

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 14/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480038841.6

[43] 公开日 2007年1月24日

[11] 公开号 CN 1902226A

[22] 申请日 2004.12.3

[21] 申请号 200480038841.6

[30] 优先权

[32] 2003.12.3 [33] DK [31] PA200301786

[86] 国际申请 PCT/DK2004/000843 2004.12.3

[87] 国际公布 WO2005/054291 英 2005.6.16

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.23

[71] 申请人 诺和诺德公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 T·B·克耶尔德森

A·S·安德森 M·施雷恩

A·R·索伦森 P·马德森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 赵艳华

权利要求书 6 页 说明书 49 页 序列表 36 页
附图 3 页

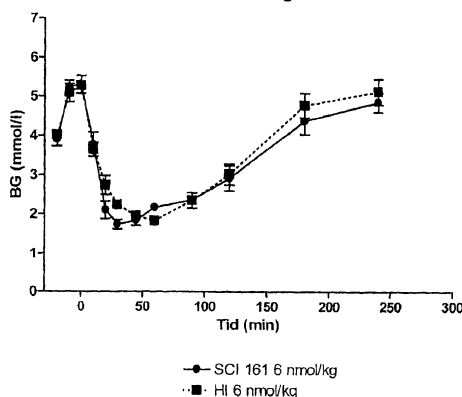
[54] 发明名称

单链胰岛素

[57] 摘要

本发明涉及具有胰岛素活性的单链胰岛素，其包含由 5-11 个氨基酸的连接肽连接的 B 和 A 链或修饰的 B 和 A 链。该单链胰岛素具有生物胰岛素活性和与人胰岛素的 IGF-1 相比类似或者更低的 IGF-1 受体亲和性以及高的物理稳定性。单链胰岛素在连接肽中可以含有至少一个碱性氨基酸残基。单链胰岛素还可以在一个或者多个 Lys 残基中被酰化。

正常Wistar大鼠中的血糖
HI: 6 nmol/kg IV
SCI: nmol/kg IV



1. 具有生物胰岛素活性并且包含由连接肽连接的人胰岛素 B 和 A 链或者其类似物或衍生物的单链胰岛素，其中的连接肽具有 5-11 个氨基酸残基并且不含有两个相邻的碱性氨基酸残基，并且如果单链胰岛素分子没有被酰化化学修饰则其中单链胰岛素对人胰岛素受体的亲和性是人胰岛素对人胰岛素受体的亲和性的至少大约 20%。

2. 具有生物胰岛素活性并且包含由连接肽连接的人胰岛素的 B 和 A 链或者其类似物或衍生物的单链胰岛素，其中的连接肽具有 5-11 个氨基酸残基，前提是如果连接肽含有两个相邻的碱性氨基酸残基则 B 和/或 A 链中的至少一个天然氨基酸残基被另一个可编码的氨基酸残基替代，或者 A 链、B 链或者连接肽中的至少一个赖氨酸残基已经被酰化化学修饰，或者连接肽不是以下序列之一
 Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1),
 Arg-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 2),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 3),
 Arg-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4),
 Gly-Gly-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 5),
 Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6),
 Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 7),
 Arg-Arg-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8),
 Gly-Gly-His-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 9), 或
 Arg-Arg-His-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 10)。

3. 具有生物胰岛素活性并且包含由连接肽连接的人胰岛素 B 和 A 链或者其类似物或衍生物的单链胰岛素，其中的连接肽具有 5-11 个氨基酸残基，前提是 pI 在大约 6.5 以上的单链胰岛素与人胰岛素的 A 和 B 链相比在 A 和/或 B 链中包含至少一个氨基酸残基替代和/或缺失，或者

A 链、B 链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经被酰化化学修饰。

4. 具有生物胰岛素活性并且包含由连接肽连接的人胰岛素 B 和 A 链或者其类似物或衍生物的单链胰岛素，其中的连接肽具有 5-14, 5-11, 6-10, 6-8, 6-7, 7-9 或者 7-8 个氨基酸残基，且其中 A 链、B 链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经被酰化化学修饰。

5. 根据权利要求 1-3 中任何一项的单链胰岛素，该单链胰岛素分子中至少一个赖氨酸基团被酰化。

6. 根据权利要求 5 的单链胰岛素，其在 B29 被酰化。

7. 根据权利要求 6 的单链胰岛素，其被具有 6 到 24, 6-20, 6-18 或 6-14 个碳原子的脂肪酸酰化。

8. 根据权利要求 1 的单链胰岛素，其中性 pH 下可溶并且 pI 低于大约 6.5。

9. 根据权利要求 8 的单链胰岛素，其 pI 为大约 4.5 到低于大约 6.5。

10. 根据权利要求 1 的单链胰岛素，其与人胰岛素受体的亲和性是人胰岛素对人胰岛素受体亲和性的至少 30%。

11. 根据权利要求 1-10 任何一项的单链胰岛素，其中的连接肽具有 7-10, 7-9 或 7-8 个氨基酸残基。

12. 根据权利要求 1-10 中任何一项的单链胰岛素，其中的连接肽包含选自下列的序列：AGRGSGK (SEQ ID NO: 15); AGLGSGK (SEQ ID NO: 33); AGMSGK (SEQ ID NO: 45); ASWGSGK (SEQ ID NO: 48); TGLGSGK

(SEQ ID NO: 22); TGLGRGK (SEQ ID NO: 23); TGLGSGK (SEQ ID NO: 21); HGLYSGK (SEQ ID NO: 50); KGLGSGQ (SEQ ID NO: 51); VGLMSGK (SEQ ID NO: 56); VGLSSGQ (SEQ ID NO: 27); VGLYSGK (SEQ ID NO: 28); VGLSSGK (SEQ ID NO: 30); VGMSSGK (SEQ ID NO: 65); VWSSSGK (SEQ ID NO: 76); VGSSSGK (SEQ ID NO: 16) 和 VGMSSGK (SEQ ID NO: 106)。

13. 根据权利要求 1 的单链胰岛素，其具有式

$$B(1-26) - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - A(1-21),$$

其中 X_1 是 Thr、Lys 或 Arg, X_2 是 Pro、Lys 或 Asp, X_3 是 Lys、Pro 或 Glu, X_4 是 6-11 个氨基酸残基的肽序列, B(1-26) 是由人胰岛素 B 链的从 B 链 N 末端数起的前 26 个氨基酸残基组成的肽链或者其类似物或衍生物, A(1-21) 是天然胰岛素的 A 链或者其类似物或者衍生物, 其中 X_4 不含有两个相邻的碱性氨基酸残基, 且如果单链胰岛素分子没有被酰化化学修饰, 其中的单链胰岛素对人胰岛素受体的亲和性是人胰岛素对人胰岛素受体的亲和性的至少大约 20%。

14. 根据权利要求 2 的单链胰岛素，其具有式

$$B(1-26) - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - A(1-21) \text{ 的单链胰岛素,}$$

其中 X_1 是 Thr、Lys 或 Arg, X_2 是 Pro、Lys 或 Asp, X_3 是 Lys、Pro 或 Glu, X_4 是 6-11 个氨基酸残基的肽序列, B(1-26) 是由人胰岛素 B 链的从 B 链的 N 末端数起的前 26 个氨基酸残基组成的肽链或者其类似物或衍生物, A(1-21) 是天然胰岛素的 A 链或者其类似物或者衍生物, 前提是如果 X_4 含有两个相邻的碱性氨基酸残基则 B 和/或 A 链中的至少一个天然氨基酸残基被另一个可编码氨基酸残基替代, 或者 A 链、B 链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经通过酰化被化学修饰, 或者 X_4 不是下列序列中的一个: Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1), Arg-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 2), Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 3), Arg-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4),

Gly-Gly-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 5),
 Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6),
 Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 7),
 Arg-Arg-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8),
 Gly-Gly-His-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 9), 或
 Arg-Arg-His-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 10)。

15. 根据权利要求 3 的单链胰岛素, 其具有式

$$B(1-26) - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - A(1-21),$$

其中 X_1 是 Thr、Lys 或 Arg, X_2 是 Pro、Lys 或 Asp, X_3 是 Lys、Pro 或 Glu, X_4 是 6-11 个氨基酸残基的肽序列, B(1-26) 是由人胰岛素 B 链的从 B 链 N 末端数起的前 26 个氨基酸残基组成的肽链或者其类似物或衍生物, A(1-21) 是天然胰岛素的 A 链或者其类似物或者衍生物, 前提是 pI 在大约 6.5 以上的单链胰岛素与人胰岛素的 A 和 B 链相比在 A 和/或 B 链中包含至少一个氨基酸残基替代和/或缺失, 或者 A 链、B 链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经被酰化化学修饰。

16. 根据权利要求 4 的单链胰岛素, 其具有式

$$B(1-26) - X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - A(1-21),$$

其中 X_1 是 Thr、Lys 或 Arg, X_2 是 Pro、Lys 或 Asp, X_3 是 Lys、Pro 或 Glu, X_4 是 5-14, 5-11, 6-10, 6-8, 6-7, 7-9 或 7-8 个氨基酸残基的肽序列, B(1-26) 是由人胰岛素 B 链的从 B 链 N 末端数起的前 26 个氨基酸残基组成的肽链或者其类似物或衍生物, A(1-21) 是天然胰岛素的 A 链或者其类似物或者衍生物, 其中 A 链、B 链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经通过酰化被化学修饰。

17. 根据权利要求 1-16 中任何一项的单链胰岛素, 其中位置 A21 的氨基酸残基被除 Cys 外的另一个氨基酸残基替代。

18. 根据权利要求 13-16 的单链胰岛素，其中 X_4 是具有下式 $X_a-X_b-X_c-X_d-X_e-X_f-X_g$ (SEQ ID NO: 129) 的肽序列，其中

X_a 选自由 L, R, T, A, H, Q, G, S 和 V 组成的组；

X_b 选自由 W, G, S, A, H, R 和 T 组成的组；

X_c 选自由 L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G 和 P 组成的组；

X_d 选自由 R, A, Y, M, S, N, H 和 G 组成的组；

X_e 选自由 S, R, A, T, K, P, N, M, H, Q, V 和 G 组成的组；

X_f 选自由 G 和 A 组成的组；且

X_g 选自由 K, R, P, H, F, T, I, Q, W 和 A 组成的组。

19. 根据权利要求 13-18 中任何一项的单链胰岛素，其中 X_4 包含序列 SGK。

20. 根据权利要求 13-18 中任何一项的单链胰岛素，其中 X_4 包含序列 GSGK (SEQ ID NO: 131)。

21. 根据权利要求 13-18 中任何一项的单链胰岛素，其中 X_4 包含序列 SSSGK (SEQ ID NO: 132)。

22. 根据权利要求 1-21 中任何一项的单链胰岛素，其中位置 B1、B3、B10、B22、B28、B29、A8、A15、A18 和 A21 中的至少一个天然氨基酸残基被另一个氨基酸残基替代。

23. 根据权利要求 1-21 中任何一项的单链胰岛素，其是 des B1, desB27, desB28 或 desB29 胰岛素类似物。

24. 编码根据权利要求 1-23 的任何单链胰岛素的多核苷酸序列。

25. 含有根据权利要求 24 的多核苷酸序列的表达载体。

26. 含有根据权利要求 25 的表达载体的转化的宿主细胞。

27. 包含生物活性量的根据权利要求 1-23 中任何一项的单链胰岛素的药物制剂。

28. 药物制剂，它包含生物活性量的根据权利要求 1-23 中任何一项的单链胰岛素以及另外的生物活性化合物。

29. 根据权利要求 28 的药物制剂，其中另外的生物活性化合物选自自由迅速作用胰岛素类似物、延长作用胰岛素类似物、GLP-1、GLP-2 以及 exendin 或其类似物或衍生物组成的组。

30. 根据权利要求 29 的药物制剂，其 pH 为 4-10.5。

31. 根据权利要求 30 的药物制剂，pH 为 4-8.5。

32. 降低哺乳动物中血糖水平的方法，其通过向需要进行该治疗的患者施用治疗活性剂量的根据权利要求 27-31 任何一项的药物制剂。

33. 根据权利要求 1-23 的任何一项的单链胰岛素作为药物的用途。

34. 根据权利要求 1-23 的任何一项的单链胰岛素在制备用于治疗糖尿病的药物制剂中的用途。

单链胰岛素

发明领域

本发明涉及单链胰岛素，它具有胰岛素的活性，可以用于糖尿病的治疗。单链胰岛素具有高的物理稳定性以及低的原纤维形成倾向，在中性 pH 下是可溶的。本发明还涉及了编码单链胰岛素的 DNA 序列、它们制备的方法以及含有单链胰岛素的药物组合物。

