



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I774694 B

(45) 公告日：中華民國 111 (2022) 年 08 月 21 日

(21) 申請案號：106132612

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 09 月 22 日

(51) Int. Cl. :

*C07K14/62 (2006.01)**C12N15/17 (2006.01)**C12N15/70 (2006.01)**C07K1/14 (2006.01)**A61K38/28 (2006.01)**A61P3/10 (2006.01)*

(30) 優先權：2016/09/23 南韓

10-2016-0122484

(71) 申請人：南韓商韓美藥品股份有限公司 (南韓) HANMI PHARM. CO., LTD. (KR)

南韓

德商賽諾菲安萬特德國公司 (德國) SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

(DE)

德國

(72) 發明人：崔仁榮 CHOI, IN YOUNG (KR)；鄭聖燁 JUNG, SUNG YOUB (KR)；柯恩 馬克斯 KORN MARCUS (DE)；蓋斯里根 史蒂芬 GUESSREGEN STEFAN (DE)；天那覺斯 諾伯特 TENNAGELS NORBERT (DE)

(74) 代理人：洪武雄；陳昭誠

(56) 參考文獻：

WO 2016/006963A1

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：4 共 96 頁

(54) 名稱

具有降低對胰島素受體之親和力之胰島素類似物及其用途

(57) 摘要

本發明係有關一種新穎之胰島素類似物、其用途、及製備該類似物之方法。

The present invention relates to a novel insulin analog, use thereof, and a method for preparing the analog.

I774694

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※ I P C 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

具有降低對胰島素受體之親和力之胰島素類似物及其用途

INSULIN ANALOGS WITH REDUCED AFFINITY TO
INSULIN RECEPTOR AND USE THEREOF

【中文】

本發明係有關一種新穎之胰島素類似物、其用途、及製備該類似物之方法。

【英文】

The present invention relates to a novel insulin analog, use thereof, and a method for preparing the analog.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

本案的圖為實驗數據，並非本案的代表圖。故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

具有降低對胰島素受體之親和力之胰島素類似物及其用途

INSULIN ANALOGS WITH REDUCED AFFINITY TO
INSULIN RECEPTOR AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】本發明係有關一種新穎之胰島素類似物、其用途、及製備該類似物之方法。

【先前技術】

【0002】已知體內蛋白質係藉由各種不同途徑清除，包括被血液內蛋白酶降解、透過腎臟排泄、被受體脫除，等等。在此方面，已嘗試各種不同方法，透過迴避蛋白質清除機轉來延長生理蛋白質之半衰期，來改良蛋白質之醫療效力。

【0003】一般而言，胰島素為由人體胰臟分泌之激素，其調節血糖濃度，而且扮演維持正常血糖濃度的角色，同時攜帶血液中過剩的葡萄糖至細胞中，以提供能量給細胞。然而糖尿病患者中，因缺乏胰島素、對胰島素產生抗性、及喪失 β -細胞功能，而無法讓胰島素正常運作，因此無法利用血中葡萄糖作為能量來源，並因血糖濃度升高而導致高血糖症。結果，糖尿病患者無法利用血中葡萄糖作為能量來源，但卻出現高葡萄糖濃度之高血糖症狀，並

於尿中排泄葡萄糖，成為各種不同併發症的原因。因此，胰島素分泌異常(第 I 型)或胰島素抗性(第 II 型)之患者均需要胰島素療法，並可藉由投與胰島素來正常調節血糖濃度。

【0004】然而，如同其他蛋白質與肽激素，胰島素具有極短之活體內半衰期，因此出現需要重覆投藥之缺點。此等頻繁投藥導致患者嚴重疼痛與不適，因此需要從患者順應性、安全性、與方便性等方面來改良投藥法。

【0005】因此，研究中著重於發展各種不同蛋白質調配物、化學接合物(例如：脂肪酸接合物)，等等，透過延長此等蛋白質藥物(如：胰島素)之活體內半衰期來減少投藥頻率，以改善醫療效力及患者生活品質。

【0006】依據過去報告，50%或更多胰島素被腎臟清除，其餘被標靶部位(如：肌肉、脂肪、肝，等等)中之受體所介導清除(RMC)過程清除。

【0007】此方面已有報告說明(*J Pharmacol Exp Ther* (1998) 286: 959, *Diabetes Care*(1990) 13: 923、與 *Diabetes* (1990) 39: 1033，等等)，其降低活體內活性來避免胰島素之 RMC，以提高血中胰島素濃度。然而，*J Pharmacol Exp Ther* (1998) 286: 959、*Diabetes Care* (1990) 13: 923 中，建議在胰島素類似物中取代至少兩個胺基酸或未提供明確結果，而在 *Diabetes* (1990) 39: 1033 中，胰島素類似物在其對受體之結合親和力上未顯現變化，或因取代了直接涉及與胰島素受體結合之胺基酸而致其活性下降。

【0008】本發明者已發展彼等藉由取代未直接涉及

與胰島素受體結合之胺基酸而僅降低其與胰島素受體之結合親和力之類似物，且已證實其等對胰島素受體具有降低之結合親和力，藉以完成本發明。

【發明內容】

[技術問題]

【0009】本發明目的為提供一種新穎之胰島素類似物。

【0010】本發明另一目的為提供一種編碼該胰島素類似物之單離核酸、包括該核酸之重組表現載體、及包括該表現載體之轉化體。

【0011】本發明再另一目的為提供一種製備胰島素類似物之方法。

【0012】本發明再另一目的為提供一種包含胰島素類似物作為活性成份之組成物，例如：醫藥組成物。

【0013】本發明再另一目的為提供一種治療胰島素相關疾病(例如：糖尿病)之醫藥組成物，其包含胰島素類似物作為活性成份。

【0014】本發明再另一目的為提供一種治療糖尿病之方法，其包括對有此需要之個體投與胰島素類似物或包含胰島素類似物作為活性成份之醫藥組成物。

【0015】本發明再另一目的為提供一種以胰島素類似物於製備醫藥上之用途。

【0016】本發明再另一目的為提供一種以胰島素類似物於治療胰島素相關疾病，明確言之糖尿病上之用途。

[解決技術]

【0017】為了達成上述目的，本發明態樣提供一種胰島素類似物，及明確言之，一種包括在選自由天然胰島素之 B-鏈之第 16 個胺基酸、B-鏈之第 25 個胺基酸、A-鏈之第 14 個胺基酸、與 A-鏈之第 19 個胺基酸所組成群中之胺基酸(群)中之至少一個修飾之胰島素類似物。

【0018】一項實施例中，該修飾法可為天然胰島素 B-鏈之第 16 個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天冬胺酸；天然胰島素 B-鏈之第 25 個胺基酸(亦即苯基丙胺酸)修飾成天冬胺酸或麩胺酸；天然胰島素 A-鏈之第 14 個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸；或天然胰島素 A-鏈之第 19 個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸。

【0019】另一項實施例中，該胰島素類似物可為包括如下通式 1 代表之 SEQ ID NO: 55 之 A-鏈與如下通式 2 代表之 SEQ ID NO: 56 之 B-鏈之所有組合之胰島素類似物，但不包括天然胰島素，亦即不包括其中 A-鏈等同 SEQ ID NO: 53，且 B-鏈亦等同 SEQ ID NO: 54 之肽。

【0020】[通式 1]

Xaa1-Ile-Val-Glu-Xaa5-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa12-Leu-Xaa14-Gln-Xaa16-Glu-Asn-Xaa19-Cys-Xaa21 (SEQ ID NO: 55)

通式 1 中，

Xaa1 為丙胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、麩胺酸、

或天冬醯胺，

Xaa5 為丙胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、或天冬醯胺，

Xaa12 為丙胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、組胺酸、或天冬醯胺，

Xaa14 為酪胺酸、組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸，

Xaa16 為丙胺酸、白胺酸、酪胺酸、組胺酸、麩胺酸、或天冬醯胺，

Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸，及

Xaa21 為天冬醯胺、甘胺酸、組胺酸、或丙胺酸。

【0021】 [通式 2]

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa16-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Xaa25-Tyr-Xaa27-Xaa28-Lys-Thr (SEQ ID NO: 56)

通式 2 中，

Xaa16 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天冬胺酸，

Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸，

Xaa27 為蘇胺酸、或不存在，及

Xaa28 為脯胺酸、麩胺酸、或天冬胺酸、或不存在。

【0022】 再另一項實施例中，該胰島素類似物可為包括如上通式 1 代表之 SEQ ID NO: 55 之 A-鏈與 SEQ ID NO: 54 之 B-鏈之胰島素類似物。

【0023】再另一項實施例中，該胰島素類似物可為包括 SEQ ID NO: 53 之 A-鏈與如上通式 2 代表之 SEQ ID NO: 56 之 B-鏈之胰島素類似物。

【0024】再另一項實施例中，該胰島素類似物可為胰島素類似物，其中：

通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸、組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及

通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天冬胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

【0025】再另一項實施例中，該胰島素類似物可為胰島素類似物，其中：

通式 1 中，

Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、或絲胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及

通式 2 中，

Xaa16 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或天冬胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

【0026】再另一項實施例中，該胰島素類似物可為胰島素類似物，其中：

[通式 1]

(1)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為組胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，Xaa28 為脯胺酸；

(2)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為離胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(3)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為麩胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(4)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為絲胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(5)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為蘇胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸

酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(6)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為麩胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(7)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為絲胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(8)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為蘇胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(9)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為丙胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(10)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為天冬胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為

酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(11)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為天冬胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(12)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為天冬胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；及

(13)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

【0027】再另一項實施例中，該胰島素類似物可為包括選自 SEQ ID NO：28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、與 52 所組成群中之胺基酸序列之胰島素類似物。

【0028】再另一態樣中，本發明提供一種編碼該胰島素類似物之單離核酸。

【0029】再另一態樣中，本發明提供一種包括該核酸

之重組表現載體。

【0030】再另一態樣中，本發明提供一種包括重組表現載體之轉化體。

【0031】一項實施例中，該轉化體可為大腸桿菌(*E. coli*)。

【0032】再另一態樣中，本發明提供一種製備胰島素類似物之方法，其包括：

a) 藉由培養包含編碼該胰島素類似物之核酸之轉化體來表現胰島素類似物；及

b) 單離及純化所表現之胰島素類似物。

【0033】一項實施例中，該單離及純化可包括：

b-1) 從步驟 a) 之培養物中得到轉化體，並粉碎該轉化體；

b-2) 從粉碎之細胞溶胞物中回收所表現之胰島素類似物後，接著重摺疊該類似物；

b-3) 採用陽離子交換層析法純化該重摺疊之胰島素類似物；

b-4) 採用胰蛋白酶與羧基肽酶 B 處理該經純化之胰島素類似物；及

b-5) 依序採用陽離子交換層析法、與陰離子交換層析法或逆相層析法純化該經過處理之胰島素類似物。

【0034】另一態樣中，本發明提供一種包含胰島素類似物作為活性成份之組成物，例如：醫藥組成物。

【0035】再另一態樣中，本發明提供一種用於治療胰

島素相關疾病(例如：糖尿病)之醫藥組成物，其包含胰島素類似物作為活性成份。

【0036】再另一態樣中，本發明提供一種治療胰島素相關疾病(例如：糖尿病)之方法，其包括對有此需要之個體投與胰島素類似物或包含胰島素類似物作為活性成份之醫藥組成物。

【0037】再另一態樣中，本發明提供一種以該胰島素類似物於製備醫藥上之用途。

【0038】一項實施例中，該醫藥係用於預防或治療胰島素相關疾病。

【0039】另一項實施例中，該醫藥係用於預防或治療糖尿病。

【0040】再另一態樣中，本發明提供一種以該胰島素類似物於治療胰島素相關疾病，明確言之糖尿病上之用途。

[本發明之優勢效應]

【0041】本發明之非天然胰島素類似物可為需要投與胰島素之患者改善順應性。

【圖式簡單說明】

【0042】第 1 圖出示採用蛋白質電泳法分析胰島素類似物純度之結果。明確言之，代表性胰島素類似物 9、10、11、與 12 之結果(條帶 1：分子大小標記物；條帶 2：天然胰島素；條帶 3：胰島素類似物 9；條帶 4：胰島素類似物 10；條帶 5：胰島素類似物 11；及條帶 6：胰島素類似物 12)。

【0043】第 2a 至 2d 圖出示採用高壓層析法分析胰島素類似物純度之結果。明確言之，代表性胰島素類似物 9、10、11、與 12 之結果。各圖中，依序從上至下出示 RP-HPLC (C18)、RP-HPLC (C4)、與 SE-HPLC 之結果。

