] 结果说明和验证:实测质量是对于化合物测得的质量,实测 M/z 是对于化合物测得的分子离子 $(M+z)/z$;
- [1301] 所计算的质量是所需化合物的分子量;
- [1302] 所计算的 m/z 是所需化合物的分子量 $(m+z)/z$;
- [1303] 纯度:如系统软件所报告的,分析物峰的总离子流(TIC)AUC占总AUC(不包括溶剂峰)的百分比;
- [1304] 身份:从最高到最低表示为 m/z 的每个分析物质量峰的质量。扫描范围是使用的方法中扫描的范围。检测方法例如为线性反射器。
- [1305] LCMS方法6
- [1306] 系统:Waters Acquity UPLC H-Class SQD2 2000
- [1307] 柱:Acquity UPLC BEH 1.7 μC18 100 Å 2.1x50mm. 部件编号:186002350
- [1308] 检测器:UV:PDA,SQD 2000
- [1309] 检测器设置:电离方法:ES+;扫描范围:500-2000;锥孔电压:60V;扫描时间:0.5
- [1310] 条件:线性梯度:10%至80%B;梯度运行时间:2.50min;总运行时间:4min;流速:0.3ml/min(0-2.51min)和0.8ml/min(2.51-4.00min)
- [1311] 柱温:40°C PDA:210-400nm
- [1312] 洗脱液:溶剂A:99.90% H_2O ,0.1%TFA;溶剂B:99.90% CH_3CN ,0.1%TFA;溶剂C:NA
- [1313] 结果说明和验证:化合物的实测质量为 M/z ,其为该化合物的实测分子离子 $(M+z)/z$ 。
- [1314] 所计算的质量是所需化合物的分子量;
- [1315] 所计算的 m/z 是所需化合物的分子量 $(m+z)/z$;
- [1316] 纯度:如系统软件所报告的,分析物峰的总离子流(TIC)AUC占总AUC(不包括溶剂峰)的百分比;
- [1317] 身份:从最高到最低表示为 m/z 的每个分析物质量峰的质量。
- [1318] 扫描范围是使用的方法中扫描的范围。

- [1319] 检测方法例如为线性反射器。
- [1320] LCMS方法7
- [1321] 系统:Agilent 1290 infinity系列UPLC
- [1322] 柱:Eclipse C18+2.1x50 mm 1.8u。
- [1323] 检测器:AgilentTechnologies LC/MSD TOF 6230 (G6230A)。
- [1324] 电离方法:Agilent Jet Stream源;扫描范围:m/z最小值100,m/z最大值3200;线性反射器模式正模式。
- [1325] 线性梯度:5%至95%B
- [1326] 梯度运行时间:6分钟0-4.5min 5-95%B,4.5-5.595%B,5.5-5.595-5%B,5.5-6 5%B
- [1327] 流速:0.40ml/min;固定柱温:40℃
- [1328] 溶剂A:99.90%H₂O,0.02%TFA;溶剂B:99.90%CH₃CN,0.02%TFA
- [1329] 实测质量是对于m<4000的化合物而言的化合物的m/z ((m+z)/z),或者是使用Masshunter Workstation软件版本B.05.00 Build 5.0.519.13 SP1 (Agilent) 去卷积所得到的质量(平均值)。
- [1330] 所计算的质量是所需化合物的平均分子量;.
- [1331] 所计算的m/z是所需化合物的分子量 (m+z)/z。
- [1332] LCMS方法8
- [1333] 系统:Waters Acquity UPLC SQD 2000
- [1334] 柱:Acquity UPLC BEH 1,7μC18100 Å2,1x 50mm
- [1335] 检测器:UV:PDA,SQD 2000
- [1336] 检测器设置:电离方法:ES+;扫描范围:100-1500;锥孔电压:25V扫描时间:0.5
- [1337] 条件:线性梯度:0%至50%B;梯度运行时间:2.5min
- [1338] 总运行时间:4min
- [1339] 流速:0.3ml/min
- [1340] 柱温:40℃
- [1341] PDA:210-400nm
- [1342] 洗脱液:溶剂A:99.90%H₂O,0.1%TFA;溶剂B:99.90%CH₃CN,0.1%TFA;溶剂C:NA
- [1343] 结果说明和验证:实测质量是对于化合物测得的质量,实测M/z是对于化合物测得的分子离子 ((M+z)/z);
- [1344] 所计算的质量是所需化合物的分子量;
- [1345] 所计算的m/z是所需化合物的分子量 (m+z)/z。
- [1346] 纯度:如系统软件所报告的,分析物峰的总离子流 (TIC) AUC占总AUC (不包括溶剂峰)的百分比。
- [1347] 身份:从最高到最低表示为m/z的每个分析物质量峰的质量。
- [1348] 扫描范围是使用的方法中扫描的范围。
- [1349] 检测方法例如为线性反射器。
- [1350] LCMS方法9
- [1351] LC-系统:Waters Acquity UPLC H级
- [1352] 柱:Waters Acquity BEH,C-18,1.7μm,2.1mm×50mm

[1353] 检测器:Waters Xevo G2-XS QTof

[1354] 检测器设置:电离方法:ES;扫描范围:50-4000amu;操作模式:MS分辨率模式正/负:正模式电压:毛细管3.00kV;样品锥80V,源60V;温度:源150℃,脱溶剂化500℃,扫描时间:0.500s;中间扫描延迟:0.014s

[1355] 条件:线性梯度:5%至95%B,梯度运行时间:4.0分钟;总运行时间:7.0分钟;流速:0.4ml/min;柱温:40℃

[1356] 洗脱液:溶剂A:99.90%MQ-水,0.1%甲酸;溶剂B:99.90%乙腈,0.1%甲酸;溶剂C:99.99%Q水,0.01%TFA

[1357] 梯度:A 90-0%;B 5-95%,C 5%

[1358] 结果说明和验证:实测质量是对于化合物测得的质量,实测M/z是对于化合物测得的分子离子 $(M+z)/z$;

[1359] 所计算的质量是所需化合物的分子量;

[1360] 所计算的m/z是所需化合物的分子量 $(m+z)/z$ 。

[1361] 纯度:如系统软件所报告的,分析物峰的总离子流(TIC)AUC占总AUC(不包括溶剂峰)的百分比。

[1362] 身份:从最高到最低表示为m/z的每个分析物质量峰的质量。

[1363] 扫描范围是使用的方法中扫描的范围。

[1364] 检测方法例如为线性反射器。

[1365] LCMS方法10

[1366] LC-系统:Waters Acquity UPLC H

[1367] 柱:Waters Acquity BEH,C-18,1.7μm,2.1mm×50mm,

[1368] 检测器:Waters Xevo G2-XS QTof

[1369] 检测器设置:电离方法:ES扫描范围:50-4000amu;操作模式:MS分辨率模式正/负:正模式电压:毛细管3.00kV,样品锥80V,源60V,温度:源150℃,脱溶剂化500℃,扫描时间:0.500s,中间扫描延迟:0.014s

[1370] 条件:线性梯度:5%至95%B;梯度运行时间:4.0分钟,总运行时间:7.0分钟,流速:0.4ml/min柱温:40℃

[1371] 洗脱液:溶剂A:99.90%MQ-水,0.1%甲酸;溶剂B:99.90%乙腈,0.1%甲酸;溶剂C:99.99%MQ水,0.01%TFA

[1372] 梯度:A 90-70%1min,70-30%6min,30-0%0.5min,0%0.5min,B 5-25%1min,25-65%6min,65-95%0.5min,95%0.5min,C 5%

[1373] 结果说明和验证:实测质量是对于化合物测得的质量,实测M/z是对于化合物测得的分子离子 $(M+z)/z$;

[1374] 所计算的质量是所需化合物的分子量;

[1375] 所计算的m/z是所需化合物的分子量 $(m+z)/z$ 。

[1376] 纯度:如系统软件所报告的,分析物峰的总离子流(TIC)AUC占总AUC(不包括溶剂峰)的百分比。

[1377] 身份:从最高到最低表示为m/z的每个分析物质量峰的质量。扫描范围是使用的方法中扫描的范围。检测方法例如为线性反射器。

[1378] 实施例1:本发明的[OEF-Ins]化合物的制备

[1379] 根据本发明使用的寡聚体延伸的融合胰岛素化合物可以通过本领域已知的各种技术来产生,例如,如WO 2016/193380A1中所述。

[1380] 编码胰岛素的DNA与编码重组延伸体的DNA融合。将DNA克隆到酵母中,表达并收获胰岛素。延伸的胰岛素被表达为单链前体,使用ALP酶(或胰蛋白酶和可选的CPB等)将该单链前体切割成双链延伸的胰岛素。

[1381] 在SP Sepharose上捕获前体:

[1382] SP柱(约200mL)用0.5M NaOH再生,并用0.1M柠檬酸pH 3.5平衡。捕获运行(阳离子交换)在20℃下进行。

[1383] 用水1:1稀释酵母上清液,并以10-20mL/min的流速加样。

[1384] 用0.1M柠檬酸pH 3.5洗涤,并用60%EtOH进行洗涤。用0.2M乙酸钠pH 5.5/40% EtOH洗脱该类似物。

[1385] 用水稀释两次SP合并物(约600ml),并添加50mM甘氨酸。将pH调节至9.3,并添加3-5mg胰蛋白酶/g胰岛素。在UPLC上进行反应。

[1386] 3小时后,添加柠檬酸,将pH调节至3.5,并在50mm 15μm Gemini柱上纯化。

[1387] 柱:10μm Gemini C18 50×250mm 200Å,477ml。

[1388] 缓冲液:

[1389] A:10ml甲酸/5L 10%w/w乙腈

[1390] B:70%w/w乙腈

[1391] 梯度为10-50%B-缓冲液。

[1392] 梯度时间/总柱体积120min

[1393] 流速:80ml/min

[1394]

表 1. [OEF-Ins]化合物

化合物	胰岛素类似物	延伸体-A 链 (从 C-端延伸)	延伸体-B 链 (从 N-端延伸)	[计算质 量(Da)] 平均值	LCMS 方法 3 [实测质量 (Da)] 平均值
OEF-Ins-1 (SEQ ID NO:7 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30	(GQEP) ₁₉ -KP		13675.0	13676.0
OEF-Ins-2 (SEQ ID NO:8 的 A 链和 SEQ ID NO:24 的 B 链)	A14E, B3Q, B25H, B29R, desB30		KP-(GQAPGQAPGQEP) ₆ -GQAP	12992.0	12993.0
OEF-Ins-3 (SEQ ID NO:9 的 A 链和 SEQ ID NO:23 的 B 链)	A14E, A21G, B3Q, B25H, B29R, desB30	(GQAPGQAPGQEP) ₆ -GQAP-KP.		12935.0	12936.0
OEF-Ins-4 (SEQ ID NO:8 的 A 链和 SEQ ID NO:22 的 B 链)	A14E, B25H, B29R, desB30		KP(GQEP) ₁₉	13732.0	13733.0
OEF-Ins-5 (SEQ ID NO:7 的 A 链和 SEQ ID NO:23 的 B 链)	A14E, A21G, B3Q, B25H, B29R, desB30	(GQEP) ₁₉ -KP		13689.0	13690.0

[1395]

OE-Ins-6 (SEQ ID NO:11 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30	(GQEP) ₁₂ -KP		10795.0	10796.0
OE-Ins-7 (SEQ ID NO:10 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30	(GQEP) ₆ -KP		8327.0	8328.0
OE-Ins-8 (SEQ ID NO:13 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30,	(GQEP) ₃ -GQE-KP		7407.1	7407.9
OE-Ins-9 (SEQ ID NO:12 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30,	(GQAPGQEP) ₆ -KP		10447.4	
OE-Ins-10 (SEQ ID NO:8 的 A 链和 SEQ ID NO:27 的 B 链)	A14E, B25H, B29R, desB30		KP(GQEP) ₆	8384.1	8384.6
OE-Ins-11 (SEQ ID NO:8 的 A 链和 SEQ ID NO:28 的 B 链)	A14E, B25H, B29R, desB30		KP(GQEP) ₄	7561.3	7562.1
OE-Ins-12 (SEQ ID NO:8 的 A 链和 SEQ ID NO:25 的 B 链)	A14E, B25H, B29R, desB30		KP(GQAP) ₁₉	12629.9	12630.4

[1396]

OEf-Ins-13 (SEQ ID NO:14 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30	(GQAP) ₁₉ -KP		12572.8	12573.3
OEf-Ins-14 (SEQ ID NO:9 的 A 链和 SEQ ID NO:26 的 B 链)	A14E, A21G, B29R, desB30	(GQAPGQAPGQEP)6-GQAP-KP		12931.0	12931.6
OEf-Ins-15 (SEQ ID NO:15 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30	(GQAPGQAPGQAPGQEP)6-GQA P-KP		15041.3	15041.5
OEf-Ins-16 (SEQ ID NO:17 的 A 链和 SEQ ID NO:26 的 B 链)	A14A, A21G, B29R, desB30	(GQAP) ₁₈ -GQA-KP		12427.7	12428.4
OEf-Ins-17 (SEQ ID NO:18 的 A 链和 SEQ ID NO:26 的 B 链)	A14E, A21G, B29R, desB30	(GQAP) ₁₈ -GQA-KP		12485.7	12486.1
OEf-Ins-18 (SEQ ID NO:18 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30	(GQAP) ₁₈ -GQA-KP		12475.7	12476.1
OEf-Ins-19 (SEQ ID NO:19 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21Q, B25H, B29R, desB30	(G) ₁₈ -K		6859.5	6853.2*

[1397]

OEf-Ins-20 (SEQ ID NO:16 的 A 链和 SEQ ID NO:21 的 B 链)	A14E, A21G, B25H, B29R, desB30	(GQAP)24-GQA-KP		14596.0	14596.4
OEf-Ins-21 (SEQ ID NO:16 的 A 链和 SEQ ID NO:26 的 B 链)	A14E, A21G, B29R, desB30	(GQAP)24-GQA-KP		14606.0	14606.3
OEf-Ins-22 (SEQ ID NO:20 的 A 链和 SEQ ID NO:26 的 B 链)	A21G, B29R, desB30	(GQAP)18-GQA-KP		12519.8	12520.2**
OEf-Ins-23 (SEQ ID NO:18 的 A 链和 SEQ ID NO:29 的 B 链)	A14E, A21G, B16E, B25H, B29R, desB30	(GQAP)18-GQA-KP		12441.7	12442.0

*MALDI 数据; **MS 方法 7

- [1398] 实施例2:Fc的通用制备
- [1399] 首先使用p3700-A-IgG4-Fc (228-447) 序列构建编码MA-IgG4Fc氨基酸序列 (226M,

227A IgG4-Fc (228-447)) 的DNA序列:

[1400] (A SCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK)

[1401] 然后从大肠杆菌以高水平产生作为包涵体的A 227A,IgG4-Fc (228-447) (Fc1)。

[1402] 使用蒸馏水将包涵体洗涤两次,并以10mg/m溶解于6M尿素,10mM DTT,50mM Tris pH 9.0中。完全溶解后,将溶液酸化至pH 4.5以除去杂质。如下文更详细描述,将Fc分子通过溶液-固相程序再折叠:将溶解的包涵体快速稀释到再折叠溶液(3M尿素,0.25精氨酸,1mM半胱氨酸,50mM Tris pH 9.0)中至1mg/mL的终浓度保持24小时。在使用疏水性相互作用树脂(Phenyl Fast-Flow)固相捕获后,Fc蛋白正确地再折叠。

[1403] 使用Capto混合模式色谱法进一步纯化再折叠的Fc分子,并将该纯化的Fc分子最终溶解于100mM Tris pH 8.0中。

[1404] 表2.Fc类似物。如上所述制备Fc类似物。给出了这些化合物的通过LCMS(使用LCMS方法1)确定的完整质量。

[1405]

化合物编号	Fc 序列突变	计算平均质量	实测平均质量 LCMS 方法 1
Fc1 (SEQ ID NO:31)	227A hIgG4-Fc(228-447)	49741.48	49741.59
Fc2 (SEQ ID NO:33)	227A, 315Q, 384Q hIgG4-Fc(228-447)	49797.60	49797.69

[1406]

Fc3 (SEQ ID NO:34)	226G, 227A hIgG4-Fc(228-447)	49856.58	49858.75
Fc4 (SEQ ID NO:35)	227A, 228S, 235K, 315Q, 384Q hIgG1-Fc(228-447)	49727.76	49726.87
Fc5 (SEQ ID NO:36)	227A, 235K, 315Q, 384Q hIgG4-Fc(228-447)	49827.62	49826.69
Fc6 (SEQ ID NO:37)	227A, 234A, 235A hIgG4-Fc(228-447)	49505.14	49505.8
Fc7 (SEQ ID NO:38)	226A, 227S hIgG1-Fc(228-447)	49835.86	49835.26
Fc8 (SEQ ID NO:39)	227A, 235K hIgG4-Fc(228-447)	49771.50	49772.2
Fc9 (SEQ ID NO:30)	227A, 234A, 235K hIgG4-Fc(228-447)	49619.32	49619.96
Fc10 (SEQ ID NO:40)	226A, 227S, 235K, 237A, 330S, 331S hIgG1-Fc(228-447)	49905.86	49905.77
Fc11 (SEQ ID NO:41)	226A, 227S, 234A, 235K, 237A, 330S, 331S hIgG1-Fc(228-447)	49821.70	49821.54
Fc12 (SEQ ID NO:42)	226A, 227S, 234A, 235K, 237A, 315Q, 330S, 331S, 384Q hIgG1-Fc(228-447)	49877.82	49877.38
Fc13 (SEQ ID NO:43)	226A, 227S, 234A, 235E, 237A, 330S, 331S hIgG1-Fc(228-447)	49823.58	49822.66
Fc14 (SEQ ID NO:44)	227A, 234A, 235K, 297Q hIgG4-Fc(228-447)	49647.4	49647.1
Fc15 (SEQ ID NO:32)	227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc(228-447)	49449.11	49449.4
Fc16 (SEQ ID NO:45)	227A, 234A, 235K, 297E, des447 hIgG4-Fc(228-447)	49393.0	49393.4

[1407]

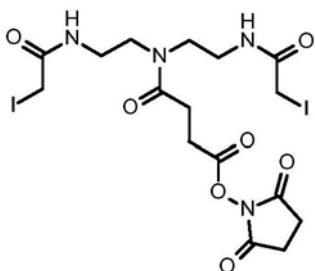
Fc17 (SEQ ID NO:46)	226A, 227G, 228P, 234A, 235K, des447 hIgG4-Fc(228-447)	49497.2	49498.5
------------------------	---	---------	---------

[1408] 实施例3:用于胰岛素类似物衍生化的连接体的制备

[1409] 实施例3.1

[1410] (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酸酯(化学式6)的合成

[1411]



[1412] 步骤1:4-[双[2-(叔丁氧羰基氨基)乙基]氨基]-4-氧代-丁酸

[1413] 将N-[2-[2-(叔丁氧羰基氨基)乙基]氨基]甲酸叔丁酯(3.0g)溶解于DCM(50ml)中。添加琥珀酸酐(1.08g),然后添加分子筛,3Å(2.0g)。在室温下搅拌该混合物。1.5h后添加更多分子筛,3Å(2.0g)。搅拌20小时后,过滤该反应混合物,并在真空下浓缩以得到油状物。将该油状物溶解于乙酸乙酯(100ml)中并用5%柠檬酸洗涤,并用无水MgSO₄干燥。过滤后,将滤液在真空下浓缩以得到呈澄清泡沫的产物。

[1414] LCMS方法5:计算m/1:404.5;实测m/1:404.3;保留时间:3.67min。

[1415] 步骤2:4-[双(2-氨基乙基)氨基]-4-氧代-丁酸

[1416] 将4-[双[2-(叔丁氧羰基氨基)乙基]氨基]-4-氧代-丁酸(4.0g)溶解于二氯甲烷(50ml)中。添加TFA(10ml)。在室温下搅拌该混合物2小时。脱保护的产物作为TFA盐沉淀为油状物。将该混合物在真空下浓缩以得到澄清油状物。它易溶于乙腈中,再次浓缩为油状物,随后与甲苯共浓缩两次。将残余物在真空下放置过夜。在乙醚中结晶后真空干燥。形成白色晶体。

[1417] 步骤3:4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酸

[1418] 将4-[双(2-氨基乙基)氨基]-4-氧代-丁酸(600mg)溶解于0.2M Na₂CO₃(30ml)和乙腈(20ml)中。逐份添加碘乙酸羟基-琥珀酰亚胺酯(905mg)粉末,添加过程中pH保持在9-9.5。将反应混合物在室温下搅拌30分钟。反应物经柠檬酸酸化(不沉淀),浓缩至一半体积以除去乙腈,并用乙酸乙酯(3×100ml)萃取。干燥(MgSO₄)合并的黄色乙酸乙酯层,并在真空下浓缩以得到黄色油状物,其通过RP-色谱法纯化。

[1419] 柱:30×250mm(Gemini-NX 5um_C18_110A AXIA_30×250mm)柱体积=177ml

[1420] A缓冲液:Milli-Q水+0.1%TFA

[1421] B缓冲液:Milli-Q水中的80%乙腈+0.1%TFA

[1422] 流速:25ml/min

[1423] 梯度:0-70%B-45min

[1441] 步骤4: 6-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-6-氧代己酸

[1442] 将6-[双(2-氨基乙基)氨基]-6-氧代己酸(1.00g)溶解于0.2M Na₂CO₃(30ml)和乙腈(20ml)中,并且用1N NaOH调节pH至9.3。逐份添加碘乙酸OSu酯(1.537g)粉末。在添加期间和之后,pH保持在9-9.5。将澄清溶液在室温下搅拌30分钟。该反应物用10%柠檬酸酸化至pH为4,然后浓缩至一半体积(以除去乙腈),然后用水稀释至100ml,之后通过RP色谱法纯化:

[1443] 柱:30×250mm(Gemini-NX 5um_C18_110A AXIA_30×250mm) CV=177ml

[1444] A缓冲液:在Milli-Q水中的0%乙腈+0.1%TFA

[1445] B缓冲液:在Milli-Q水中的80%乙腈+0.1%TFA

[1446] 流速:25ml/min

[1447] 梯度:0-50%B-60min

[1448] 将产物合并物在真空下浓缩,用乙腈汽提3次,并在真空干燥器中干燥以得到纯产物,为硬油性残余物。产量1.2g(95%)。

[1449] LCMS方法5:计算m/1:568.2;实测m/1:568.2;保留时间:1.80min。

[1450] 步骤5: (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-6-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-6-氧代己酸酯(化学式7)

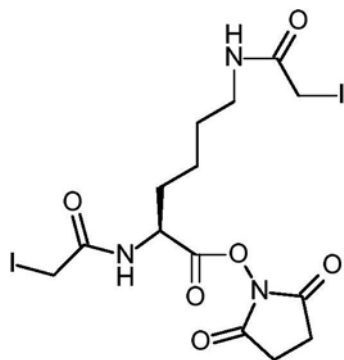
[1451] 将6-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-6-氧代己酸(975mg)溶解于无水THF(75ml)中。添加N-羟基琥珀酰亚胺(220mg)和DIC(532μL)。将混合物在室温下搅拌24小时。过滤除去沉淀物。将滤液在真空下浓缩。将残余物溶解于乙腈(50ml)中并在冰上冷却。滤出沉淀物。将滤液在真空下浓缩。在乙醚中搅拌残余物。滤出所形成的固体,用乙醚洗涤并真空干燥,得到呈淡黄色固体的产物。产量1.03g(90%)。

[1452] LCMS方法5:计算m/1:665.2;实测m/1:665.2;保留时间:2.51min。

[1453] 实施例3.3

[1454] (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-(2S)-2,6-双[(2-碘乙酰基)氨基]-己酸酯(化学式8)的合成

[1455]



[1456] 步骤1: (2S)-2,6-双[(2-氯乙酰基)氨基]己酸

[1457] 向L-赖氨酸一盐酸盐一水合物(53.2g,291mmol)的水(200mL)溶液中加入氢氧化钠(69.8g,1.75mol)的水(200mL)溶液,并将该混合物冷却至0℃。滴加氯乙酰氯(69.5mL,874mmol)的乙醚(200mL)溶液45分钟。将反应混合物在0℃下搅拌2小时,然后在室温下过夜。分离水层,用乙醚(2×300mL)和二氯甲烷(3×300mL)洗涤,然后用浓盐酸酸化至pH2,并用二氯甲烷(3×400mL)萃取。将二氯甲烷萃取物合并,用无水硫酸钠干燥。过滤后,减压除去溶剂。冷冻干燥水相。在两个相中都检测到产物2。通过RP HPLC(4轮;柱Deltapak C18,50