发明背景

胰岛素是由胰腺的 β -细胞分泌的多肽激素，由两个多肽链 A 和 B 组成，它们由链间二硫桥连接起来。此外，A 链具有一个链内二硫桥。

该激素作为单链前体胰岛素原（前胰岛素原）合成，它由含 24 个氨基酸的前肽以及其后的含 86 个氨基酸的胰岛素原按照以下的构型组成：肽-B-Arg Arg-C-Lys Arg-A，其中 C 是 31 个氨基酸的连接肽。Arg-Arg 和 Lys-Arg 是用于从 A 和 B 链切割连接肽形成双链胰岛素分子的切割位点。胰岛素在维持正常的代谢调控中是必需的。

胰岛素的两条链结构使胰岛素可以呈现多种构象，一些发现已经表明胰岛素具有发生相当大的构象改变倾向，对这种改变能力的限制显著降低了胰岛素受体与配基的亲合性。与天然胰岛素相比，胰岛素原对胰岛素受体的亲合性降低了 100 倍。封闭胰岛素中的氨基酸残基 A1 导致与受体结合较弱，这与“A 链的自由 N 端和 B 链的自由 C 端对于与胰岛素受体的结合是非常重要的”这个法则一致。

胰岛素分子的内在物理和化学稳定性是糖尿病的胰岛素疗法的基本条件。这些基本性质对于胰岛素的形成和可应用的胰岛素给药方

法，以及药物制剂的保存期和储存条件是重要的。在胰岛素的给药中溶液的使用使分子暴露于一些因素的组合中，例如升高的温度、可变的气液固界面以及剪切力，这些可以导致不可逆的构象改变例如原纤维形成。这对于滴注泵（无论是在体外携带还是移植的）中的胰岛素溶液是有重要意义的，滴注泵使胰岛素暴露在这些因子的组合中以及由于泵的长时间移动产生的剪切力中。因此在使用滴注泵作为胰岛素的给药系统时原纤维形成特别成为人们关注的问题。此外，胰岛素的溶解性受到多种因子的影响，在 pH 范围从 4.2 到 6.6 溶解性显著降低。pH 沉淀区一般限制了制剂，但是在开发某些类似物的制剂中也被有意使用。

因此，胰岛素的稳定性和溶解性性质对于目前的胰岛素治疗是重要的根本方面。本发明通过在 B 和 A 链之间引入 C 肽降低分子弹性，同时降低原纤维形成倾向并且限制或者改变 pH 沉淀区，以提供稳定的单链胰岛素类似物而解决这些问题。

具有胰岛素活性的单链胰岛素在 EP 1,193,272 中公开。这些单链胰岛素具有 5-18 个氨基酸的修饰的 C 肽，据报道它们具有最多 42% 的胰岛素活性。EP 1,193,272 公开了下列连接 B30 和 A21 的修饰的 C 肽：

Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg (SEQ	ID	NO: 1),
Arg-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ	ID	NO: 2),
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Arg (SEQ	ID	NO: 3),
Arg-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ	ID	NO: 4),
Gly-Gly-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ	ID	NO: 5),
Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ	ID	NO: 6),
Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ	ID	NO: 7),
Arg-Arg-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ	ID	NO: 8),
Gly-Gly-His-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ	ID	NO: 9),
Arg-Arg-His-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ	ID	NO: 10)。

EP 741,188 公开的单链胰岛素具有 10-14 个氨基酸残基的修饰的 C 肽，并且具有

14 到 34% 胰 岛 素 活 性 且 具 有 以 下 连 接 肽 Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg (SEQ ID NO: 11) 和 Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr (SEQ ID NO: 12)。WO 95/16708 公开了具有 1-15 个氨基酸残基的连接肽且连接肽中 C 末端氨基酸残基非 Lys 或 Arg 的单链胰岛素。WO 95/16708 公开了以下的 C 肽序列 Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr (SEQ ID NO: 13) 和 Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Ala-Ala-Ala-Pro-Gln-Thr (SEQ ID NO: 14)。据报道这些单链胰岛素具有胰岛素活性，但是与 IGF-1 受体也具有相当高的亲和性。

本发明的目的是提供与已知化合物相比具有改良性质的单链胰岛素，涉及到胰岛素的活性、物理稳定性和溶解性以及药代动力学例如延长或者迅速作用特征。本发明的另一个目的是提供单链胰岛素的制备方法以及含有这些化合物的药物组合物。

发明概述

本发明一方面涉及了具有生物胰岛素活性并且包含由连接肽连接的人胰岛素或者其类似物或衍生物的 B 和 A 链的单链胰岛素，其中的连接肽具有 5-11 个氨基酸残基并且不含有两个相邻的碱性氨基酸残基并且其中单链胰岛素对人胰岛素受体的亲和性是人胰岛素的至少大约 20%（如果单链胰岛素分子没有被酰化化学修饰的话）。

在另一个方面中，本发明涉及具有生物胰岛素活性并且包含由连接肽连接的人胰岛素或者其类似物或衍生物的 B 和 A 链的单链胰岛素，其中的连接肽具有 5-11 个氨基酸残基，前提是如果连接肽含有两个相邻的碱性氨基酸残基则 B 和/或 A 链中的至少一个天然氨基酸残基被另一个可编码的氨基酸残基替代，或者 A 链、B 链或者连接肽中的至少一个赖氨酸残基已经被酰化化学修饰，或者连接肽不是以下的序列

Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1),
 Arg-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 2),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 3),
 Arg-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4),
 Gly-Gly-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 5),
 Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6),
 Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 7),
 Arg-Arg-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8),
 Gly-Gly-His-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 9), 或
 Arg-Arg-His-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 10)。

在另一个方面中本发明涉及具有生物胰岛素活性并且包含由连接肽连接的人胰岛素或者其类似物或衍生物的 B 和 A 链的单链胰岛素，其中的连接肽具有 5-11 个氨基酸残基，前提是 pI 在大约 6.5 以上的该单链胰岛素与人胰岛素的 A 和 B 链相比在 A 和/或 B 链中包含至少一个氨基酸残基替代和/或缺失，或者 A 链、B 链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经被酰化化学修饰。

在另一个方面中本发明涉及具有生物胰岛素活性并且包含由连接肽连接的人胰岛素或者其类似物或衍生物的 B 和 A 链的单链胰岛素，其中的连接肽具有 5-14, 5-11, 6-10, 6-8, 6-7, 7-9 或者 7-8 个氨基酸残基，且其中 A 链、B 链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经被酰化化学修饰。

在一个实施方案中，单链胰岛素在单链胰岛素分子中至少一个赖氨酸基团上被酰化。在另一个实施方案中，B29Lys 被酰化。在另一个实施方案中，在单链胰岛素分子中插入的赖氨酸被酰化或者 B1 N-末端氨基酸残基被酰化。

一方面单链胰岛素被具有 6-24, 6-20, 6-18 或者 6-14 个碳原子的脂肪酸酰化。

另一方面本发明涉及在中性 pH 下可溶、pI 低于大约 6.5 的单链胰岛素。

另一方面, 单链胰岛素的 pI 从大约 4.5 到低于大约 6.5。

另一方面本发明涉及了单链胰岛素, 其中至少一个赖氨酸残基被酰化修饰。

另一方面, 具有未化学修饰 A 和 B 链的单链胰岛素与人胰岛素受体的亲和性是人胰岛素的至少 30%。

另一方面, 单链胰岛素在连接肽中最多含有两个碱性氨基酸残基, 它们由至少一个非碱性氨基酸残基隔开。

本发明的另一个方面中, 单链胰岛素与天然人胰岛素的 A 和 B 链相比, 在 A 或 B 链中含有至少一个额外的碱性氨基酸。优选通过替代 B 链的 C 末端或者 A 链的 N 末端中的一个天然氨基酸残基引入碱性氨基酸, 在本发明的一个实施方案中 B27 位置的残基被 Arg 替代。

在本发明的另一个方面中单链胰岛素在 A 链的 A21 位置具有的氨基酸残基与天然的氨基酸残基 Asn 不同。因此位置 A21 中的 Asn 可以被除 Cys 外的任何其他可编码氨基酸残基替代。在一个实施方案中位置 A21 的氨基酸残基可以选自由 Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr 或者 Val 组成, 特别是由 Gly, Ala, Ser, 和 Thr 组成的组。在另一个实施方案中 A21 是 Gly。

在本发明的一个实施方案中单链胰岛素在连接肽中含有至少一个碱性氨基酸残基并且在位置 A21 上是 Gly。在本发明的另一个实施方案中单链胰岛素在连接肽中含有两个碱性氨基酸残基并且在位置 A21 上是 Gly。

在另一个实施方案中单链胰岛素具有的连接肽有 6-10, 6-9, 6-8,

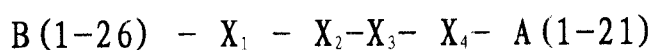
或 6-7 个氨基酸残基。

在另一个实施方案中单链胰岛素具有的连接肽有 7-10, 7-9 或 7-8 个氨基酸残基。

在另一个实施方案中连接肽在相对于 A 链中第一个氨基酸残基 (A1) 的倒数第二个位置上具有 Gly。

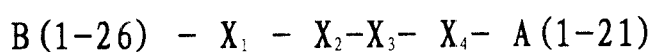
在另一个实施方案中连接肽包含选自 AGRGSGK (SEQ ID NO: 15); AGLGSGK (SEQ ID NO: 33); AGMGSGK (SEQ ID NO: 45); ASWGSGK (SEQ ID NO: 48); TGLGSGQ (SEQ ID NO: 22); TGLGRGK (SEQ ID NO: 23); TGLGSGK (SEQ ID NO: 21); HGLYSGK (SEQ ID NO: 50); KGLGSGQ (SEQ ID NO: 51); VGLMSGK (SEQ ID NO: 56); VGLSSGQ (SEQ ID NO: 27); VGLYSGK (SEQ ID NO: 28); VGLSSGK (SEQ ID NO: 30); VGMSSGK (SEQ ID NO: 65); VWSSSGK (SEQ ID NO: 76); VGSSSGK (SEQ ID NO: 16) 和 VGMSSGK (SEQ ID NO: 106) 的序列。

在另一个实施方案中单链胰岛素具有式



其中 X_1 是 Thr, Lys 或 Arg, X_2 是 Pro, Lys 或 Asp, X_3 是 Lys, Pro 或 Glu, X_4 是 6-11 个氨基酸的肽序列, B(1-26) 是由人胰岛素 B 链的从 B 链 N 末端开始的前 26 个氨基酸残基组成的肽链或者其类似物或衍生物, A(1-21) 是天然胰岛素的 A 链或者其类似物或者衍生物, 其中 X_4 不含有两个相邻的碱性氨基酸残基且其中的单链胰岛素对人胰岛素受体的亲和性是人胰岛素的至少大约 20%, 如果单链胰岛素分子没有被酰化化学修饰的话。

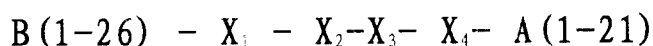
在另一个实施方案中单链胰岛素具有式



其中 X_1 是 Thr, Lys 或 Arg, X_2 是 Pro, Lys 或 Asp, X_3 是 Lys, Pro 或 Glu, X_4 是 6-11 个氨基酸的肽序列, B(1-26) 是由人胰岛素 B 链的从 B 链 N 端开始数前 26 个氨基酸残基组成的肽链或者其类似物或

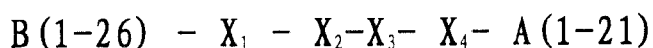
衍生物, A(1-21)是天然胰岛素的A链或者其类似物或者衍生物,前提是如果 X_4 含有两个相邻的碱性氨基酸残基则B和/或A链中的至少一个天然氨基酸残基被另一个可编码氨基酸残基替代或者A链、B链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经通过酰化被化学修饰或者 X_4 不是下列序列中的一个: Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1), Arg-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 2), Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 3), Arg-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4), Gly-Gly-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 5), Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6), Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 7), Arg-Arg-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8), Gly-Gly-His-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 9), 或 Arg-Arg-His-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 10)。

在另一个实施方案中单链胰岛素具有式



其中 X_1 是 Thr, Lys 或 Arg, X_2 是 Pro, Lys 或 Asp, X_3 是 Lys, Pro 或 Glu, X_4 是 6-11 个氨基酸的肽序列, B(1-26) 是由人胰岛素B链的从B链N端开始的前26个氨基酸残基组成的肽链或者其类似物或衍生物, A(1-21) 是天然胰岛素的A链或者其类似物或者衍生物,前提是 pI 在大约 6.5 以上的单链胰岛素与人胰岛素的A和B链相比在A和/或B链中包含至少一个氨基酸残基替代和/或缺失,或者A链、B链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经被酰化化学修饰。