【0044】第 3 圖出示證實人類胰島素與胰島素類似物 10 之葡萄糖吸收能力之實驗結果。

【0045】第 4 圖出示證實人類胰島素與胰島素類似物 10 之細胞安定性之實驗結果。

【實施方式】

【0046】下文中，將詳細說明本發明之實施例。

【0047】同時，本文所揭示各說明與例舉之實施例適用於其他說明與例舉之實施例。亦即本文所揭示各種不同因子之所有組合均屬於本發明範圍。此外，本發明範圍不應受到下文所提供明確揭示內容之限制。

【0048】此外，彼等習此相關技藝者依據例行實驗即可了解或證實本申請案所說明本發明明確實施例有許多等效物，且此等等效物均計畫包括在本發明範圍內。

【0049】本說明書全文採用胺基酸之單字母與三字母代碼。此外，本文述及之胺基酸縮寫係依據 IUPAC-IUB 原則說明。

【0050】本發明一項態樣提供一種新穎胰島素類似物，且明確言之，包括在選自：天然胰島素之 B-鏈之第 16 個胺基酸、B-鏈之第 25 個胺基酸、A-鏈之第 14 個胺基酸、與 A-鏈之第 19 個胺基酸之胺基酸(群)中至少一個修飾之

胰島素類似物。

【0051】本文所採用術語「胰島素類似物」意指不同於天然胰島素之非天然胰島素。

【0052】該胰島素類似物包括不同於天然人類胰島素之非天然人類胰島素。此等胰島素類似物包括天然胰島素之一部份胺基酸經過添加、刪除或取代等修飾之類似物。

【0053】明確言之，本發明胰島素類似物可為與天然胰島素之序列具有至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、或至少 95% 序列一致性者。此外，相較於天然胰島素，本發明胰島素類似物可為具有降低與受體之結合親和力同時仍具有上述序列一致性者。此外，該胰島素類似物仍具有如同天然胰島素之葡萄糖吸收能力且/或具有降低活體內血糖濃度之能力。

【0054】更明確言之，相較於天然胰島素對胰島素受體之結合親和力(100%)，本發明胰島素類似物對胰島素受體之結合親和力為約 99% 或以下、約 95% 或以下、約 90% 或以下、約 85% 或以下、約 80% 或以下、約 75% 或以下、約 70% 或以下、約 65% 或以下、約 60% 或以下、約 55% 或以下、約 50% 或以下、約 45% 或以下、約 40% 或以下、約 35% 或以下、約 30% 或以下、約 25% 或以下、約 20% 或以下、約 15% 或以下、約 10% 或以下、約 9% 或以下、約 8% 或以下、約 7% 或以下、約 6% 或以下、約 5% 或以下、約 4% 或以下、約 3% 或以下、約 2% 或以下、約 1% 或以下、或約

0.1%或以下(然而，本發明胰島素類似物對胰島素受體之結合親和力不會相當於 0%)。

【0055】胰島素類似物對胰島素受體之結合親和力可採用閃爍近似分析法(SPA)分析，其在過度表現重組體人類胰島素受體之細胞膜中，利用胰島素類似物與標記 I¹²⁵之胰島素之間之競爭性反應。此方法亦可用於評估胰島素類似物對胰島素受體之結合親和力。該方法之實施例可採用實例 8 所使用之方法。

【0056】本文所採用術語「約」意指包括± 0.5、± 0.4、± 0.3、± 0.2、± 0.1，等等之範圍，及術語「約」包括，但不限於，與該術語後面接續之數值相等或在接近範圍內之任何數值。

【0057】此外，本發明胰島素類似物可具有如同天然胰島素之葡萄糖吸收能力。

【0058】明確言之，相較於天然胰島素之葡萄糖吸收能力(100%)，本發明胰島素類似物可為具有約 10%或以上、約 20%或以上、約 30%或以上、約 40%或以上、約 50%或以上、約 55%或以上、約 60%或以上、約 65%或以上、約 70%或以上、約 75%或以上、約 80%或以上、約 85%或以上、約 90%或以上、約 95%或以上、約 100%或以上、約 110%或以上、約 120%或以上、約 130%或以上、約 140%或以上、約 150%或以上、約 160%或以上、約 170%或以上、約 180%或以上、約 190%或以上、或約 200%或以上之葡萄糖吸收能力者。

【0059】可採用相關技藝上用於測定葡萄糖吸收能力之各種不同方法來測定葡萄糖吸收能力，例如：可採用實例 9 說明之測定葡萄糖吸收能力之方法，但該測定方法不受其等限制。

【0060】明確言之，應用於本發明之胰島素類似物可呈單一多肽鏈或兩條多肽鏈之型式，更佳係兩條多肽鏈，但該胰島素類似物沒有受到特別限制。

【0061】該胰島素類似物可呈兩條多肽鏈之型式，其可由兩條多肽組成，亦即對應於天然胰島素 A-鏈之多肽與對應於天然胰島素 B-鏈之多肽。特定言之，對應於天然胰島素之 A-鏈或 B-鏈可能為該兩條多肽鏈中任一條多肽鏈與天然胰島素之 A-鏈或 B-鏈具有至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、或至少 95% 之序列一致性者，但沒有特別限制，且彼等習此相關技藝者很容易由構成該兩條多肽鏈之序列與天然胰島素之 A-鏈或 B-鏈序列比對後決定。

【0062】天然胰島素為由胰臟分泌之激素，通常具有促進細胞內葡萄糖吸收及抑制脂肪降解之角色，藉以控制活體內血糖濃度。可以控制血糖濃度之胰島素係由沒有控制血糖濃度功能之前體(胰島素原)經過處理後產生。胰島素係由兩條多肽鏈組成，亦即 A-鏈與 B-鏈，其分別包括 21 個與 30 個胺基酸，且利用兩個二硫橋鏈連接。各 A-鏈與 B-鏈可包括如下 SEQ ID NO: 53 與 54 代表之胺基酸序

列。

【0063】

A-鏈：

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO : 53)

B-鏈：

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO : 54)

【0064】 一項實施例中，本發明說明之胰島素類似物可為彼等對受體具有降低之結合親和力且同時具有如同天然胰島素之控制活體內血糖濃度功能者。更明確言之，該胰島素類似物可具有降低活體內血糖濃度之能力。

【0065】 此外，一項實施例中，該胰島素類似物之種類與分子大小沒有特別限制，只要其等具有降低之受體所介導內化作用或受體所介導清除作用即可。因此，本發明胰島素類似物具有比天然胰島素改良之血液半衰期。本發明胰島素類似物包括反式胰島素(inverted insulin)、天然胰島素衍生物、天然胰島素片段，等等。該胰島素類似物不僅可採用重組方法製備，而且可以採用固相合成法製備，製備方法不受其等限制。

【0066】 本文所採用術語「天然胰島素衍生物」係指與天然胰島素之胺基酸序列具有至少一處差異之肽、由天然胰島素序列經過修飾後製成之肽、及可如同天然胰島素

一般控制活體內血糖濃度之天然胰島素擬似物。此等天然胰島素衍生物可為彼等具有控制活體內血糖濃度功能者。

【0067】明確言之，天然胰島素衍生物可為經由任何取代、添加、刪除之修飾法及修飾天然胰島素之一部份胺基酸、或該等方法組合所製備者。

【0068】明確言之，天然胰島素衍生物可與天然胰島素 A-鏈與 B-鏈之各胺基酸序列具有 80%或更高之同源性，及/或胺基酸殘基中一部份基團可經過化學取代修飾(例如： α -甲基化、 α -羥基化)、刪除(例如：脫胺化)、或修飾(例如：N-甲基化)，等等，但不受其等限制。

【0069】適用於本發明之天然胰島素衍生物可採用用於製備衍生物之各種不同方法之組合製備。

【0070】此外，此等製備天然胰島素衍生物之修飾法包括採用 L-型或 D-型胺基酸(群)、與/或非天然胺基酸(群)之修飾法；及/或天然序列之修飾法或轉譯後修飾法(例如：甲基化、醯化、泛素化、分子間共價鍵，等等)。

【0071】此外，彼等在天然胰島素之胺基與/或羧基端添加一個或多個胺基酸之胰島素均包括在內。

【0072】進行胺基酸(群)之取代或嵌入時，不僅可使用人類蛋白質中常見之 20 種胺基酸，而且可以使用非典型或非天然胺基酸。非典型胺基酸之商品來源可包括 Sigma-Aldrich、ChemPep、Genzyme pharmaceuticals，等等。包含此等胺基酸之肽與典型肽之序列可由肽合成商業公司，如：American Peptide Company、Bachem (USA)、與 Anygen

(韓國)合成或購得，但不受其等特別限制。

【0073】本文所採用術語「天然胰島素片段或天然胰島素衍生物片段」係指一種胰島素型式，其中已脫除天然胰島素或天然胰島素衍生物中胺基端或羧基端之至少一個胺基酸。此等胰島素片段可具有控制活體內血糖濃度之功能。

【0074】此外，本發明胰島素類似物可為彼等分別或組合採用製備天然胰島素之衍生物與片段之方法所製備者。

【0075】明確言之，根據本發明胰島素類似物可包括彼等在天然胰島素 A-鏈與 B-鏈上具有修飾者，及明確言之，彼等在天然胰島素 A-鏈之特定胺基酸殘基(群)經過修飾與/或天然胰島素 B-鏈之特定胺基酸殘基(群)經過修飾者。

【0076】明確言之，胰島素類似物可為彼等在選自由天然胰島素之 B-鏈之第 16 個胺基酸、B-鏈之第 25 個胺基酸、A-鏈之第 14 個胺基酸、與 A-鏈之第 19 個胺基酸所組成群中之胺基酸經過不同胺基酸取代之至少一個修飾者，明確言之，其可經麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天冬胺酸、組胺酸、離胺酸、或丙胺酸取代，但不受其等限制。

【0077】明確言之，該胰島素類似物可為彼等在上述胺基酸中至少一個、至少兩個、至少三個、或四個胺基酸被其他胺基酸(群)取代者。

【0078】明確言之，該修飾法可為胰島素 B-鏈之第 16

個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天冬胺酸；胰島素 B-鏈之第 25 個胺基酸(亦即苯基丙胺酸)修飾成天冬胺酸或麩胺酸；胰島素 A-鏈之第 14 個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸；或胰島素 A-鏈之第 19 個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸。

【0079】因此，該胰島素類似物可包括由天然胰島素 B-鏈之第 16 個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天冬胺酸；及/或由天然胰島素 B-鏈之第 25 個胺基酸(亦即苯基丙胺酸)修飾成天冬胺酸或麩胺酸；及/或由天然胰島素 A-鏈之第 14 個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸；及/或由天然胰島素 A-鏈之第 19 個胺基酸(亦即酪胺酸)修飾成麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸，但該修飾不受其等限制。

【0080】更明確言之，該胰島素類似物可為彼等包括如下通式 1 代表之 SEQ ID NO: 55 之 A-鏈與如下通式 2 代表之 SEQ ID NO: 56 之 B-鏈者。此等胰島素類似物可呈 A-鏈與 B-鏈利用二硫鍵交聯之型式，或呈胰島素原型式，但不受其等限制。

【0081】[通式 1]

Xaa1-Ile-Val-Glu-Xaa5-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa12-Leu-Xaa14-Gln-Xaa16-Glu-Asn-Xaa19-Cys-Xaa21 (SEQ ID NO: 55)

通式 1 中，

Xaa1 為丙胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、麩胺酸、或天冬醯胺，

Xaa5 為丙胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、或天冬醯胺，

Xaa12 為丙胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、組胺酸、或天冬醯胺，

Xaa14 為酪胺酸、組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸、

Xaa16 為丙胺酸、白胺酸、酪胺酸、組胺酸、麩胺酸、或天冬醯胺，

Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸，及

Xaa21 為天冬醯胺、甘胺酸、組胺酸、或丙胺酸。

[通式 2]

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa16-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Xaa25-Tyr-Xaa27-Xaa28-Lys-Thr (SEQ ID NO : 56)

通式 2 中，

Xaa16 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天冬胺酸，

Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸，

Xaa27 為蘇胺酸、或不存在，及

Xaa28 為脯胺酸、麩胺酸、或天冬胺酸、或不存在。

【0082】本文中，排除包括 SEQ ID NO : 53 之 A-鏈與 SEQ ID NO : 54 之 B-鏈之肽類。

【0083】此外，本發明範圍內亦包括彼等與包括上述通式 1 之 A-鏈與上述通式 2 之 B-鏈，同時包括上述特徵性修飾(亦即不會出現在天然胰島素中之胺基酸殘基)，明確言之，A-鏈之第 14 個與/或第 19 個胺基酸、與/或 B-鏈之第 16 個與/或第 25 個胺基酸，且對受體之結合親和力低於天然胰島素之對應胰島素類似物之序列具有 70%或更高，明確言之 80%或更高，更明確言之 90%或更高，甚至更明確言之 95%或更高同源性的肽類。