×500mm,在180min中乙腈/水2:98至20:80,在30min中20:80至40:60+0.05%TFA)纯化标题化合物(2)。冷冻干燥得到呈无色油状物的(2S)-2,6-双[(2-氯乙酰基)氨基]己酸(2)。

[1458] 产量:26.0g (30%)。

[1459] ¹HNMR谱(300MHz,乙酸D₄,dH):4.66(dd,J=8.4和5.0Hz,1H);4.22(s,2H);4.17(s,2H);3.33(t,J=7.0Hz,2H);2.02-1.76(m,2H);1.68-1.53(m,2H);1.52-1.37(m,2H)。

[1460] LC-MS Rt(Kinetex C18,4.6x50 mm,乙腈/水5:95至100:0+0.1%FA):2.76min。

[1461] LC-MS m/z:299.3。

[1462] 步骤2:(2S)-2,6-双[(2-碘乙酰基)氨基]己酸

[1463] 将上述化合物(26.0g,86.9mmol)和碘化钠(65.2g,435mmol)在无水乙腈(1000mL)中的混合物在室温下搅拌过夜。过滤后,在真空下除去溶剂。将残余物溶解于2%乙腈水溶液中并添加硫代硫酸钠直至溶液变成无色。该混合物通过RP HPLC(3轮;柱Deltapak C18,50×500mm,在60分钟内乙腈/水2:98至20:80,然后在30分钟内20:80至40:60+0.05%TFA)纯化。冷冻干燥得到呈吸湿性白色固体的标题化合物。

[1464] 产量:10.3g (25%)。

[1465] ¹HNMR谱(300MHz,乙酸D₄,80°C,dH):4.66(dd,J=8.3和5.1Hz,1H);3.90(dd,J=12.4和10.6Hz,2H);3.83(s,2H);3.32(t,J=6.8Hz,2H);2.04-1.94(m,1H);1.91-1.77(m,1H);1.70-1.47(m,4H)。

[1466] LC-MS Rt(Kinetex C18,4.6x50 mm,乙腈/水5:95至100:0+0.1%FA):2.94min。

[1467] LC-MS m/z:483.3。

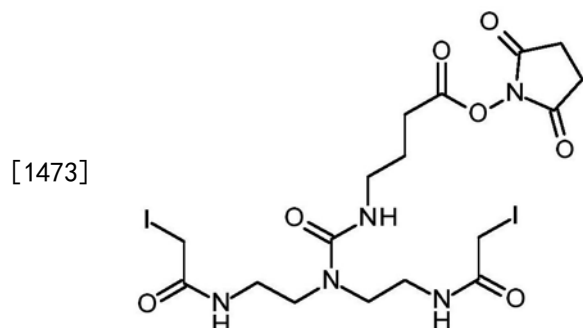
[1468] 步骤3:(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-(2S)-2,6-双[(2-碘乙酰基)氨基]己酸酯(化学式8)

[1469] 在(2S)-2,6-双[(2-碘乙酰基)氨基]己酸(500mg)在无水THF(10mL)中的溶液中添加N-羟基琥珀酰亚胺(150mg)和DIC(0.201mL)。将该混合物在室温下搅拌24小时,然后真空浓缩。将残余物溶于乙腈(100mL)中,在冰上冷却并过滤。将乙腈相在真空下浓缩。将残余物在乙醚中搅拌,滤出所形成的固体,用乙醚洗涤并真空干燥,得到呈浅黄色固体的产物。

[1470] LCMS方法4:计算m/z:580.1;实测m/z:580.1;保留时间:1.75min。

[1471] 实施例3.4

[1472] (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酸酯(化学式9)的合成



[1474] 步骤1:4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酸

[1475] 将2-氯三苯甲基树脂100-200目1.5mmol/g(1,9.22g,13.8mmol)在无水二氯甲烷(50mL)中溶胀1小时。将Fmoc-GABA-OH(3.00g,9.22mmol)和N,N-二异丙基乙胺(6.40mL,

36.9mmol) 在无水N,N-二甲基甲酰胺 (30mL) 和无水二氯甲烷 (20mL) 的混合物中的溶液添加至树脂中并将该混合物振摇过夜。用N,N-二甲基甲酰胺 (3×50 mL)、2-丙醇 (3×50mL) 和二氯甲烷 (3×50mL) 洗涤树脂。经N,N-二甲基甲酰胺中的20%哌啶 (1×5min, 1×30min, 2×50mL) 处理以除去Fmoc基团。使用N,N-二甲基甲酰胺 (3×50mL)、2-异丙醇 (3×50mL) 和二氯甲烷 (3×50mL) 洗涤树脂。

[1476] 将4-硝基苯基氯甲酸酯 (9.27g, 46.1mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (9.64mL, 55.3mmol) 在无水四氢呋喃/二氯甲烷混合物 (1:1, 50mL) 中的溶液添加到树脂中, 并且将该混合物振荡110分钟。过滤树脂并用二氯甲烷 (3×50mL)、N,N-二甲基甲酰胺 (3×50mL) 和二氯甲烷 (3×50mL) 洗涤。将2-(1-((2-((2-((1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己亚基)-3-甲基丁基)氨基)乙基)氨基)乙基)氨基)丁亚基)-5,5-二甲基环己烷-1,3-二酮 (2,14.3g, 27.7mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (4.80mL, 27.7mmol) 在N,N-二甲基甲酰胺 (50mL) 中的溶液添加到树脂中, 并将该混合物振荡90分钟。过滤树脂并用N,N-二甲基甲酰胺 (3×50mL)、2-异丙醇 (3×50mL) 和二氯甲烷 (3×50mL) 洗涤。

[1477] 经N,N-二甲基甲酰胺中的2%一水合肼 (4×4min, 3×40mL) 处理以除去IvDde基团。用N,N-二甲基甲酰胺 (3×50mL)、二氯甲烷 (3×50mL) 和N,N-二甲基甲酰胺 (3×50mL) 洗涤树脂。将碘乙酸酐 (9.80g, 27.7mmol) 和2,4,6-三甲吡啶 (1.20mL, 9.22mmol) 在N,N-二甲基甲酰胺 (40mL) 中的溶液添加到树脂中, 并将该混合物振荡20分钟。过滤树脂并用N,N-二甲基甲酰胺 (4×50mL) 和二氯甲烷 (10×50mL) 洗涤。用三氟乙酸在二氯甲烷中的2%溶液 (2×1.5小时, 2×40mL) 处理树脂, 然后用二氯甲烷 (3×50mL) 洗涤。合并溶液并蒸发至干。通过RP HPLC (柱Deltapak C18, 50×500mm, 乙腈/水+0.05%TFA, 在60分钟内2:98至20:80, 在60分钟内20:80至50:50+0.05%TFA) 纯化残余物。冷冻干燥得到呈白色固体的标题化合物。

[1478] 产量: 560mg (11%)。

[1479] ¹HNMR谱 (300MHz, 乙酸D₄, dH): 3.82 (s, 4H); 3.45 (t, J=6.3Hz, 8H); 3.30 (t, J=6.9Hz, 2H); 2.43 (t, J=7.4Hz, 2H); 1.92-1.81 (m, 2H)。

[1480] LC-MS Rt (Kinetex C18, 4.6x50 mm, 乙腈/水5:95至100:0+0.1%FA): 2.89min。

[1481] LC-MS m/z: 569.5。

[1482] 步骤2: (2,5-二氧代吡咯烷-1-基) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酸酯4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酸 (化学式9)

[1483] 将4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基甲酰基氨基]丁酸 (250mg) 溶解于无水THF (20mL) 中。添加N-羟基琥珀酰亚胺 (62mg) 和DIC (0.15mL)。将该混合物在室温下搅拌24小时。滤出沉淀物, 并将滤液在真空下浓缩。将残余物溶解于乙腈 (50mL) 中, 在冰上冷却。滤出沉淀物 (二环己基脲), 并将滤液在真空下浓缩。

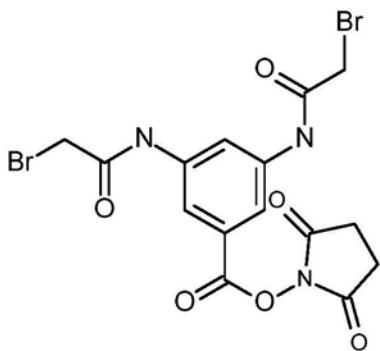
[1484] 将残余物在乙醚中搅拌, 滤出所形成的固体, 用乙醚洗涤并在真空下干燥, 得到呈浅黄色固体的产物。产量295mg。

[1485] LCMS方法8: 计算m/z: 666.2; 实测m/z: 666.1; 保留时间: 2.61min。

[1486] 实施例3.5

[1487] (2,5-二氧代吡咯烷-1-基) -3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯 (化学式10) 的合成

[1488]



[1489] 将3,5-二氨基苯甲酸(0.5g)溶解于5ml无水DMF中。将该反应物在冰上冷却,同时在+5℃下在反应中滴加溶解于DMF(1.8mL)中的溴乙酸酐(1.8g)。除去冰浴并将反应物在室温下搅拌4小时。向反应中加入50ml冰冷的水,形成灰色沉淀物。将该混合物在冰箱中储存过夜。

[1490] 滤出沉淀物并用水洗涤。将沉淀物溶解于2-甲基-四氢呋喃(20mL)中,用Na₂SO₄干燥,过滤,并在真空下浓缩。向残余物中添加N-羟基琥珀酰亚胺(416mg)和DIC(1.0mL)。在室温下搅拌3h后,将混合物在真空下浓缩。添加乙腈(20mL)并滤出尿素。将滤液在真空下浓缩至约5mL。从乙醚中沉淀。洗涤沉淀物并离心两次。分离的化合物在真空下用氮气流干燥。

[1491] LCMS方法9:m/1:计算492.1;实测491.9。

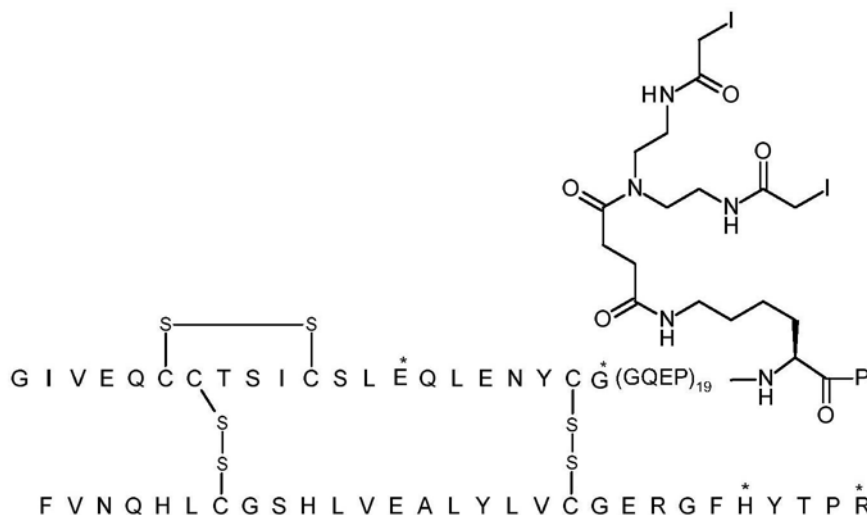
[1492] 实施例4:胰岛素衍生物的制备

[1493] 实施例4.1中给出了代表性胰岛素衍生物的制备。除非另有说明,否则实施例4.2-4.26的胰岛素衍生物按照实施例4.1中提供的方法制备。

[1494] 实施例4.1

[1495] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素的合成

[1496]



[1497] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-1) (1300mg) 在水 (10ml) 和乙腈 (2ml) 中的溶液用1N NaOH调节至pH 10。添加CaCl₂·2H₂O (20mol 过量, 28mg)。重新调节pH至11.3。在剧烈搅拌下逐滴加入溶解于THF/MeCN 1:1 (3ml) 中的实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学式6)。pH降至10.6。将该混合物搅拌45分钟,并用水稀释至80ml,用1N HCl将pH

调节至2.5。通过反相色谱法纯化。

[1498] 柱:Phenomenex,Gemini-NX,AXIA,5 μ ,C18,110 Å,30x250 mm

[1499] 缓冲液:A:水中的0.1%TFA:乙腈中的0.1%TFA

[1500] 梯度:60分钟20-40%B

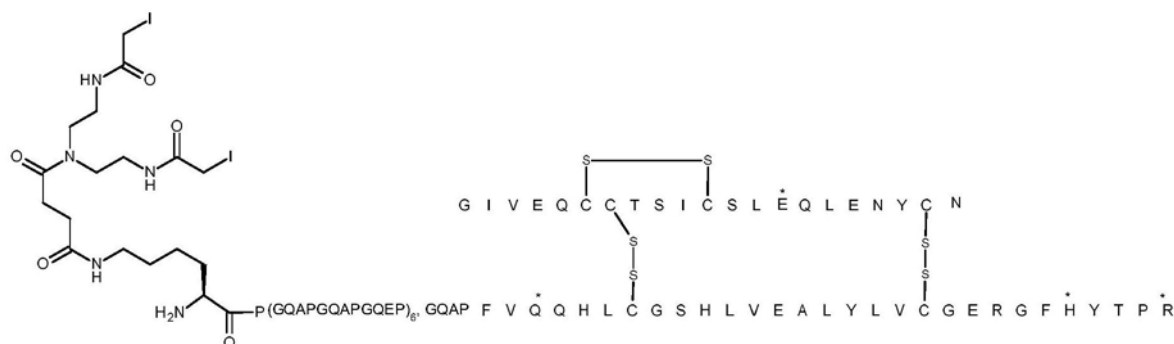
[1501] 将产物合并物冻干得到标题化合物,产率为61%。

[1502] LCMS方法6:计算m/4:1290.6;实测m/4:1291.9;保留时间:1.37min。

[1503] 实施例4.2

[1504] A14E,B(-78K(N(ϵ)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)),
B(-77P), (B-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1505]



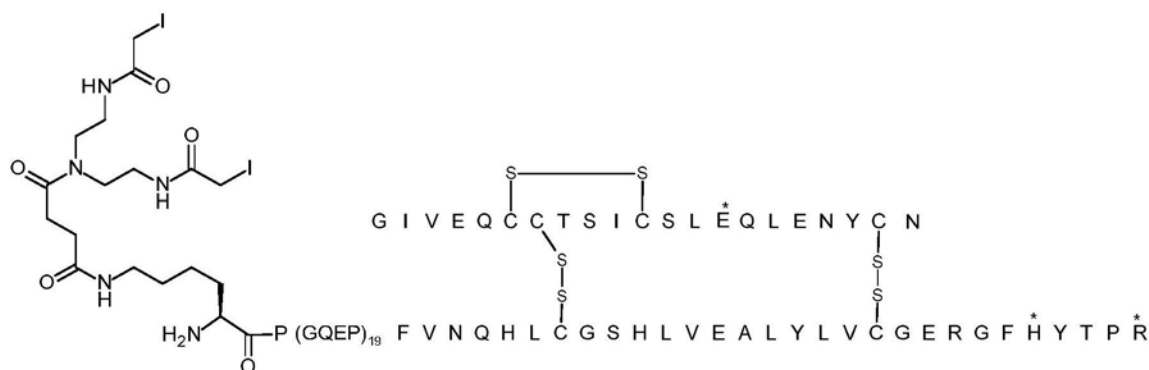
[1506] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,B(-78K),B(-77P),
(B-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-2) 和实施例3.1
的(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酸酯
(化学式6) 制备标题化合物。

[1507] LCMS方法4:计算m/11:1229.0;实测m/11:1231.9;保留时间:1.6min。

[1508] 实施例4.3

[1509] A14E,B(-78K(N(ϵ)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)),
B(-77P), (B-1) (GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1510]



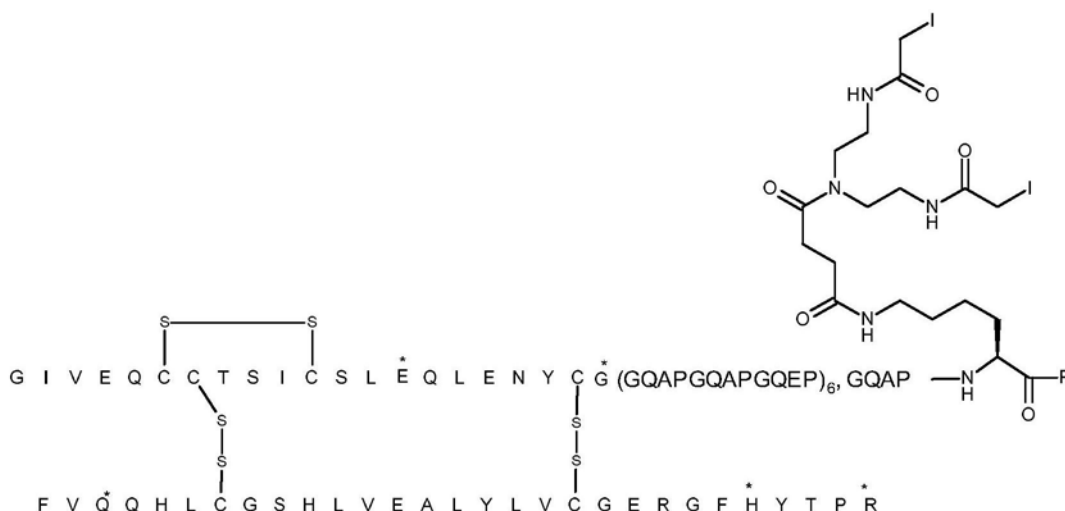
[1511] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,B(-78K),B(-77P),B
(-1) (GQEP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-4) 和实施例3.1的(2,5-二氧代吡咯
烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酸酯(化学式6) 制备标题
化合物。

[1512] LCMS方法3:计算质量:14253.0;实测质量14254.0。

[1513] 实施例4.4

[1514] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基),A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1515]



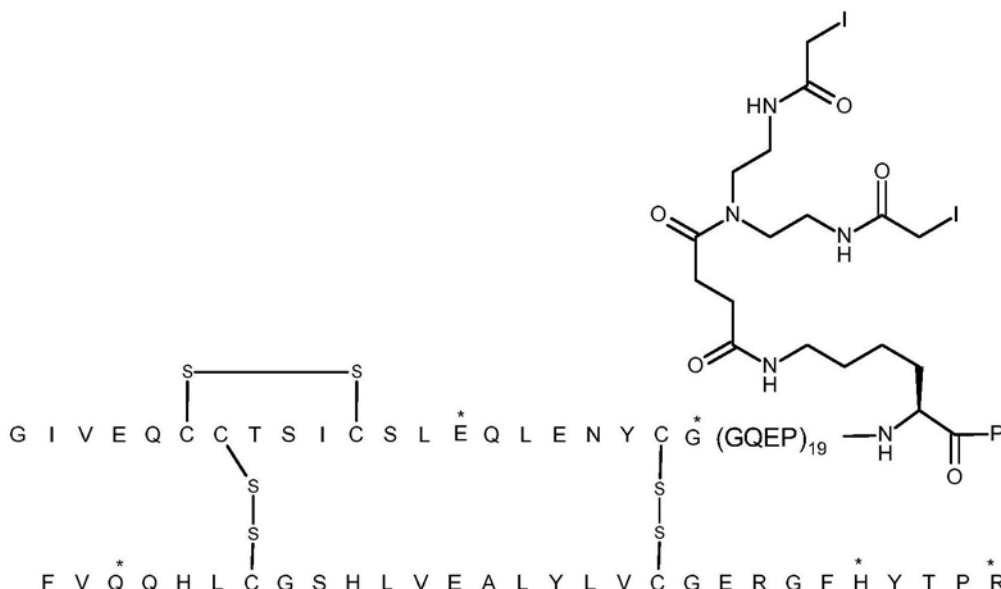
[1516] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K,A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-3) 和实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学式6) 制备标题化合物。

[1517] LCMS方法4:计算m/91496.2;实测m/9:1496.2;保留时间:1.56min。

[1518] 实施例4.5

[1519] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基),A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1520]



[1521] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K,A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-5) 和实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学式6) 制备标题

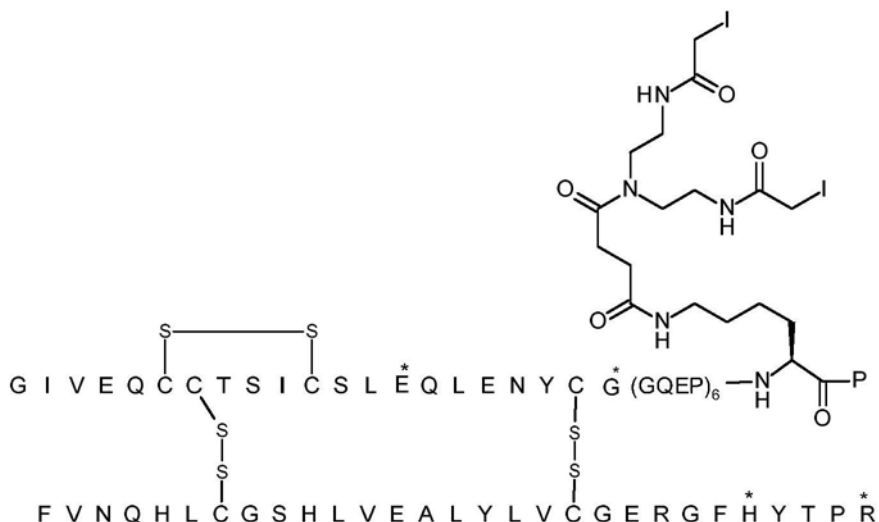
化合物。

[1522] LCMS方法6:计算m/101421.1;实测m/10:1422.1;保留时间:1.35min。

[1523] 实施例4.6

[1524] A14E,A21G,A22 (GQEP)₆,A46K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基),A47P,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1525]



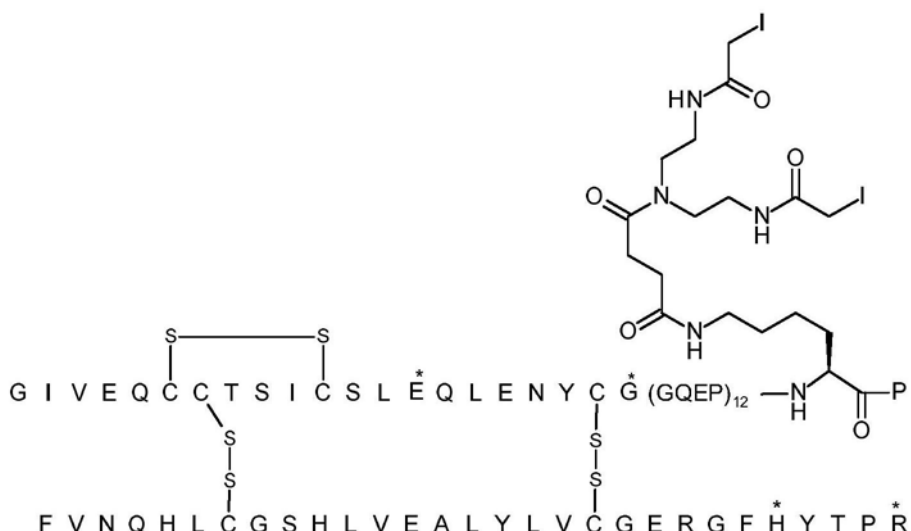
[1526] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQEP)₆,A46K,A47P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-7) 和实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学式6) 制备标题化合物。

[1527] LCMS方法5:计算m/51770.6;实测m/5:1770.6;保留时间:1.37min。

[1528] 实施例4.7

[1529] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₂,A70K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基),A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1530]



[1531] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₂,A70K,A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-6) 和实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学式6) 制备标题化合物。