在另一个实施方案中单链胰岛素具有式



其中 X_1 是 Thr, Lys 或 Arg, X_2 是 Pro, Lys 或 Asp, X_3 是 Lys, Pro 或 Glu, X_4 是 5-14, 5-11, 6-10, 6-8, 6-7, 7-9 或 7-8 个氨

基酸的肽序列, B(1-26) 是由人胰岛素 B 链的从 B 链 N 端开始的前 26 个氨基酸残基组成的肽链或者其类似物或衍生物, 且 A(1-21) 是天然胰岛素的 A 链或者其类似物或者衍生物, 其中 A 链、B 链或者连接肽中至少一个赖氨酸残基已经通过酰化被化学修饰。

在其中一个方面中, X_1 是 Thr, X_2 是 Pro, 且 X_3 是 Lys。

在另一个实施方案中, X_4 是具有下式 $X_a - X_b - X_c - X_d - X_e - X_f - X_g$ (SEQ ID NO: 129) 的肽序列, 其中

X_a 选自由 L, R, T, A, H, Q, G, S 和 V 组成的组;

X_b 选自由 W, G, S, A, H, R 和 T 组成的组;

X_c 选自由 L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G 和 P 组成的组;

X_d 选自由 R, A, Y, M, S, N, H 和 G 组成的组;

X_e 选自由 S, R, A, T, K, P, N, M, H, Q, V 和 G 组成的组;

X_f 选自由 G 和 A 组成的组; 且

X_g 选自由 K, R, P, H, F, T, I, Q, W 和 A 组成的组

在另一个实施方案中

X_a 选自由 L, R, T, A, H 和 V 组成的组;

X_b 选自由 W, G, S, A, H, R 和 T 组成的组;

X_c 选自由 L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G 和 P 组成的组;

X_d 选自由 R, A, Y, M, S, N, H 和 G 组成的组;

X_e 选自由 S, R, A, T, K, P 和 N 组成的组;

X_f 是 G; 且

X_g 选自由 K, R, Q 和 P 组成的组;

在另一个实施方案中

X_a 选自由 T, A, V, K 组成的组;

X_b 是 G;

X_c 选自由 L, Y, M, H, R, K, W 组成的组;

X_d 是 G;

X_e 选自由 S, K 组成的组;

X_f 是 G; 且

X_g 选自由 K, R, Q 组成的组

在另一个实施方案中 X_4 具有序列 $X_5-G-X_6-G-X_7-G-X_8$ (SEQ ID NO: 130)

其中

X_5 选自由 Val, Leu, Arg, Thr, Ala, His, Gln, Gly 或 Ser 组成的组,

X_6 选自由 Leu, Tyr, Met, His, Arg, Thr, Gln, Lys, Val, Ser, Ala, Gly, Pro 组成的组,

X_7 选自由 Ser, Arg, Ala, Thr, Lys, Pro, Asn, Met, His, Gln, Val, Gly 组成的组, 且

X_8 是 Lys 或 Arg。

在另一个实施方案中 X_5 选自由 Val, Leu, Arg, Thr, Ala 和 His 组成的组,

X_6 选自由 Leu, Tyr, Met 和 His 组成的组,

X_7 选自由 Ser, Arg, Ala, Thr, Lys, Pro 和 Asn 组成的组, 且

X_8 是 Lys 或 Arg。

在一个实施方案中 X_4 包含序列 SGK。在另一个实施方案中 X_4 包含序列 GSGK (SEQ ID NO: 131)。在另一个实施方案中 X_4 包含序列 SSSGK (SEQ ID NO: 132)。

在一个实施方案中在位置 B1, B3, B10, B22, B27, B28, B29, A8, A15, A18 和 A21 的天然氨基酸残基中的至少一个被另一个氨基酸残基替代。

在另一个实施方案中单链胰岛素是 desB1, desB25, desB27, desB28 或 desB29 胰岛素类似物。

在另一个实施方案中 X₄ 包含序列 TRXXXGR (SEQ ID NO: 112) , 其中 X 是任何氨基酸。

在另一个方面本发明涉及单链胰岛素, 其中 A 链和 B 链通过含有 6-11 个氨基酸的肽序列相连, 前提是该肽序列不是 Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1), Arg-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 2), Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Arg (SEQ ID NO: 3), Arg-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4), Gly-Gly-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 5), Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6), Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 7), Arg-Arg-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8), Gly-Gly-His-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg (SEQ ID NO: 9), 或者 Arg-Arg-His-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly (SEQ ID NO: 10)。

在另一个实施方案中连接肽不是 SANNTK (SEQ ID NO: 136), SPNTTK (SEQ ID NO: 137), SSNTTK (SEQ ID NO: 138) 或者 SRNTTK (SEQ ID NO: 139)。

本发明还涉及编码所要求的单链胰岛素的多核苷酸序列。另一方面本发明涉及含有这种多核苷酸序列的载体以及含有这种多聚核苷酸序列或者载体的宿主细胞。

另一方面本发明涉及在宿主细胞中产生单链胰岛素的方法, 所述方法包括 (i) 在适宜所述单链胰岛素表达的条件下培养包含编码单链胰岛素的多核苷酸序列的宿主细胞; 以及 (ii) 从培养基中分离单链胰岛素。

在本发明的一个实施方案中宿主细胞是酵母宿主细胞且在另一个实施方案中宿主细胞选自糖酵母属 (Saccharomyces)。在另一个实施

方案中宿主细胞选自啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 种。

在另一个实施方案中本发明涉及在单链胰岛素分子中至少一个赖氨酸残基被酰化的方法。

在另一个实施方案中本发明涉及单链胰岛素作为药物用于糖尿病的治疗的用途。

另一方面本发明涉及包含本发明单链胰岛素以及适宜佐剂和添加剂例如适于稳定、保存或者维持等渗的一种或多种物质(例如锌离子、苯酚、甲苯酚、对羟基苯甲酸酯、氯化钠、甘油或者甘露醇)的药物制剂。本发明制剂的锌含量可以是每个胰岛素六聚体 0 到大约 6 个锌原子。药物制剂的 pH 可以在大约 4 到大约 8.5 之间, 在大约 4 到大约 5 之间, 在大约 6.5 到大约 7.5 之间。

另一方面本发明涉及包含单链胰岛素以及至少一种其他药物例如迅速作用或者延长作用的胰岛素类似物以及 GLP-1, GLP-2 和 exendin 及其类似物和衍生物的药物组合物。根据本发明的单链胰岛素还可以与迅速作用或者延长作用的胰岛素类似物以及 GLP-1, GLP-2 和 exendin 及其类似物和衍生物或者口服抗糖尿病药例如噻唑烷二酮、二甲双胍 (metformin) 以及其他用于口服治疗的其他 II 型糖尿病药物制剂一起在组合治疗中使用。

在另一个方面中本发明涉及单链胰岛素在制备用于降低哺乳动物中血糖水平特别用于治疗糖尿病的药物制剂中的用途。

在另一个实施方案中本发明涉及通过向需要进行以下治疗的患者施用治疗活性剂量的根据本发明的单链胰岛素, 在哺乳动物中降低血糖水平的方法。

附图简述

图 1 显示根据本发明的单链胰岛素在正常 Wistar 大鼠中的血糖降

低与人胰岛素的效果进行比较。HI 是人胰岛素，SCI 是单链胰岛素，图 2 显示在猪中 s.c. 给药后单链胰岛素的消失以及图 3 显示在猪中 s.c. 给药后另一个单链胰岛素的消失。

发明详述

根据本发明的单链胰岛素具有胰岛素生物活性。如果单链胰岛素分子没有被酰化化学修饰，它们还与胰岛素受体具有人胰岛素的至少 20% 的亲合性。而且它们具有 IGF-1 受体亲合性，与人胰岛素的该亲合性相似或者更低。没有被酰化化学修饰的单链胰岛素与胰岛素受体具有人胰岛素该亲合性的至少 20%。根据本发明的单链胰岛素的特征还在于具有高度的物理稳定性。

与人胰岛素相比具有一个额外正电荷且 pI 低于大约 6.5 的单链胰岛素在中性 pH 下可溶且具有如人胰岛素的作用特征但是具有提高的物理稳定性。如果向胰岛素分子引入与人胰岛素相比额外的正电荷则 pI 会随着每加入的一个正电荷升高一。与人胰岛素相比具有两个额外正电荷则单链胰岛素会获得延长的特征。也可以通过在一个或者更多 Lys 残基中或者在 N 末端的 B1 氨基酸残基中引入酰基基团使单链胰岛素延长作用。酰化的单链胰岛素在中性 pH 下可溶并且可以与迅速作用的双链胰岛素例如 NovoRapid 混合。单链胰岛素可以选择性地在例如 B29 上酰化。或者在 B 链的 C 末端、连接肽序列或者 A 链的 N 末端的一个或者更多天然氨基酸残基可以被 Lys 残基替代，然后用如美国专利 No. 6500645 中公开的众所周知的方法将 Lys 残基酰化。

本发明的具有提高稳定性的单链胰岛素还可以与美国专利 No. 6500645 和 5,750,497 中描述的可溶的长效胰岛素相混合。产生的组合保持了两相性药物动力学特征。而且单链胰岛素可以在位置 B10 和/或 B28 上具有氨基酸替代，降低胰岛素自身聚合。

本发明单链胰岛素中的连接肽最长可以是 14 个氨基酸长。但是连

接肽通常的长度是 6-10 或 7-10, 7-9 或 7-8。

在一个实施方案中连接肽具有基序 VGSSSGX (SEQ ID NO: 122): VGSSSXK (SEQ ID NO: 123); VGSSXGK (SEQ ID NO: 124): VGSXSGK (SEQ ID NO: 125); VGXSSGK (SEQ ID NO: 126); VXSSSGK (SEQ ID NO: 1127) 和 XGSSSGK (SEQ ID NO: 128), 其中 X 是任何可编码的氨基酸残基。下表表示了 X 的选择含义。

连接肽	1. 优选 X 选自	2. 优选 X 选自
VGSSSGX (SEQ ID NO: 122)	K 和 R	P; H; F; T; I; Q; W; 和 A
VGSSSXK (SEQ ID NO: 123)	G	A
VGSSXGK (SEQ ID NO: 124)	S; R; A; T; K; P; 和 N	M; H; Q; V; 和 G
VGSXSGK (SEQ ID NO: 125)	R	A; Y; M; S; N; H 和 G
VGXSSGK (SEQ ID NO: 126)	L; Y; M; 和 H	R; T; Q; K; V; S; A; G; P
VXSSSGK (SEQ ID NO: 127)	W	G; S; A; H; R; T; P
XGSSSGK (SEQ ID NO: 128)	L, R, T, A, H, V	Q, G, S

连接肽的另一个基序是 TRXXXGR (SEQ ID NO: 112) 其中 X 可以是任何可编码氨基酸残基。

可以使用线形或者分支的、具有至少两个碳原子的饱和或者不饱和的羧酸的酰基基团对单链胰岛素酰化。

羧酸的示例有癸酸、月桂酸、十四酸 (肉豆蔻酸)、十五酸、十六酸、十七酸、硬脂酸、十二酸、十三酸和十四酸。

酰基基团也可以是亲脂的取代基, 选自 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, 其中 n 是 4 到 24, 例如 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 和 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 。

在本发明的一个实施方案中酰基基团是直链或者支链的链烷 α, ω -二羧酸。在本发明的另一个实施方案中酰基基团具有式 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_t\text{CO}-$ ，其中 t 是从 2 到 24 的整数。

在本发明的另一个实施方案中酰基基团选自包含 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ ，其中 m 是 2 到 24，例如 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ ， $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ ， $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ ， $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 和 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 。

酰基基团可以通过间隔分子例如适宜的氨基酸残基连接在单链胰岛素上。因此间隔物和酰基基团可以具有化学式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CONH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_p\text{CO}-$ ，其中 n 是从 4-24, 10-24 或 8-24 的整数， p 是从 1-3 的整数。在另一个实施方案中，间隔物和酰基基团具有化学式 $\text{HOOC}_3(\text{CH}_2)_n\text{CONH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_p\text{CO}-$ ，其中 n 是从 4-24 的整数， p 是从 1-3 的整数。在另一个实施方案中，间隔物和酰基基团组合具有化学式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CONH}-\text{CH}(\text{CH}_2)_p(\text{COOH})\text{CO}-$ ，其中 n 是从 4-24 的整数， p 是从 1-3 的整数或者 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{CONH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_p\text{COOH})\text{CO}-$ ，其中 n 是从 4-24 的整数， p 是从 1-3 的整数。