【0084】本文所採用術語「同源性」意指與野生型蛋白質之胺基酸序列或編碼該蛋白質之聚核苷酸序列之相似性，且包括具有與本發明胺基酸序列或聚核苷酸序列之上述相同序列百分比或更高百分比之序列。此同源性可由裸視比對決定，或可利用生物資訊算法決定，其藉由排比兩個序列來分析同源程度。兩個胺基酸序列之間之同源性可採用百分比表示。適用之自動化算法可採用威斯康辛遺傳套裝軟體(Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA))之 GAP、BESTFIT、與 FASTA 及 TFASTA 電腦軟體模組(TFASTA computer software module)。自動化排列算法包括 Needleman & Wunsch、Pearson & Lipman、與 Smith & Waterman 之序列排列算法。可採用包括 FASTP、BLAST、BLAST2、PSIBLAST、與 CLUSTAL W 之軟體自動計算及測定同源性。

【0085】一項實施例中，該胰島素類似物可為包括如上通式 1 代表之 SEQ ID NO: 55 之 A-鏈與 SEQ ID NO: 54

之 B-鏈之胰島素類似物；或包括 SEQ ID NO: 53 之 A-鏈與如上通式 2 代表之 SEQ ID NO: 56 之 B-鏈之胰島素類似物，但不受其等特別限制。

【0086】更明確言之，該胰島素類似物可為其中通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸、組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天冬胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸之胰島素類似物，但不受其等限制。

【0087】更明確言之，該胰島素類似物可為其中通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、或絲胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或天冬胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸之胰島素類似物，但不受其等限制。

【0088】更明確言之，該胰島素類似物可為其中通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸或天冬胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸之

胰島素類似物，但不受其等限制。

【0089】一項實施例中，根據本發明胰島素類似物可對應於下列胰島素類似物：

(1)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為組胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(2)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為離胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(3)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為麩胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(4)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為絲胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(5)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12

為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為蘇胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(6)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為麩胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(7)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為絲胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(8)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為蘇胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(9)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為丙胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(10)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為天冬胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(11)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為天冬胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(12)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為天冬胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；及

(13)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

【0090】此外，一項實施例中，該胰島素類似物可為包括

選自 SEQ ID NO：28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、與 52 所組成群中之胺基酸序列之胰島素類似物，但不受其等限制。

【0091】根據本發明胰島素類似物可為包括上述明確序列之肽、(基本上)由上述明確序列組成之肽，但不受其等限制。

【0092】同時，雖然本發明中說明其為「由明確 SEQ ID NO 組成之肽或胰島素類似物」，但其並未排除任何在對應 SEQ ID NO 之胺基酸序列上游或下游無意義序列之添加、或其天然發生之突變、或靜默突變，只要該肽具有與對應 SEQ ID NO 之胺基酸序列所組成肽或該胰島素類似物相同或等效之活性即可，且此等添加序列或突變顯然亦在本發明範圍內。

【0093】同時，該胰島素類似物包括所有肽本身、其鹽類(例如：肽之醫藥上可接受之鹽)、或其溶劑合物。

【0094】此外，肽或胰島素類似物可呈任何醫藥上可接受之型式。

【0095】鹽之種類沒有特別限制。然而，該鹽較佳為對個體(例如：哺乳動物)安全且有效，但不受其等特別限制。

【0096】本文所採用術語「醫藥上可接受」係指該物質在醫藥學判斷之範圍下，可有效用於計畫用途，不會誘發過度毒性、刺激性、過敏反應，等等。

【0097】本文所採用術語「醫藥上可接受之鹽」包括由醫藥上可接受之無機酸、有機酸、或鹼類衍生之鹽。合適酸類實例可包括鹽酸、溴酸、硫酸、硝酸、過氯酸、延胡索酸、順丁烯二酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水楊酸、琥

珀酸、對甲苯磺酸、酒石酸、乙酸、檸檬酸、甲磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸，等等。由合適鹼類衍生之鹽類可包括鹼金屬，如：鈉、鉀，等等；鹼土金屬，如：鎂；銨；等等之鹽類。

【0098】此外，本文所採用術語「溶劑合物」係指根據本發明肽或其鹽與溶劑分子之間形成之複合物。

【0099】另一態樣中，本發明提供一種編碼該胰島素類似物之單離核酸、包括該核酸之重組表現載體、及包括該重組表現載體之轉化體。

【0100】該胰島素類似物係如上述相同說明。

【0101】本文所採用術語「核酸」意指呈單股或雙股型之去氧核糖核苷酸(DNA)或核糖核苷酸(RNA)，包括基因組 DNA、cDNA、及其所轉錄之 RNA，且作為核酸分子中基本構成單位之核苷酸不僅包括天然核苷酸，而且包括在糖或鹼基上具有修飾之類似物(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York, 1980; Uhlman and Peyman, *Chemical Reviews*, 90: 543 - 584, 1990)。本發明核酸可以採用分子生物學標準技術單離或製備。例如：本發明核酸可採用 PCR 擴增法，依據天然胰島素之基因序列(NM_000207.2, NCBI)，使用適當引子序列製備，且可使用自動化 DNA 合成儀，採用標準技術製備。

【0102】明確言之，本發明核酸包括由 SEQ ID NO：27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、或 51 代表之核苷酸序列。一項實施例中，本發明核酸不僅包

括由 SEQ ID NO：27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、或 51 代表之核苷酸序列，而且包括與上述序列具有至少 70% 序列同源性之所有序列，較佳係至少 80%，更佳係至少 90%，甚至更佳係至少 95%，及最佳係至少 98%，其中由上述核酸編碼之肽對受體之結合親和力比天然胰島素降低，但實質上仍具有控制活體內血糖濃度之功能。

【0103】根據本發明重組體載體可構築成用於典型選殖或表現之載體，且可使用真核細胞或原核細胞作為宿主細胞，構築成載體。

【0104】本文所採用術語「載體」意指可以在適當宿主細胞中表現目標蛋白質之重組體載體，其係一種核酸構築體，其中包括以操縱方式連接之必要調節因子，以進行核酸嵌段之表現。本發明可以製備包括編碼胰島素類似物之核酸之重組體載體，且本發明胰島素類似物可藉由轉化或轉染該重組體載體進入宿主細胞中而製得。

【0105】本發明中，編碼該胰島素類似物之核酸可以以操縱方式連接發動子。

【0106】本文所採用術語「以操縱方式連接」意指在核酸表現之調節序列(例如：發動子、訊號序列、核糖體連結位點、轉錄終止序列，等等)與不同核苷酸序列之間之功能性連接，且該調節序列可藉此調節不同核苷酸序列之轉錄與/或轉譯。

【0107】本文所採用術語「發動子」意指未轉譯之核

酸序列，其可位於編碼區之上游，包括聚合酶結合位點，且具有啟動位於發動子下游之基因轉錄成 mRNA 之活性，亦即與聚合酶結合並啟動基因轉錄之 DNA 區，其可位於 mRNA 轉錄起始之 5' 區。

【0108】例如：當本發明載體為重組體載體且利用原核細胞作為宿主細胞時，通常包括可以執行轉錄之強力發動子(例如：*tac* 發動子、*lac* 發動子、*lacUV5* 發動子、*lpp* 發動子、*pLλ* 發動子、*pRλ* 發動子、*rac5* 發動子、*amp* 發動子、*recA* 發動子、*SP6* 發動子、*trp* 發動子、*T7* 發動子，等等)、起始轉譯之核糖體結合位點、及轉錄/轉譯終止序列。

【0109】此外，本發明所採用載體可藉由操縱相關技藝上常用之質體(例如：*pSC101*、*pGV1106*、*pACYC177*、*ColE1*、*pKT230*、*pME290*、*pBR322*、*pUC8/9*、*pUC6*、*pBD9*、*pHC79*、*pIJ61*、*pLAFR1*、*pHV14*、*pGEX* 系列、*pET* 系列、*pPICZα* 系列、*pUC19*，等等)、噬菌體(例如：*λgt4*、*λB*、*λ-Charon*、*λΔz1*、*M13*，等等)、或病毒(例如：SV40，等等)來製備。

【0110】同時，當本發明載體為重組體載體且利用真核細胞作為宿主細胞時，可採用從哺乳動物細胞之基因組衍生之發動子(例如：金屬硫蛋白(metallothioneins)發動子)或衍生自哺乳動物病毒之發動子(例如：腺病毒晚期發動子、人類乳突病毒之 7.5K 發動子、SV40 發動子、巨細胞病毒發動子、與 HSV 之 tk 發動子)，且通常載體包括聚腺

苷酸化序列(例如：牛生長激素終止子與衍生自 SV40 之聚腺苷酸化序列)作為轉錄終止序列。

【0111】此外，本發明重組體載體包括相關技藝上常用之抗生素-抗性基因作為選拔標記物，且可包括例如：對胺苄青黴素(ampicillin)、慶大黴素(gentamycin)、卡苯尼西林(carbenicillin)、氯黴素(chloramphenicol)、鏈黴素(streptomycin)、卡納黴素(kanamycin)、建那黴素(geneticin)、新黴素(neomycin)、與四環素具有抗性之基因。

【0112】本發明重組體載體可再包括不同序列來促進純化所收集之目標蛋白質，亦即單鏈胰島素類似物、胰島素原、或其類似物。另外包括之序列可為用於純化蛋白質之標記序列，例如：穀胱甘肽 S-轉移酶(Pharmacia, USA)、麥芽糖結合蛋白質(NEB, USA)、FLAG (IBI, USA)、6-組胺酸，等等，但用於純化目標蛋白質所必要之序列種類沒有受到此等限制。

【0113】包括上述標記序列之重組體載體所表現之融合蛋白質可採用親和力層析法純化。此外，當穀胱甘肽 S-轉移酶融合時，可採用作為酵素受質之穀胱甘肽，而當使用 6-組胺酸標記時，很容易利用 Ni-NTA 管柱收集所需之目標蛋白質。

【0114】本文所採用術語「轉化」意指將 DNA 引進宿主細胞中，並使 DNA 在其中複製成為染色體因子或完成染色體整合之過程，其係人工引進外源 DNA 至細胞中造成遺傳變化之現象。

【0115】本發明採用之轉化法可為任何轉化法，且很容易依據相關技藝常用之方法執行。常用之轉化法實例可包括 CaCl_2 沉澱法、於 CaCl_2 沉澱法中使用二甲亞砜(DMSO)作為還原劑來改良效力之哈拿汗法(Hanahan method)、電穿孔法、 CaPO_4 沉澱法、原生質融合法、使用碳化矽纖維之攪拌法、農桿菌介導之轉化法、使用 PEG、硫酸葡聚糖-、脂染胺(lipofectamine)-、與乾燥/壓抑-介導轉化之轉化法，等等。

【0116】包括編碼根據本發明胰島素類似物之核酸之重組體載體之轉化法可以不受此等方法限制，但相關技藝上常用之任何轉化或轉染方法均可採用，沒有限制。

【0117】本發明轉化體可由包括編碼胰島素類似物之目標核酸之重組體載體引進宿主細胞中製得。

【0118】可用於本發明之適當宿主沒有特別限制，只要其可表現本發明核酸即可。適當宿主實例可包括：屬於腸桿菌屬(*Escherichia*)之細菌，如：大腸桿菌(*E. coli*)；屬於桿菌屬(*Bacillus*)之細菌，如：枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)；屬於假單胞菌(*Pseudomonas*)之細菌，如：戀臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)；酵母，如：畢赤酵母(*Pichia pastoris*)、釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、及粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；昆蟲細胞，如：草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(Sf9)、及動物細胞，如：CHO、COS、及 BSC。明確言之，可採用大腸桿菌作為宿主細胞，但不受其等限制。

【0119】另一項達成本發明目的之態樣中，提供一種使用轉化體製備胰島素類似物之方法。

【0120】明確言之，製備胰島素類似物之方法可包括下列：

a) 培養包括編碼該胰島素類似物之核酸之轉化體來表現胰島素類似物；及

b) 單離及純化所表現之胰島素類似物。

【0121】用於培養本發明轉化體之培養基可依適當方式符合培養宿主細胞之要求。宿主細胞生長之培養基中所包含碳源可由習此相關技藝者依據其所製備之轉化體決定適當之選擇，且可選擇適當培養條件，來控制培養時間期與培養量。