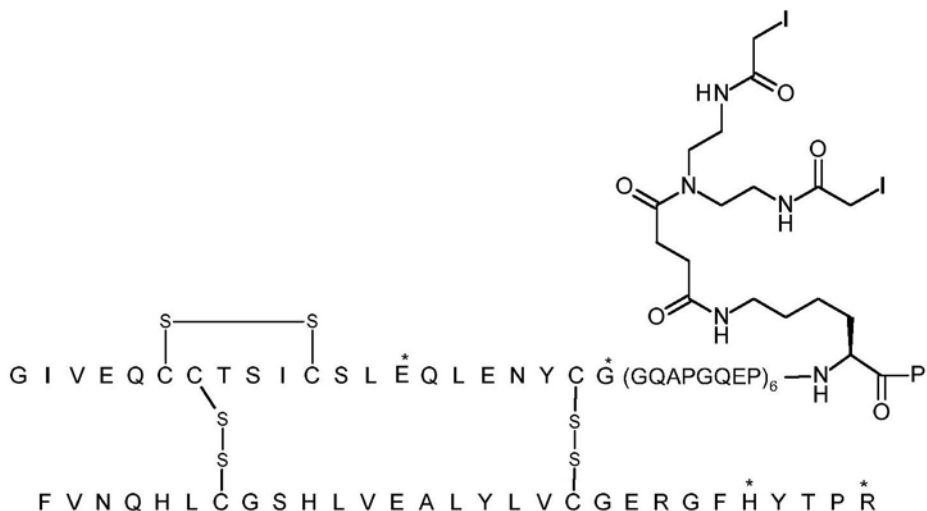
物。

[1532] LCMS方法4:计算m/61887.1;实测m/6:1887.2;保留时间:1.6min。

[1533] 实施例4.8

[1534] A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素的合成

[1535]



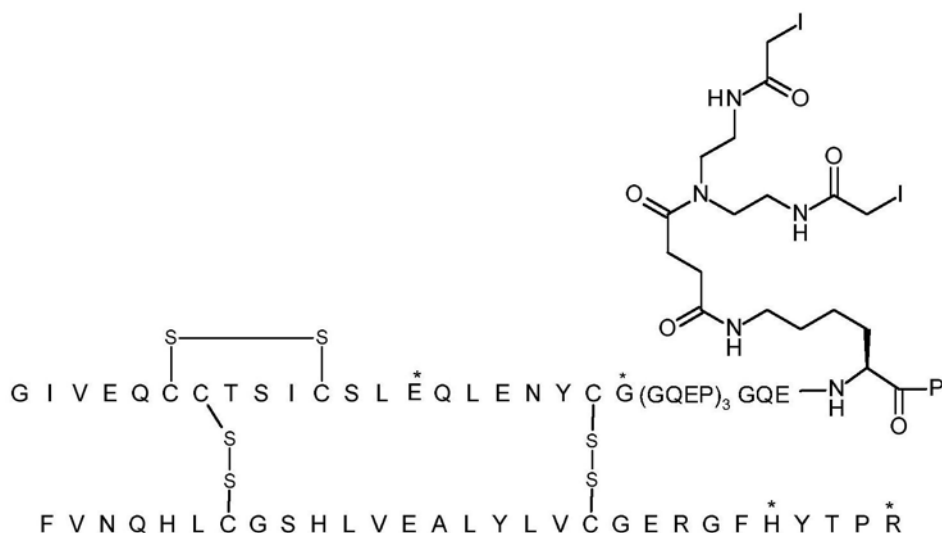
[1536] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E, A21G, A22 (GQAPGQEP)₆, A70K, A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-9) 和实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学式6) 制备标题化合物。

[1537] LCMS方法3:计算质量:10968;实测质量:10969。

[1538] 实施例4.9

[1539] A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素的合成

[1540]



[1541] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K, A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-8) 和实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学

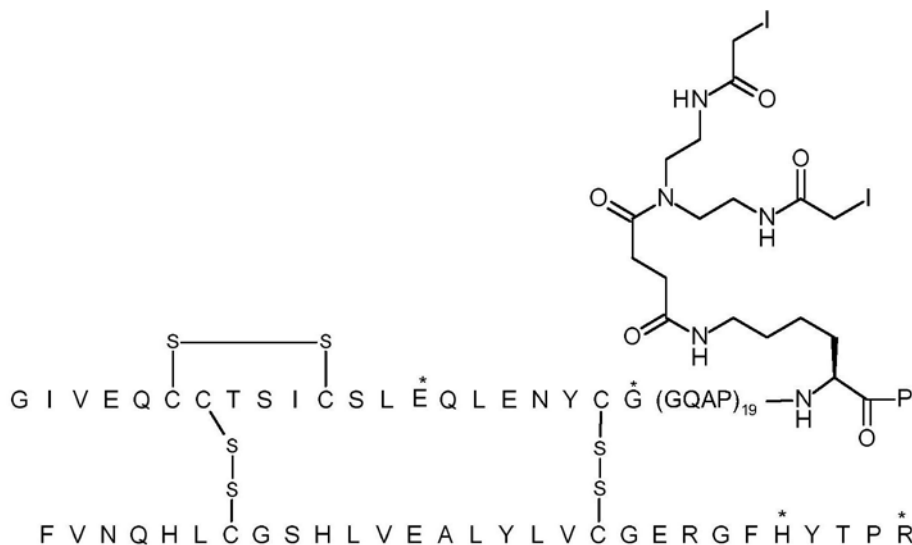
式6) 制备标题化合物。

[1542] LCMS方法3: 计算质量: 7928; 实测质量: 7928。

[1543] 实施例4.10

[1544] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素的合成

[1545]



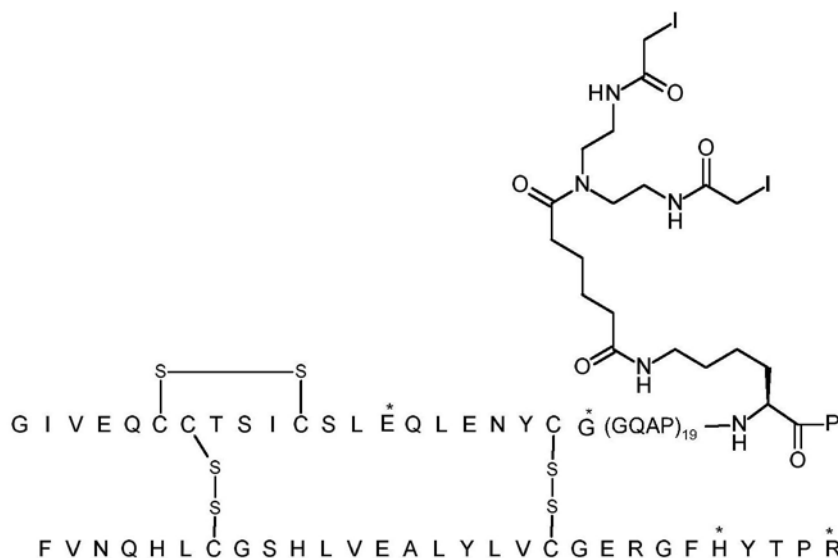
[1546] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序, 由A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-13) 和实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学式6) 制备标题化合物。

[1547] LCMS方法3: 计算质量: 13093.0; 实测质量: 13097.8。

[1548] 实施例4.11

[1549] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 6-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-6-氧代-己酰基, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素的合成

[1550]



[1551] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序, 由A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K, A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-13) 和实施例3.2的 (2,5-二氧代吡

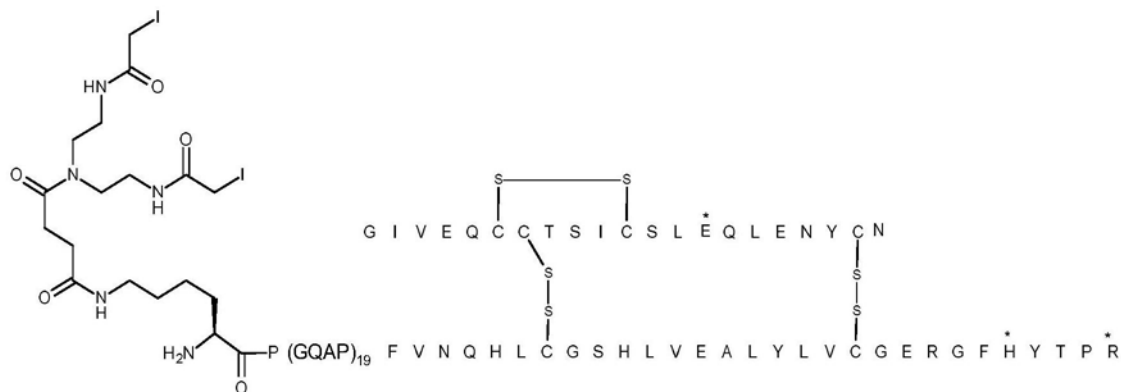
咯烷-1-基)-6-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-6-氧代-己酸酯(化学式7) 制备标题化合物。

[1552] LCMS方法3:计算质量:13122.0;实测质量:13123。

[1553] 实施例4.12

[1554] A14E,B(-78K(N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), B(-1) (GQAP) 19,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1555]



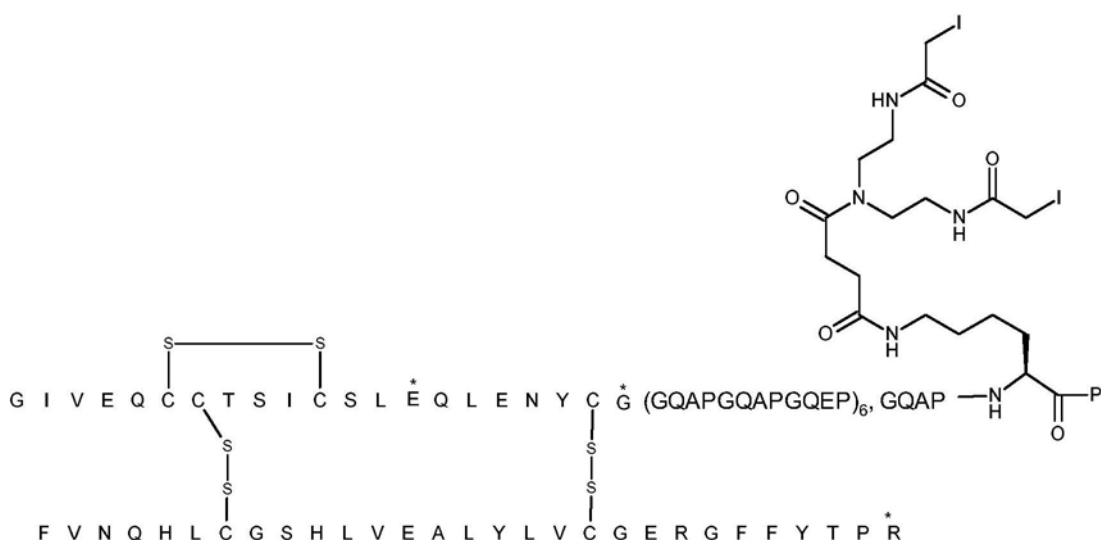
[1556] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,B(-78K),B(-77P),B(-1) (GQAP) 19,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-12) 和实施例3.1的(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯(化学式6) 制备标题化合物。

[1557] LCMS方法3:计算质量:13151.0;实测质量13151.3。

[1558] 实施例4.13

[1559] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP) 6-GQAP,A98K(N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1560]



[1561] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP) 6-GQAP,A98K,A99P,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-14) 和实施例3.1的(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯(化学式6) 制备标题化合物。

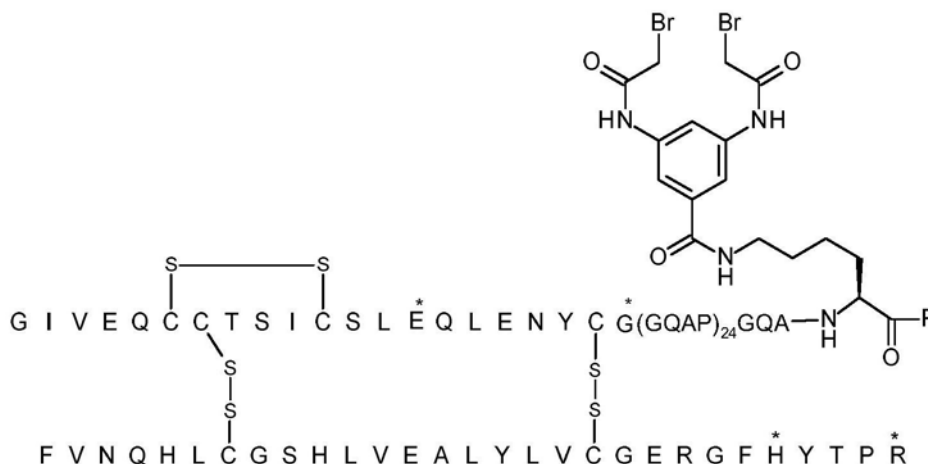
物。

[1572] LCMS方法4:计算m/4:1845.1;实测m/4:1845.8;保留时间:1.66min。

[1573] 实施例4.16

[1574] A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K (N(ε)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基),A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1575]



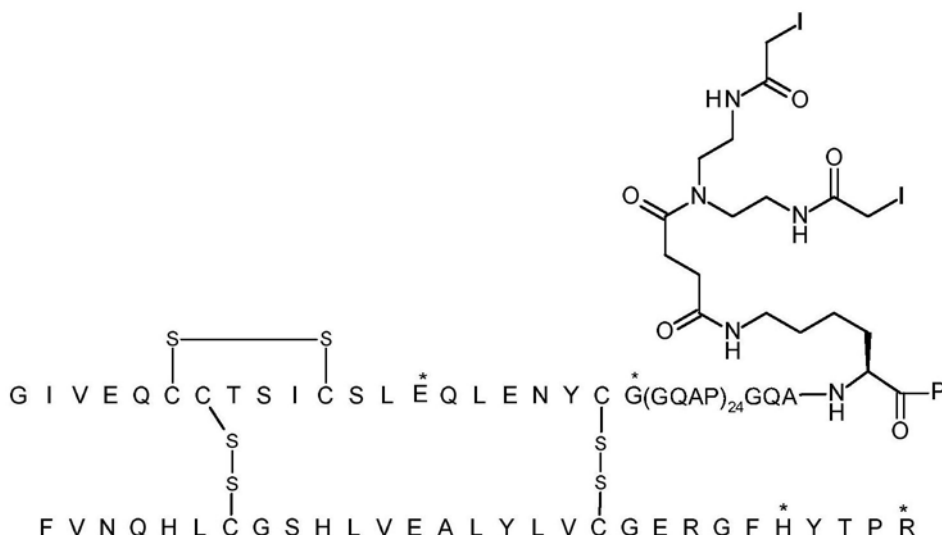
[1576] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K,A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-20) 和实施例3.5的(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯(化学式10)制备标题化合物。

[1577] LCMS方法9:计算质量:14972;实测质量:14973。

[1578] 实施例4.17

[1579] A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K (N(ε)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基),A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1580]



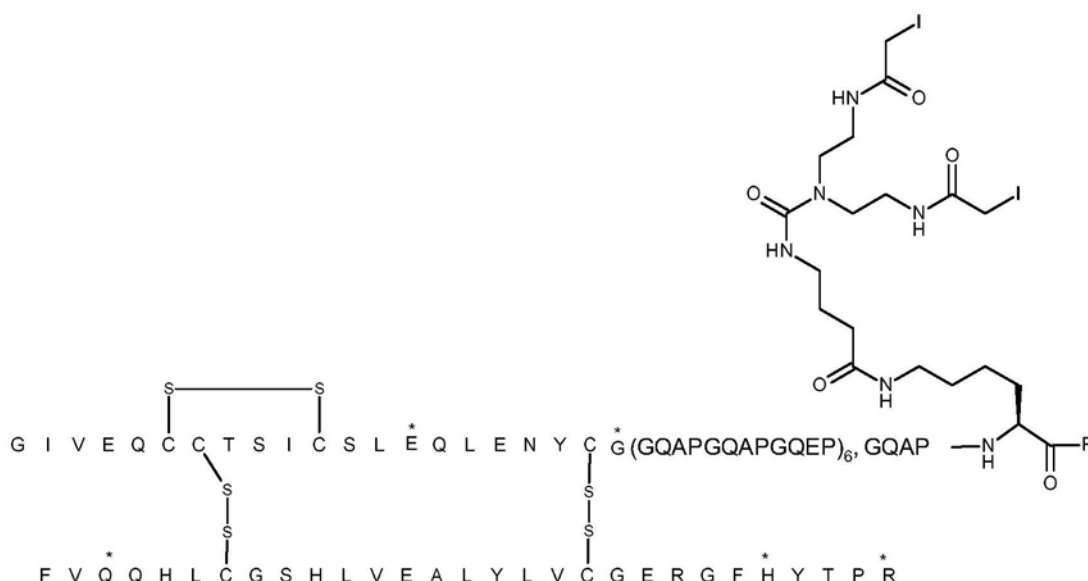
[1581] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K,A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-Ins-20) 和实施例3.1的(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酸酯(化学式6)制备标题化合物。

[1582] LCMS方法9:计算m/8:1891;实测m/81891。

[1583] 实施例4.18

[1584] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K(N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基甲酰基氨基] 丁酰基),A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1585]



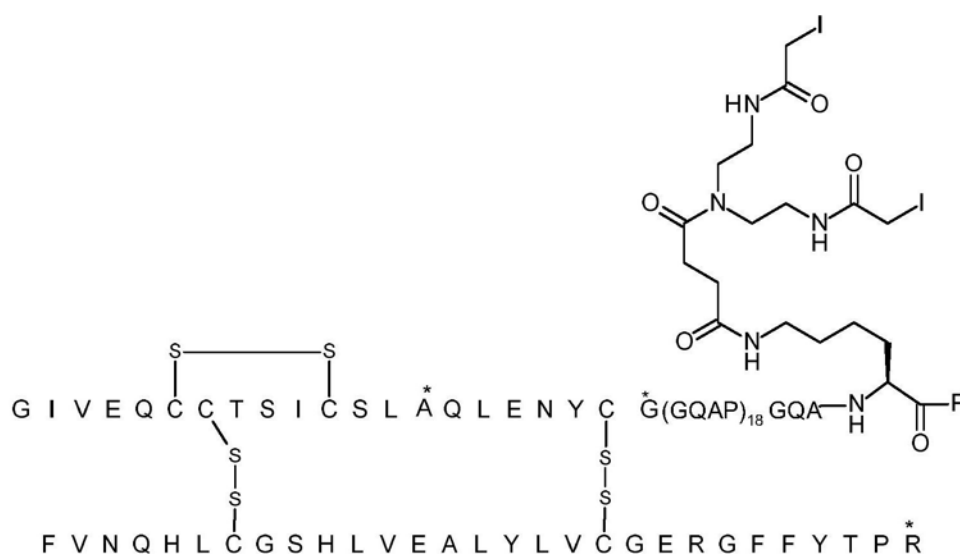
[1586] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K,A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素(OEF-Ins-3)和实施例3.4的(2,5-二氧化吡咯烷-1-基) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基甲酰基氨基] 丁酸酯(化学式9)制备标题化合物。

[1587] LCMS方法7:计算质量:13485.2实测质量13485.7。

[1588] 实施例4.19

[1589] A14A,A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K(N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基),A98P,B29R,desB30人胰岛素的合成

[1590]



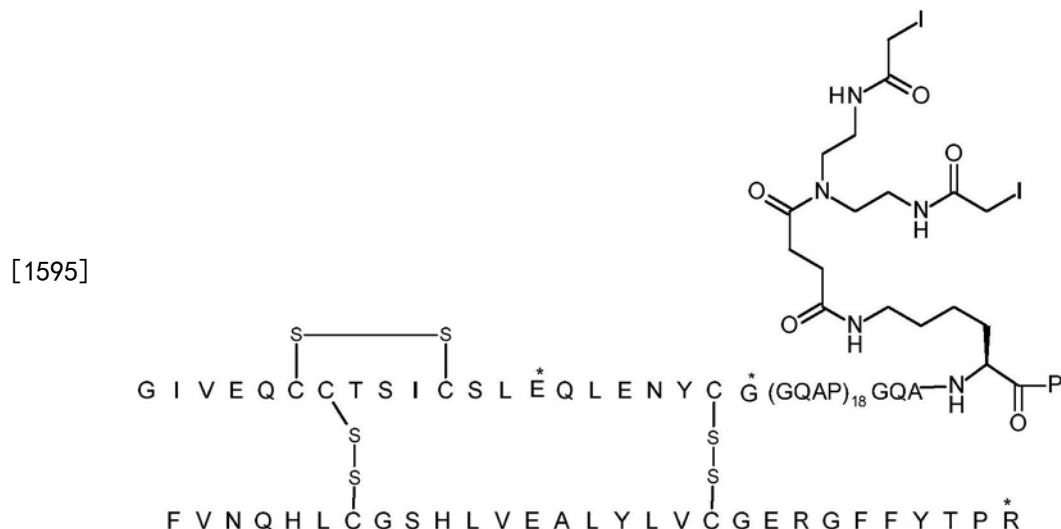
[1591] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14A,A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K,A98P,B29R,desB30人胰岛素(OEF-Ins-16)和实施例3.1的(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯(化学式6)

制备标题化合物。

[1592] LCMS方法7:计算质量:12848.8;实测质量:12949.3。

[1593] 实施例4.20

[1594] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε)-4-[双[2-(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素的合成

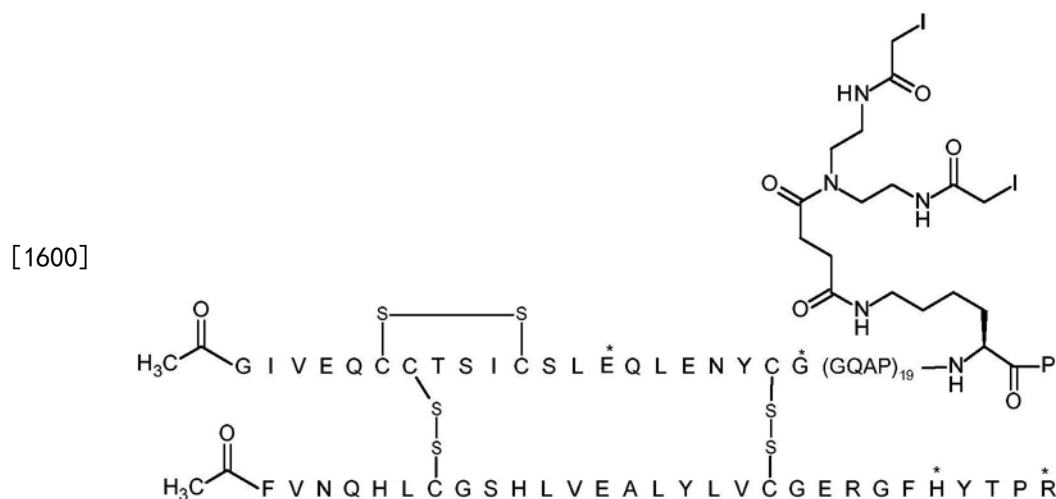


[1596] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K,A98P,B29R,desB30人胰岛素 (OEF-In_s-17) 和实施例3.1的 (2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酸酯 (化学式6) 制备标题化合物。

[1597] LCMS方法10:计算m/81626.9;实测m/8:1627;保留时间:2.18min.