最后，酰基基团可以是石胆酸提供的石胆酰 (lithocholoyl) 或者胆酰 (choloyl)。

如果单链胰岛素在非 B29 的位置酰化，则 B29 上的天然赖氨酸残基被另一个氨基酸残基例如 Arg 和 Ala 替代。

根据本发明的单链胰岛素的酰化可以通过与美国专利 Nos. 5,750,497 和 5,905,140 中公开的方法类似的方法进行。

通过使用如美国专利 No. 6500645 中公开的众所周知的技术，在适宜的宿主细胞中表达编码所研究的单链胰岛素的 DNA 序列，制备单链胰岛素。单链胰岛素可以直接表达或者以 B 链上具有 N 末端延伸的前体分子的形式表达。N 末端延伸可能具有增加直接表达产物产量的

功能，最多可以有 15 个氨基酸残基长。从培养液中分离之后，体外切除 N 末端延伸，因此 N 末端延伸在 B1 旁边具有一个切割位点。适于本发明的类型的 N 末端延伸在美国专利 No. 5,395,922 和欧洲专利 No. 765,395A 中公开。

编码本发明单链胰岛素的多核苷酸序列可以根据确定的标准方法通过合成制备，例如 Beaucage 等人 (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859-1869 描述的 phosphoramidite 法或者 Matthes 等人 (1984) *EMBO Journal* 3:801-805 描述的方法。根据 phosphoramidite 法寡聚核苷酸在例如自动化 DNA 合成仪中合成、纯化、双链化并连接形成合成的 DNA 构建体。目前制备 DNA 构建体的优选方式是聚合酶链式反应 (PCR)。

多核苷酸序列还可以是混合的基因组、cDNA 和合成来源的。例如，编码前导肽的基因组或 cDNA 序列可以与编码 A 和 B 链基因组或 cDNA 序列连接起来，之后可以插入编码所需的用于根据众所周知的方法进行同源重组的氨基酸序列的合成寡聚核苷酸或者优选地使用适宜的寡聚核苷酸进行 PCR 产生所需序列对 DNA 序列进行修饰。

另一方面本发明涉及能够在选择的微生物或者宿主细胞中复制并且携带编码本发明单链胰岛素的多核苷酸序列的载体。重组载体可以是自我复制的载体，即作为染色体外实体存在的载体，其复制独立于染色体的复制，例如质粒、染色体外元件、小染色体或者人工染色体。载体可以含有任何保证自我复制的手段。或者载体可以在引入宿主细胞中后整合到基因组中与其整合的染色体共同复制。此外，可以使用含有全部要引入宿主细胞基因组的 DNA 的单一载体或质粒或者两个或更多载体或质粒，或者转座子。载体可以是线形或者闭环质粒，优选含有使载体稳定整合到宿主细胞基因组中或者使载体在细胞中独立于基因组自主复制的元件。

在一个实施方案中，重组表达载体能够在酵母中复制。使载体在酵母中复制的序列的示例是酵母质粒 2 μ m 的复制基因 REP 1-3 和复制起点。

本发明的载体可以含有一个或者多个选择标记，所述标记能够容易地对被转化的细胞进行选择。选择标记是基因，其产物提供了对生物杀灭剂或病毒的抗性、对重金属的抗性、原养型变为营养缺陷型等等。细菌选择标记的示例是来自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 或地衣形芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 *dal* 基因，或者赋予抗生素抗性例如氨基青霉素、卡那霉素、氯霉素或者四环素抗性的标记。用于丝状真菌宿主细胞的选择标记包括 *amdS* (乙酰胺酶)，*argB* (鸟氨酸氨甲酰转移酶)，*pyrG* (鸟氨酸-5'-磷酸脱羧酶) 和 *trpC* (邻氨基苯甲酸合酶)。用于酵母宿主细胞的适宜标记是 ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 和 URA3。用于酵母的非常适宜的标记是粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的 TPI 基因 (Russell (1985) Gene 40:125-130)。

在载体中多核苷酸序列与适宜的启动子序列有效连接。启动子可以是在所选择的宿主细胞中表现转录活性的任何核酸序列，包括突变的、截短的和杂合启动子，可以从对宿主细胞同源或异源的细胞外或者细胞内多肽的编码基因中获得。

在细菌宿主细胞中指导转录的适宜启动子的实例是来自大肠杆菌 (*E. coli*) *lac* 操纵子，天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂糖酶基因 (*dagA*)，枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 果聚糖蔗糖酶 (levansucrase) 基因 (*sacB*)，地衣形芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) α -淀粉酶基因 (*amyL*)，嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 麦芽基因淀粉酶基因 (*amyM*)，解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) α -淀粉酶基因 (*amyQ*)，以及地衣形

芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 青霉素酶基因 (*penP*) 的启动子。在丝状真菌宿主细胞中指导转录的适宜启动子的示例是来自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) TAKA 淀粉酶, 米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶, 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 中性 α -淀粉酶以及黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 酸性稳定 α -淀粉酶的启动子。在酵母宿主中有用的启动子是啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Ma1, TPI, ADH 或 PGK 启动子。

本发明的多核苷酸构建体通常还与适宜的终止子有效连接。在酵母中适宜的终止子是 TPI 终止子 (Alber 等人 (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 419-434)。

用于本发明多核苷酸序列与启动子和终止子分别连接以及将它们插入含有在所选宿主中复制所需信息的适宜载体中的方法, 是本领域技术人员众所周知的。应当理解载体构建可以首先制备含有编码本发明单链胰岛素的整个 DNA 序列的 DNA 构建体然后将该片段插入适宜的表达载体中, 或者顺序插入含有单个元件 (例如信号、肽原、连接肽、A 和 B 链) 遗传信息的 DNA 片段之后连接。

本发明还涉及包含编码本发明单链胰岛素的多核苷酸序列的重组宿主细胞。包含这种多核苷酸序列的载体被引入宿主细胞中, 使载体如前所述作为染色体的整合物维持或者作为自我复制的染色体外载体维持。术语“宿主细胞”包括由于复制中出现的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。宿主细胞可以是单细胞微生物例如原核生物或者非单细胞微生物例如真核生物。有用的单细胞是细菌细胞例如革兰氏阳性细菌包括但是不限于芽孢杆菌属细胞, 链霉菌属细胞或者革兰氏阴性细胞例如大肠杆菌和假单胞菌属。真核细胞可以是哺乳动物、昆虫、植物或者真菌细胞、在优选的实施方案中宿主细胞是酵母细胞。在本发明的过程中使用的酵母生物体可以是任何适宜的酵母生物, 这些酵母在培养时产生大量根据本发明的单链胰岛素。适宜的

酵母生物体的示例是选自酵母种啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 克鲁维啤酒糖酵母 (*Saccharomyces kluyveri*), 粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*), 葡萄汁糖酵母 (*Saccharomyces uvarum*), 乳克鲁维氏酵母 (*Kluyveromyces lactis*), 多态汉逊氏酵母 (*Hansenula polymorpha*), 巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*), 甲醇毕赤氏酵母 (*Pichia methanolica*), 克鲁维毕赤氏酵母 (*Pichia kluyveri*), *Yarrowia lipolytica*, 假丝酵母属 (*Candida sp.*), 产朊假丝酵母 (*Candida utilis*), 可可假丝酵母 (*Candida cacaoi*), 地霉属 (*Geotrichum sp.*), 和发酵地霉 (*Geotrichum fermentans*) 的菌株。

酵母细胞的转化可以通过例如原生质体形成之后用本身已知方法转化。用于培养细胞的培养基可以是适于生长酵母生物体的任何常规培养基。分泌出的本发明胰岛素前体, 相当大一部分以正确加工的形式存在于培养基中, 可以用常规的步骤从培养基中回收 (包括通过离心、过滤将酵母细胞与培养基分开, 或者离子交换基质或者反相吸附基质捕获胰岛素前体, 通过加入盐如硫酸铵的方法使上清或滤液中的蛋白组分沉淀, 之后通过各种不同的层析步骤例如离子交换层析、亲和层析等等进行纯化)。

药物组合物

含有本发明单链胰岛素的药物组合物可以用于对胰岛素敏感的情况的治疗。因此它们可以用于治疗 I 型糖尿病、II 型糖尿病和高血糖症, 如有时在严重受伤或者接受了重大外科手术的人中见到的那样。对于任何患者的最佳剂量水平取决于多种不同因素, 包括所使用的特异胰岛素衍生物的效力、患者的年龄、体重、身体活力以及饮食, 取决于与其他药物的可能组合, 以及要治疗的状况的严重程度。本发明胰岛素衍生物的推荐每日剂量要由本领域内技术人员使用与已知胰岛素组合物相似的方式, 针对每个患者进行确定。

本发明的药物制剂通常皮下给药。但是本发明的单链胰岛素也可以用于胰岛素泵，也可以配制为肺（pulmonary）给药。

在连接 B30 或 B29 与 A1 的肽序列中具有至少一个碱性氨基酸残基的根据本发明的单链胰岛素预计具有延长的胰岛素活性。由于额外的正电荷，等电点与人胰岛素相比升高，因此药物制剂的 pH 优选低于中性 pH 即低于大约 6。当注射这种单链胰岛素制剂时它们会在呈中性 pH 的注射位置沉淀，然后缓慢溶解并从注射位置释放。从注射位置的缓慢释放产生延长的作用，这可能是某些应用所需要的。要求保护的单链胰岛素的药物制剂含有通常的佐剂和添加剂，优选配制成水溶液。使用例如氯化钠、乙酸钠或者甘油将水介质制备为等渗的。此外水介质可以含有锌离子、缓冲剂以及防腐剂。调节组合物的 pH 值至所需的数值，可以在 4 到 8.5 之间优选在 7 到 7.5 之间，这取决于所研究的单链胰岛素的等电点 pI。

因此本发明还涉及药物组合物，其含有本发明单链胰岛素以及任选择地用于稳定、保存或者维持等渗的一种或多种物质，例如锌离子、苯酚、甲苯酚、对羟基苯甲酸酯、氯化钠、甘油或者甘露醇。本发明制剂的锌含量可以是每个胰岛素六聚体 0 到大约 6 个锌原子。还可以使用如 WO 2003027081 中公开的 IFD 配体配制单链胰岛素。

用于根据本发明药物制剂的缓冲剂可以选自乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸、甘氨酸、甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠以及三（羟甲基）氨基甲烷、N-二（羟乙基）甘氨酸、两性离子缓冲剂（tricine）、苹果酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或者其混合物。这些特异缓冲剂中每一种都成为本发明的备选实施方案。

药物上可以接受的防腐剂可以选自苯酚、邻甲苯酚、间甲苯酚、对甲苯酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧基乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯基乙醇、苯甲醇、氯丁醇以及硫柳汞 (thiomerosal)、2-溴-2-硝基-丙二醇 (bronopol)、苯甲酸、imidurea、chlorohexidine、无水乙酸钠、氯甲苯酚、对羟基苯甲酸乙酯、苯索氯铵、chlorphenesine (3-对氯苯氧基丙烷-1,2-二醇) 或者其混合物。在本发明的另一个实施方案中, 防腐剂以 0.1 mg/ml-20 mg/ml 的浓度存在。在本发明的另一个实施方案中, 防腐剂以 0.1 mg/ml-5 mg/ml 的浓度存在。在本发明的另一个实施方案中, 防腐剂的浓度是 5mg/ml-10 mg/ml。在本发明的另一个实施方案中, 防腐剂的浓度是 10mg/ml-20 mg/ml。这些特定防腐剂中每一种都成为本发明的备选实施方案。在药物组合物中使用防腐剂对技术人员是众所周知的。方便起见参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 版, 1995。

等渗物质可以选自盐 (例如氯化钠)、糖或者糖醇、氨基酸 (例如 L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇 (例如甘油 (丙三醇)、1,2-丙二醇 (丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇 (例如 PEG400) 或者其混合物。可以使用任何糖例如单、二或多糖, 或者水溶性葡聚糖包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、普鲁兰、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉以及羧甲基纤维素钠。在一个实施方案中糖添加剂是蔗糖。糖醇定义为具有至少一个羟基基团的 C4-C8 的碳氢化合物, 包括例如甘露醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇以及阿糖醇。在一个实施方案中糖醇添加剂是甘露醇。以上提到的糖或者糖醇可以单独或者组合使用。只要糖或糖醇可溶于液体制剂, 并且对使用本发明方法达到的稳定化效果没有负面影响, 则对所使用的量没有固定的限制。在一个实施方案中糖或糖醇的浓度在大约 1 mg/ml 和大约 150 mg/ml 之间。在本发

明的另一个实施方案中等渗剂的浓度为 1 mg/ml 到 50 mg/ml。在本发明的另一个实施方案中等渗剂的浓度为 1 mg/ml 到 7mg/ml。在本发明的另一个实施方案中等渗剂的浓度为 8 mg/ml 到 24 mg/ml。在本发明的另一个实施方案中等渗剂的浓度为 25 mg/ml 到 50 mg/ml。这些特异等渗剂中每一种都成为本发明的备选实施方案。在药物组合物中使用等渗剂对技术人员是众所周知的。方便起见参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 版, 1995。