【0122】可使用之糖源實例包括糖類與碳水化合物，如：葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麥芽糖、澱粉、與纖維素；油類與脂肪，如：大豆油、葵花油、蓖麻油、與椰子油；脂肪酸如：棕櫚酸、硬脂酸、與亞油酸；醇類，如：甘油與乙醇；及有機酸類，如：乙酸。此等材料可以單獨使用或組合使用。

【0123】可使用之氮源實例可包括蛋白腴、酵母抽出物、肉汁、麥芽抽出物、玉米浸液、大豆粉、與尿素，或無機化合物，如：硫酸銨、氯化銨、磷酸銨、碳酸銨、與硝酸銨。氮源亦可單獨使用或組合使用。

【0124】可使用之磷源實例可包括磷酸二氫鉀或磷酸氫二鉀或對應之含鈉鹽。此外，培養物可包含轉化體生

長所必要之金屬鹽，如：硫酸鎂或硫酸鐵。

【0125】最後，可使用必要生長材料，如：胺基酸與維生素。此外，亦可使用適合培養基之適當前體。培養期間，可依分批培養或連續培養方式適當添加上述來源至培養基中。可使用鹼性化合物(如：氫氧化鈉、氫氧化鉀、與氨)、或酸性化合物(如：磷酸或硫酸)適當調整培養物之pH。此外，可添加消泡劑(如：脂肪酸聚二醇酯)，以防止泡沫產生。此外，為了維持培養物之好氧狀態，可在培養基中注入氧氣或含氧氣體(例如：空氣)。

【0126】本發明轉化體可於 20°C 至 45°C 下培養，且明確言之，25°C 至 40°C 下。此外，持續培養直到得到最大產量之所需胰島素類似物時為止，因此，此培養通常持續 10 小時至 160 小時。

【0127】如上討論，當依據宿主細胞提供適當培養條件時，本發明轉化體可產生胰島素類似物，依據載體組成及宿主細胞特徵產生之胰島素類似物可在細胞質中分泌或可分泌至宿主細胞之胞質周圍空間中或細胞外。

【0128】在宿主細胞內或外表現之蛋白質可採用習知方法純化。純化法實例可包括鹽析法(例如：硫酸銨沉澱法、磷酸銨沉澱法，等等)、溶劑沉澱法(例如：使用丙酮或乙醇之蛋白質分段沉澱法，等等)、透析法、凝膠過濾法、離子交換法、或層析法(如：逆相管柱層析法)、超濾法，等等，且此等方法可以單獨使用或組合使用。

【0129】一項實施例中，本發明進一步包括下列步

驟，從轉化體中分離及純化以包涵體型式表現之胰島素類似物：

b-1)從步驟 a)之培養物中得到轉化體，並粉碎該轉化體；

b-2)從粉碎之細胞溶胞物中回收所表現之胰島素類似物後，接著重摺疊該類似物；

b-3)採用陽離子交換層析法純化該經重摺疊之胰島素類似物；

b-4)採用胰蛋白酶與羧基肽酶 B 處理該經純化之胰島素類似物；及

b-5)依序採用陽離子交換層析法、與陰離子交換層析法或逆相層析法純化該經過處理之胰島素類似物。

【0130】再另一態樣中，本發明提供一種治療糖尿病之組成物（例如：醫藥組成物），其包含胰島素類似物作為活性成份。

【0131】該醫藥組成物可為治療胰島素相關疾病（例如：糖尿病）之醫藥組成物。

【0132】該胰島素類似物係如上述之相同說明。

【0133】本文所採用術語「胰島素相關疾病」意指在沒有或低度胰島素生理活性下發生或演進之疾病，例如：包括糖尿病，但不受其等特別限制。

【0134】本發明包含胰島素類似物之醫藥組成物可包括醫藥上可接受之載劑。

【0135】本文所採用術語「醫藥上可接受」意指其量

足以具有醫療效應，且不會引起副作用之性質，且很容易由習此相關技藝之人士依據醫界習知之因素決定，如：疾病種類、患者之年齡、體重、健康狀態、性別、藥物敏感性、投藥途徑、投藥方法、投藥頻率、治療期、計畫混合或同時投與之藥物(群)，等等。

【0136】用於經口投藥時，醫藥上可接受之載劑可包含結合劑、潤滑劑、崩解劑、賦形劑、溶解劑、勻散劑、安定劑、懸浮劑、著色劑、香料，等等；用於注射劑時，醫藥上可接受之載劑可包含緩衝劑、防腐劑、止痛藥、溶解劑、等滲劑、與安定劑。用於局部外用投藥時，醫藥上可接受之載劑可包含基質、賦形劑、潤滑劑、防腐劑，等等。本發明醫藥組成物可與上述醫藥上可接受之載劑組合，調配成各種不同劑型。例如：用於經口投藥時，醫藥組成物可調配成錠劑、口含錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、或薄片。用於注射用製劑之醫藥組成物可調配成單位劑量安瓿或多劑量容器。醫藥組成物亦可調配成溶液、懸浮液、錠劑、丸劑、膠囊、持續釋放型製劑。

【0137】同時，適合調配物之載劑、賦形劑、及稀釋劑實例可包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、麥芽糖醇、澱粉、金合歡膠、藻酸鹽、明膠、磷酸鈣、矽酸鈣、纖維素、甲基纖維素、微晶纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羥基苯甲酸甲酯、羥基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸鎂、礦物油，等等。此外，醫藥調配物可能進一步包含填料、抗結塊劑、潤滑劑、保濕劑、調

味劑、乳化劑、防腐劑，等等。

【0138】此外，本申請案胰島素類似物之含量可佔本申請案組成物總重量之 0.001 wt% 至 10 wt%，但該含量不受其等特別限制。

【0139】再另一態樣中，本發明提供一種治療胰島素相關疾病(例如：糖尿病)之方法，其包括對有此需要之個體投與胰島素類似物或包含胰島素類似物之醫藥組成物。

【0140】該胰島素類似物與醫藥組成物係與上述說明相同。

【0141】本文所採用術語「投藥」係指藉由適當方法將特定物質引進個體中，且本發明胰島素類似物之投藥途徑可為任何常用途徑，只要藥物可到達目標組織即可。例如：可經腹膜內、靜脈內、肌內、皮下、皮內、經口、局部外用、鼻內、肺內、及直腸內投藥，但投藥途徑不受其等限制。然而，由於肽類會在經口投藥時被消解，因此用於口服之組成物之活性成份應包覆包衣或調配成保護型，以免在胃中降解。較佳為本組成物呈注射型投藥。此外，醫藥組成物可使用某些可轉運活性成份至標靶細胞之裝置投藥。

【0142】此外，本發明醫藥組成物可由作為活性成份之藥物型態及數種相關因素決定，包括計畫治療之疾病、投藥途徑、患者之年齡、性別、及體重、及疾病嚴重性。由於本發明醫藥組成物具有優異之活體內長效性，因此其可大幅降低發明醫藥之投藥頻率與劑量。

【0143】本發明組成物之總有效劑量可呈單一劑量投與患者或可依據分段療程，長期投與多重劑量。本發明醫藥組成物中之活性成份(群)含量可能隨疾病嚴重性變化。明確言之，本發明胰島素類似物之每日總劑量可為每 1 kg 患者體重使用約 0.0001 mg 至 500 mg。

【0144】然而，該胰島素類似物之有效劑量係考慮各種不同因素決定，除了醫藥組成物之投藥途徑與治療頻率外，尚包括患者之年齡、體重、健康狀況、性別、疾病嚴重性、膳食、及排泄率。此時，彼等習此相關技藝之人士很容易決定適合本發明醫藥組成物特定用途之有效劑量。根據本發明醫藥組成物對調配物與投藥途徑及模式沒有特別限制，只要其可顯示本發明效應即可。

【0145】為了達成本發明，本發明另一態樣提供一種以該胰島素類似物於製備醫藥上之用途。

【0146】一項實施例中，該醫藥係用於預防或治療胰島素相關疾病，但該用途不受其等特別限制。

【0147】一項實施例中，該醫藥係用於預防或治療糖尿病，但該用途不受其等特別限制。

【0148】為了達成本發明，本發明又另一態樣提供一種以該胰島素類似物於治療胰島素相關疾病，明確言之糖尿病上之用途。

【0149】該胰島素類似物與胰島素相關疾病均與上述說明相同。

【0150】下文中，本發明將參考下列實例更詳細說

明。然而，此等實例僅供說明之目的，且不應以任何方式限制本發明範圍。

【0151】

實例 1：單鏈胰島素類似物表現載體之製法

為了製備分別在 A 鏈或 B 鏈具有單一修飾之胺基酸之胰島素類似物，使用所擁有之表現天然胰島素之載體作為模板，合成正向與逆向寡核苷酸(表 2)，然後進行 PCR 擴增該類似物之各基因。

A 鏈或 B 鏈中經修飾之胺基酸序列與類似物名稱示於下表 1。表 1 中，類似物 1 代表其中 A 鏈之第 14 個胺基酸(亦即酪胺酸，Y)被組胺酸取代之類似物(H)，及類似物 6 代表其中 B 鏈之第 16 個胺基酸(亦即酪胺酸，Y)被麩胺酸(E)取代之類似物。

[表 1]

| 胰島素類似物編號 | 序列修飾 |
|----------|-----------------------|
| 類似物 1 | A ¹⁴ Y → H |
| 類似物 2 | A ¹⁴ Y → K |
| 類似物 3 | A ¹⁹ Y → E |
| 類似物 4 | A ¹⁹ Y → S |
| 類似物 5 | A ¹⁹ Y → T |
| 類似物 6 | B ¹⁶ Y → E |
| 類似物 7 | B ¹⁶ Y → S |
| 類似物 8 | B ¹⁶ Y → T |

| | |
|--------|-----------------------|
| 類似物 9 | A ¹⁴ Y → A |
| 類似物 10 | A ¹⁴ Y → D |
| 類似物 11 | B ¹⁶ Y → D |
| 類似物 12 | B ²⁵ F → D |
| 類似物 13 | B ²⁵ F → E |

用於擴增胰島素類似物之引子示於下表 2。

[表 2]

| 類似物 | 序列 | SEQ ID NO |
|----------|--|--------------|
| 類似物 1 | 5' CAGCATCTGCTCCCTCCATCAGCTGGAGAACTAC 3' | 1 |
| | 5' GTAGTTCTCCAGCTGATGGAGGGAGCAGATGCTG 3' | 2 |
| 類似物 2 | 5' CAGCATCTGCTCCCTCAAGCAGCTGGAGAACTAC 3' | 3 |
| | 5' GTAGTTCTCCAGCTGCTTGAGGGAGCAGATGCTG 3' | 4 |
| 類似物 3 | 5' CTACCAGCTGGAGAACGAGTGCAACTGAGGATCC 3' | 5 |
| | 5' GGATCCTCAGTTGCACTCGTTCTCCAGCTGGTAG 3' | 6 |
| 類似物 4 | 5' CTACCAGCTGGAGAACTCCTGCAACTGAGGATCC 3' | 7 |
| | 5' GGATCCTCAGTTGCAGGAGTTCTCCAGCTGGTAG 3' | 8 |
| 類似物 5 | 5' CTACCAGCTGGAGAACACCTGCAACTGAGGATCC 3' | 9 |
| | 5' GGATCCTCAGTTGCAGGTGTTCTCCAGCTGGTAG 3' | 10 |
| 類似物 6 | 5' CTGGTGGAAGCTCTCGAGCTAGTGTGCGGGGAAC 3' | 11 |
| | 5' GTTCCCCGCACACTAGCTCGAGAGCTTCCACCAG 3' | 12 |
| 類似物 | 5' CTGGTGGAAGCTCTCTCCCTAGTGTGCGGGGAAC 3' | 13 |

| | | |
|-----|--|----|
| 7 | 5' GTTCCCCGCACACTAGGGAGAGAGCTTCCACCAG 3' | 14 |
| 類似物 | 5' CTGGTGGAAGCTCTCACCCTAGTGTGCGGGGAAC 3' | 15 |
| 8 | 5' GTTCCCCGCACACTAGGGTGAGAGCTTCCACCAG 3' | 16 |
| 類似物 | 5' CAGCATCTGCTCCCTCGCCCAGCTGGAGAACTAC 3' | 17 |
| 9 | 5' GTAGTTCTCCAGCTGGGCGAGGGAGCAGATGCTG 3' | 18 |
| 類似物 | 5' CAGCATCTGCTCCCTCGACCAGCTGGAGAACTAC 3' | 19 |
| 10 | 5' GTAGTTCTCCAGCTGGTCGAGGGAGCAGATGCTG 3' | 20 |
| 類似物 | 5' CTGGTGGAAGCTCTCGACCTAGTGTGCGGGGAAC 3' | 21 |
| 11 | 5' GTTCCCCGCACACTAGGTCGAGAGCTTCCACCAG 3' | 22 |
| 類似物 | 5' GGGGAACGAGGCTTCGACTACACACCCAAGACC 3' | 23 |
| 12 | 5' GGTCTTGGGTGTGTAGTCGAAGCCTCGTTCCCC 3' | 24 |
| 類似物 | 5' GGGGAACGAGGCTTCGAGTACACACCCAAGACC 3' | 25 |
| 13 | 5' GGTCTTGGGTGTGTACTCGAAGCCTCGTTCCCC 3' | 26 |