[1598] 实施例4.21

[1599] A1 (N(α) 乙酰基), A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B1 (N(α) 乙酰基), B25H, B29R, desB30 人胰岛素的合成

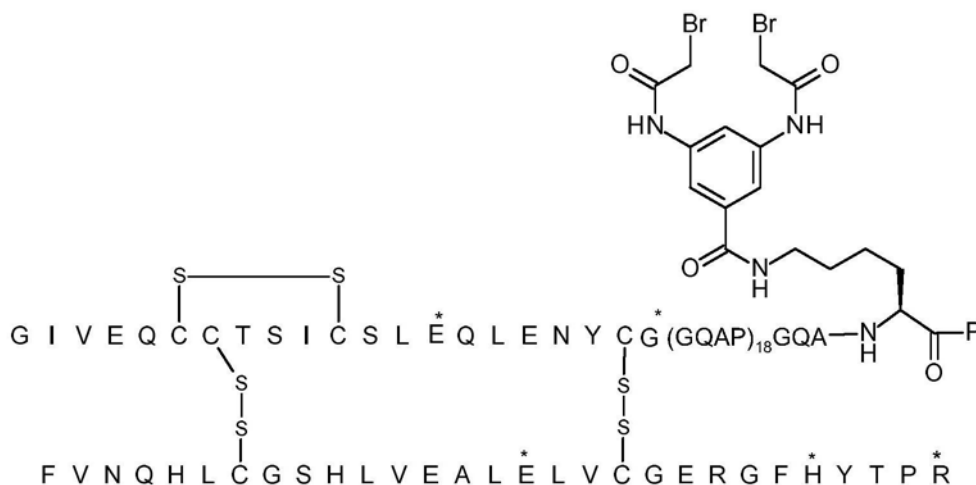


[1601] 如实施例4.1所述,通过添加乙酸酐(2当量)并在纯化前搅拌30分钟,从如实施例4.10所述制备的A14E,A21G,A22(GQAP)₁₉,A98K(N(ε)4-[双[2-(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基),A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素的粗反应混合物制备标题化合物。

[1613] 实施例4.24

[1614] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素的合成

[1615]



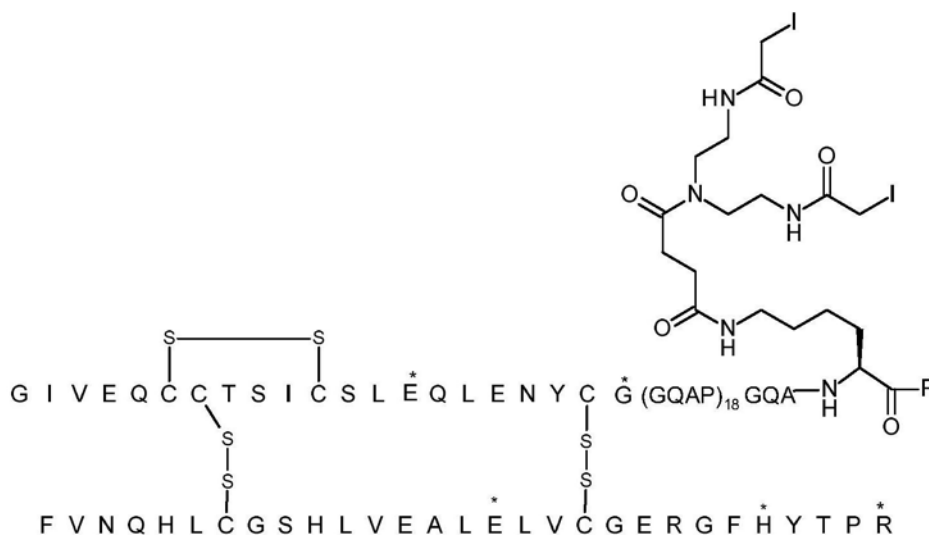
[1616] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K, A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-23) 和实施例3.5的(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯(化学式10)制备标题化合物。

[1617] LCMS方法7:计算质量:12817.7;实测质量:142828.2。

[1618] 实施例4.25

[1619] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素的合成

[1620]



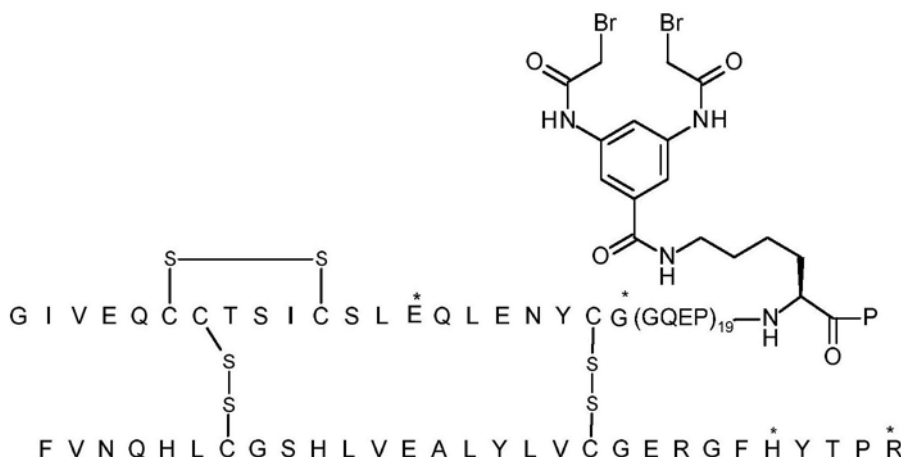
[1621] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K, A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-23) 和实施例3.1的(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酸酯(化学式6)制备标题化合物。

[1622] LCMS方法7:计算质量:12962.7;实测质量:12963.1。

[1623] 实施例4.26

[1624] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素的合成

[1625]



[1626] 按照实施例4.1描述的通用连接体-胰岛素缀合程序,由A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (OEF-Ins-1) 和实施例3.5的(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯(化学式10)制备标题化合物。

[1627] LCMS方法7:计算质量:14051.4;实测质量:14052.0。

[1628] 实施例5

[1629] 胰岛素-Fc缀合物的制备

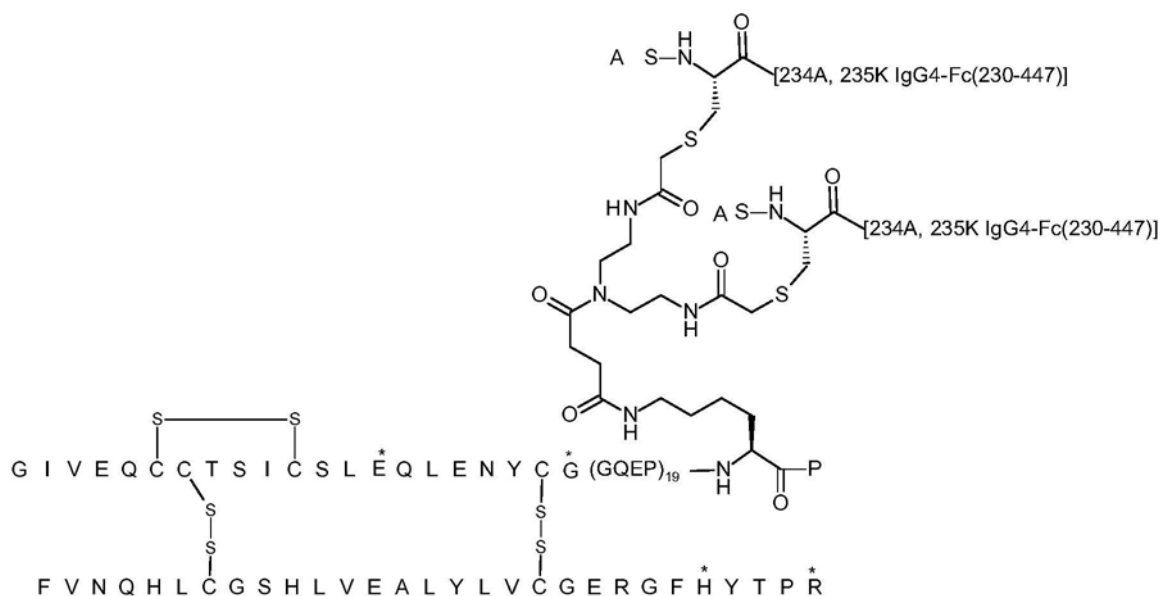
[1630] 实施例5.1和5.2中给出了代表性胰岛素-Fc缀合物的制备。除非另有说明,否则通过实施例5.1或5.2中提供的方法制备实施例5.3-5.33的胰岛素缀合物。

[1631] 实施例5.1

[1632] 通用胰岛素Fc缀合程序1

[1633] (A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K⁺, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1634]



[1635] 向20mM Tris, 25mM NaCl, pH 7.5 (160ml) 中的227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) (1600mg) 10mg/ml添加10mM EDTA (700mg)。用1N HCl调节pH至7.6。添加溶解于水中的BSPP (137mg) 并在室温下温和搅拌20小时。

[1636] 使用412ml G-25细sephadex脱盐柱将该混合物的缓冲液更换为20mM Tris, 10mM EDTA pH 7.5。

[1637] 在室温下, 向pH 7.6的洗脱合并物 (200ml 半Fc约8mg/ml) (pH 7.6) 中逐滴添加溶解于水 (13ml) 和乙腈 (2ml) 中的如实施例4.1所述制备的A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (549mg)。用2ml 1N NaOH将pH调节至7.5, 并在室温下搅拌过夜。

[1638] 将反应物用A缓冲液稀释1+5, 用1N NaOH将pH调节至8.5, 电导率为1.33mS/cm, 并通过阴离子交换进行纯化。

[1639] 柱: 140ml Poros 50HQ

[1640] A缓冲液: 20mM Tris, pH 9.0 (0.27mS/cm)

[1641] B缓冲液: 20mM Tris, 500mM NaCl, pH 9.0 (48.1mS/cm)

[1642] 流速: 6.5CV/h

[1643] 梯度, 分步: 0-40%B超过3CV, 40-60%B超过15CV, 60-100%B超过3CV, 100%B超过3CV。

[1644] 分级分离: 25mL/级分

[1645] 加样: 6.5CV/h

[1646] 浓缩化合物合并物并通过TFF脱盐到MilliQ H₂O中

[1647] 系统: Millipore Labscale

[1648] 膜: Millipore Pellicon XL

[1649] 截断值: 10kDa

[1650] 进料压力: 1.4巴

[1651] 滞留压力: 0.6巴

[1652] TOV: 5

[1653] 然后将产物冻干。

[1654] 总产率: 35%

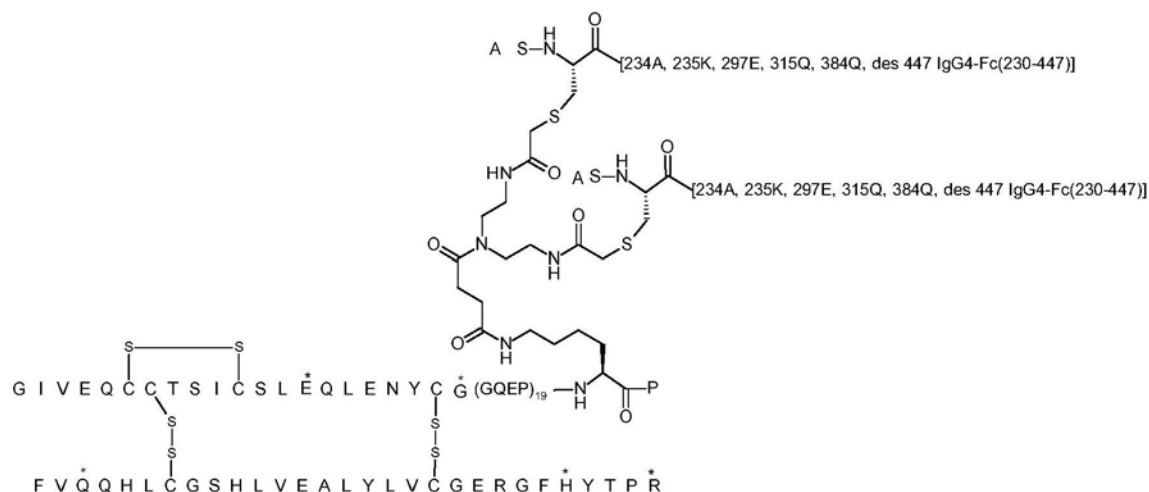
[1655] LCMS方法1: 计算质量: 63562.0; 实测质量: 63562.0。

[1656] 实施例5.2

[1657] 通用胰岛素Fc缀合 (程序2)

[1658] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K⁺, A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1659]



[1660] 用40mM NH_4HCO_3 、10mM EDTA二钠盐 (pH 8.5) (156ml) 稀释227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) (0.03312mmol, 1638mg, 156.8ml) 在20mM Tris, 30mM NaCl, pH 7.6中的溶液。在40mM NH_4HCO_3 、10mM EDTA二钠盐pH 8.5 (1.0当量, Mw 286.62g/mol, 9.49mg, 1.07ml) 中的8.83mg/ml TCEP-溶液。将所得混合物在室温下在氮气流下温和搅拌2小时。缓慢添加溶解于40mM NH_4HCO_3 、10mM EDTA二钠盐pH 8.5、20% MeCN (10.65ml) 中的如实施例4.5所述制备的A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 (470mg)。将该混合物在室温下放置过夜。用水 (500ml) 稀释该反应物, 用1N NaOH将pH调节至8.8, 电导率为1.95mS/cm, 并通过阴离子交换进行纯化。

[1661] 柱: 40ml Poros 50HQ

[1662] A缓冲液: 20mM TRIS, pH 9.0 (1.5mS/cm)

[1663] B缓冲液: 20mM TRIS, 500mM NaCl, pH 9.0 (44mS/cm)

[1664] 流速: 35ml/min

[1665] 梯度, 分步: 0-25%B超过1CV, 25%B 1CV, 25-60%B超过6CV

[1666] 分级分离: 在280nm处手动操作, 开始于25%B缓冲液1CV。

[1667] 加样: 35ml/min

[1668] 将化合物合并物冻干, 然后缓冲液交换至水。

[1669] 柱: Desalting柱, 400ml Sephadex G-25fine

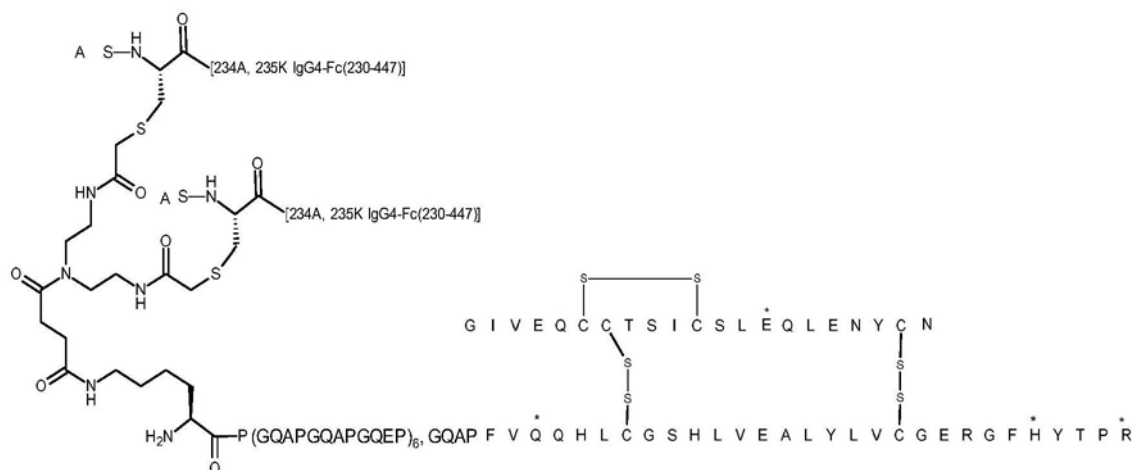
[1670] 将产品合并物冻干。产量1.0g (47%)

[1671] LCMS方法3: 计算质量: 63405.8; 实测质量: 63406.5。

[1672] 实施例5.3

[1673] A14E, B(-78K⁺), B(-77P), B(-1) (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1674]



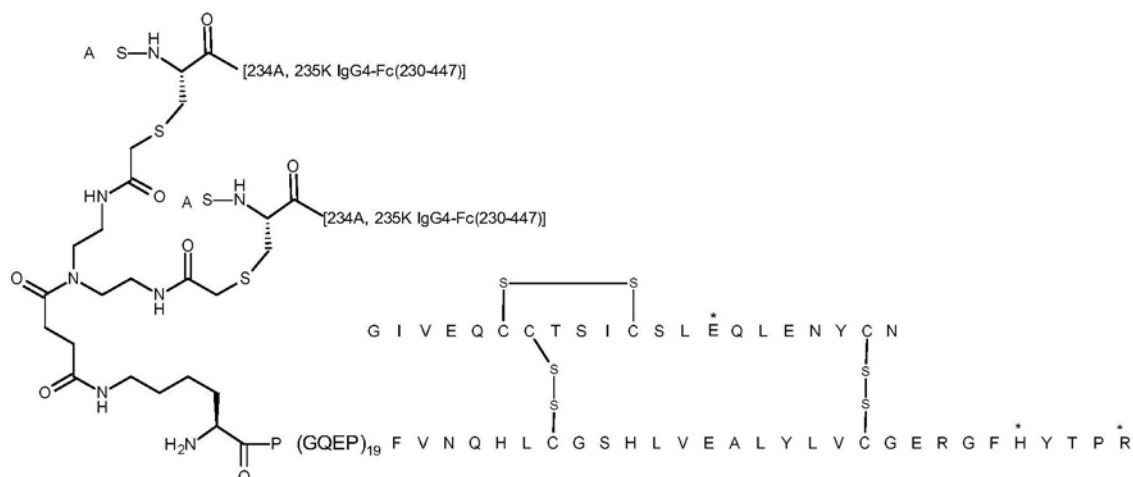
[1675] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.2所述制备的A14E, B(-78K(N(ε)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), B(-1) (GQAPGQAPGQEP)6-GQAP, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K hIgG4-Fc(228-447) (Fc9) 合成标题化合物。

[1676] LCMS方法1:计算质量:62878.7;实测质量:62879.3。

[1677] 实施例5.4

[1678] A14E, B(-78K⁺), B(-77P), B(-1) (GQEP)19, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc(228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1679]



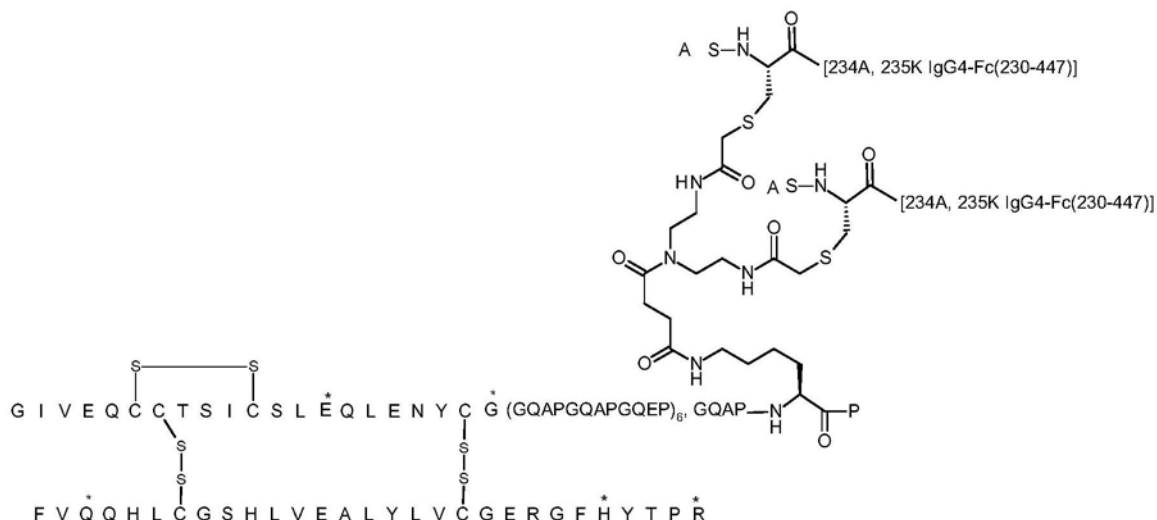
[1680] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.3所述制备的A14E, B(-78K(N(ε)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), B(-1) (GQEP)19, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K hIgG4-Fc(228-447) (Fc9) 合成标题化合物。

[1681] LCMS方法3:计算质量:63619.1;实测质量:63618.3。

[1682] 实施例5.5

[1683] A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)6-GQAP, A98K⁺, A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰

胰岛素/(227A,234A,235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备
[1684]



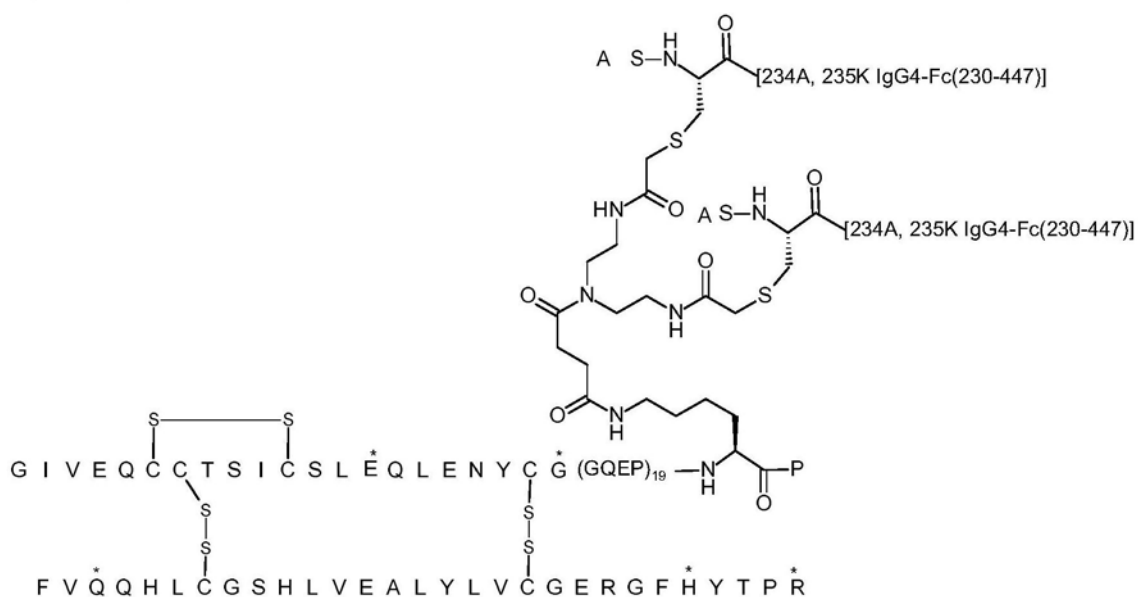
[1685] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.4所述制备的A14E, A21G, A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) 合成标题化合物。

[1686] LCMS方法3:计算质量:62821.6;实测质量:62822.1。

[1687] 实施例5.6

[1688] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K[^], A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛素/(227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1689]



[1690] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.5所述制备的A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基),

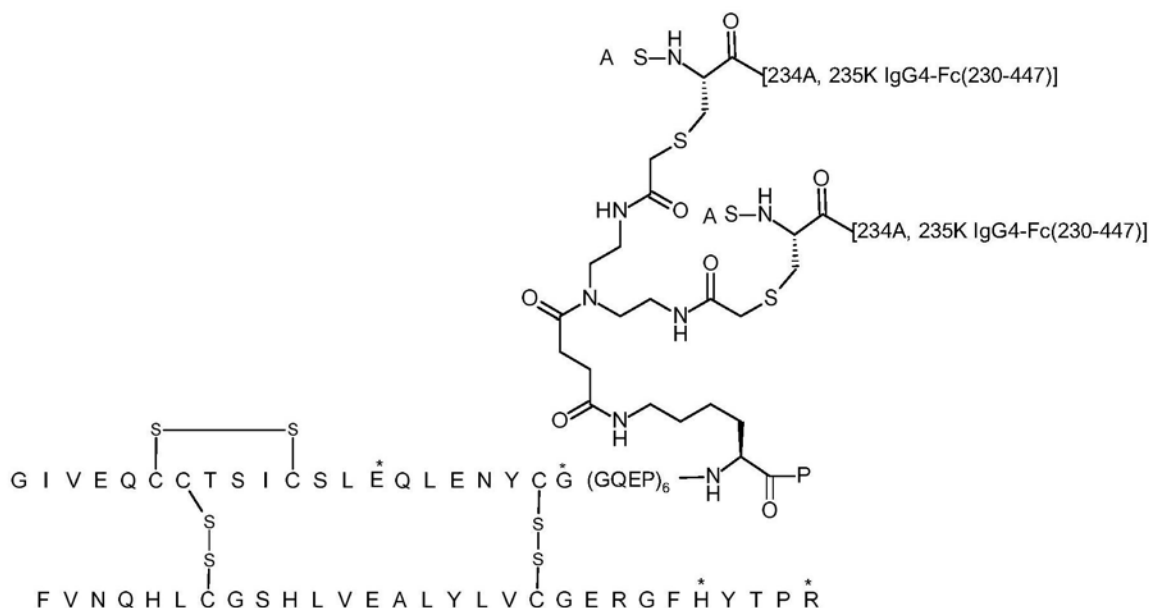
A99P, B3Q, B25H, B29R, desB30人胰岛和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) 合成标题化合物。

[1691] LCMS方法3: 计算质量: 63576.0; 实测质量: 63575.8。

[1692] 实施例5.7

[1693] A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K[^], A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1694]



[1695] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1, 由如实施例4.6所述制备的A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) 合成标题化合物。