本发明的单链胰岛素还可以与具有延长或者迅速作用胰岛素活性的其他单链胰岛素、人胰岛素或者人胰岛素类似物或衍生物混合, 制备由迅速作用和延长作用胰岛素混合物组成的胰岛素组合物。这种胰岛素类似物的示例在例如欧洲专利申请公布号 EP 214826, EP 375437 和 EP 383472 中有所描述。

根据本发明的单链胰岛素还可以与其他药物活性化合物例如 GLP-1, GLP-2 和 exendin 或者其类似物或衍生物混合。根据本发明的单链胰岛素还可以用于与口服抗糖尿病药物例如噻唑烷二酮、二甲双胍以及其他用于口服治疗的 II 型糖尿病药物制剂组合治疗。

缩写和命名

单链胰岛素指的是具有一般结构 B-C-A 的多肽序列, 其中 B 是人胰岛素 B 链或者其类似物或衍生物。A 是人胰岛素 A 链或者其类似物或衍生物, C 是含有 5-11 个氨基酸残基的连接 B 链 C 末端氨基酸残基 (通常是 B30) 与 A1 的肽链。如果 B 链是 desB30 链则连接肽连接的是 B29 和 A1。可以在 Lys 残基进行酰化对单链胰岛素进行衍生化。如同在人胰岛素中一样, 单链胰岛素含有正确位置的二硫桥 (三个), 在 CysA7 和 CysB7 之间以及在 CysA20 和 CysB19 之间, 以及在 CysA6 和 CysA11 之间的内部二硫桥。

人胰岛素 B 和 A 链的 B 和 A 链类似物是相对于人胰岛素分子的 A 和/或 B 氨基酸链具有一个或者多个突变、替代、缺失和/或添加的 B 和 A 链。优选地，胰岛素类似物中一个或者多个天然存在的氨基酸残基（优选为它们中的一个、两个或者三个）被另一个可编码氨基酸残基替代。在一个实施方案中，本发明包含的类似物分子具有相对于天然人胰岛素分子位置 B1, B3, B10, B22; B27, B28, B29, A8, A15 或者 A22 中的一个或多个，如以下进一步详述。

desB30 或 B(1-29) 指的是缺少 B30 氨基酸残基的天然胰岛素 B 链或者其类似物，B(1-26) 是从 B 链的 N 端数起由人胰岛素 B 链的前 26 个氨基酸残基组成的肽或者其类似物或衍生物，A(1-21) 指的是天然胰岛素 A 链或者其类似物或衍生物，A(1-20) 指的是人胰岛素 A 链的前 20 个天然氨基酸残基或者其类似物或衍生物。氨基酸残基用三字母氨基酸编码或者单字母氨基酸编码表示。

B1, A1 等指的是胰岛素 B 链中位置 1（从 N 端数起）的氨基酸残基以及胰岛素 A 链中位置 1（从 N 端数起）的氨基酸残基。

如这里所使用的，胰岛素类似物指的是具有形式上可以来自人胰岛素结构的分子结构的多肽。因此来自其他动物的胰岛素成为人胰岛素的类似物。类似物的结构可以通过例如缺失和/或替代至少一个出现在天然胰岛素中的氨基酸残基和/或添加至少一个氨基酸残基得到。添加的和/或替代的氨基酸残基可以是可编码氨基酸残基——这被定义为突变，或者其他天然存在的氨基酸残基包括 D-氨基酸或者完全合成的氨基酸例如 N-甲基氨基酸——这被定义为替代。结构也可以通过插入非肽部分或者使用非肽部分例如颠倒转 (retroinverso) 片段替代，或者掺入非肽键例如氮杂肽键 (CO 被 NH 取代) 或假肽键 (例如 NH 被 CH₂ 取代)，衍生自天然存在的胰岛素。

Asn 残基的突变或替代提高了胰岛素及其药物制剂的化学稳定性。D-氨基酸的掺入以及天然肽键更换为非肽键可能使得胰岛素对蛋白水解酶具有抗性。

当序列中存在 Asp 和 Glu 残基，肽链可以通过异肽键（即分别通过 β - 或 γ -连接的侧链羧基基团）继续。

胰岛素类似物的示例是这样的：其中 B 链位置 28 上的 Pro 可以突变为 Asp、Lys 或者 Ile。在另一个实施方案中位置 B29 的 Lys 突变为 Pro。另外 B27 Thr 可以突变为 Lys, Arg 或 Glu。此外，位置 A21 的 Asn 可以突变为 Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr 或 Val，特别是 Gly, Ala, Ser, 或 Thr，优选为 Gly。此外，位置 B3 的 Asn 可以突变为 Thr, Lys, Gln, Glu 或 Asp，位置 A18 的 Asn 可以突变为 Gln。其他胰岛素类似物的示例有缺失类似物 des(B1 Phe) 胰岛素；B 链具有 N 末端延伸的胰岛素类似物以及 A 链具有 C 末端延伸（例如 Lys）的胰岛素类似物。

如这里使用的，胰岛素衍生物指的是被体外化学修饰（例如在胰岛素侧链的一个或者更多位置中引入基团例如在酪氨酸残基中引入硝基基团、在酪氨酸残基中引入碘或者将自由的羧基基团转变为酯基团或酰胺基团；或者将氨基基团通过酰化转化为酰胺；或者使羟基酰化产生酯；或者使伯胺烷基化产生仲胺）后的天然存在的胰岛素或胰岛素类似物。其他衍生物通过胰岛素中氨基酸残基侧链的氧化或还原获得。

根据以下的规则命名单链胰岛素：序列从 B 链开始然后是 C 肽，结束于 A 链。根据氨基酸残基在人胰岛素中的各自对应氨基酸残基进行命名，对突变和酰化进行明确描述而不提及 A 和 B 链中未改变的氨基酸残基。例如与人胰岛素相比具有下列突变 A21G, B3Q, B29R, desB30 和连接 B 链 C 末端和 A 链 N 末端的 C 肽 TGLGKGQ (SEQ ID NO: 19)

的胰岛素被命名为 B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGKGQ (SEQ ID NO: 19)-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素。

酰基基团指的是有机酸去除羟基基团后产生的基团，即 R-CO- 基团，其中 R 可以是氢原子、烷基基团或者 O-烷基基团。

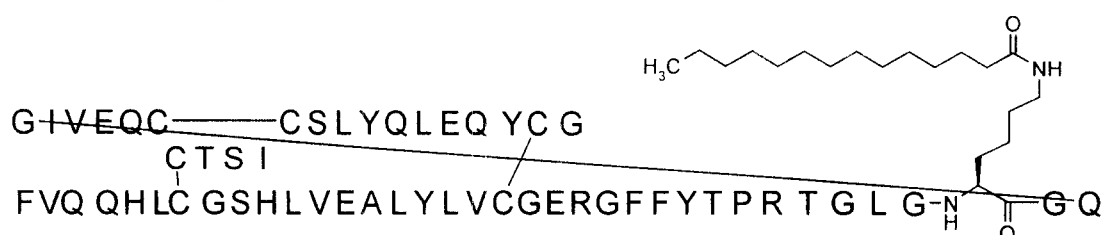
酰化的意思是氨基基团的氢原子或者羟基基团被交换为酰基基团的化学反应。

偏好或者选择性酰化指的是在所需的位置以更高程度优选地比不必要的位置相比至少两倍或者三倍高程度出现的酰化。在本发明的一个实施方案中酰化应当优选地只出现在 LysB29 的 ϵ -氨基基团中或者出现在另一个位置上插入的 Lys 残基中或者出现在 N 末端的 B1 氨基酸残基中。

活化酸指的是羧酸，其中活化的离去基团已经被连接在酰基碳上使酰基与氨基基团反应形成酰胺键，释放离去基团。活化的脂肪酸可以是活化脂肪酸的酯，活化脂肪酸的酰胺以及酸酐或氯化物。活化的脂肪酸包括其衍生物例如与 1-羟基苯并三唑和 N-羟基琥珀酰亚胺形成的酯。

脂肪酸或者酰基基团指的是具有至少两个碳原子的线性或者支链的饱和或不饱和的羧酸。在本发明的一个实施方案中酰基基团是具有 6 到 24 个碳原子的脂肪酸。

如果胰岛素被酰化，则给出连接点以及酰基基团的名称，且在对应的结构/序列中，详述所讨论的残基和酰基基团。例如：



给出的名称是：B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps)肉豆蔻酰)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素(SEQ ID NO:133)。

具有胰岛素活性的单链胰岛素指的是能够降低哺乳动物中血糖的单链胰岛素，血糖的测定使用适宜的动物模型（可以是大鼠、兔或者猪）在适宜的给药如静脉内或者皮下给药之后进行。

pI 是肽具有零净电荷时的 pH。可以使用以下公式计算肽的 pI，

$$\text{电荷}(pH) = \frac{N_{N\text{Term}=H}}{1+10^{pH-8.2}} - \frac{N_{C\text{Term}=OH}}{1+10^{3.2-pH}} - \frac{N_{Asp}}{1+10^{4.0-pH}} - \frac{N_{Glu}}{1+10^{4.5-pH}} + \frac{N_{Lys}}{1+10^{pH-10.4}} + \frac{N_{Arg}}{1+10^{pH-10.4}} - \frac{N_{FreeCys}}{1+10^{9-pH}} - \frac{N_{Tyr}}{1+10^{10-pH}} + \frac{N_{His}}{1+10^{pH-6.4}}$$

电荷(pI) = 0

其中 N 是出现的数目。

在中性 pH 下可溶指的是 0.6mM 单链胰岛素在中性 pH 下可溶。

高度物理稳定性指的是原纤维形成的趋势低于人胰岛素原纤维形成的 50%。原纤维形成可以描述为在给定条件下原纤维形成开始之前的延迟时间。

原纤维形成指的是部分未折叠的胰岛素分子之间相互作用形成线形聚集体的物理过程。

具有胰岛素受体和 IGF-1 受体亲和性的多肽是在适宜的结合检测中能够与胰岛素受体和人 IGF-1 受体相互作用的多肽。这种受体检测是本领域内众所周知的，将在实施例中进行进一步描述。本单链胰岛素不与 IGF-1 受体结合，或者与所述受体具有相当低的亲和性。更确切地说，在根据实施例中的描述进行测定时，本单链胰岛素与 IGF-1 受体具有的亲和性与人胰岛素的亲和性大致相同或较低。

本单链胰岛素对胰岛素受体的亲和性如实施例所述进行测定，通常是人胰岛素对胰岛素受体亲和性的百分之二十到二百之间。

“*POT*”是粟酒裂殖酵母丙糖磷酸异构酶基因，“*TPI1*”是啤酒糖酵母的丙糖磷酸异构酶基因。

“前导肽 (leader)”指的是由前肽 (pre-peptide) (信号肽) 和肽原 (pro-peptide) 组成的氨基酸序列。

术语“信号肽”指的是作为蛋白质前体形式上的 N 端序列而存在的前肽。信号肽的功能是促进异源蛋白向内质网的转运。信号肽通常在该过程中被切掉。对于产生蛋白质的酵母生物，信号肽可以是异源或者同源的。可以用于本发明的 DNA 构建体的一些信号肽包括酵母天冬氨酸蛋白酶 3 (YAP3) 信号肽或者任何功能类似物 (Egel-Mitani 等人 (1990) YEAST 6:127-137 和 US 5,726,038) 以及 *MFA1* 基因的 α -因子信号 (Thorner (1981) The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Strathern 等人, 编, pp 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 和 US 4,870,000)。

术语“肽原”指的是多肽序列，其功能是将表达的多肽从内质网引导到高尔基体上，然后再到分泌小体中用于分泌到培养基中（即多肽跨细胞壁向外运输或者至少通过细胞膜进入酵母细胞的周质空间）。肽原可以是酵母的 α -因子肽原，参阅 US 4,546,082 和 4,870,008。或者肽原可以是合成的肽原，即肽原未见于自然界。适宜的合成肽原是那些在 US 5,395,922; 5,795,746; 5,162,498 和 WO 98/32867 中公开的。优选地，肽原在 C 末端含有内肽酶加工位点，例如 Lys-Arg 序列或者其任何功能类似物。

在这里的上下文中按照下表示的通常含义使用了氨基酸的三字母或者单字母表示。除非有明确说明，这里提及的氨基酸是 L-氨基酸。另外，除非特殊说明，肽的氨基酸序列的左和右端分别是 N 和 C 末端。