胰島素類似物進行擴增之 PCR 條件係 95°C 下 30 秒，55°C 下 30 秒，及 68°C 下 6 分鐘，重覆 18 次循環。取該條件下得到之胰島素類似物片段嵌入 *pET22b* 載體中，呈細胞內包涵體表現，所得表現載體稱為 *pET22b*-胰島素類似物 1 至 13。該表現載體包含編碼胰島素類似物 1 至 13 且在 T7 發動子控制下之胺基酸序列之核酸，且胰島素類似物蛋白質呈包涵體表現在包括表現載體之宿主細胞中。

胰島素類似物 1 至 13 之 DNA 序列與蛋白質序列示於下表 3。

採用 DNA 序列分析法檢測各序列修飾，結果證實各該

胰島素類似物之序列已依據計畫目的經過修飾。

[表 3]

| 類似物 | 序列 | SEQ ID NO |
|----------|---|--------------|
| 類似物 1 | DNA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC CAT CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 27 |
| | 蛋白質 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu His Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 28 |

| | | | |
|----------|-----|---|----|
| 類似物 2 | DNA | <p>TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAG CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC</p> | 29 |
| | 蛋白質 | <p>Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Lys Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn</p> | 30 |
| 類似物 3 | DNA | <p>TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC</p> | 31 |

| | | | |
|----------|-----|--|----|
| | | GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GAG TGC AAC | |
| | 蛋白質 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Glu Cys Asn | 32 |
| 類似物 4 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TCC TGC AAC | 33 |

| | | | |
|----------|-----|--|----|
| | 蛋白質 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Ser Cys Asn | 34 |
| 類似物 5 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC ACC TGC AAC | 35 |
| | 蛋白質 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly | 36 |

| | | | |
|----------|-----|--|----|
| | | Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Thr Cys Asn | |
| 類似物 6 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAG CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 37 |
| | 蛋白質 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 38 |
| 類似物 7 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TCC CTA GTG | 39 |

| | | | |
|----------|-----|---|----|
| | | <p>TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC</p> | |
| | 蛋白質 | <p>Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ser Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn</p> | 40 |
| 類似物 8 | DNA | <p>TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC ACC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG</p> | 41 |

| | | | |
|----------|-----|--|----|
| | | AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | |
| | 蛋白質 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Thr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 42 |
| 類似物 9 | DNA | TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GCC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC | 43 |
| | 蛋白質 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe | 44 |

| | | | |
|-----------|-----|---|----|
| | | <p>Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Ala Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn</p> | |
| 類似物 10 | DNA | <p>TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC</p> | 45 |
| | 蛋白質 | <p>Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asp Gln Leu Glu Asn Tyr</p> | 46 |

| | | | |
|-----------|-----|---|----|
| | | Cys Asn | |
| 類似物 11 | DNA | <p>TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC</p> | 47 |
| | 蛋白質 | <p>Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Asp Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn</p> | 48 |
| 類似物 12 | DNA | <p>TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GAC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC</p> | 49 |

| | | | |
|-----------|-----|---|----|
| | | <p>CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC</p> | |
| | 蛋白質 | <p>Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Asp Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn</p> | 50 |
| 類似物 13 | DNA | <p>TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GAG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG</p> | 51 |

| | | | |
|--|-----|--|----|
| | | GAG AAC TAC TGC AAC | |
| | 蛋白質 | Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Glu Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn | 52 |

【0152】

實例 2：重組體胰島素類似物融合肽之表現

重組體胰島素類似物之表現係在 T7 發動子之控制下進行。使用分別表現重組體胰島素類似物之載體轉化大腸桿菌 BL21-DE3 (大腸桿菌 B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) *gal* λ DE3; Novagen)。依據建議之方法進行轉化(Novagen)。收集經過各重組體表現載體轉化之純系，接種至包含胺苄青黴素(ampicillin)(50 μ g/mL)之 2X Luria Broth 營養液(LB)中，於 37°C 下培養 15 小時。重組體菌種培養液與包含 30% 甘油之 2X LB 培養基依 1:1 (v/v)之比例混合，取各 1 mL 混合物分配至冷凍管中，存放在 -140°C 下，用為製造重組體融合蛋白質之細胞儲液。

為了表現重組體胰島素類似物，各取一瓶細胞儲液解凍，接種至 500 mL 2X Luria 營養液中，於 37°C 下振盪培

養 14 小時至 16 小時。當 OD600 達到 5.0 或更高時終止培養，使用培養液作為接種培養液。使用 50 L 發酵槽 (MSJ-U2, B.E.MARUBISHI, Japan)，取接種培養液接種至 17 L 發酵培養基中，開始初次槽式發酵。培養條件維持在 37°C 溫度下，空氣流速 20 L/min (1 vvm)，攪拌速度 500 rpm，使用 30% 氨溶液在 pH 6.70 下。當培養液中之營養素消耗時，依分批加料方式添加進料溶液進行發酵。以 OD 值追蹤菌種生長。當 OD 達到 100 或更高時，添加 IPTG 至最終濃度為 500 μ M。添加後，繼續培養約 23 小時至 25 小時。培養終止時，離心收集重組體菌種，存放在 -80°C 下直到使用時為止。

【 0153 】

實例 3：重組體胰島素類似物之回收及重摺疊

為了將實例 2 所表現之重組體胰島素類似物改變成可溶型，打破細胞後，接著重摺疊。取細胞集結粒 (100 g；濕重) 再懸浮於 1 L 溶胞緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 9.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)、0.2 M NaCl、與 0.5% Triton X-100) 中。使用微流化器 (Microfluidic Corp. Model M-110EH-30)，在操作壓力 15,000 psi 下打破細胞。打破之細胞溶胞液於 7,000 rpm 與 4°C 至 8°C 之溫度下離心 20 分鐘。上清液棄置不要，集結粒再懸浮於 3 L 洗滌緩衝液 (0.5% Triton X-100 與 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.2 M NaCl、與 1 mM EDTA)。於 7,000 rpm 與 4°C 至 8°C 之溫度下離心 20 分鐘後，細胞集結粒再懸浮於蒸餾水中，再依相同方式離心。所得集結粒再懸浮

於緩衝液(1 M L-甘胺酸、3.78 g L-半胱胺酸-HCl, pH 10.6), 於室溫下攪拌 1 小時。為了回收該再懸浮之重組體胰島素類似物, 添加 8 M 尿素, 攪拌 3 小時至 5 小時。溶解之重組體胰島素原類似物進行重摺疊時, 於 7,000 rpm 及 4°C 至 8°C 之溫度下離心 30 分鐘, 收集上清液, 使用 15 mM L-半胱胺酸-HCl(即還原劑)處理 1 小時。使用蠕動幫浦添加預定體積蒸餾水, 於 4°C 至 8°C 之溫度下攪拌至少 12 小時。

【 0154】

實例 4：陽離子交換層析純化法

完成重摺疊時, 取樣加至經過 20 mM 檸檬酸鈉(pH 2.0)緩衝液(含 45%乙醇)平衡之 SP FF 管柱 (GE healthcare)中, 然後使用 0%至 100%梯度之 20 mM 檸檬酸鈉(pH 2.0)緩衝液(含 0.5 M 氯化鉀與 45%乙醇), 以 10 份管柱體積溶離該胰島素類似物蛋白質。

【 0155】

實例 5：使用胰蛋白酶與羧基肽酶 B 處理

溶離出之樣本使用超濾膜脫鹽, 然後更換緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0)。所得蛋白質樣本使用相當於相對樣本中蛋白質含量約 30,000 莫耳比之胰蛋白酶, 與相當於相對樣本中蛋白質含量約 3,000 莫耳比之羧基肽酶 B 處理, 於 4°C 至 8°C 之溫度下攪拌至少 16 小時。

【 0156】

實例 6：陽離子交換層析純化法

反應完成時, 取樣再加至經過 20 mM 檸檬酸鈉(pH 2.0)

緩衝液(含 45%乙醇)平衡之 SP FF (GE healthcare)管柱中，然後使用 0%至 100%梯度之 20 mM 檸檬酸鈉(pH 2.0)緩衝液(含 0.5 M 氯化鉀與 45%乙醇)，以 10 份管柱體積溶離該胰島素類似物蛋白質。

【0157】

實例 7：逆向層析純化法

單純分離實例 6 所得純胰島素類似物時，將其加至已經過磷酸鈉與異丙醇平衡之逆向層析 Source30RPC (GE healthcare, USA)，使用含磷酸鈉與異丙醇之緩衝液之線性梯度溶離該胰島素類似物蛋白質。

所純化之胰島素類似物採用蛋白質電泳(SDS-PAGE, 第 1 圖)與 HPLC 分析，其中分析編號 9、10、11、與 12 之代表性胰島素類似物之純度，結果示於第 2 圖。

【0158】

實例 8：胰島素類似物對胰島素受體之結合親和力之比較

測定胰島素類似物對胰島素受體之結合親和力時，採用閃爍近似分析法(SPA)進行分析。取 CHO 細胞株之細胞膜(其中表現胰島素受體)與 PVT SPA 珠一起加至 96-孔微分析盤(pico-plate)中。為了證實對胰島素受體之結合親和力，取人類胰島素與各胰島素類似物稀釋成超過 10 種不同濃度，並與標記放射同位素 I^{125} 之胰島素(作為競爭劑)共同添加，於室溫下競爭反應 4 小時。4 小時後，採用貝他計數器測定對胰島素受體之結合親和力。各材料之結合親和

力以 GraphPad Prism 6 軟體計算 IC_{50} ，相對於人類胰島素對胰島素受體之結合親和力換算成相對結合親和力。

結果，相對於人類胰島素，與胰島素受體之結合親和力為：胰島素類似物(編號 1) 90%；胰島素類似物(編號 2) 95%；胰島素類似物(編號 3) 1.0%；胰島素類似物(編號 4) <0.1%；胰島素類似物(編號 6) 20%；胰島素類似物(編號 7) 8.5%；胰島素類似物(編號 9) 79%；胰島素類似物(編號 10) 79%；胰島素類似物(編號 11) 24%；胰島素類似物(編號 12) <0.1%；及胰島素類似物(編號 13) <0.1%(表 4)。因此，觀察到本發明胰島素類似物對胰島素受體之結合親和力比天然胰島素低。

[表 4]

| 材料名稱 | | 與胰島素受體之 結合親和力 (相對於人類胰 島素) |
|--------|------------------|------------------------------------|
| 胰島素類似物 | 胰島素類似物 (編號 1) | 90% |
| | 胰島素類似物 (編號 2) | 95% |
| | 胰島素類似物 (編號 3) | 1.0% |
| | 胰島素類似物 | <0.1% |

| | | |
|--|-------------------|-------|
| | (編號 4) | |
| | 胰島素類似物 (編號 6) | 20% |
| | 胰島素類似物 (編號 7) | 8.5% |
| | 胰島素類似物 (編號 9) | 79% |
| | 胰島素類似物 (編號 10) | 79% |
| | 胰島素類似物 (編號 11) | 24% |
| | 胰島素類似物 (編號 12) | <0.1% |
| | 胰島素類似物 (編號 13) | <0.1% |

【0159】

實例 9：胰島素類似物 10 之活體外效力比較

為了評估該胰島素類似物 10 之活體外效力，取來自小鼠且分化成脂肪細胞之 3T3-L1 細胞株用於測試葡萄糖吸收能力或脂質合成作用。每週 2 或 3 次繼代培養 3T3-L1 細胞於含 10% 新生胎牛血清 (NBCS) 之杜氏改良伊格氏培養基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM, Gibco, 目錄 No, 12430) 中並維持。取 3T3-L1 細胞懸浮於分化培養基