[1696] LCMS方法3: 计算质量: 58213.7; 实测质量: 58213.2。

[1697] 实施例5.8

[1698] A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₂, A70K[^], A71P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

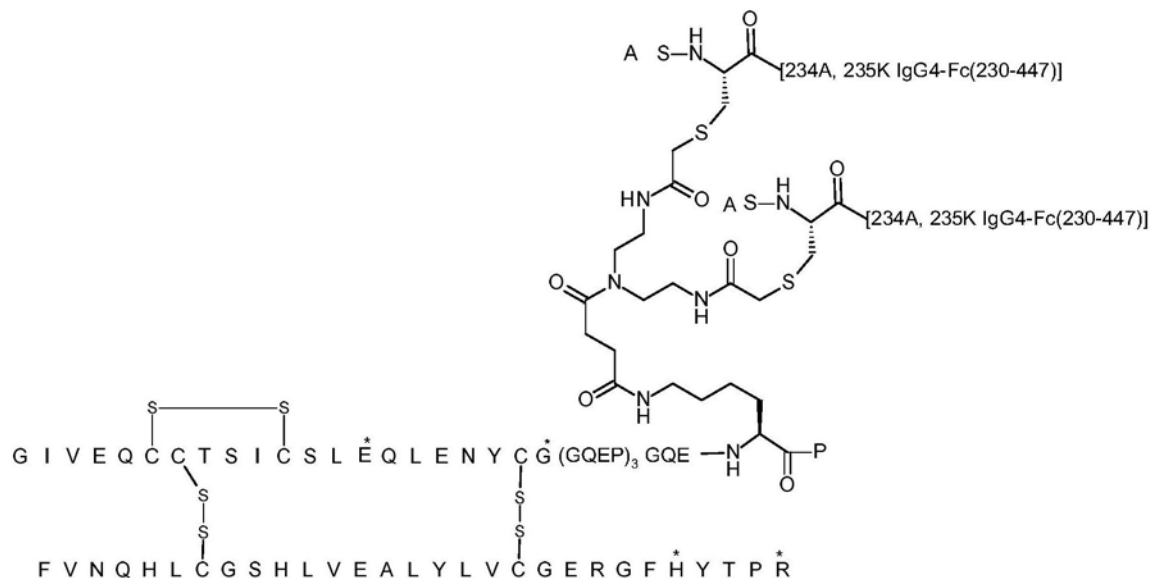
(228-447) (Fc9) 合成标题化合物。

[1706] LCMS方法3:计算质量:60334.0;实测质量:60336.5。

[1707] 实施例5.10

[1708] A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K[^], A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1709]



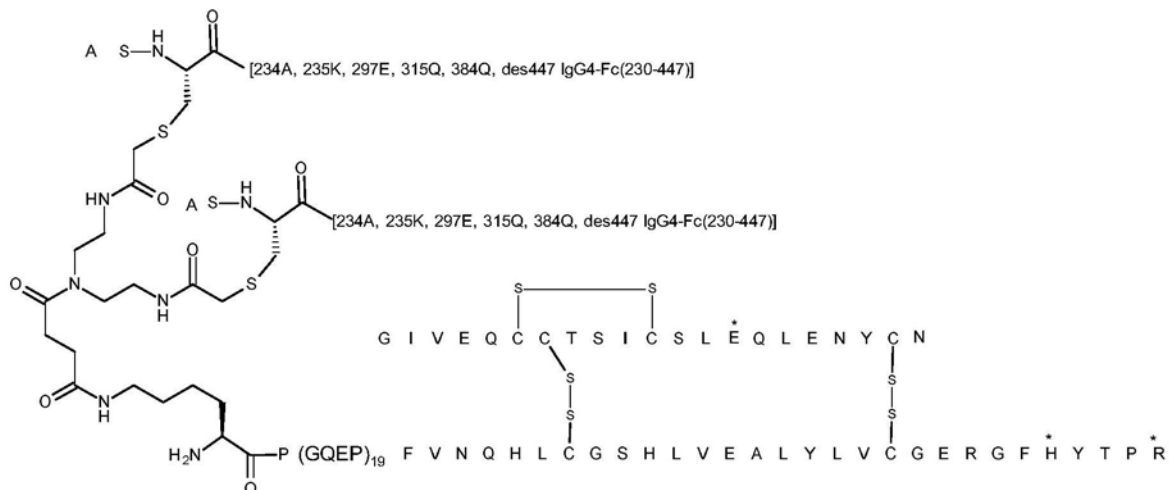
[1710] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.9所述制备的A14E, A21G, A22 (GQEP)₃, A34G, A35Q, A36E, A37K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A38P, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) 合成标题化合物。

[1711] LCMS方法3:计算质量:57293.7;实测质量:57295.8。

[1712] 实施例5.11

[1713] A14E, B(-78K[^]), B(-77P), B(-1) (GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1714]



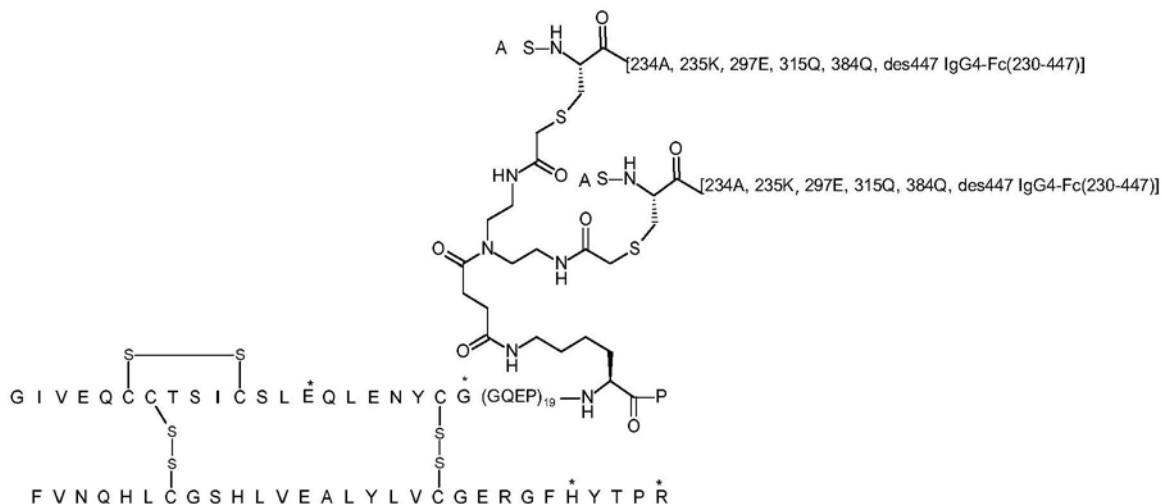
[1715] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.3所述制备的A14E, B(-78K(N(ε)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)), B(-77P), B(-1)(GQEP)₁₉, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc(228-447)(Fc15)合成标题化合物。

[1716] LCMS方法3:计算质量:63448.9;实测质量:63451.6。

[1717] 实施例5.12

[1718] (A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K⁺,A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素)/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1719]



[1720] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.1所述制备的A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1721] LCMS方法3:计算质量:63391.8;实测质量:63394.4。

[1722] 实施例5.13

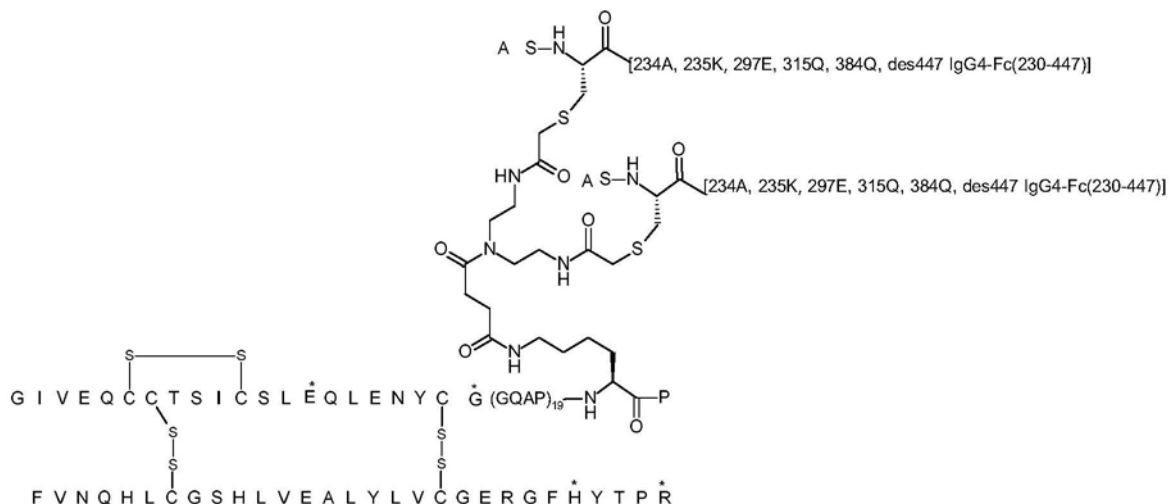
315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1731] LCMS方法3:计算质量:60164.0;实测质量:60165.6。

[1732] 实施例5.15

[1733] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K⁺, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1734]



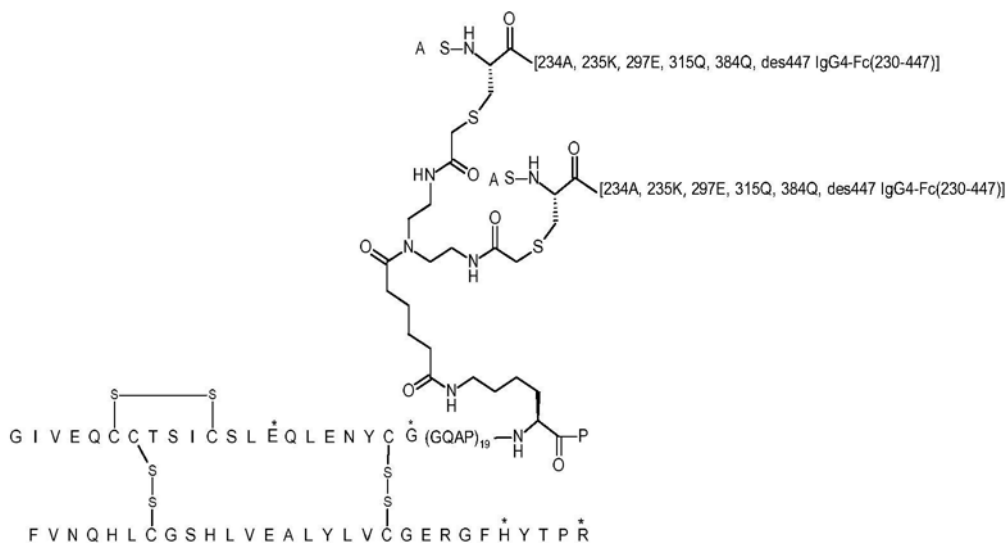
[1735] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.10所述制备的A14E,A21G,A22(GQAP)₁₉,A98K(N(ε)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基),A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc(228-447)(Fc15)合成标题化合物。

[1736] LCMS方法3:计算质量:62289.2;实测质量:62292.0。

[1737] 实施例5.16

[1738] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K⁺, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 6-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-6-氧代-己酰基缀合物的制备

[1739]



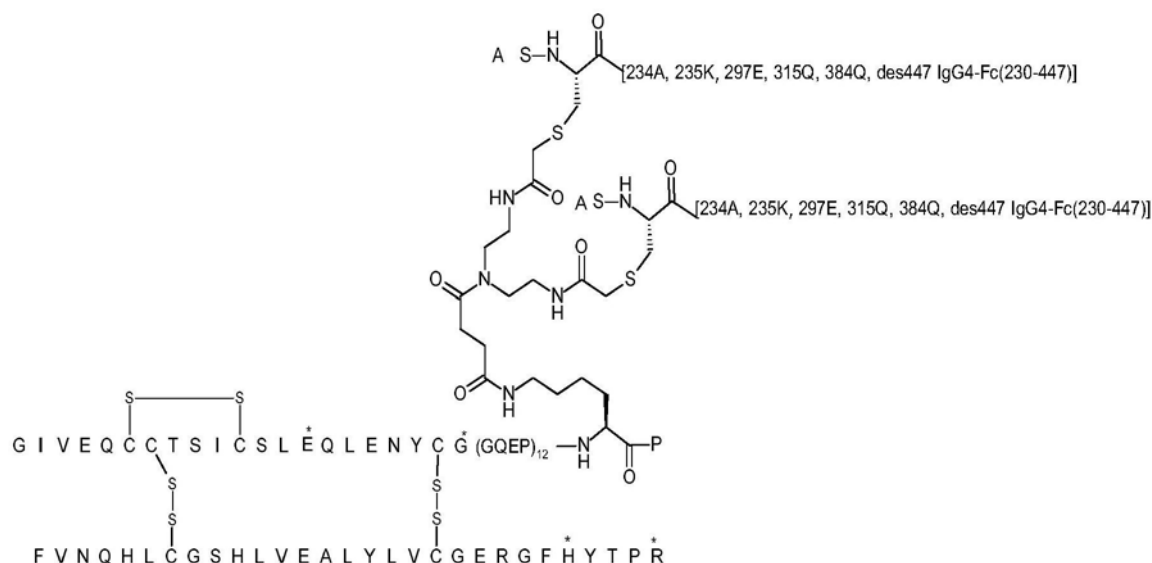
[1740] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.11所述制备的A14E,A21G,A22 (GQAP)₁₉,A98K (N(ε) 6-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-6-氧代-己酰基,A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1741] LCMS方法3:计算质量:62317.3;实测质量:62323.8。

[1742] 实施例5.17

[1743] A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₂,A70K[^],A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素/ (227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1744]

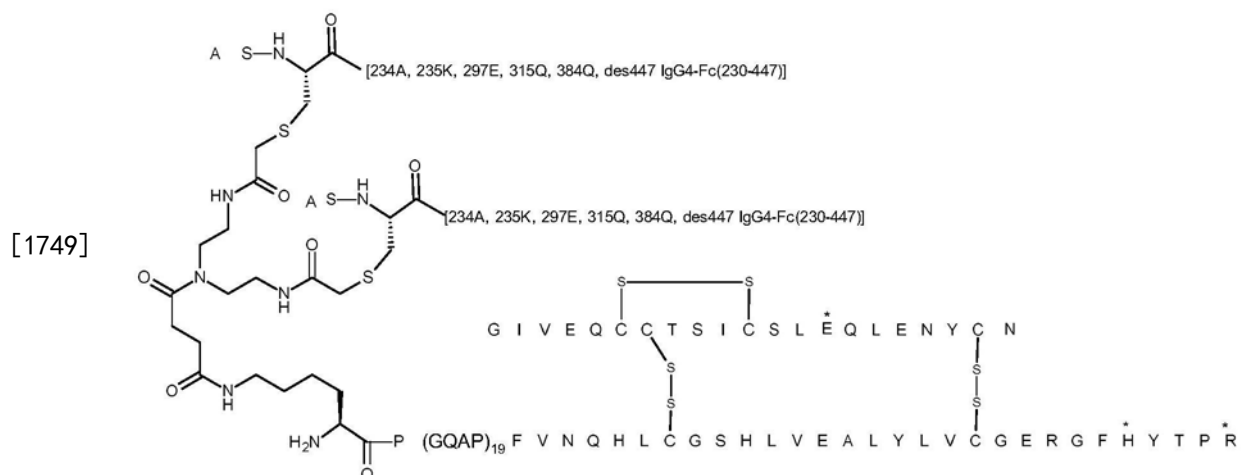


[1745] 按照实施例5.2描述的通用胰岛素Fc缀合程序2,由如实施例4.7所述制备的A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₂,A70K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基),A71P,B25H,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1746] LCMS方法3:计算质量:60511.9;实测质量:60517.7。

[1747] 实施例5.18

[1748] A14E,B (-78K[^]),B (-77P),B (-1) (GQAP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素/ (227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备



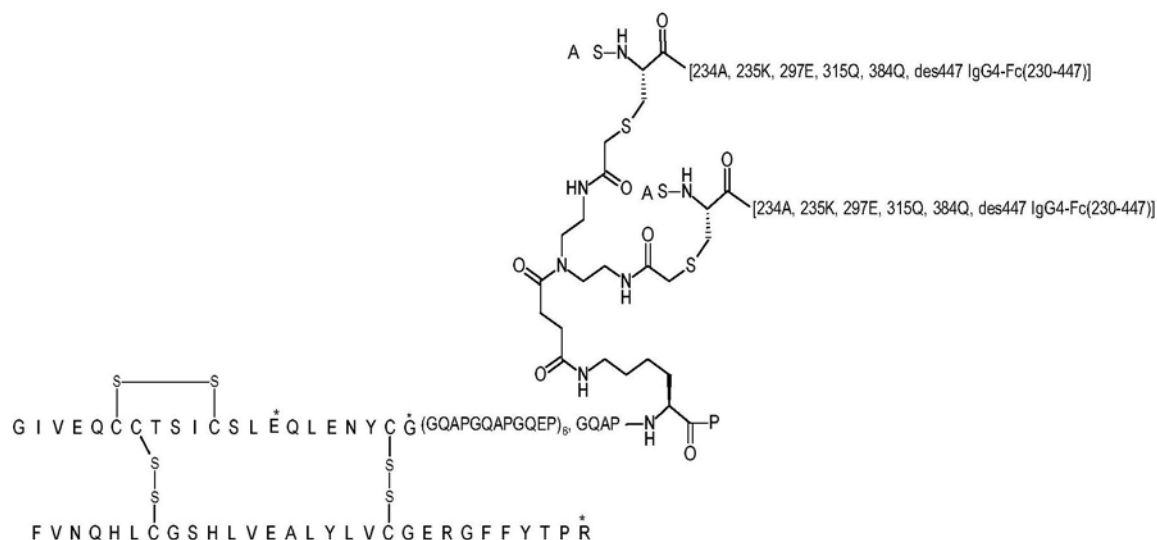
[1750] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.12所述制备的A14E,B(-78K(N(ε)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基)),B(-77P),B(-1)(GQAP)₁₉,B25H,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc(228-447)(Fc15)合成标题化合物。

[1751] LCMS方法3:计算质量:62346.3;实测质量:62348。

[1752] 实施例5.19

[1753] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K⁺,A99P,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1754]



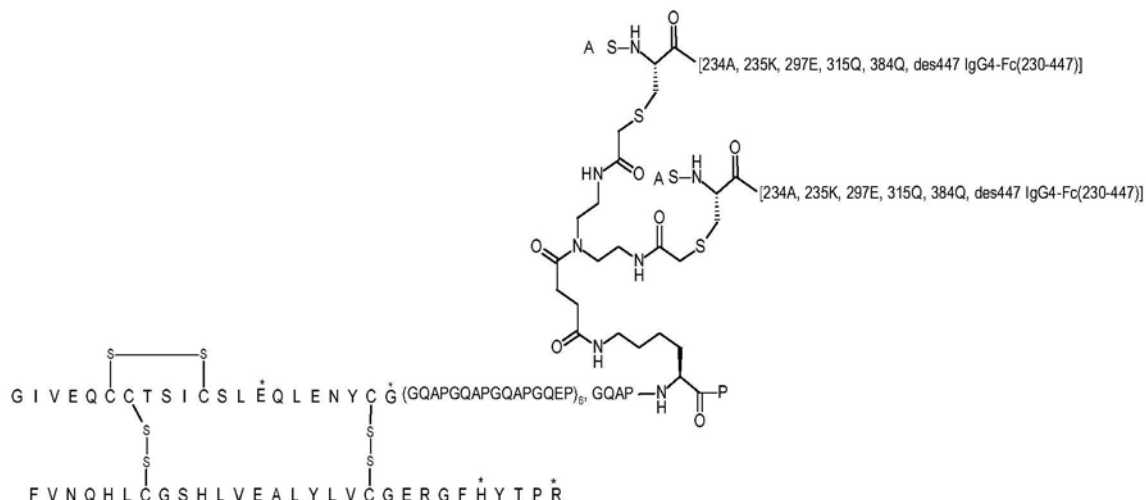
[1755] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.13所述制备的A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K(N(ε)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基),A99P,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc(228-447)(Fc15)合成标题化合物。

[1756] LCMS方法3:计算质量:62647.4;实测质量:62649.7。

[1757] 实施例5.20

[1758] A14E,A21G,A22(GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A122K⁺,A123P,B25H,B29R,desB30人

胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备
[1759]



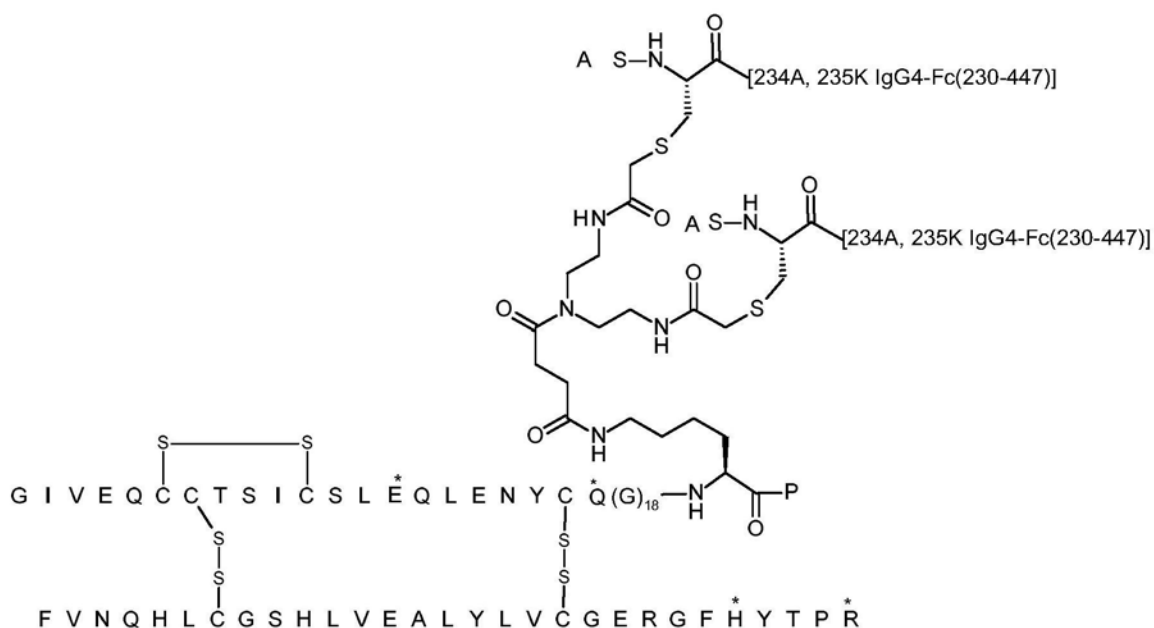
[1760] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.14所述制备的A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A122K(N(ε)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基),A123P,B25H,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc(228-447)(Fc15)合成标题化合物。

[1761] LCMS方法3:计算质量:64757.7;实测质量:64757.5。

[1762] 实施例5.21

[1763] A14E,A21Q,A22(G)₁₈,A40K⁺,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,

[1764] 234A,235K hIgG4-Fc(228-447))4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备
[1765]



[1766] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.15所述制备的A14E,A21Q,A22(G)₁₈,A40K(N(ε)4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基

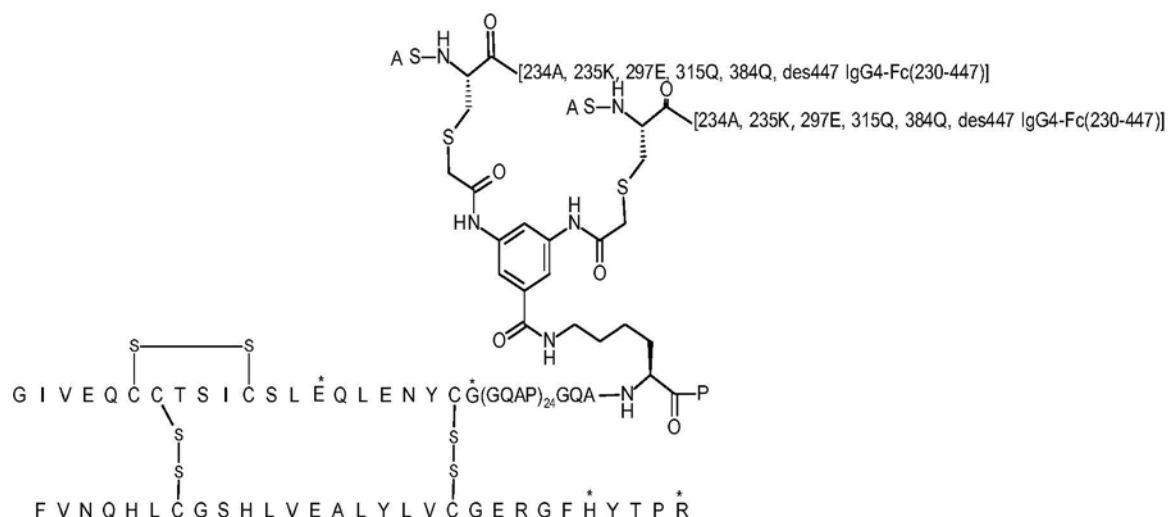
基), B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K hIgG4-Fc (228-447) (Fc9) 合成标题化合物。