氨基酸缩写

氨基酸	三字母编码	单字母编码
甘氨酸	Gly	G
脯氨酸	Pro	P
丙氨酸	Ala	A
缬氨酸	Val	V
亮氨酸	Leu	L
异亮氨酸	Ile	I
甲硫氨酸	Met	M
半胱氨酸	Cys	C
苯丙氨酸	Phe	F
酪氨酸	Tyr	Y
色氨酸	Trp	W
组氨酸	His	H
赖氨酸	Lys	K
精氨酸	Arg	R
谷氨酰胺	Gln	Q
天冬酰胺	Asn	N
谷氨酸	Glu	E
天冬氨酸	Asp	D
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T

在说明和实施例中使用了以下的缩写

Bzl = Bn: 苄基

DIEA: N,N-二异丙基乙胺

DMF: N,N-二甲基甲酰胺

tBu: 叔丁基

Glu: 谷氨酸

TSTU: *O*-(*N*-琥珀酰亚胺基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯

THF: 四氢呋喃

EtOAc: 乙酸乙酯

DIPEA: 二异丙基乙胺

HOAt: 1-羟基甲基-7-氮杂苯并三唑

NMP: *N*-甲基吡咯烷-2-酮

TEA: 三乙胺

Su: 琥珀酰亚胺基 = 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基

TFA: 三氟乙酸

DCM: 二氯甲烷

DMSO: 二甲亚砜

RT: 室温

在以下的实施例中进一步详细描述本发明，实施例不是以任何方式限制所要求的本发明的范畴。所有引用的参考文献在这里特异引用其全部描述的内容作为参考。

实施例

一般步骤

所有表达质粒是 C-POT 类型的，与 EP 171, 142 中描述的相似，其特征为含有粟酒裂殖酵母丙糖磷酸异构酶基因 (POT)，用于在啤酒糖酵母中质粒的筛选和稳定化。质粒还含有啤酒糖酵母的丙糖磷酸异构酶启动子和终止子。除了编码前导肽和胰岛素产物融合蛋白的 *EcoRI-XbaI* 片段的序列以外，所有的序列都与质粒 pKFN1003 (在 WO 90/100075 中描述) 中的相应序列相似。为了表达不同的融合蛋白，pKFN1003 的 *EcoRI-XbaI* 片段被编码目标前导肽-胰岛素融合蛋白的 *EcoRI-XbaI* 片段替换。这些 *EcoRI-XbaI* 片段可以使用合成的寡聚核苷酸和 PCR 根据标准技术合成。

通过转化宿主菌株啤酒糖酵母菌株 MT663 (*MATa/MAT α pep4-3/pep4-3 HIS4/his4 tpi::LEU2/tpi::LEU2 Cir⁺*) 制备酵母转化子。与递交 WO 92/11378 有关，酵母菌株 MT663 保存于德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)，其保存编码为 DSM 6278。

MT663 生长于 YPGaL (1% Bacto 酵母提取物, 2% Bacto 蛋白胨, 2% 半乳糖, 1% 乳酸) 上至 600nm 的 OD 达到 0.6。离心收获 100ml 培养物，用 10ml 水洗涤，再次离心并重悬于 10ml 含有 1.2 M 山梨糖醇, 25 mM Na₂EDTA pH = 8.0 和 6.7 mg/ml 二硫苏糖醇的溶液中。悬液在 30°C 孵育 15 分钟，离心，细胞重悬于 10ml 含有 1.2 M 山梨糖醇, 10 mM Na₂EDTA, 0.1 M 柠檬酸钠, pH5.8, 和 2 mg Novozym®234 的溶液中。悬液在 30°C 孵育 30 分钟，离心收集细胞，用 10ml 的 1.2M 山梨糖醇和 10ml CAS (1.2 M 山梨糖醇, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl (Tris = 三羟甲基氨基甲烷) pH = 7.5) 漂洗然后重悬于 2ml CAS 中。转化时，1ml 的 CAS 悬浮的细胞与大约 0.1mg 的质粒 DNA 混合室温放

置 15 分钟。加入 1ml 的 (20% 聚乙二醇 4000, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl, pH = 7.5), 混合物在室温下再孵育 30 分钟。混合物离心, 沉淀重悬于 0.1ml SOS (1.2 M 山梨糖醇, 33% v/v YPD, 6.7 mM CaCl₂) 并且在 30°C 下孵育 2 小时。然后离心悬液, 沉淀重悬于 0.5ml 的 1.2M 山梨糖醇。然后加入 52°C 的 6ml 上层琼脂 (Sherman 等人 (1982) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory 的 SC 培养基, 含有 1.2M 山梨糖醇和 2.5% 琼脂), 将悬液倾倒在含有相同的琼脂固化的含山梨糖醇培养基的平板上层。

使用表达质粒转化的啤酒糖酵母菌株 MT663 在 YPD 中, 30°C 生长 72 小时。

实施例 1

根据上面的描述, 制备并从培养基中分离多个单链胰岛素, 纯化用于进一步的检测。检测单链胰岛素的生物学胰岛素活性, 这通过单链胰岛素与人胰岛素受体的结合亲和性与人胰岛素的该结合亲和性比较进行, 如下面的描述。

此外, 如下描述检测了对 IGF-1 的亲和性。结果示于表 1 中, 其中 “IR” 表示相对于人胰岛素与人胰岛素受体的结合。

表 1

单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1 受体的结合
1606	RSFDGK (SEQ ID NO:34)		41 %	
1663	TVGSSRGK (SEQ ID NO:35)		46 %	
1664	TGSSRGK (SEQ ID NO:36)		43 %	
1735	VGRSSGK (SEQ ID NO:31)	[A21G]	143 %	
1754	AGRGSGP (SEQ ID NO:18)		53 %	
1767	AGRGSGP (SEQ ID NO:18)	[A18Q_A21G]	28 %	
1801	AGRGSGK (SEQ ID NO:15)		129%	
1817	AGRGSGK (SEQ ID NO:15)	[A21G]	63%	
1800	AGRGSGK (SEQ ID NO:15)	[A18Q_A21G]	175%	

单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1受体的结合
1805	AGRGSGK (SEQ ID NO:15)	[B3Q_A18Q_A21G]	83%	
1808	AGRGSGK (SEQ ID NO:15)	[B1G_B3Q_A18Q_A21G]	86%	
1802	AGRGK (SEQ ID NO:32)	[A18Q_A21G]	25%	
1786001	AGLGDGK (SEQ ID NO:37)		50%	
1786017	AGLGVGK (SEQ ID NO:38)		47%	
1786026	AGLGMGK (SEQ ID NO:39)		35%	
1786030	AGLGSGK (SEQ ID NO:33)		197%	
1786036	AGLGYGK (SEQ ID NO:40)		35%	
1786044	AGLGQGK (SEQ ID NO:41)		22%	
1786046	AGLGGGK (SEQ ID NO:42)		68%	
1786053	AGLGRGK (SEQ ID NO:43)		54%	
1764	AGLGSGK (SEQ ID NO:33)	[A18Q_A21G]	120 %	
1816	AGLGSGQ (SEQ ID NO:44)	[B3Q_A18Q]	37%	
1757	AGLGSGK (SEQ ID NO:24)		116 %	
1755	AGMGSGK (SEQ ID NO:45)		137%	
1762	AGMGSGP (SEQ ID NO:25)	[A18Q_A21G]	20 %	
1672	AGSSSGK (SEQ ID NO:46)		31%	
1784	WASGSGK (SEQ ID NO:47)	[A18Q_A21G]	23%	
1785	ASWGSGK (SEQ ID NO:48)	[A18Q_A21G]	136%	
1796	AWSGSGK (SEQ ID NO:49)	[A18Q_A21G]	102%	
1781	TGLGSGQ (SEQ ID NO:22)		122%	
1782	TGLGSGK (SEQ ID NO:21)		130%	

单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1 受体的结合
1783	TGLGRGK (SEQ ID NO:23)		86%	
1810	TGLGSGQ (SEQ ID NO:22)	[A18Q_A21G]	73%	
1811	TGLGSGK (SEQ ID NO:21)	[A18Q_A21G]	136%	
1812	TGLGRGK (SEQ ID NO:23)	[A18Q_A21G]	118%	
1820	TGLGKGQ (SEQ ID NO:19)	[B3Q_B29R_A18Q_A21G]	55%	
1821	TGLGSGK (SEQ ID NO:21)	[B3Q_B29R_A18Q_A21G]	128%	
1835	TGLGKGQ (SEQ ID NO:19)	[B29E_A18Q]	50%	
1837	TGLGKGQ (SEQ ID NO:19)	[B29A_A18Q]	71%	
1838	TGLGKGQ (SEQ ID NO:19)	[B29R_A18Q]	113%	
1845	TGLGKGQ (SEQ ID NO:19)	[B27E_B29A_A18Q]	20%	
1846	TGLGKGR (SEQ ID NO:20)	[B29A_A18Q]	92%	
1847	TGLGKGR (SEQ ID NO:20)	[B27E_B29A_A18Q]	82%	
1848	TGLGKGR (SEQ ID NO:20)	[B27E_B29E_A18Q]	40%	
1849	TGLGKGR (SEQ ID NO:20)	[B29E_A18Q]	60%	
1850	TGLGSGQ (SEQ ID NO:22)	[B10R]	31%	
1864	TGLGSGK (SEQ ID NO:21)	[B3K_A18Q_A21G]	301%	
1877	TGLGSGK (SEQ ID NO:21)	[B28D_A18Q]	140%	
1881	TGLGSGK (SEQ ID NO:21)	[A18K_A21G]		
1891	TGLGSGQ (SEQ ID NO:22)	[B10A_A18Q]	34%	
1892	TGLGSGQ (SEQ ID NO:22)	[desB1_B3Q_B10A_A18Q]	38%	
1893	TGLGSGQ (SEQ ID NO:22)	[B10Q_A18Q]	51%	
1894	TGLGSGQ (SEQ ID NO:22)	[desB1_B3Q_B10Q_A18Q]	38%	

单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1受体的结合
1791	HGLYSGK (SEQ ID NO:50)	[A18Q_A21G]	226%	
1818	KGLGSGQ (SEQ ID NO:51)	[B3Q_B29R_A18Q_A21G]	125%	
1819	C (SEQ ID NO:26)	[B3Q_B29R_A18Q_A21G]	47%	
1824	GRGSGK (SEQ ID NO:52)	[B1G_B3Q_A18Q_A21G]	75%	
1727	VGLSSGD (SEQ ID NO:53)		54 %	
1728	VGLSSGQ (SEQ ID NO:54)		151 %	
1730	VGLRSGK (SEQ ID NO:55)		306 %	
1731	VGLMSGK (SEQ ID NO:56)		247 %	
1841	VGLGGPGAGK (SEQ ID NO:29)		43%	
1842	VGLGPGAGK (SEQ ID NO:58)		41%	
1813	VGLGGPGAG K(SEQ ID NO:59)	[A18Q]	39%	
1814	VGLGGPGAGK (SEQ ID NO:60)	[A18Q]	43%	
1815	VGLGPGAGK (SEQ ID NO:58)	[A18Q]	57%	
1787	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[A18Q_A21G]	123%	
1788	VGLYSGK (SEQ ID NO:28)	[A18Q_A21G]	323%	
1789	VGLRSGK (SEQ ID NO:55)	[A18Q_A21G]	248%	
1790	VGLMSGK (SEQ ID NO:56)	[A18Q_A21G]	261%	
1734	VGLSSGK (SEQ ID NO:30)	[A21G]	211 %	
1866	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[A18Q]	196%	
1869	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B22K_B29A_A18Q]	69%	
1870	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B29A_A15K_A18Q]		
1871	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B29A_A18K]	82%	

单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1受体的结合
1872	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B3K_B29A_A18Q]		
1854	VGLYSGK (SEQ ID NO:28)	[B29E_A18Q]	40%	
1875	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B28K_B29A_A18Q]	35%	
1876	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B27K_B29A_A18Q]	38%	
1878	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B3K_A18K_A21G]	172%	
1879	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B29A_A18Q]	92%	
1880	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B1G_B3Q_A18Q_A21G]	54%	
1855	VGLYSGK (SEQ ID NO:28)	[B28D_A18Q]	221%	
1858	VGLGGPGKGR (SEQ ID NO:121)	[B29E_A18Q]	36%	
1861	VGLGKPGAGK (SEQ ID NO:61)	[A18Q_A21G]	36%	
1862	VGLGGPGAGK (SEQ ID NO:29)	[B3K_A18Q_A21G]	42%	
1884	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B29A_A8K_A18Q]	89%	
1896	VGLSSGQ (SEQ ID NO:27)	[B29A_A18Q_A22K]	38%	
1863	HGRGSGK (SEQ ID NO:62)	[A18Q_A21G]	122%	
1873	KGLSSGQ (SEQ ID NO:63)	[B29A_A18Q]	60%	
1874	VKLSSGQ (SEQ ID NO:64)	[B29A_A18Q]	835	
1688023	VGRSSGK (SEQ ID NO:31)		97%	
1688059	VGMSSGK (SEQ ID NO:65)		112%	
1655	TGSSSGK (SEQ ID NO:66)		43 %	
1656	TVGSSSGK (SEQ ID NO:67)		57 %	
1689007	LGSSSGK (SEQ ID NO:68)		49%	
1689008	RGSSSGK (SEQ ID NO:69)		54%	