(含 10% FBS 之 DMEM)，然後於 48 孔盤中，每孔接種濃度 5×10^4 個細胞，培養 48 小時。為了使細胞分化成脂肪細胞，取 $1 \mu\text{g/mL}$ 人類胰島素(Sigma, 目錄編號 I9278)、 $0.5 \mu\text{M}$ 3-異丁基-1-甲基黃嘌呤(IBMx, Sigma, 目錄編號 I5879)、與 $1 \mu\text{M}$ 地塞美松(dexamethasone)(Sigma, 目錄編號 D4902)與分化培養基混合，在排除原有培養基後，在各孔中添加 $250 \mu\text{L}$ 該混合物。48 小時後，培養基換成僅補充 $1 \mu\text{g/mL}$ 人類胰島素之分化培養基。然後檢視誘導分化成脂肪細胞 12 天，同時每 48 小時，使用補充 $1 \mu\text{g/mL}$ 人類胰島素之分化培養基更換培養基。為了測試葡萄糖吸收能力，使用無血清 DMEM 培養基洗滌已分化之細胞一次，然後各添加 $250 \mu\text{L}$ 無血清 DMEM 培養基，誘發消耗血清 4 小時。採用無血清 DMEM 培養基進行人類胰島素與胰島素類似物 10 從 $10 \mu\text{M}$ 至 0.001 nM 的 10 倍連續稀釋。各取 $250 \mu\text{L}$ 所製備之樣本加至細胞中，於 5% CO_2 培養箱中，於 37°C 下培養 24 小時。為了測定培養後之培養基中葡萄糖殘留量，各取 $200 \mu\text{L}$ 培養基，使用 D-PBS 稀釋 5 倍後，進行 GOPOD 分析(GOPOD 分析套組, Megazyme, 目錄編號 K-GLUC)。依據葡萄糖標準溶液之吸光度，換算培養基中殘留之葡萄糖濃度，分別計算人類胰島素與胰島素類似物 10 之葡萄糖吸收能力的 EC_{50} 值。

共重覆進行 3 次試驗，結果人類胰島素與胰島素類似物 10 之 EC_{50} 值經計算分別為 $14.4 \pm 1.0 \text{ nM}$ 與 $7.8 \pm 0.7 \text{ nM}$ 。意即證實胰島素類似物 10 之葡萄糖吸收能力為相對

於人類胰島素之 $185.5 \pm 25.7\%$ (第 3 圖)。

【0160】

實例 10：胰島素類似物 10 之細胞安定性之比較

為了證實胰島素類似物 10 之細胞安定性，採用來自人類之 HepG2 細胞株進行試驗。首先，每週 2 至 3 次繼代培養 HepG2 細胞於包含 10% FBS 之 DMEM 培養基中。在 24 孔盤中各添加 300 μ L 聚-L-離胺酸(Trevigen，目錄編號 3438-100-01)並於 37°C 下塗佈 2 小時。使用冷 D-PBS 洗滌 2 次後，取 HepG2 細胞懸浮於培養基(含 10% FBS 之 DMEM)中，接種至 24-孔盤，每孔濃度 1×10^5 個細胞，培養 24 小時。使用試驗培養基(含 2% FBS 之 DMEM)洗滌後，在各孔中添加含 500 nM 人類胰島素與胰島素類似物 10 之 500 μ L 試驗培養基。細胞於 37°C 之 5% CO₂ 培養箱中培養 0、2、6、9、24、與 48 小時後，培養完成時回收培養基及冷凍存放。測定培養基中胰島素殘留量，使用 PBS-T 稀釋 100 倍，採用人類胰島素 ELISA 套組 (Alpco，目錄編號 80-INSHU-E10.1)分析。

共重覆進行 3 次試驗，結果人類胰島素與胰島素類似物 10 在培養 48 小時後，培養基中胰島素殘留量分別為相對於 0 小時時之 $20.9 \pm 11.4\%$ 與 $72.7 \pm 5.7\%$ 。亦即，已證實胰島素類似物 10 具有高於人類胰島素之細胞安定性(第 4 圖)。

熟悉本發明相關技藝之人士從上文即可了解，本發明可在不修改本發明技術觀念或基本特徵下，依其他特定型

式具體實施。因此，本文揭露之實施例僅供說明之目的，不應構成本發明之範圍限制。反之，本發明計畫不僅涵括實施例，而且涵括各種不同替代項、等效物、及其他包括在附錄之申請專利範圍所定義之本發明本質與範圍內之其他實施例。

【符號說明】

無。

【序列表】

- <110> 韓美藥品股份有限公司 (HANMI PHARM. CO., LTD.)
賽諾菲安萬特德國公司 (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH)
- <120> 具有降低對胰島素受體之親和力之胰島素類似物及其用途
- <130> OPA17190
- <140> TW 106132612
<141> 2017-09-22
- <150> KR 10-2016-0122484
<151> 2016-09-23
- <160> 56
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引子
- <400> 1
cagcatctgc tccctccatc agctggagaa ctac
34
- <210> 2
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引子
- <400> 2
gtagttctcc agctgatgga gggagcagat gctg
34
- <210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引子
- <400> 3
cagcatctgc tccctcaagc agctggagaa ctac
34
- <210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 4

gtagttctcc agctgcttga gggagcagat gctg

34

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 5

ctaccagctg gagaacgagt gcaactgagg atcc

34

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 6

ggatcctcag ttgcactcgt tctccagctg gtag

34

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 7

ctaccagctg gagaactcct gcaactgagg atcc

34

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 8

ggatcctcag ttgcaggagt tctccagctg gtag

34

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 9
 ctaccagctg gagaacacct gcaactgagg atcc 34

<210> 10
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 10
 ggatcctcag ttgcaggtgt tctccagctg gtag 34

<210> 11
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 11
 ctgggtggaag ctctcgagct agtgtgcggg gaac 34

<210> 12
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 12
 gttccccgca cactagctcg agagcttcca ccag 34

<210> 13
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 13

ctgggtggaag ctctctccct agtgtgcggg gaac

34

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 14

gttccccgca cactagggag agagcttcca ccag

34

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 15

ctgggtggaag ctctcacccct agtgtgcggg gaac

34

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 16

gttccccgca cactaggggtg agagcttcca ccag

34

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 17

cagcatctgc tcctcgccc agctggagaa ctac

34

<210> 18
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 18
 gtagttctcc agctgggcga gggagcagat gctg 34

<210> 19
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 19
 cagcatctgc tcctcgacc agctggagaa ctac 34

<210> 20
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 20
 gtagttctcc agctggtcga gggagcagat gctg 34

<210> 21
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 21
 ctggtggaag ctctcgacct agtgtgcggg gaac 34

<210> 22
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 22
gttccccgca cactaggctg agagcttcca ccag 34

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 23
ggggaacgag gcttcgacta cacacccaag acc 33

<210> 24
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 24
ggtcttgggt gtgtagtcca agcctcgttc ccc 33

<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 25
ggggaacgag gcttcgagta cacacccaag acc 33

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 26
ggtcttgggt gtgtactcca agcctcgttc ccc 33

<210> 27

<211> 258
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 1

<400> 27
 ttcgттаacc aacacttgтg тgгctcacac ctgгtggaag ctctctacct agtгtgсggg .60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggтgggg 120
 caggтggagc тgggcggggg ccctgгtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 тccctgcaga agcгtgгcat тgtggaacaa тgctgtacca gcатctgctc cctccatcag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 28
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 1

<400> 28
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu His Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 29
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 2

<400> 29

ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctcaagcag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 30
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 2

<400> 30
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Lys Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 31
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 3

<400> 31
 ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaacg agtgcaac 258

<210> 32
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 3

<400> 32
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Glu Cys Asn
 85

<210> 33
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 4

<400> 33
 ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttgge cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact cctgcaac 258

<210> 34
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 4

<400> 34
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30
Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45
Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60
Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80
Leu Glu Asn Ser Cys Asn
85

<210> 35
<211> 258
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 類似物 5

<400> 35
ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
ctggagaaca cctgcaac 258

<210> 36
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 類似物 5

<400> 36
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Thr Cys Asn
 85

<210> 37
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 6

<400> 37
 ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctcgagct agtgtgctggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggctggg 120
 caggctggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttgge cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcactgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 38
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 6

<400> 38
 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 Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 39
<211> 258
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 類似物 7

<400> 39
ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctccct agtgtgcggg 60
gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtaggg 120
caggtaggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttgge cctggagggg 180
tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcattctgctc cctctaccag 240
ctggagaact actgcaac 258

<210> 40
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 類似物 7

<400> 40
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ser
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30
Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45
Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60
Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 41
<211> 258
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 類似物 8

<400> 41

ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctaccct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcactctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 42

<211> 86

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 類似物 8

<400> 42

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

<210> 43

<211> 258

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 類似物 9

<400> 43

ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctcgcccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 44
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 9

<400> 44
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 45
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 10

<400> 45
 ttcgtaacc aacacttgtg tggtcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctcgaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 46
 <211> 86

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 10

<400> 46
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asp Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 47
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 11

<400> 47
 ttcgtaaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctcgacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 48
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 11

<400> 48
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Asp

50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 51
 <211> 258
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 13

<400> 51
 ttcgttaacc aaccttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tcgagtacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcattctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaac 258

<210> 52
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 類似物 13

<400> 52
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Glu Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 53
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 智人

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

Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

<210> 54
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 54
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

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

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

<220>
 <223> 胰島素類似物, A-鏈

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa 為丙胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、麩胺酸、或
 天冬醯胺

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> Xaa 為丙胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、或
 天冬醯胺

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)
 <223> Xaa 為丙胺酸、絲胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、組胺酸、或
 天冬醯胺

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)

<223> Xaa 為酪胺酸、組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> Xaa 為丙胺酸、白胺酸、酪胺酸、組胺酸、麩胺酸、或天冬醯胺

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)

<223> Xaa 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)

<223> Xaa 為天冬醯胺、甘胺酸、組胺酸、或丙胺酸

<400> 55

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

Glu Asn Xaa Cys Xaa
 20

<210> 56

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰島素類似物, B-鏈

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)

<223> Xaa 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天冬胺酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25)

<223> Xaa 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223> Xaa 為蘇胺酸, 或不存在

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (28)
<223> Xaa 為脯胺酸、麩胺酸、或天冬胺酸，或不存在

<400> 56
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Xaa Xaa Lys Thr
20 25 30

申請專利範圍

1. 一種胰島素類似物，其包含如下通式 1 所示 SEQ ID NO: 55 之 A-鏈與如下通式 2 所示 SEQ ID NO: 56 之 B-鏈(但其限制條件為不包括其中 A-鏈等同 SEQ ID NO: 53 且 B-鏈亦等同 SEQ ID NO: 54 之肽)；

[通式 1]

Xaa1-Ile-Val-Glu-Xaa5-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-
Xaa12-Leu-Xaa14-Gln-Xaa16-Glu-Asn-Xaa19-Cys-Xaa21
(SEQ ID NO: 55)

其中通式 1 中，

Xaa1 為甘胺酸；

Xaa5 為麩醯胺酸；

Xaa12 為絲胺酸；

Xaa14 為酪胺酸、組胺酸、離胺酸、丙胺酸、或天冬胺酸；

Xaa16 為白胺酸；

Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或蘇胺酸；及

Xaa21 為天冬醯胺；及

[通式 2]

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-
Glu-Ala-Leu-Xaa16-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-
Xaa25-Tyr-Xaa27-Xaa28-Lys-Thr (SEQ ID NO: 56)

其中通式 2 中，

Xaa16 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、或天

冬胺酸；

Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸；

Xaa27 為蘇胺酸；及

Xaa28 為脯胺酸。

2. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其包含如通式 1 所示 SEQ ID NO：55 之 A-鏈與 SEQ ID NO：54 之 B-鏈。

3. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其包含 SEQ ID NO：53 之 A-鏈與如通式 2 所示 SEQ ID NO：56 之 B-鏈。

4. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，

其中通式 1 中，

Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸、麩胺酸、或絲胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及

通式 2 中，

Xaa16 為酪胺酸、麩胺酸、絲胺酸、或天冬胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸、天冬胺酸、或麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

5. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其中：

(1)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為組胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺

酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(2)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為離胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(3)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為麩胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(4)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為絲胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(5)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為蘇胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(6)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，

Xaa16 為麩胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(7)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為絲胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(8)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為蘇胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(9)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為丙胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(10)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為天冬胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(11)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，

Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為天冬胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；

(12)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為天冬胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸；及

(13)通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

6. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其包含選自 SEQ ID NO：28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、與 52 所組成群中之胺基酸序列。

7. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其中

通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為麩胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

8. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其中

通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12

為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為絲胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

9. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其中

通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為蘇胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

10. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其中

通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為天冬胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為苯基丙胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

11. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其中

通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12 為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為天冬胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

12. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素類似物，其中：

通式 1 中，Xaa1 為甘胺酸，Xaa5 為麩醯胺酸，Xaa12

為絲胺酸，Xaa14 為酪胺酸，Xaa16 為白胺酸，Xaa19 為酪胺酸，及 Xaa21 為天冬醯胺；及通式 2 中，Xaa16 為酪胺酸，Xaa25 為麩胺酸，Xaa27 為蘇胺酸，及 Xaa28 為脯胺酸。

13. 一種編碼如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之胰島素類似物之單離核酸。
14. 一種重組體表現載體，其包含如申請專利範圍第 13 項之核酸。
15. 一種轉化體，其包含如申請專利範圍第 14 項之重組體表現載體。
16. 如申請專利範圍第 15 項之轉化體，其中該轉化體為大腸桿菌(*E. coli*)。
17. 一種製備如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之胰島素類似物之方法，其包括
 - a) 藉由培養包含編碼如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之胰島素類似物之核酸之轉化體來表現胰島素類似物；及
 - b) 單離及純化所表現之胰島素類似物。
18. 一種製備如申請專利範圍第 17 項之胰島素類似物之方法，其中該單離及純化包括：
 - b-1) 從步驟 a) 之培養物中得到轉化體，並粉碎該轉化體；
 - b-2) 從粉碎之細胞溶胞物中回收所表現之胰島素類似物後，接著重摺疊該類似物；

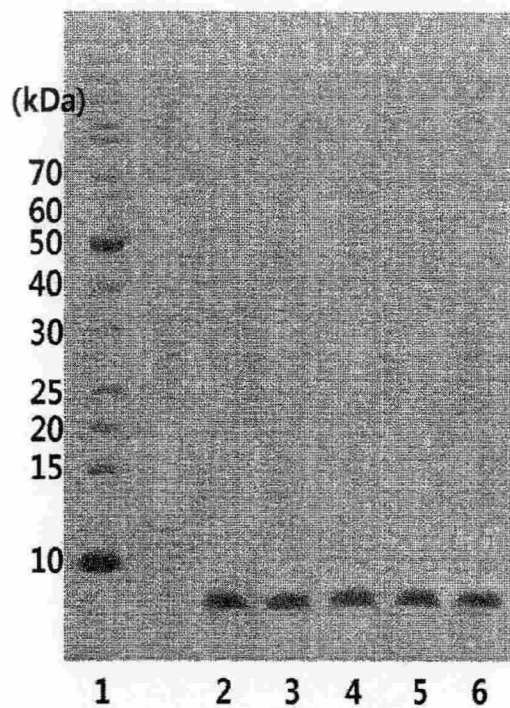
b-3)採用陽離子交換層析法純化該重摺疊之胰島素類似物；

b-4)採用胰蛋白酶與羧基肽酶 B 處理該經純化之胰島素類似物；及

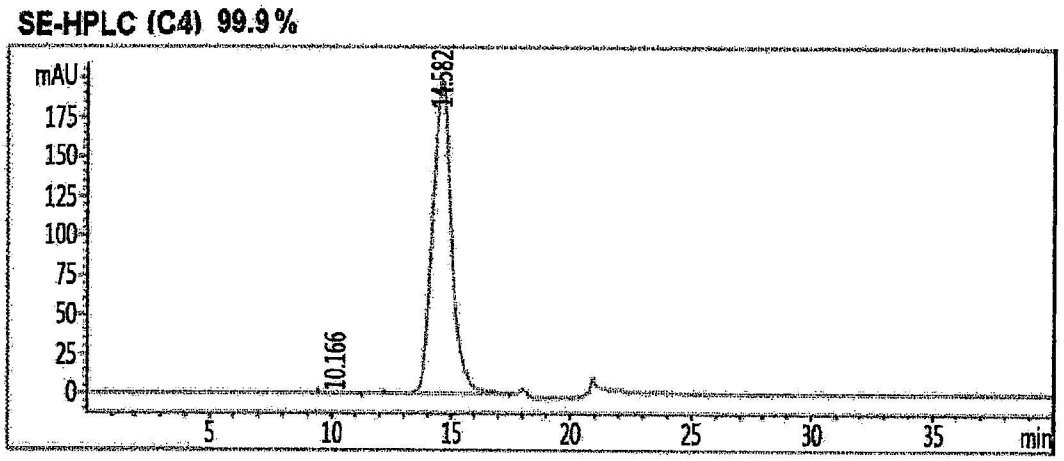
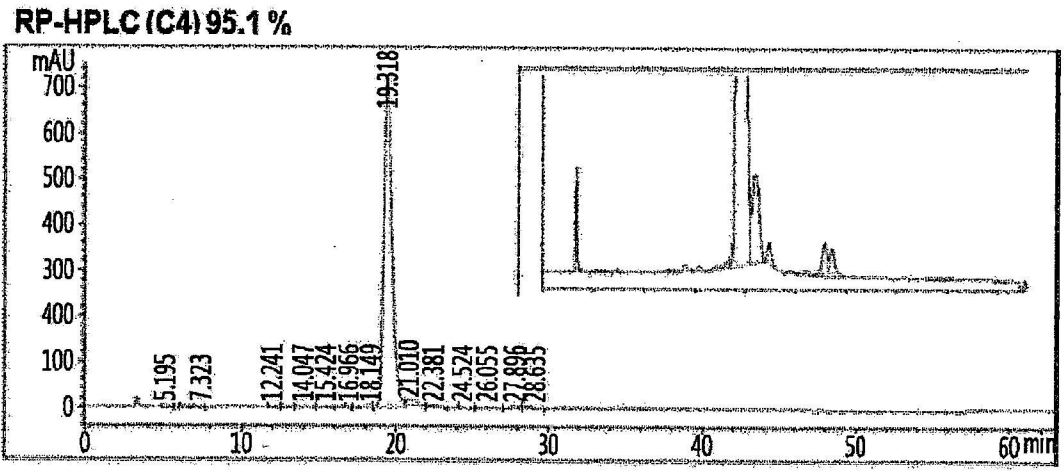
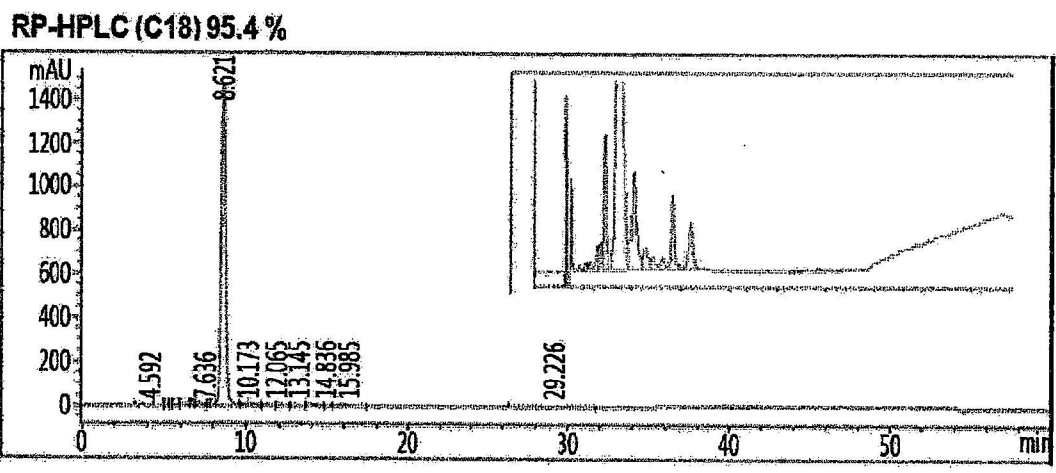
b-5)依序採用陽離子交換層析法、與陰離子交換層析法或逆相層析法純化該經過處理之胰島素類似物。