[1767] LCMS方法3: 计算质量: 56746.1; 实测质量: 56750.1。

[1768] 实施例5.22

[1769] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3, 5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物的制备

[1770]



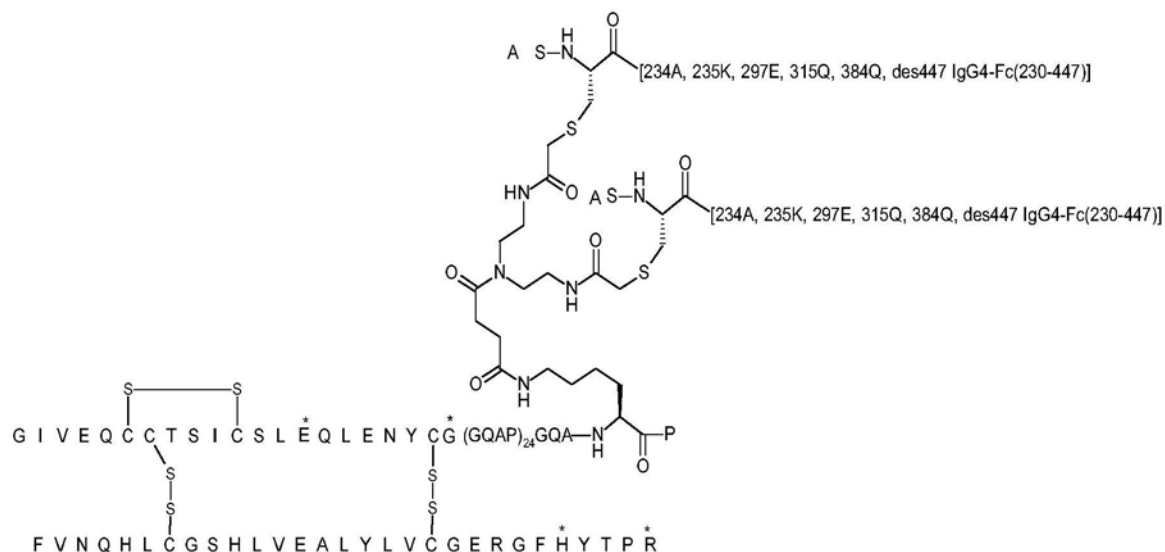
[1771] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1, 由如实施例4.16所述制备的A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K (N(ε) 3, 5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1772] LCMS方法10: 计算质量: 64261; 实测质量: 64263。

[1773] 实施例5.23

[1774] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₂₄, A118G, A119Q, A120A, A121K[^], A122P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1775]



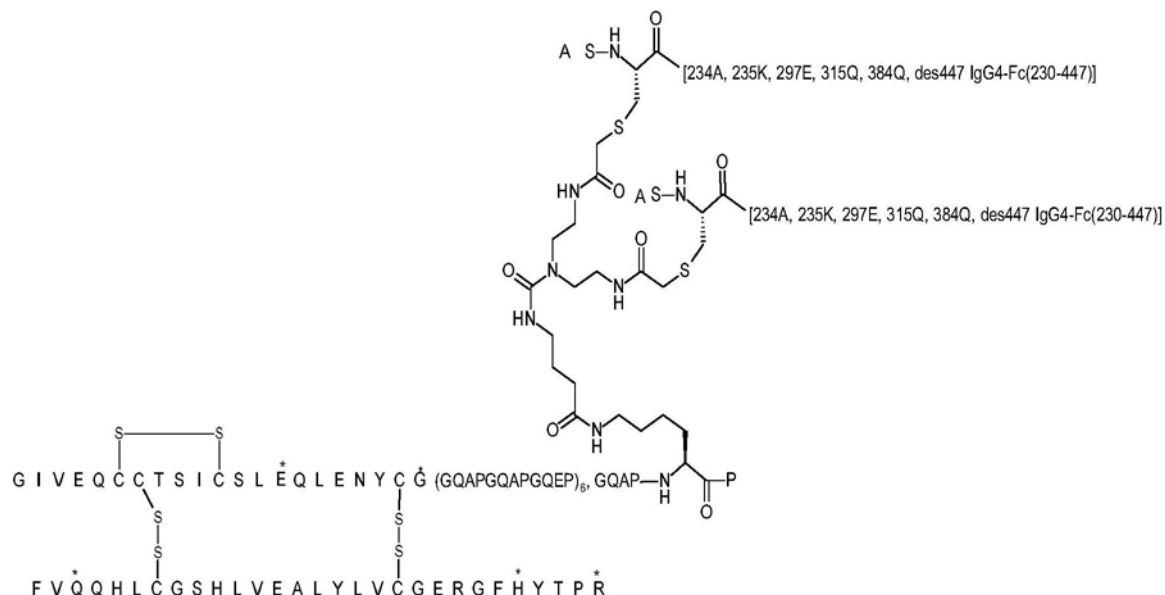
[1776] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.17所述制备的A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基),A122P,B25H,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1777] LCMS方法10:计算质量:64312;实测质量:64322。

[1778] 实施例5.24

[1779] A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K⁺,A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素/(227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基甲酰基氨基] 丁酰基缀合物的制备

[1780]



[1781] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1,由如实施例4.18所述制备的A14E,A21G,A22 (GQAPGQAPGQEP)₆-GQAP,A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基甲酰基氨基] 丁酰基),A99P,B3Q,B25H,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的

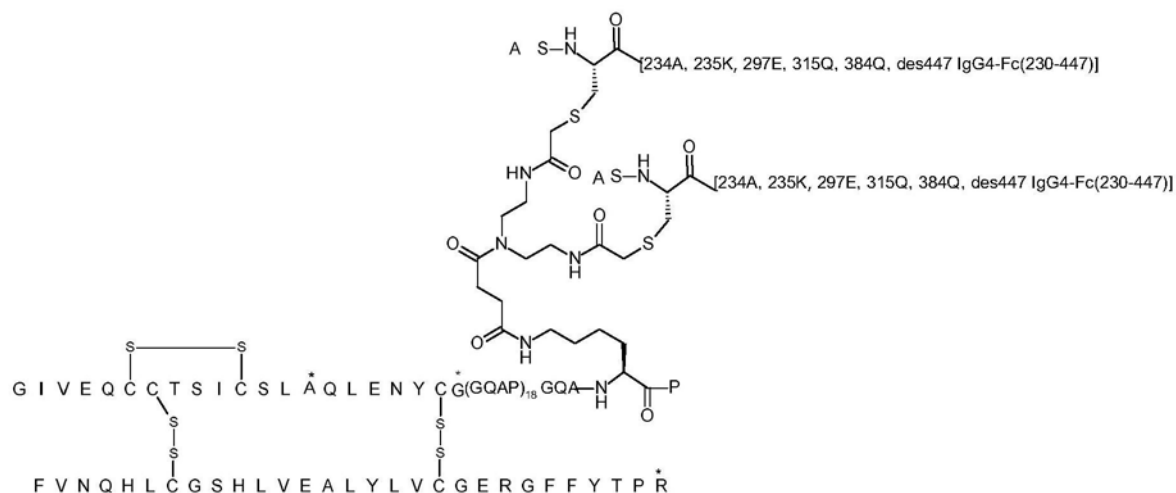
227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1782] LCMS方法3: 计算质量: 62680.4; 实测质量: 62682.8。

[1783] 实施例5.25

[1784] (A14A, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K⁺, A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1785]



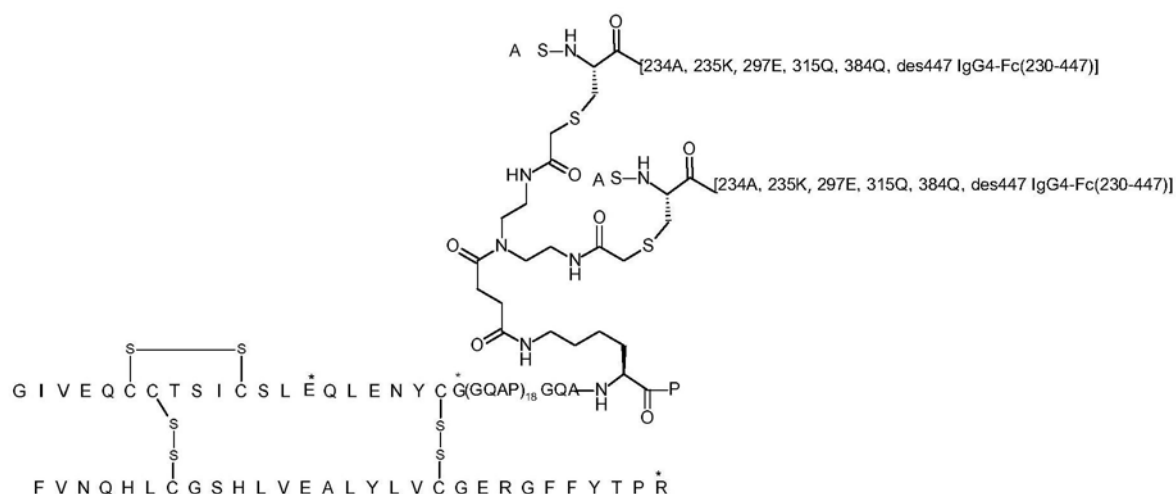
[1786] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1, 由如实施例4.19所述制备的 A14A, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的 227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1787] LCMS方法3: 计算质量: 62144.1; 实测质量: 62143.9。

[1788] 实施例5.26

[1789] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K⁺, A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1790]



[1791] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1, 由如实施例4.20所述制备的

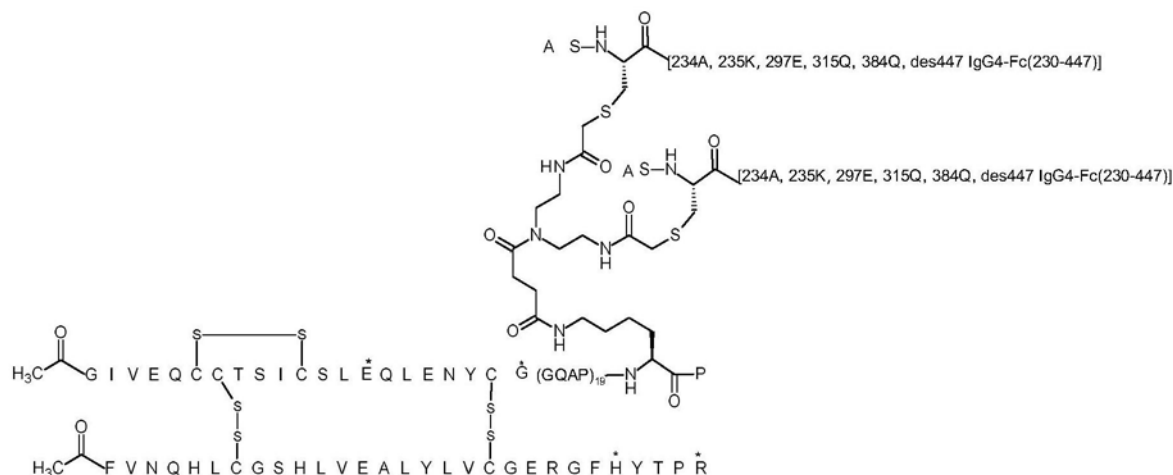
A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1792] LCMS方法10: 计算质量: 62202; 实测质量: 62205。

[1793] 实施例5.27

[1794] (A1 (N(α) 乙酰基), A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K[^], A99P, B1 (N(α) 乙酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1795]



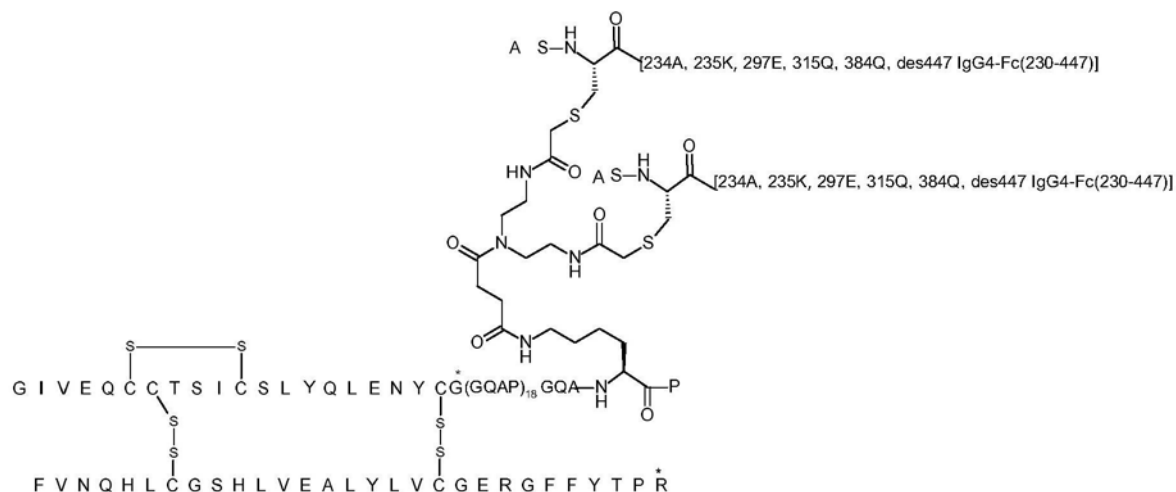
[1796] 按照实施例5.1描述的通用胰岛素Fc缀合程序1, 由如实施例4.21所述制备的A1 (N(α) 乙酰基), A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₉, A98K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基), A99P, B1 (N(α) 乙酰基), B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1797] LCMS方法10: 计算质量: 62373.3; 实测质量: 623376.5。

[1798] 实施例5.28

[1799] (A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1800]



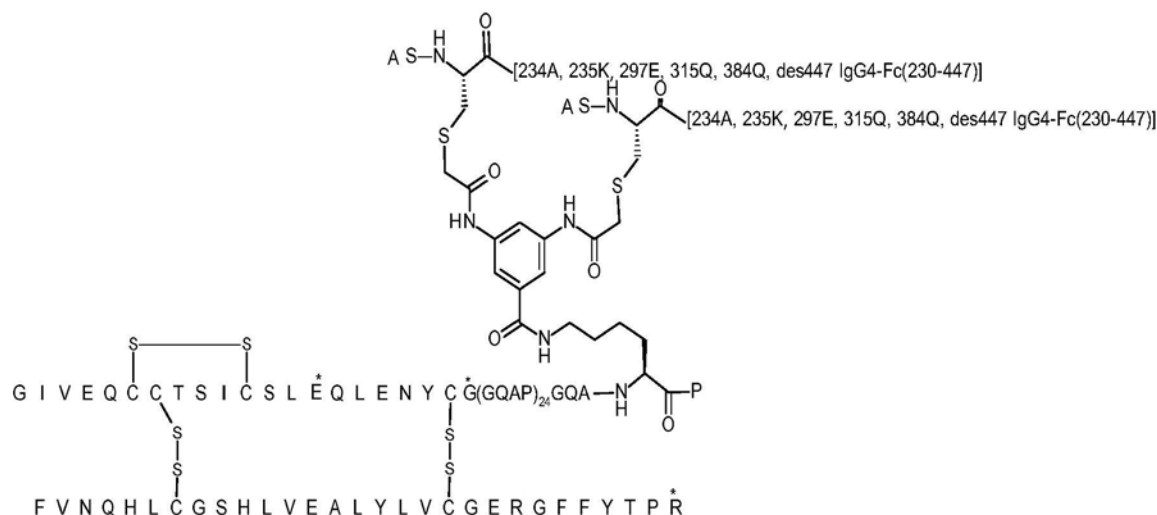
[1801] 按照实施例5.2描述的通用胰岛素Fc缀合程序2,由如实施例4.22所述制备的A21G,A22 (GQAP)₁₈,A94G,A95Q,A96A,A97K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基) 氨基] 乙基] 氨基]-4-氧代-丁酰基),A98P,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1802] LCMS方法3:计算质量:62236.2;实测质量:62338.6。

[1803] 实施例5.29

[1804] (A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K[^],A122P,B29R,desB30人胰岛素) / (227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基) 氨基] 苯甲酰基缀合物的制备

[1805]



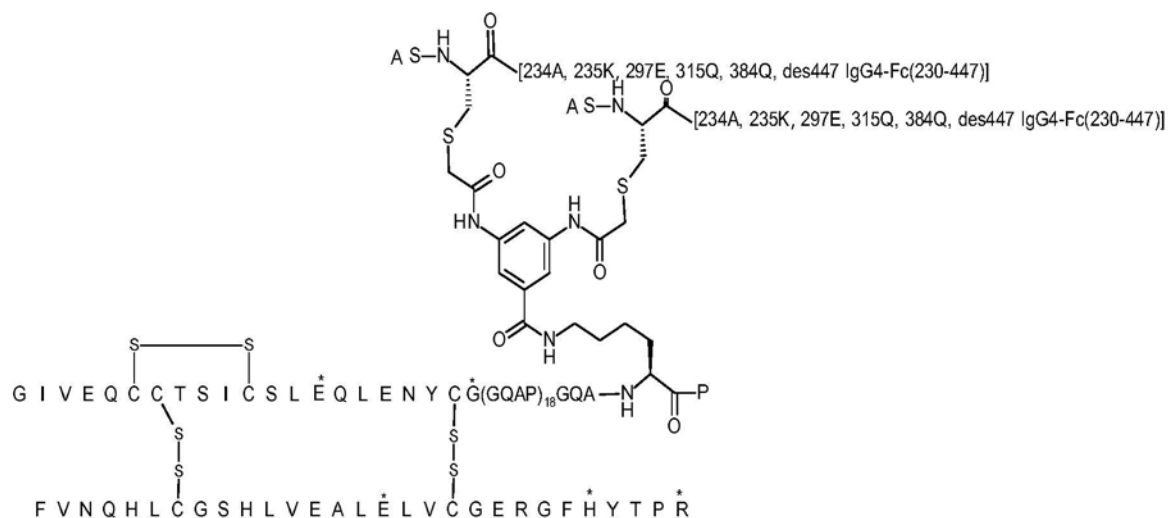
[1806] 按照实施例5.2描述的通用胰岛素Fc缀合程序2,由如实施例4.23所述制备的A14E,A21G,A22 (GQAP)₂₄,A118G,A119Q,A120A,A121K (N(ε) 3,5-双[(2-溴乙酰基) 氨基] 苯甲酰基),A122P,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A,234A,235K,297E,315Q,384Q,des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1807] LCMS方法3:计算质量:64271.3;实测质量:64273.7。

[1808] 实施例5.30

[1809] A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物的制备

[1810]



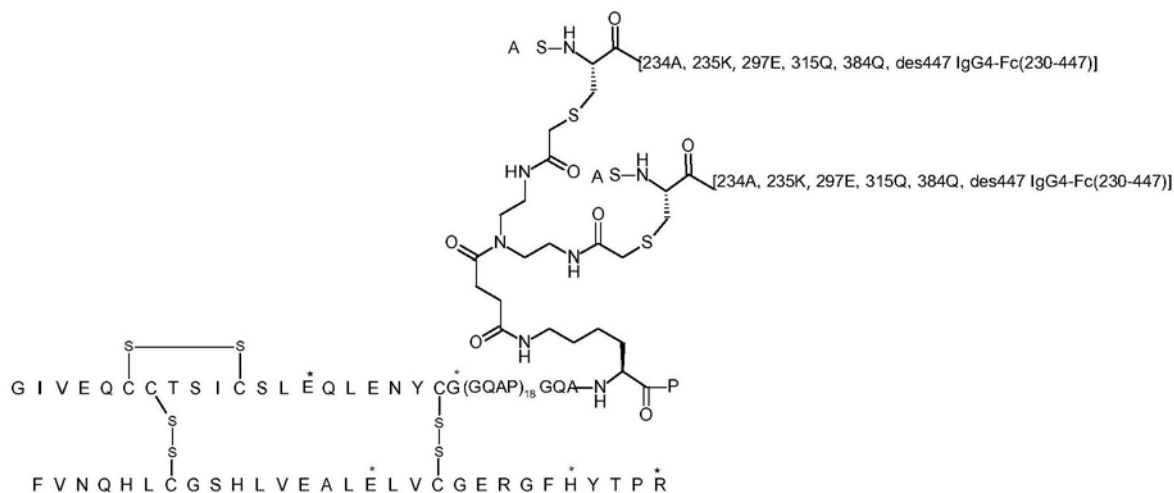
[1811] 按照实施例5.2描述的通用胰岛素Fc缀合程序2,由如实施例4.24所述制备的A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基), A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1812] LCMS方法3: 计算质量: 62107; 实测质量: 62109。

[1813] 实施例5.31

[1814] (A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K[^], A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1815]



[1816] 按照实施例5.2描述的通用胰岛素Fc缀合程序2,由如实施例4.25所述制备的A14E, A21G, A22 (GQAP)₁₈, A94G, A95Q, A96A, A97K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A98P, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的

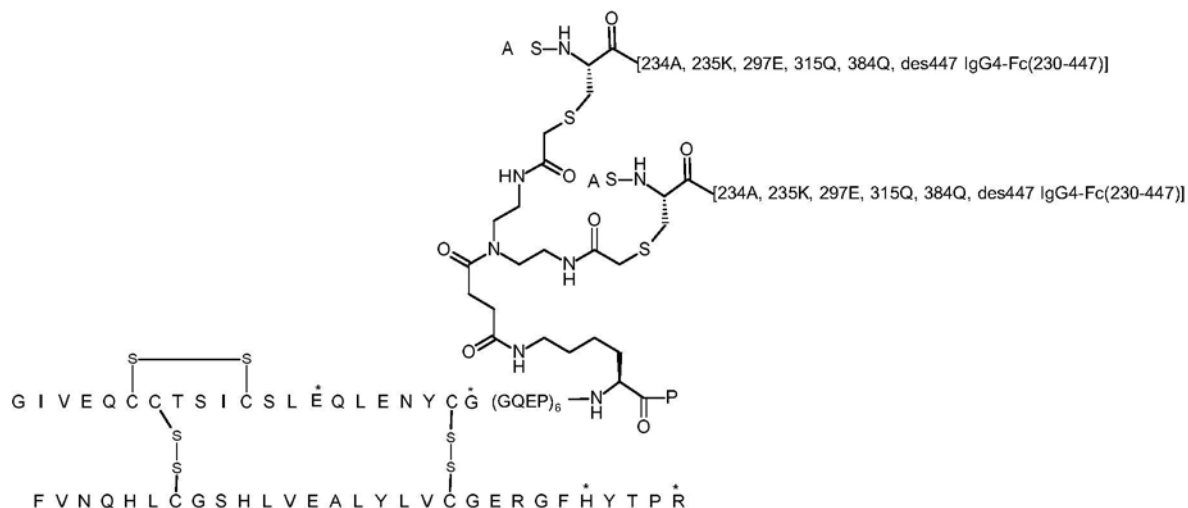
227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1817] LCMS方法7: 计算质量: 62158.1; 实测质量: 62160.7。

[1818] 实施例5.32

[1819] A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K⁺, A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素 / (227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 4-[双[2-[(2-乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基缀合物的制备

[1820]