单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1受体的结合
1689012	QGSSSGK (SEQ ID NO:70)		34%	
1689021	GGSSSGK (SEQ ID NO:71)		23%	
1689037	SGSSSGK (SEQ ID NO:72)		49%	
1724005	VDSSSGK (SEQ ID NO:73)		32%	
1724012	VPSSSGK (SEQ ID NO:74)		80%	
1724014	VESSSGK (SEQ ID NO:75)		40%	
1724015	VWSSSGK (SEQ ID NO:76)		298%	
1724016	VTSSSGK (SEQ ID NO:77)		51%	
1724029	VASSSGK (SEQ ID NO:78)		81%	
1724040	VSSSSGK (SEQ ID NO:79)		73%	
1724042	VRSSSGK (SEQ ID NO:80)		76%	
1769013	QVGSSSGK (SEQ ID NO:81)	[A18Q_A21G]	33%	
1769015	EVGSSSGK (SEQ ID NO:82)	[A18Q_A21G]	42%	
1769020	SVGSSSGK (SEQ ID NO:83)	[A18Q_A21G]	51%	
1769027	LVGSSSGK (SEQ ID NO:84)	[A18Q_A21G]	68%	
1769033	PVGSSSGK (SEQ ID NO:85)	[A18Q_A21G]	37%	
1769040	VVGSSSGK (SEQ ID NO:86)	[A18Q_A21G]	29%	
1769053	GVGSSSGK (SEQ ID NO:87)	[A18Q_A21G]	37%	
1769062	PVGSSSGK (SEQ ID NO:85)	[A18Q_A21G]	56%	
1711	RGSSSGK (SEQ ID NO:120)		65%	
1674	VGASSGK (SEQ ID NO:86)		49%	
	VGSSNGK (SEQ ID NO:87)		48%	

单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1受体的结合
1638077	VGSSRGK (SEQ ID NO:17)		61%	0,1%
	VGSSGK (SEQ ID NO:88)			
1676	VGSSAGK (SEQ ID NO:119)		22%	
1723	VGSSRGK (SEQ ID NO:17)	[A21G]	33 %	
1617	VGSSNGK (SEQ ID NO:118)		48 %	
1677	VGSSSAK (SEQ ID NO:89)		22%	
1766	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)		62%	0,05%
1724004	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)		72%	
1760016	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[B10D]	135%	
1760023	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[B10E]	77%	
1760043	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[B10Q]	67%	
1760056	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[B10E]	83%	
1760059	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[B10N]	48%	
1738	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[A18Q]	89 %	
1740	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[B1G_B3Q_A18Q_A21G]	90 %	
1741	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[B1G]	112 %	
1744	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[A18Q_A21G]	80 %	
1860	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[B3K_A18Q_A21G]	83%	
1733	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	[A21G]	42 %	
1712	VGSSSGK (SEQ ID NO:16)	B27R	85%	
1719	VGHSRGK (SEQ ID NO:90)		103%	
1721	HGSSRGK (SEQ ID NO:91)		118%	

单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1受体的结合
	VGSASGK (SEQ ID NO:92)		80%	
1687009	VGSNSGK (SEQ ID NO:93)		48%	
1708	VGSRSGK (SEQ ID NO:94)		128%	0,2%
1718	VGSHRGK (SEQ ID NO:95)		69%	
1687030	VGSGSGK (SEQ ID NO:96)		55%	
1687033	VGSYSGK (SEQ ID NO:97)		80%	0,2%
1687046	VGSMSGK (SEQ ID NO:98)		82%	0,1%
1688001	VGPSSGK (SEQ ID NO:99)		48%	
1688005	VTSSGK (SEQ ID NO:100)		75%	
1688006	VGQSSGK (SEQ ID NO:101)		56%	
1688007	VGYSSGK (SEQ ID NO:102)		95%	0,2%
1688011	VGLSSGK (SEQ ID NO:30)		132%	0,1%
1688012	VGKSSGK (SEQ ID NO:103)		93%	
1688014	VGGSSGK (SEQ ID NO:104)		51%	
1709	VGRSSGK (SEQ ID NO:105)		97%	0,5%
1688028	VGMSSGK (SEQ ID NO:106)		127%	0,2%
1688056	VGVSSGK (SEQ ID NO:107)		59%	
	VGHSSGK (SEQ ID NO:108)		112%	0,15%
	LGSSGK (SEQ ID NO:113)		49%	
	RGSSGK (SEQ ID NO:114)		54%	0,5%
	QGSSGK (SEQ ID NO:115)		34%	
	GGSSGK (SEQ ID NO:116)		23%	

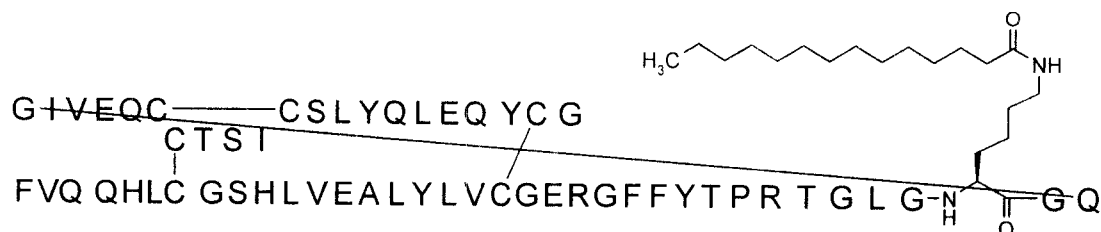
单链胰岛素 (PAK)	连接肽	氨基酸替代	IR	相对于人胰岛素与人 IGF-1受体的结合
	SGSSGK (SEQ ID NO:117)		49%	
	GSSGK (SEQ ID NO:109)		35%	
	QGSSGK (SEQ ID NO:110)		36%	
	TRSSGR (SEQ ID NO:111)			

具有连接肽 TRXXXGR (SEQ ID NO:112) 基序的单链胰岛素与胰岛素受体的结合相当于人胰岛素的该结合的百分比

B 链	XXX	A 链	胰岛素受体结合 IR	人 IGF-1 受体结合
B(1-29)	YGS	A(1-21)		
B((1-29)	SSN	A(1-21)	61%	0,1%
B(1-29)	LSQ	A(1-21)	62%	0,05%
B(1-29)	PKS	A(1-21)	18%	
B(1-29)	LGG	A(1-21)	43%	
B(1-29)	VTG	A(1-21)	57%	
B(1-29)	STN	A(1-21)	46%	
B(1-29)	LES	A(1-21)	43 %	
B(1-29)	IDS	A(1-21)	31%	
B(1-29)	NSQ	A(1-21)	38%	
B(1-29)	PSY	A(1-21)	49%	
B(1-29)	ENT	A(1-21)	34%	
B(1-29)	TPQ	A(1-21)	22%	
B(1-29)	NRT	A(1-21)	22%	

实施例 2

B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps) 肉豆蔻酰)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素 (SEQ ID NO: 133) (PAK1820)



B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGKGQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素 (SEQ ID NO: 133) (150 mg, 24 μmol) 溶解于碳酸钠水溶液 (100 mM, 2.8 mL) 中, 加入含有肉豆蔻酸 *N*-羧基琥珀酰亚胺酯 (7.7 mg, 24 μmol , 可以根据 B. Faroux-Corlay 等人, J. Med. Chem. 2001, 44, 2188-2203 制备) 的 *N*-甲基吡咯烷-2-酮 (0.5 mL)。在得到的混合物中加入更多的 *N*-甲基吡咯烷-2-酮 (3 mL) 和碳酸钠水溶液 (100 mM, 0.8 mL), 至 pH 10-11。产生的混合物在室温下搅拌 50 分钟。使用 1N 盐酸调节 pH 至 5.5。通过离心和倾倒分离形成的固体。使用制备型 HPLC 在 Jones Kromasil RP18 5 μm , 15x225 mm 柱上进行两个循环纯化残留物, 使用 8 mL/min 的流速以及下面的梯度:

0.00 - 5.00 min: 10% CH₃CN + 0.1% TFA,
 5.00 - 35.0 min: 10% - 50% CH₃CN + 0.1% TFA,
 35.0 - 45.0 min: 50% - 90% CH₃CN + 0.1% TFA.

混合纯化的级分, 冻干, 得到 12mg 的标题化合物。

纳流电喷雾 MS: $m/z = 6541 (M+1)$ 。

HPLC: $R_t = 15.44 \text{ min}$ 。

柱: C4, 5 μm , 150x4 60mm "phenomenex, Jupiter"。

上样 20 μl 。

流速: 1.5 ml/min。

溶剂:

A: 80% 0,0125 M Tris, 0,0187 M (NH₄)₂SO₄ pH = 7, 20% CH₃CN。

B: 80% CH₃CN, 20%水。

梯度:

0.00 - 20.00 min: 5% - 55% B,

20.0 - 22.0 min: 55% - 80% B,

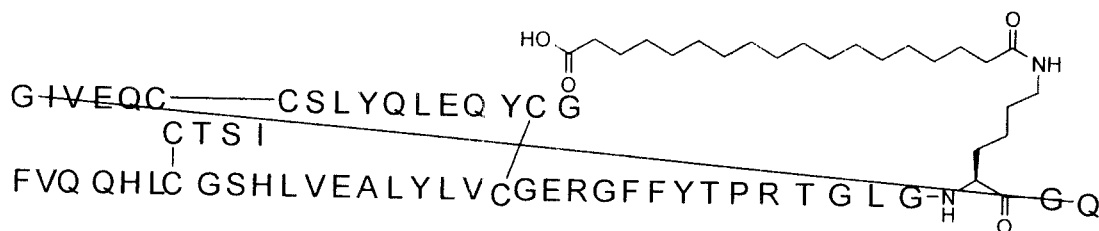
22.0 - 24.0 min: 80% B,

24.0 - 25.0 min: 80% - 5% B,

25.0 - 32.0 min: 5% B.

实施例 3

B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps) 十 八 烷 二 酰
基)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素 (SEQ ID NO: 133) (PAK1820)



B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGKGQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素 (SEQ ID NO: 133) (150 mg, 24 μmol) 溶解于碳酸钠水溶液 (100 mM, 2.8 mL) 中, 加入叔丁基十八烷二酸琥珀酰亚胺酯 (根据实施例 4 中描述的方法制备 (11 mg, 24 μmol) 溶解于乙腈 (2 mL))。在得到的混合物中加入更多的乙腈 (2 mL)。混合物的 pH 是 10-11。产生的混合物在室温下搅拌 1 小时。使用 1N 盐酸调节 pH 至 5.86。通过离心和倾倒分离形成的固体。使用制备型 HPLC 在 Jones Kromasil RP18 5μm, 15x225 mm 柱上进行两轮纯化残留物, 使用 8 mL/min 的流速以及下面的梯度:

0.00 - 5.00 min: 10% CH₃CN,

5.00 - 35.0 min: 10% - 50% CH₃CN,

35.0 - 45.0 min: 50% - 90% CH₃CN.

混合纯化的级分, 冻干产生 48mg 的中间产物 B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps) 叔 丁 基 十 八 烷 二

酰)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素 (SEQ ID NO:133)。

上面的 B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps)叔丁基十八烷二酰)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素(SEQ ID NO:133) (48 mg) 加入到三氟乙酸 (1.8 ml) 中, 混合物在室温下轻轻搅拌 35 分钟。真空浓缩混合物, 并用二氯甲烷反萃 (strip) 两次。使用制备型 HPLC 在 Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleosil 300-7 C4 柱上进行两轮纯化残留物, 使用 8 mL/min 的流速以及下面的梯度:

0.00 - 5.00 min: 10% CH₃CN,
5.00 - 30.0 min: 10% - 50% CH₃CN,
30.0 - 35.0 min: 50% - 90% CH₃CN。
35.0 - 40.0 min: 100% CH₃CN。

这产生了 19mg B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps) 十八烷二酰)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素(SEQ ID NO:133)。

纳流电喷雾 MS: m/z=6626 (计算的: 6626)

HPLC: Rt = 12.62min.