19. 一種治療糖尿病之醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之胰島素類似物作為活性成份。

圖式

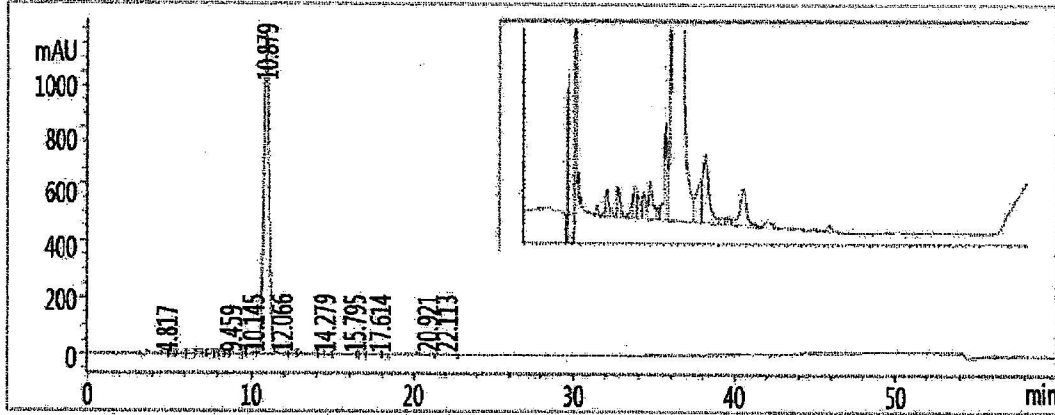


第1圖

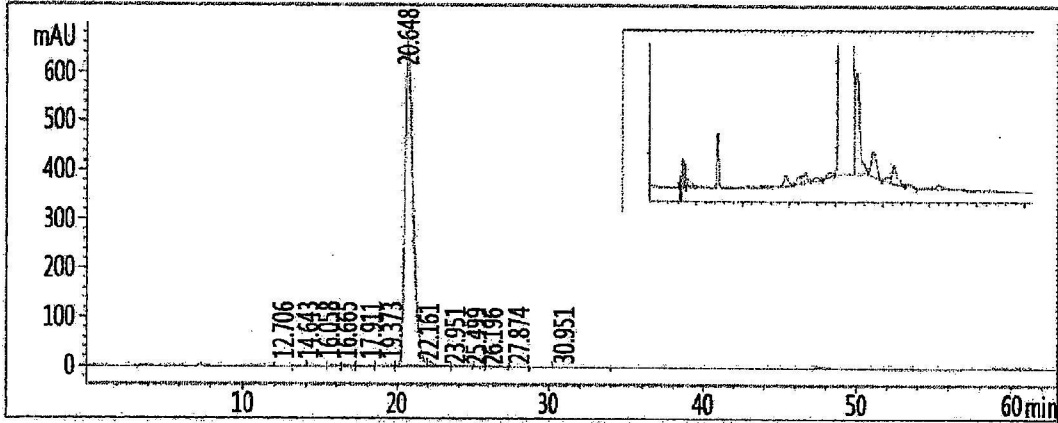


第2a圖

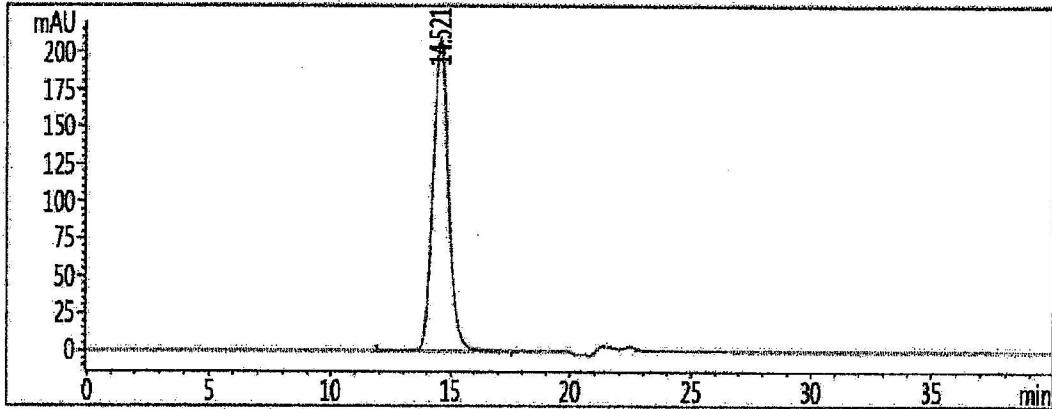
RP-HPLC (C18) 98.1 %



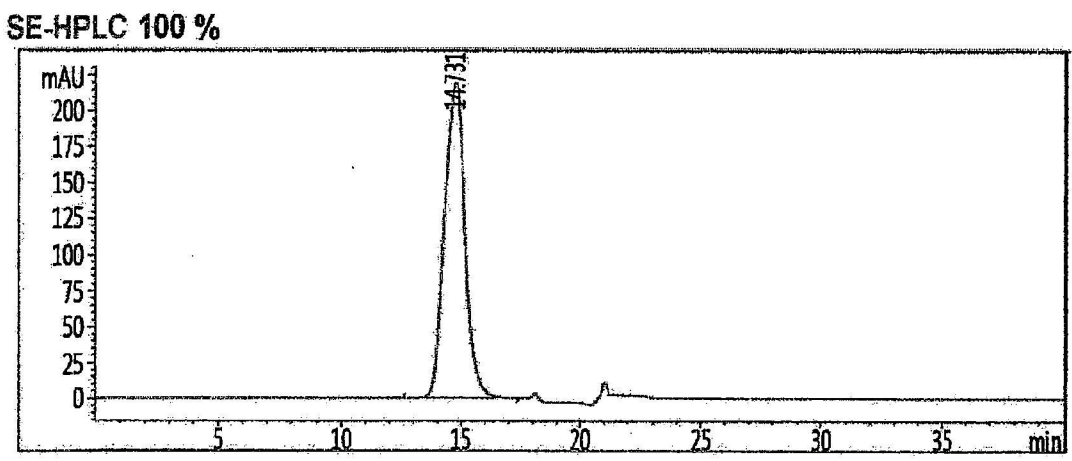
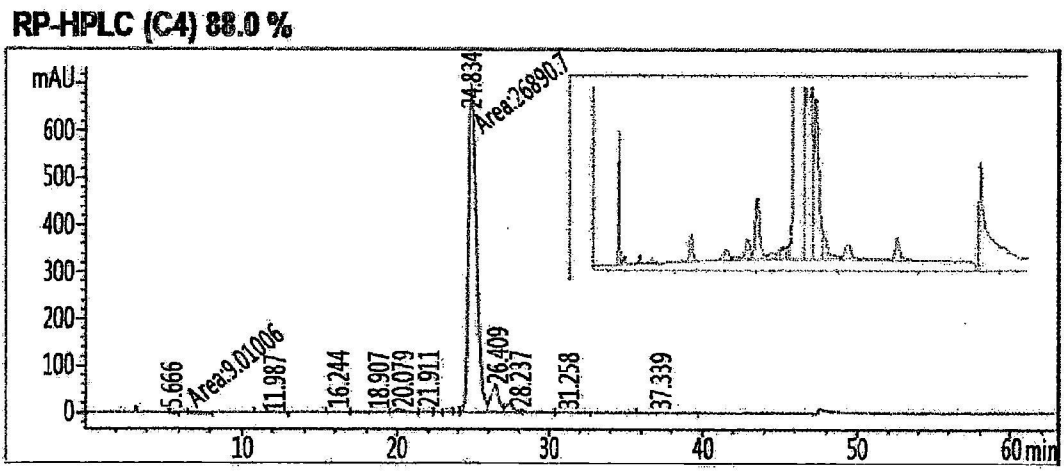
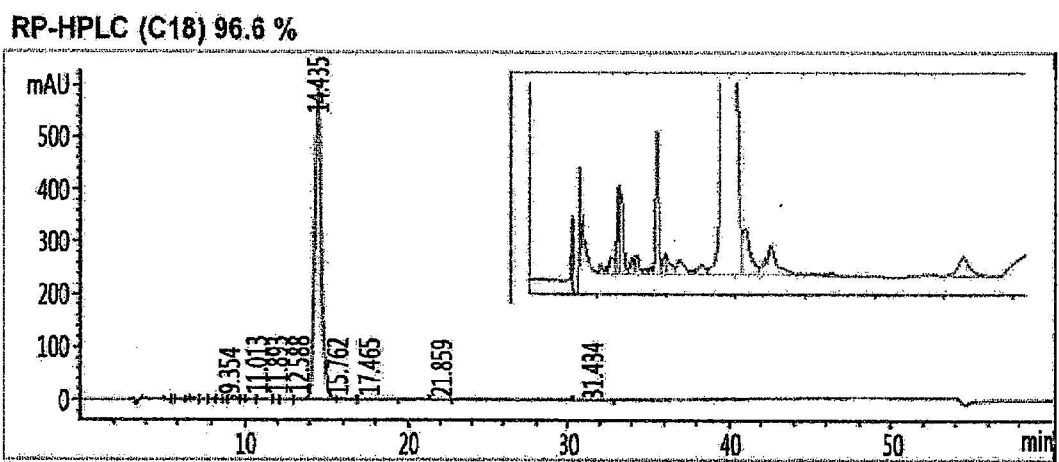
RP-HPLC (C4) 98.2 %



SE-HPLC (C4) 100 %

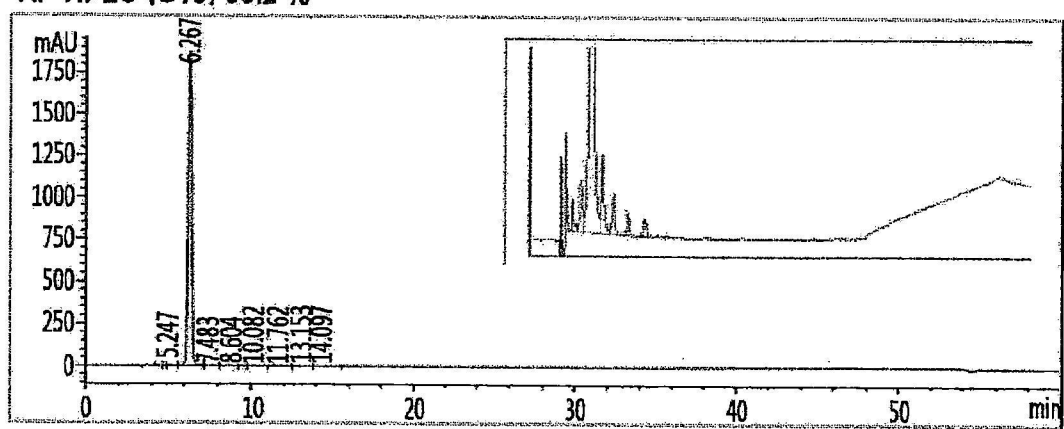


第2b圖

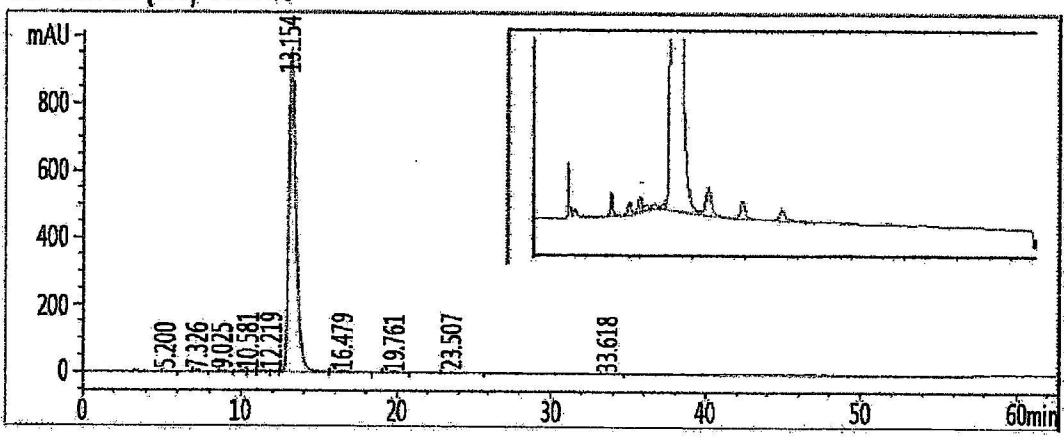


第2c圖

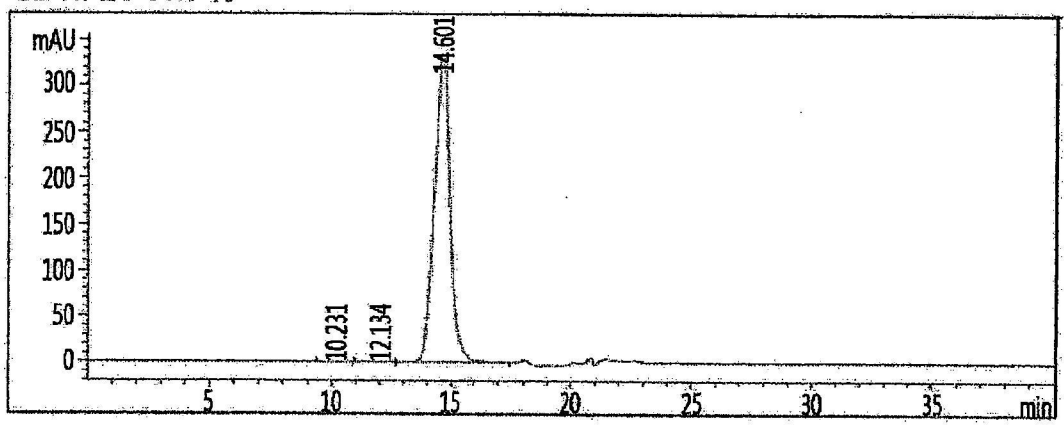
RP-HPLC (C18) 98.2 %



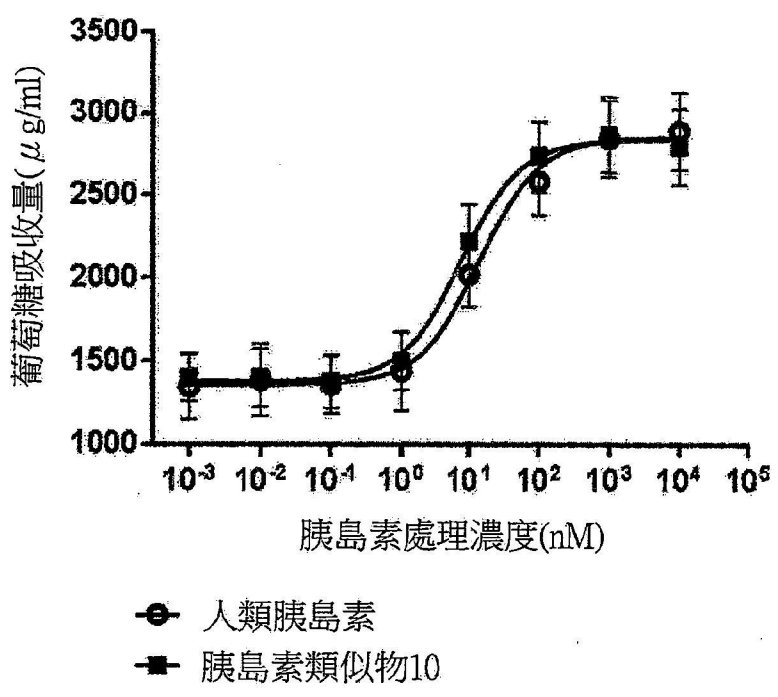
RP-HPLC (C4) 98.8%



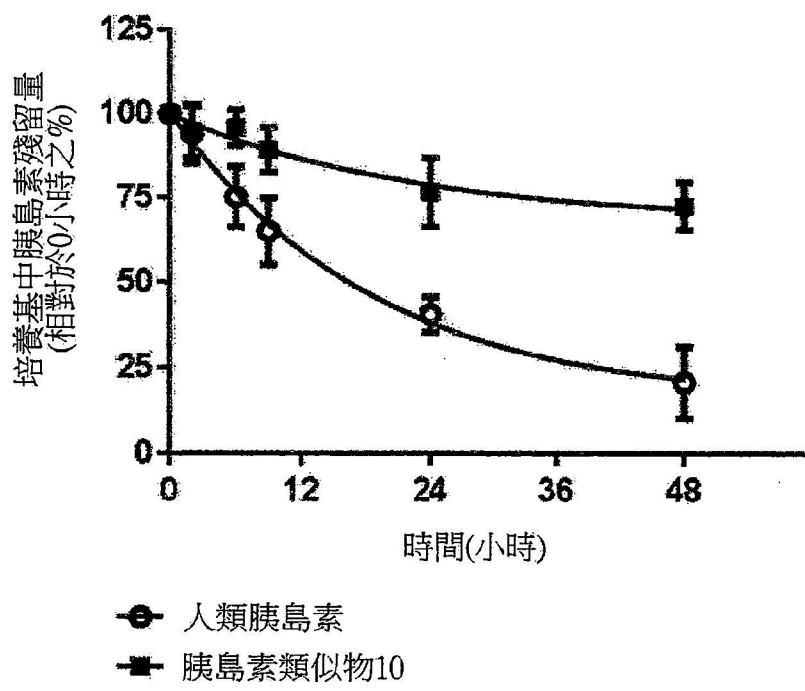
SE-HPLC 99.9 %



第2d圖



第3圖



第4圖