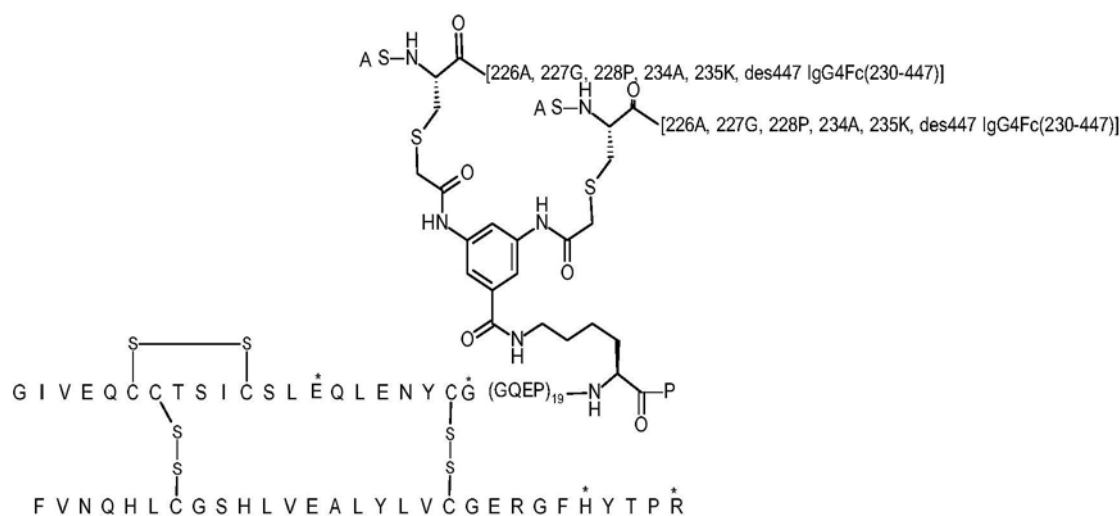
[1821] 按照实施例5.2描述的通用胰岛素Fc缀合程序2, 由如实施例4.6所述制备的A14E, A21G, A22 (GQEP)₆, A46K (N(ε) 4-[双[2-[(2-碘乙酰基)氨基]乙基]氨基]-4-氧代-丁酰基), A47P, B25H, B29R, desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的227A, 234A, 235K, 297E, 315Q, 384Q, des447 hIgG4-Fc (228-447) (Fc15) 合成标题化合物。

[1822] LCMS方法3: 计算质量: 58213.7; 实测质量: 58213.2。

[1823] 实施例5.33

[1824] (A14E, A21G, A22 (GQEP)₁₉, 98K⁺, A99P, B25H, B29R, desB30人胰岛素) / (226A, 227G, 228P, 234A, 235K, des447 hIgG4-Fc (228-447)) 3,5-双[(2-乙酰基)氨基]苯甲酰基缀合物的制备

[1825]



[1826] 按照实施例5.2描述的通用胰岛素Fc缀合程序2,由如实施例4.26所述制备的A14E,A21G,A22 (GQEP)₁₉,A98K (N(ε)_{3,5}-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基),A99P,B25H,B29R,desB30人胰岛素和如实施例2所述制备的226A,227G,228P,234A,235K,des447 IgG4-Fc (228-447) (Fc17) 合成标题化合物。

[1827] LCMS方法3:计算质量:63388.8;实测质量:63391.1。

[1828] 实施例6:胰岛素受体亲和力

[1829] 如(VienbergS.G.等人:Receptor-isoform-selective insulin analogues give tissue-preferential effects;Biochemical Journal 2011440 (3) p.301-308) 所述测定缀合物的胰岛素受体亲和力,参见表3中的结果。相对于人胰岛素对胰岛素受体A的亲和力(100%)报告亲和力。

[1830] 表3:体外数据

以下实施例编号的化合物	胰岛素受体亲和力 [相对于HI的IC ₅₀ (%)] 平均值
5.1	5.07
5.2	6.10
5.3	2.57
5.4	2.14
5.5	3.34
5.6	5.07
5.7	2.43

[1831]

[1832]

5.8	10.58
5.9	2.96
5.10	2.47
5.11	1.72
5.12	1.85
5.13	5.55
5.14	5.37
5.15	3.68
5.16	3.86
5.17	3.98
5.18	2.78
5.19	4.00
5.20	5.49
5.21	2.10
5.22	3.56
5.23	4.70
5.24	4.60
5.25	4.49
5.26	3.95
5.27	1.07
5.29	3.06
5.31	0.47
5.32	2.16
5.33	3.85

[1833] 数据显示,所有测试的本发明化合物均相对于人胰岛素在0.5%至10%的范围内与胰岛素受体结合。这些亲和力被认为在体内给药后足以促进血糖降低。此外,从实施例9可以看出,本发明的化合物也是胰岛素受体的激动剂。从实施例8可以看出,本发明的化合物在向大鼠皮下给药后全都能够有效地降低血糖。

[1834] 实施例7:PK研究

[1835] 通过静脉内和皮下施用于SD大鼠在体内测试胰岛素-Fc缀合物。收集血液样品,并通过免疫分析测定胰岛素-Fc浓度。由静脉和皮下给药所得到的平均保留时间和半衰期值在表4中示出。

[1836] 表4. 大鼠静脉内/皮下PK数据

[1837]

以下实施例编号的化合物	大鼠静脉内 PK [T1/2 (h)] 平均值	大鼠皮下 PK [T1/2 (h)] 平均值
-------------	-------------------------------	------------------------------

[1838]

5.1	32.6	39.1
5.2	42.8	44.0
5.3	35.6	33.1
5.4	26.4	32.2
5.5	44.7	35.7
5.6	31.1	30.1
5.7	36.5	32.3
5.8	36.3	36.6
5.9	36.3	31.7
5.11	30.7	33.1
5.12	23.3	25.1
5.13	53.3	43.4
5.14	46.6	54.0
5.15	58.4	67.6
5.16	25.7	36.2
5.17	46.2	40.3
5.18	24.9	28.0
5.19	30.8	55.0
5.21	43.2	38.8
5.23	57.1	73.2
5.24	50.6	51.9
5.25	47.7	44.5
5.26	49.8	53.5
5.27	40.7	50.4

[1839] 结论是,本发明的胰岛素-Fc缀合物在施用于大鼠时均显示出非常长的PK谱。

[1840] 实施例8:PD研究

[1841] 在开始研究时体重约为350g的正常雄性Sprague-Dawley大鼠中研究实施例的胰岛素Fc缀合物的药效学效果。

[1842] 动物在实验过程中自由获取食物和水。在颈区皮下给予30nmol/kg的剂量(除非在下图中另有说明)。从舌静脉收集用于血糖和血浆胰岛素分析的血液样品,直到给药后10天。使用Biosen S Line (EKF) 测量血糖。

[1843] 血糖谱在图1-7中示出。

[1844] 除了这些附图之外,血糖谱也在以下的表5a-g中示出。

[1845] 表5a. 向大鼠皮下给予本发明化合物后的平均血糖谱(来自图1), 剂量为30nmol/kg, 除非另有说明。

[1846]

时间	实施例 5.21	实施例 5.5	实施例 5.1	实施例 5.7
----	----------	---------	---------	---------

[1847]

(天)	(mM, 剂量: 300 nmol/kg)	(mM)	(mM)	(mM)
0	5.254	5.266	6.68	5.918
0.006944	5.972			
0.041667	4.224	5.276	5.888	5.682
0.125	3.238	4.894	4.988	4.502
0.208333	2.842	4.422		3.974
0.291667	3.212	4.358	3.752	3.428
0.3336	3.494			
1	2.58	3.106	2.524	2.758
2	2.118	2.33	2.036	2.15
3	2.074	2.786	2.964	2.3
4	2.37	4.764	3.244	2.81
5	2.478	5.842		4.404
6	4.534	6.016	6.508	6.702
7	5.588	5.76	6.18	6.518
8	6.552	5.794	5.996	6.33
9	5.644			
10	5.788			

[1848] 表5b. 向大鼠皮下给予本发明化合物后的平均血糖谱(来自图2), 剂量为30nmol/kg, 除非另有说明。

[1849]

时间 (天)	实施例 5.6 (mM)	实施例 5.8 (mM)	实施例 5.12 (mM)	实施例 5.13 (mM)
0	6.46	5.538	5.816	6.384
0.041667	6.024	5.44	5.598	5.976
0.125	5.092	4.488	5.674	4.892
0.208333		3.55	5.338	
0.291667	3.90	3.238	4.598	4.184
1	2.808	2.978	2.986	2.428
2	2.464	1.844	2.524	2.452
3	2.996	2.545	2.576	3.308
4	2.996	3.325	3.284	5.676
5		5.39	6.884	
6	5.98	6.8425	6.506	5.908
7	5.82	6.4875	6.202	5.812
8	6.012	6.1875	6.046	5.492

[1850] 表5c.向大鼠皮下给予本发明化合物后的平均血糖谱(来自图3),剂量为30nmol/kg,除非另有说明。

时间 (天)	实施例 5.9 (mM)	实施例 5.14 (mM)	实施例 5.15 (mM)	实施例 5.16 (mM)
0	5.812	6.248	6.748	6.544
0.041667	5.448	5.32	6.168	5.972
0.125	5.438	4.08	5.052	4.74
0.208333	4.902			
0.291667	4.426	3.048	3.292	4.028
1	3.044	2.356	2.524	2.42
2	2.614	2.4	2.752	2.592
3	2.594	2.832	4.116	3.156
4	3.734	4.304	5.744	5.7
5	5.932			
6	6.244	6.032	6.32	5.784
7	6.312	6.076	6.516	5.848
8	6.186	5.5	5.904	5.72

[1852] 表5d.向大鼠皮下给予本发明化合物后的平均血糖谱(来自图4),剂量为30nmol/kg,除非另有说明。

时间 (天)	实施例 5.2 (mM)	实施例 5.17 (mM)	实施例 5.19 (mM)
0	6.608	6.372	6.4
0.041667	6.196	5.84	5.988
0.125	5.328	5.14	4.92
0.291667	4.48	3.672	3.84
1	2.7	2.6	2.632
2	2.66	2.704	2.62
3	3.08	2.772	4.312
4	5.156	5.232	6.104
6	6.232	5.88	5.9
7	6.092	5.908	6.128
8	5.972	5.656	5.512

[1854] 表5e.向大鼠皮下给予本发明化合物后的平均血糖谱(来自图5),剂量为30nmol/kg,除非另有说明。

时间 (天)	实施例 5.26 (mM)	实施例 5.23 (mM)	实施例 5.27 (mM)
-----------	------------------	------------------	------------------

[1856]

0	5.82	5.384	5.504
0.041667	5.984	5.768	6.308
0.125	5.3	4.808	5.72
0.291667	4.384	4.136	5.164
1	3.332	2.86	3.036
2	4.992	2.6	3.852
3	6.352	3.536	4.384
4	5.804	5.544	5.272
5	5.752	5.684	5.236
6	6.232	5.796	5.564
7	6.048	6.056	5.824
8	6.236	5.672	5.924
9	5.972	5.62	5.68
10	5.88	6.308	6.12

[1857] 表5f. 向大鼠皮下给予本发明化合物后的平均血糖谱(来自图6), 剂量为30nmol/kg, 除非另有说明。

[1858]

时间 (天)	实施例 5.25 (mM)	实施例 5.24 (mM)	实施例 5.33 (mM)	媒介物
0	5.724	5.604	5.496	5.404
0.041667	6.104	5.98	5.284	6.232
0.125	4.9	5.172	4.716	5.784
0.291667	4.032	4.164	3.744	5.86
1	3.28	2.924	3.744	5.668
2	3.864	3.128	2.232	6.128
3	6.224	3.352	1.844	5.912
4	5.976	6.272	2.432	5.436
5	6.036	5.788	3.98	5.544
6	6.496	5.824	6.132	5.892
7	6.14	6.092	5.712	5.852
8	6.452	6.016	5.38	5.992
9	6.528	5.872	5.316	5.828
10	6.144	6.072	5.44	5.796

[1859] 表5g. 向大鼠皮下给予本发明化合物后的平均血糖谱(来自图7), 剂量为30nmol/kg, 除非另有说明。

[1860]

时间 (天)	实施例 5.12 (mM)	德谷胰岛素 (mM, 剂量:
-----------	------------------	-------------------

[1861]

		90 nmol/kg)
0	5.516	5.382
0.020833		4.104
0.041667	6.16	3.182
0.083333		2.718
0.125	4.608	
0.166667		2.336
0.25		3.424
0.291667	3.988	
0.3336		4.292
0.5		5.302
1	2.88	5.758
2	2.348	
3	2.972	
4	6.028	
5	6.06	
6	5.74	
7	5.716	
8	5.568	
9	5.204	
10	5.556	

[1862] 从获得并在图1至图7以及表5a-g中示出的数据可以得出以下结论:所有本发明化合物在大鼠中都能够非常有效地长时间(3-5天)降低血糖。相比较而言,作为超长效胰岛素以 **Tresiba®** 销售的德谷胰岛素在3倍高剂量时仅能够降低血糖不到半天。

[1863] 实施例9:胰岛素刺激的脂肪生成

[1864] 如Moody AJ,Stan MA,Stan M,Gliemann J.A Simple Free Fat Cell Bioassay for Insulin.Hormone And Metabolic Research.1974;6(1):12-6所述,在1%HSA的存在下,在分离的大鼠脂肪细胞中测量胰岛素刺激的脂肪生成,参见表6中的结果。相对于人胰岛素的活性(100%)报告活性。

[1865] 表6:脂肪生成数据

[1866]

以下实施例编号 的化合物	大鼠脂肪细胞中的脂肪生成 [效力(%)] 平均值
5.21	0.95
5.3	0.55
5.4	0.36
5.5	2.21
5.1	6.69
5.7	1.88
5.8	5.31
5.11	0.39
5.12	2.35
5.9	3.02
5.13	3.07
5.2	3.57
5.17	4.39
5.14	4.86
5.18	0.87
5.15	3.68
5.16	4.34
5.24	3.83
5.20	5.41
5.19	3.02
5.26	3.23
5.25	2.08
5.23	5.36
5.22	4.64
5.29	2.64
5.31	0.60
5.33	5.44
5.32	3.72

[1867] 结论是,脂肪生成活性数据与相应的胰岛素受体亲和力和数据处于相同的范围内,因此,本发明的胰岛素-Fc缀合物都具有胰岛素激动剂活性。

序列表

<110> 诺和诺德股份有限公司
<120> 寡聚体延伸的胰岛素-Fc 缀合物及其医学用途
<130> 160075W002
<160> 76
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 220
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(220)
<223> 人 IgG1-Fc(228-447)

<400> 1

[0001] Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205

[0002] Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 2
<211> 227
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 肽
<222> (1).. (227)
<223> 人 IgG2-Fc(220-446)

<400> 2

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	50						55					60					
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	
	65					70					75					80	
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
					85					90					95		
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				100					105					110			
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			115					120					125				
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		130					135					140					
[0003]	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	
	145					150					155					160	
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
					165					170					175		
	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
				180					185					190			
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
			195					200					205				
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
		210					215					220					
	Pro	Gly	Lys														
	225																
	<210>	3															
	<211>	220															

<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(220)
<223> 人 IgG4-Fc (228-447)

<400> 3

Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

[0004]

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
115 120 125

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

165

170

175

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(14)
<223> 人 IgG1 铰链

[0005]

<400> 4

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(11)
<223> 人 IgG2 铰链

<400> 5

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(12)

<223> 人 IgG4 铰链

<400> 6

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro
1				5				10			

<210> 7

<211> 99

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-1 和 OEF-Ins-5 的 A 链

<400> 7

[0006]	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	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
			20					25					30		

Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
			35					40					45		

Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
			50					55				60			

Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
			65					70				75			80

Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
				85				90						95	

Pro Lys Pro

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-2、OEF-Ins-4、OEF-Ins-10、OEF-Ins-11 和 OEF-Ins-12 的 A 链

<400> 8

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> 9
<211> 99
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-3 和 OEF-Ins-14 的 A 链

<400> 9

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 Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
65 70 75 80

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala
85 90 95

[0007]

Pro Lys Pro

<210> 10
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-7 的 A 链

<400> 10

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	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
			20					25					30		

Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Lys	Pro
		35				40						45		

[0008]

<210> 11
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-6 的 A 链

<400> 11

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	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
			20					25					30		

Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
		35				40						45			

Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu
		50				55						60			

Pro Gly Gln Glu Pro Lys Pro
65 70

<210> 12
<211> 71
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-9 的 A 链

<400> 12

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 Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala
35 40 45

[0009]

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Glu Pro Lys Pro
65 70

<210> 13
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-8 的 A 链

<400> 13

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 Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
20 25 30

Pro Gly Gln Glu Lys Pro
35

<210> 14
<211> 99
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-13 的 A 链

<400> 14

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 Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

[0010]

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
85 90 95

Pro Lys Pro

<210> 15
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-15 的 A 链

<400> 15

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 Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
85 90 95

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
100 105 110

[0011]

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro
115 120

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-20 和 OEF-Ins-21 的 A 链

<400> 16

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 Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
85 90 95

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
100 105 110

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Lys Pro
115 120

<210> 17

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> OEF-Ins-16 的 A 链

<400> 17

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

Glu Asn Tyr Cys Gly Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
85 90 95

Lys Pro

<210> 18
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OEF-Ins-17、OEF-Ins-18 和 OEF-Ins-23 的 A 链

<400> 18

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 Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

[0013]

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
85 90 95

Lys Pro

<210> 19
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-19 的 A 链

<400> 19

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

Glu Asn Tyr Cys Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys
35 40

<210> 20

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-22 的 A 链

<400> 20

[0014]

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 Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
85 90 95

Lys Pro

[0015]

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

<220>

<223> OEF-Ins-1、OEF-Ins-6、OEF-Ins-7、OEF-Ins-8、OEF-Ins-9、OEF-Ins-13、OEF-Ins-15、OEF-Ins-18、
OEF-Ins-19 和 OEF-Ins-20 的 B 链

<400> 21

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 Arg
20 25

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-4 的 B 链

<400> 22

Lys Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
1 5 10 15

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
20 25 30

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
35 40 45

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
50 55 60

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Phe Val
65 70 75 80

Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
85 90 95

Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Arg
100 105

<210> 23

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-3 和 OEF-Ins-5 的 B 链

<400> 23

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

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

[0016]

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-2 的 B 链

<400> 24

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
20 25 30

Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
35 40 45

Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
50 55 60

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Phe Val
65 70 75 80

Gln Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
85 90 95

Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Arg
100 105

<210> 25

<211> 78

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-12 的 B 链

<400> 25

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

[0017]

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
20 25 30

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
35 40 45

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
50 55 60

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro
65 70 75

<210> 26

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-14、OEF-Ins-16、OEF-Ins-17、OEF-Ins-21 和 OEF-Ins-22 的 B 链

<400> 26

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 Arg
20 25

<210> 27

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-10 的 B 链

<400> 27

Lys Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
1 5 10 15

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Phe Val Asn Gln His Leu
20 25 30

[0018]

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
35 40 45

Gly Phe His Tyr Thr Pro Arg
50 55

<210> 28

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OEF-Ins-11 的 B 链

<400> 28

Lys Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
1 5 10 15

Glu Pro Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
20 25 30

Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Arg
35 40 45

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

<220>
<223> OEF-Ins-23 的 B 链

<400> 29

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 Arg
20 25

[0019] <210> 30
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc9 的 Fc 片段

<400> 30

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Ala Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 31

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc1 的 Fc 片段

<400> 31

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

[0020]

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

[0021]

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 32

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc15 的 Fc 片段

<400> 32

Ala	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Lys	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
1				5					10					15	

Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			20					25					30		

Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
		35						40					45		

Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	50					55					60				

[0022]

Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Glu	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
65					70					75					80

Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Gln	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
			85						90					95	

Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			100					105					110		

Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
	115						120					125			

Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
	130					135					140				

Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Gln	Gly	Gln
145					150					155					160

Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				165					170					175	

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
210 215 220

<210> 33

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc2 的 Fc 片段

<400> 33

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

[0023]

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Gln Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Gln Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

[0024]

<210> 34
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc3 的 Fc 片段

<400> 34

Gly Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

[0025]

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 35

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc4 的 Fc 片段

<400> 35

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Leu Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
				20					25						30		
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
			35					40					45				
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
		50					55					60					
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
	65				70					75					80		
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Gln	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
				85					90						95		
	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				100				105						110			
[0026]	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
			115				120						125				
	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
		130					135					140					
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Gln	Gly	Gln	
	145				150					155					160		
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
					165				170					175			
	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
				180					185					190			
	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
		195						200					205				
	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
		210					215					220					

<210> 36
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Fc5 的 Fc 片段

<400> 36

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45

[0027] Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Gln Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Gln Gly Gln
 145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 37

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc6 的 Fc 片段

<400> 37

[0028]

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

[0029]

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 38

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc7 的 Fc 片段

<400> 38

Ala Ser Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
	50						55					60					
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
	65					70				75					80		
	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
					85				90						95		
	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				100				105							110		
	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
		115					120						125				
	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
		130					135						140				
[0030]	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
	145					150					155				160		
	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
				165						170					175		
	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				180					185					190			
	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
			195					200					205				
	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
		210					215					220					
	<210>	39															
	<211>	221															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	Fc8 的 Fc 片段															

<400> 39

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

[0031]

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 40
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc10 的 Fc 片段

<400> 40

Ala Ser Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Lys Gly Ala Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

[0032]

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 41

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

[0033]

<220>

<223> Fc11 的 Fc 片段

<400> 41

Ala Ser Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Lys Gly Ala Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

[0034]

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 42

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc12 的 Fc 片段

<400> 42

Ala Ser Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Lys Gly Ala Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Gln Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

[0035]

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Gln Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 43

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc13 的 Fc 片段

<400> 43

Ala Ser Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

[0036] Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 44

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc14 的 Fc 片段

<400> 44

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Ala Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

[0037]

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

[0038]

<210> 45
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc16 的 Fc 片段

<400> 45

Ala Ser Cys Pro Ala Pro Glu Ala Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Glu Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

[0039]

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
210 215 220

<210> 46

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc17 的 Fc 片段

<400> 46

Ala Gly Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
					20				25						30		
	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
		35						40					45				
	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		50					55					60					
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
	65					70					75					80	
	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
					85					90					95		
	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				100					105					110			
[0040]	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
		115						120					125				
	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
		130						135					140				
	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
	145					150					155					160	
	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
					165					170					175		
	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
			180						185					190			
	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
		195						200					205				
	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Ala	Gly	Pro	
		210						215					220				

	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Lys	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
	225						230				235					240	
	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
					245					250					255		
	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	
				260					265					270			
	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
		275					280						285				
	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
	290						295					300					
	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
	305					310					315					320	
[0041]	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
					325					330					335		
	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	
				340					345					350			
	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
		355						360					365				
	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
	370					375						380					
	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
	385					390					395					400	
	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	
					405					410					415		
	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	
				420					425					430			

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

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

<220>
<223> A14E, A21G 人胰岛素的 A 链

<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 Gly
20

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

<220>
<223> B3Q, B29R, desB30 人胰岛素的 B 链

<400> 48

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

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

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

<220>
<223> A14E, A21Q 人胰岛素的 A 链

<400> 49

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

[0042]

Glu Asn Tyr Cys Gln
20

<210> 50
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人胰岛素的 A 链

<400> 50

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

[0043] <210> 51
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> B16H, B25H, B29R, desB30 人胰岛素的 B 链

<400> 51

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 Arg
20 25

<210> 52
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A14A, A21G 人胰岛素的 A 链

<400> 52

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

Glu Asn Tyr Cys Gly
20

<210> 53
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 53

Gln Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Lys
20

[0044]

<210> 54
<211> 78
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 54

Gly Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
1 5 10 15

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Lys Pro
65 70 75

<210> 55
<211> 79
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 55

Gly Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
1 5 10 15

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

[0045]

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro
65 70 75

<210> 56
<211> 51
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 56

Gly Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
1 5 10 15

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
35 40 45

Pro Lys Pro
50

<210> 57
<211> 79
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 57

Gly Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala
1 5 10 15

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

[0046]

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro
65 70 75

<210> 58
<211> 103
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 58

Gly Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
1 5 10 15

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
65 70 75 80

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu
85 90 95

Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro
100

[0047]

<210> 59
<211> 102
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 59

Gly Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
1 5 10 15

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
65 70 75 80

Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala
85 90 95

Pro Gly Gln Ala Lys Pro
100

<210> 60
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 60

Gly Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
1 5 10 15

Lys Pro

[0048]

<210> 61
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A-链 OEF

<400> 61

Gly Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
1 5 10 15

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Lys Pro
20 25

<210> 62
<211> 51
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> A-链 OEF

<400> 62

Gly Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
1 5 10 15

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
20 25 30

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
35 40 45

Pro Lys Pro
50

<210> 63

<211> 79

<212> PRT

<213> 人工序列

[0049]

<220>

<223> A-链 OEF

<400> 63

Gly Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
1 5 10 15

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
20 25 30

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
35 40 45

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu
50 55 60

Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Lys Pro
65 70 75

<210> 64

<211> 78

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> B-链 OEF

<400> 64

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
20 25 30

Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
35 40 45

Glu Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
50 55 60

[0050] Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro
65 70 75

<210> 65
<211> 78
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> B-链 OEF

<400> 65

Lys Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
1 5 10 15

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
20 25 30

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
35 40 45

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln
50 55 60

Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Gln Glu Pro
65 70 75

<210> 66
<211> 78
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> B-链 OEF

<400> 66

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
20 25 30

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
35 40 45

[0051]

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
50 55 60

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro
65 70 75

<210> 67
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> B-链 OEF

<400> 67

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ala Pro Gly Gln Ala Pro Gly Gln Ala Pro
20 25

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1/IgG4 铰链序列

<400> 68

Ala Gly Pro Cys Pro
1 5

<210> 69
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 铰链

<400> 69

[0052] Ala Ser Pro Cys
1

<210> 70
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 铰链

<400> 70

Pro Pro Cys Pro
1

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 铰链

	<400> 71
	Ala Ser Pro Cys Pro
	1 5
	<210> 72
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> IgG1/IgG4 铰链
	<400> 72
	Ala Ser Cys Pro
	1
	<210> 73
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
[0053]	<220>
	<223> IgG4 铰链
	<400> 73
	Ala Gly Ser Cys Pro
	1 5
	<210> 74
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> IgG4 铰链
	<400> 74
	Pro Ser Cys Pro
	1
	<210> 75
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列

<220>
<223> IgG4 铰链

<400> 75

Gly Ala Ser Cys Pro
1 5

<210> 76
<211> 21
<212> PRT
[0054] <213> 人工序列

<220>
<223> A21G 人胰岛素的 A 链

<400> 76

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

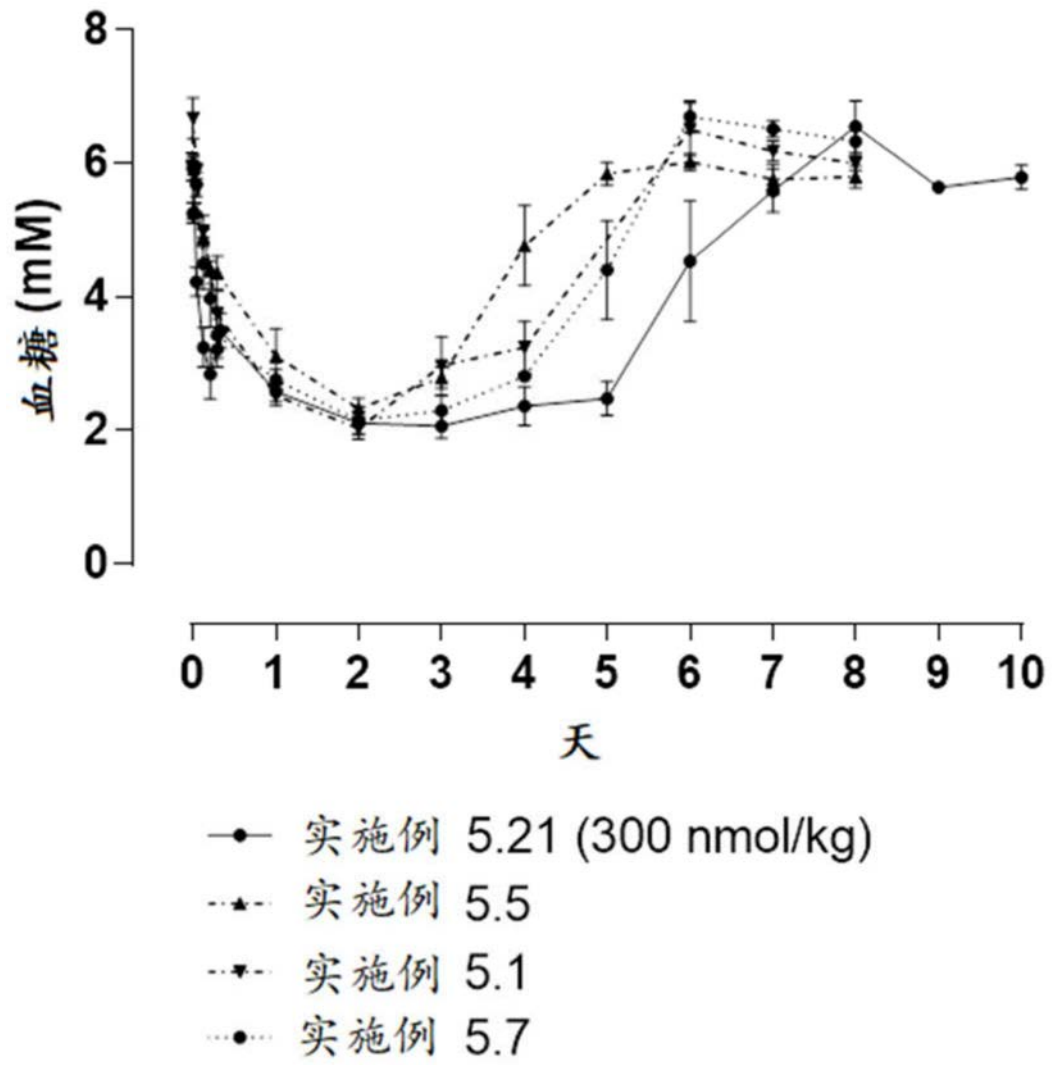


图1

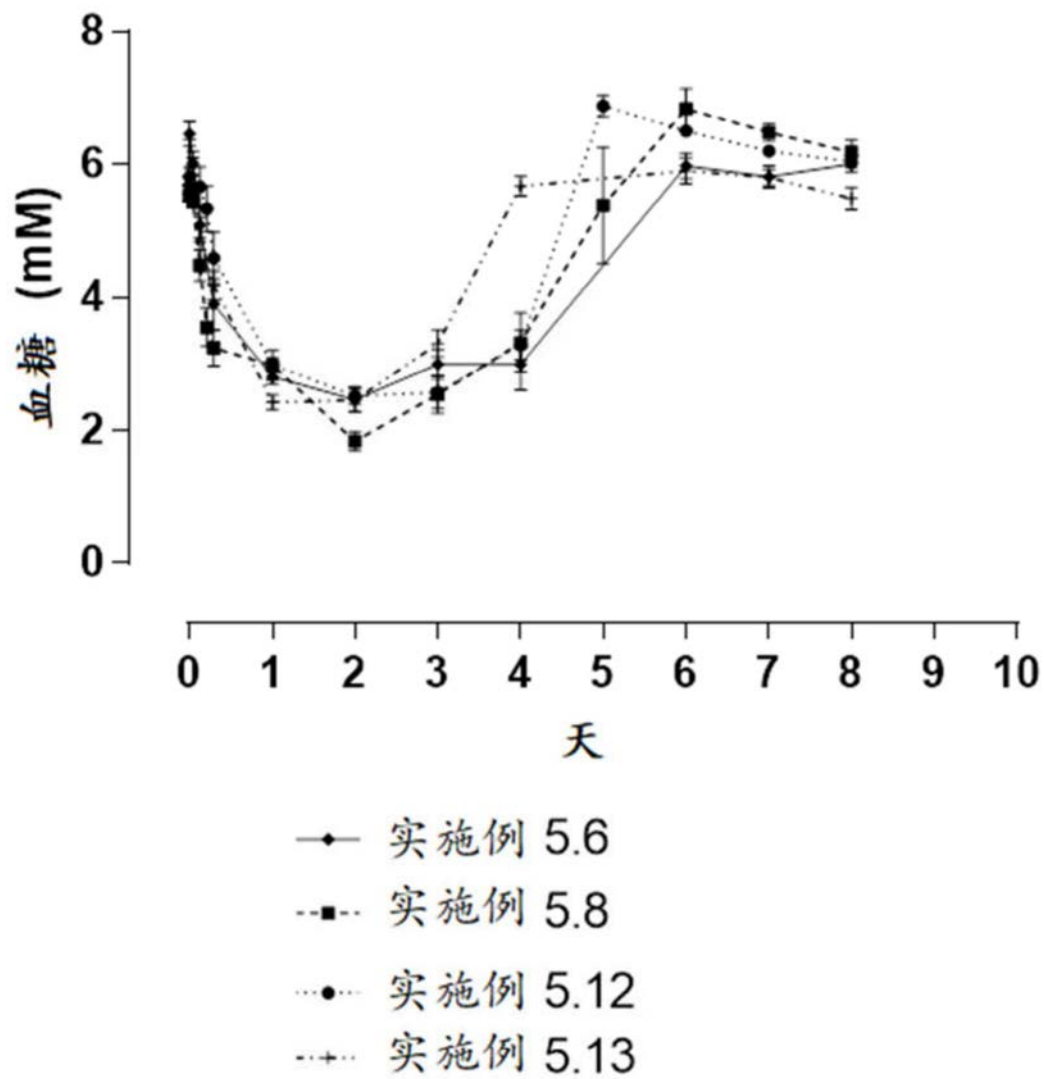


图2

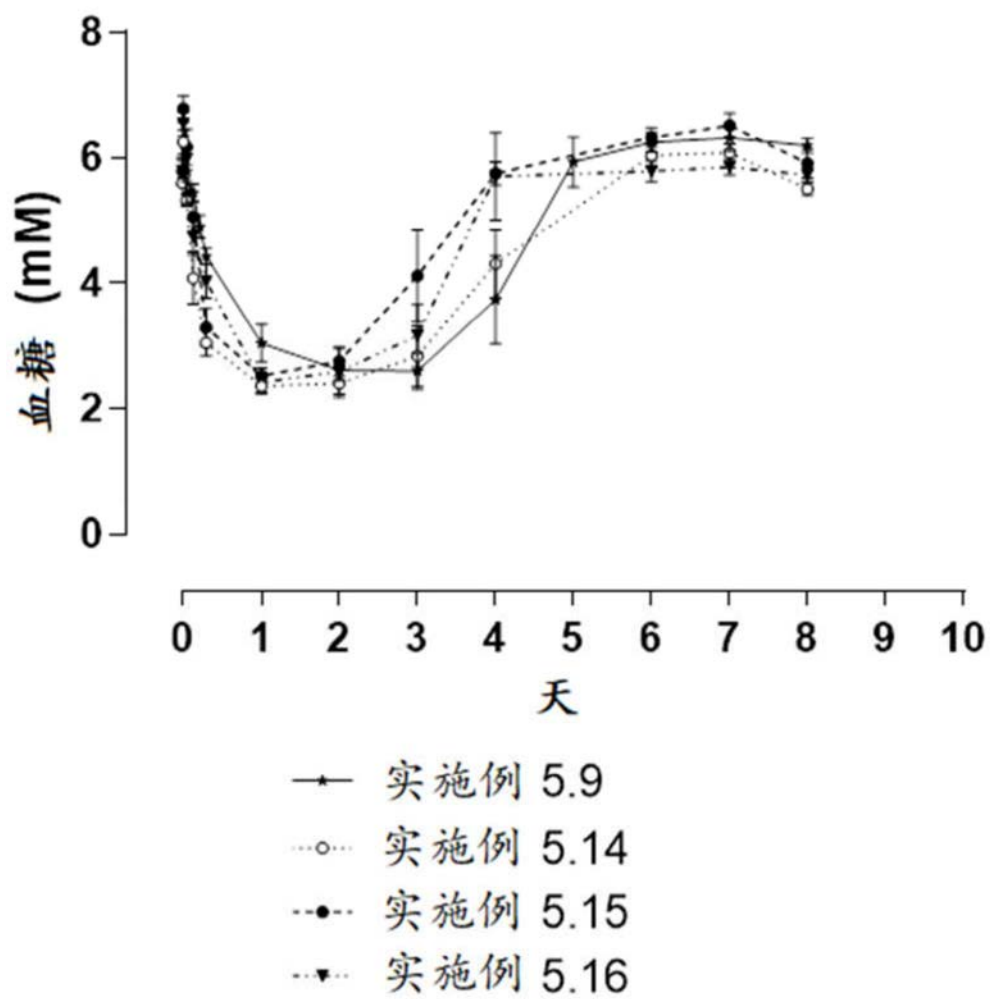


图3

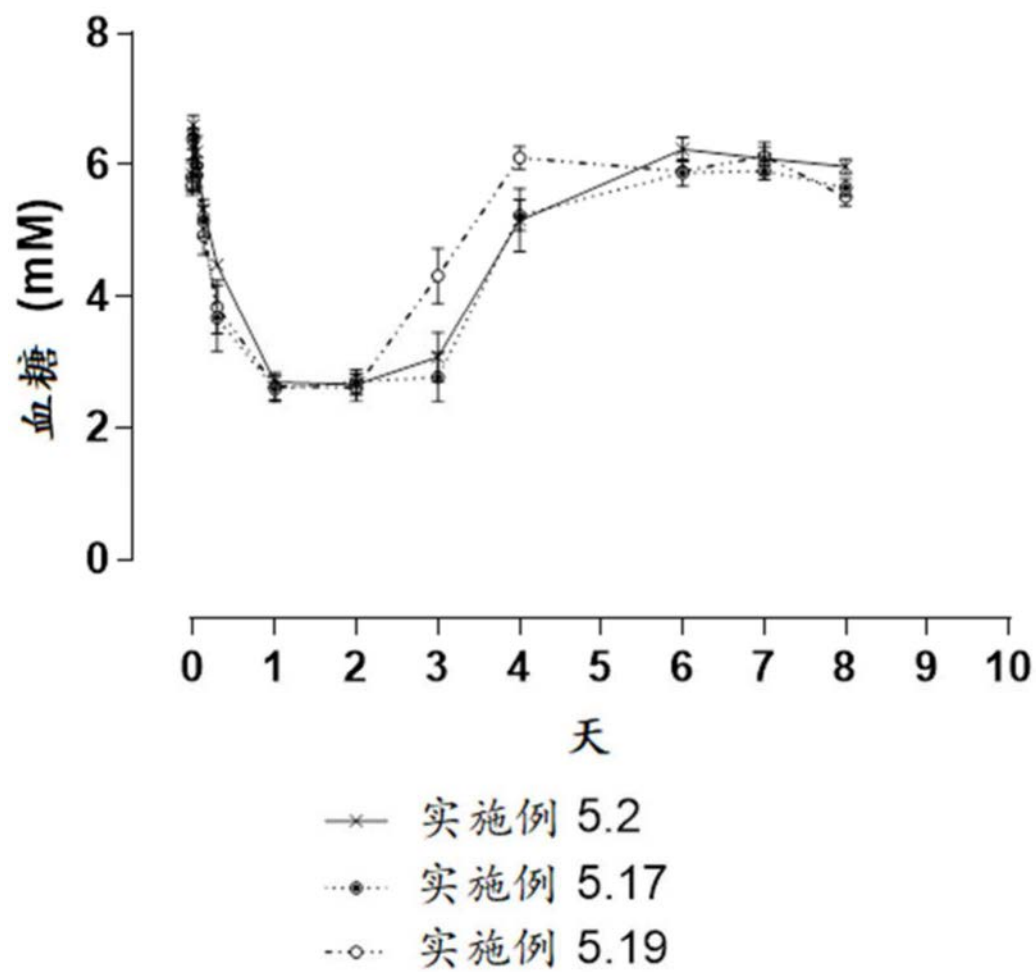


图4

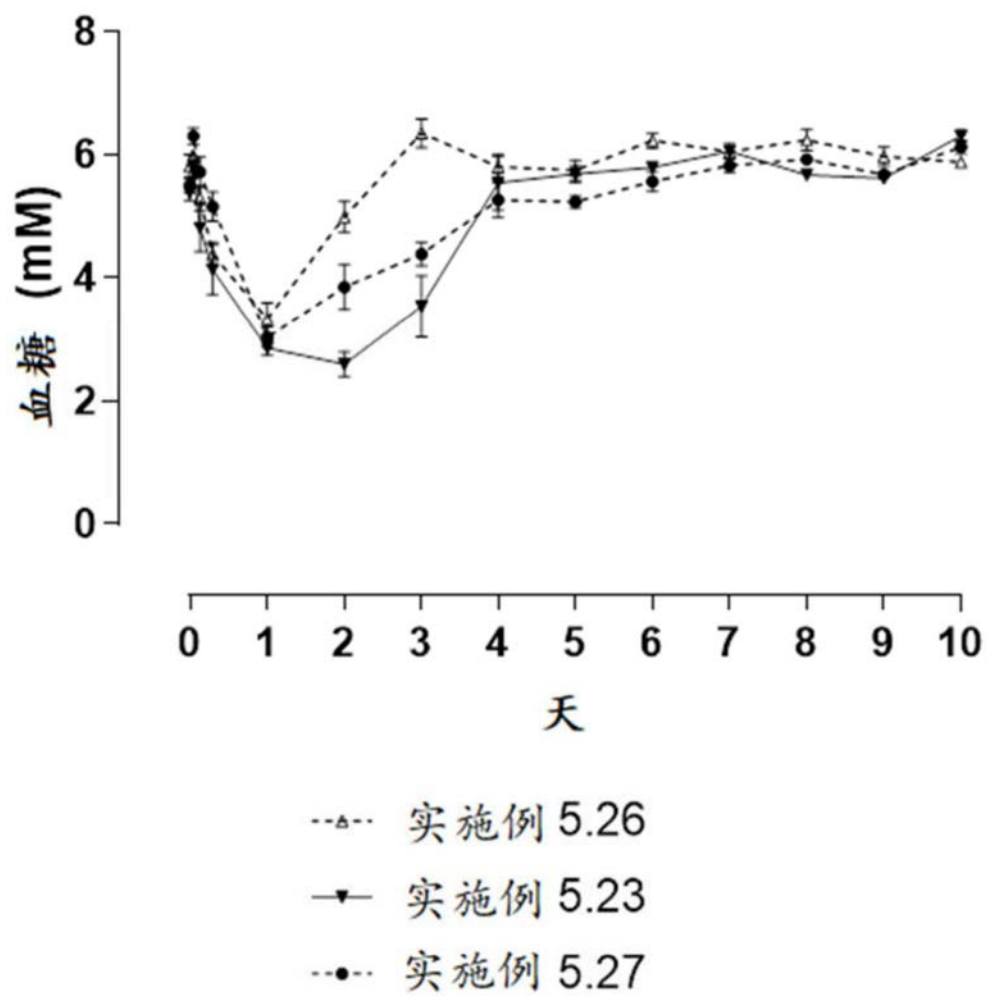


图5

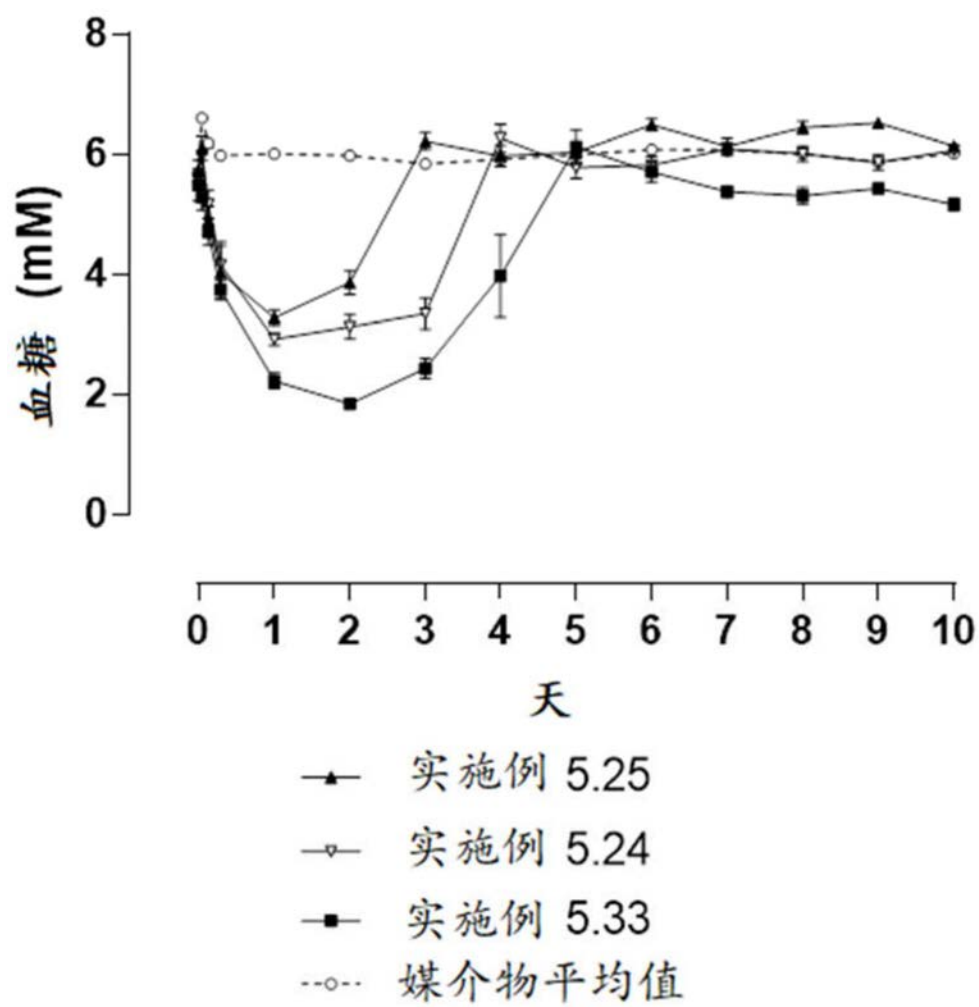


图6

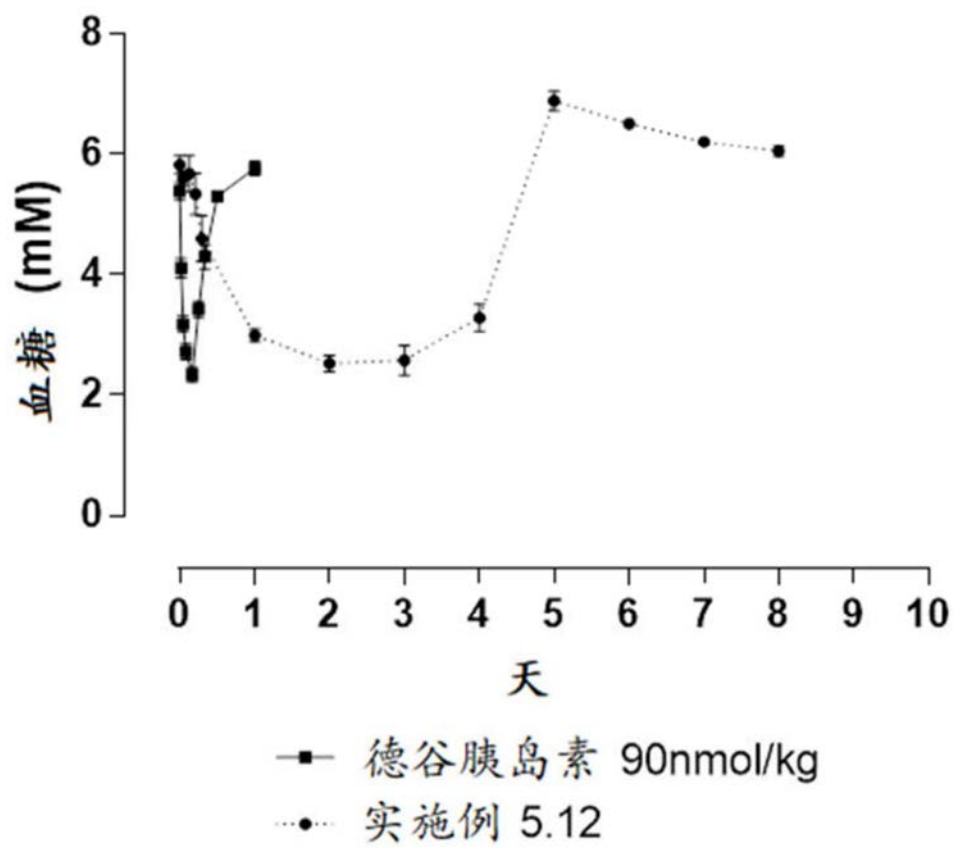


图7