柱: C4, 5 μ , 150x460mm "phenomenex, Jupiter".

流速: 1.5 ml/min

溶剂:

A: 80% 0,0125 M Tris, 0,0187 M (NH₄)₂SO₄ pH = 7, 20% CH₃CN。

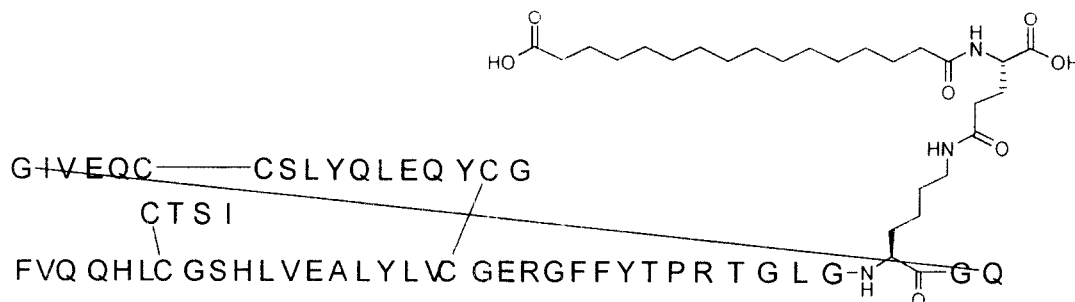
B: 80% CH₃CN, 20% 水。

梯度:

0.00 - 20.00 min: 5% - 55% B,
20.0 - 22.0 min: 55% - 80% B,
22.0 - 24.0 min: 80% B,
24.0 - 25.0 min: 80% - 5% B,
25.0 - 32.0 min: 5% B。

实施例 4

B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps) 十六烷二酰
- γ -L-Glu)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素 (SEQ ID
NO: 133) (PAK1820)



该化合物的制备与实施例 2 中的描述类似，
B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGKGQ-A(1-21)-A18Q-A21G 人胰岛素 (SEQ ID
NO: 133) 用叔丁基十六烷二酰- γ -L-Glu(OSu)-OtBu 酰化，之后是 TFA
介导的 tBu 酯的去保护。

标题化合物的数据：

MALDI-TOF: $m/z = 6727$ (计算: 6727)

HPLC: $R_t = 10.15$ min.

柱: C4, 5 μ , 150x4 60mm "phenomenex, Jupiter".

流速: 1,5 ml/min.

溶剂:

A: 80% 0,0125 M Tris, 0,0187 M $(NH_4)_2SO_4$ pH = 7, 20% CH_3CN .

B: 80% CH_3CN , 20% 水。

梯度:

0.00 - 20.00 min: 5% - 55% B,

20.0 - 22.0 min: 55% - 80% B,

22.0 - 24.0 min: 80% B,

24.0 - 25.0 min: 80% - 5% B,

25.0 - 32.0 min: 5% B.

叔丁基十六烷二酰- γ -L-Glu(OSu)-OtBu 的制备

十六烷二酸 (40.0 g, 140 mmol) 悬于甲苯 (250 ml) 中, 混合物加热回流。N,N-二甲基甲酰胺二叔丁基乙缩醛 (76.3 g, 375 mmol) 在 4 小时内逐滴加入。混合物回流过夜。50℃真空除去溶剂, 粗制材料悬于 DCM/AcOEt (500 ml, 1:1) 中搅拌 15 min。过滤收集固体然后用 DCM (200 ml) 振荡洗涤。滤出液真空蒸发得到粗制的单叔丁基十六烷二酸, 30 克。该物质浮于 DCM (50 ml) 中, 用冰冷却 10 min, 过滤。真空去除溶剂, 得到 25 克的粗制单叔丁基十六烷二酸, 用庚烷 (200 ml) 重结晶得到单叔丁基十六烷二酸 15.9 g (33%)。除重结晶外, 另一种方法可以用硅胶层析纯化单酯, 用 AcOEt/庚烷洗脱。

$^1\text{H-NMR}$ (CDC13) δ : 2.35 (t, 2H), 2.20 (t, 2H), 1.65-1.55 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.34-1.20 (m, 20 H)。

单叔丁基酯 (2 g, 5.8 mmol) 溶解于 THF (20 ml) 中, 用 TSTU (2.1 g, 7.0 mmol) 和 DIEA (1.2 ml, 7.0 mmol) 处理, 搅拌过夜。混合物过滤, 滤出液真空蒸发。残留物溶解于 AcOEt 中用冷的 0.1M 盐酸和水洗涤两次。用 MgSO_4 干燥, 真空蒸发得到叔丁基十六烷二酸琥珀酰亚胺酯, 2.02 g (79%)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDC13) δ : 2.84 (s, 4H), 2.60 (t, 2H), 2.20 (t, 2H), 1.74 (p, 2H), 1.56 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.40 (m, 2H), 1.30-1.20 (m, 18H)。

叔丁基十六烷二酸琥珀酰亚胺酯 (1 g, 2.27 mmol) 溶于 DMF (15 ml) 中用 L-Glu-OtBu (0.51 g, 2.5 mmol) 和 DIEA (0.58 ml, 3.41 mmol) 处理, 混合物搅拌过夜。真空蒸发溶剂, 粗制产物溶解于 AcOEt 中, 用 0.2M 盐酸、水和盐水洗涤两次。用 MgSO_4 干燥, 真空蒸发得到叔丁基十六烷二酰- γ -L-Glu-OtBu, 1.2 g (100%)。

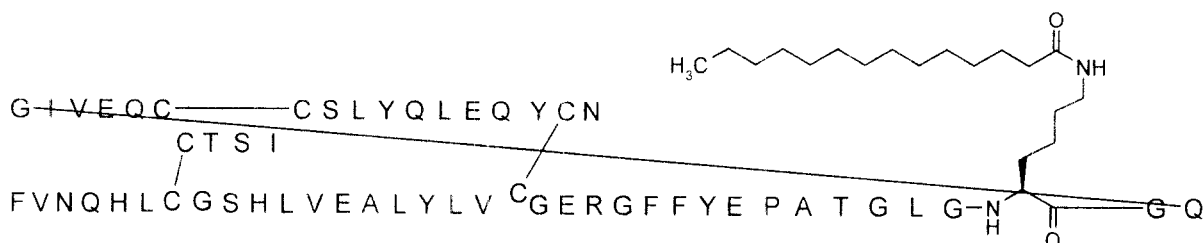
$^1\text{H-NMR}$ (CDC13) δ : 6.25 (d, 1H), 4.53 (m, 1H), 2.42 (m, 2H), 2.21 (m, 4H), 1.92 (m, 1H), 1.58 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.43-1.22 (m, 18H)。

叔丁基十六烷二酰- γ -L-Glu-OtBu (1.2 g, 2.27 mmol) 溶解于 THF (15 ml) 中, 用 TSTU (0.82 g, 2.72 mmol) 和 DIEA (0.47 ml, 2.72 mmol) 处理, 搅拌过夜。混合物过滤, 滤出液真空蒸发。残留物溶解于 AcOEt 中, 用冷的 0.1M 盐酸和水洗涤两次。用 MgSO₄ 干燥, 真空蒸发得到叔丁基十六烷二酰- γ -L-Glu(OSu)-OtBu, 1.30 g (92%)。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 6.17 (d, 1H), 4.60 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.72 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.32 (m, 1H), 2.20 (m, 4H), 2.08 (m, 1H), 1.6 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.33-1.21 (m, 20 H)。

实施例 5

B(1-29)-B27E-B29A-TGLGK((eps) 肉豆蔻酰)GQ-A(1-21)-A18Q 人胰岛素 (SEQ ID NO:134) (PAK1845)



B(1-29)-B27E-B29A-TGLGKQ-A(1-21)-A18Q 人胰岛素 (SEQ ID NO:134) (117 mg, 20 μ mol) 溶解于碳酸钠水溶液 (100 mM, 2.5 mL) 中, 加入含有肉豆蔻酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (9 mg, 可以根据 B. Faroux-Corlay 等人, J. Med. Chem. 2001, 44, 2188-2203 制备) 的乙腈溶液 (1.8 mL)。得到的混合物在室温下搅拌 65 分钟, 用 1N 盐酸调节 pH 至 5.5。离心和倾倒分离形成的固体。残留物在 Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleusil 300-7 C4 柱上用制备型 HPLC 纯化, 流速为 10 mL/min, 使用以下的梯度:

0 - 10 min: 20% CH₃CN + 0.1% TFA,
10 - 80 min: 20% - 90% CH₃CN + 0.1% TFA,

35.0 - 45.0 min: 50% - 90% CH₃CN + 0.1% TFA。

混合纯化的级分，冻干，得到 20mg 标题中的化合物。

MALDI-TOF MS: m/z = 6509. 计算: 6518

HPLC: Rt = 11.64 min. 柱: “Phenomenex, Jupiter”, C4 5 μ , 150x4-60mm, 上样: 20 μ l. 溶剂: A: 80 % 0.0125 M Tris, 0,0187 M (NH₄)₂SO₄ pH = 7, 20% CH₃CN; B: 80 % CH₃CN, 20% 水, 流速 1.5 ml/min, 使用以下梯度:

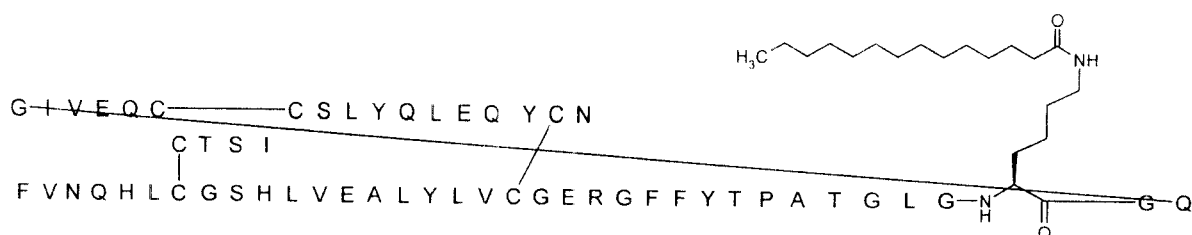
0 - 20 min: 5 - 55% B,
20 - 22 min: 55 - 80% B,
22 - 24 min: 80% B,
24 - 25 min: 80 - 5% B,
25 - 32 min: 5% B.

HPLC: Rt = 12.95 min. 柱: “Phenomenex, Jupiter”, C4 5 μ , 150x4-60mm, 上样: 20 μ l. 溶剂: A: 0.1% TFA, 10%CH₃CN, 89.9 % 水; B: 0.1% TFA, 80 % CH₃CN, 19.9% 水, 流速: 1.5 ml/min, 使用以下的梯度:

0 - 17 min: 20 - 90% B,
17 - 21 min: 90% B,
21 - 23 min: 90 - 20% B,
23 - 30 min: 20% B.

实施例 6

B(1-29)-B29A-TGLGK((eps)肉豆蔻酰)GQ-A(1-21)-A18Q 人胰岛素 (SEQ ID NO: 135) (PAK1837)



B(1-29)-B29A-TGLGKGQ-A(1-21)-A18Q 人胰岛素 (SEQ ID NO:135) (151mg, 24 μ mol) 溶解于碳酸钠水溶液 (100 mM, 5 mL) 中, 加入含有肉豆蔻酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (8 mg, 可以根据 B. Faroux-Corlay 等人, J. Med. Chem. 2001, 44, 2188-2203 制备) 的 N-甲基吡咯烷-2-酮 (2.5mL)。得到的混合物在室温下搅拌 45 分钟, 用 1N 盐酸调节 pH 至 5.6。离心和倾倒分离形成的固体。残留物在 Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleusil 300-7 C4 柱上用制备型 HPLC 纯化, 流速为 8 mL/min, 使用以下的梯度:

0 - 5 min: 10% CH₃CN + 0.1% TFA,
5 - 35 min: 10% - 90% CH₃CN + 0.1% TFA,
35 - 40 min: 90% CH₃CN + 0.1% TFA,
40 - 45 min: 100% CH₃CN.

混合纯化的级分, 冻干, 得到 24mg 标题中的化合物。

MALDI-TOF MS: m/z = 6489。计算值: 6498

HPLC: Rt = 10.97 min。柱: VYDAC Protein, C4 25 cm, cat # 214TP54, 上样: 5 μ l。溶剂: A: 80 % 0.01 M Tris, 0,015 M (NH₄)₂SO₄ pH = 7.3, 20% CH₃CN; B: 80 % CH₃CN, 20% 水, 流速 1.5 ml/min, 使用以下梯度:

0 - 20 min: 10 - 80% B,
20 - 20.1 min: 80 - 90% B,
20.1 - 21 min: 90 - 10% B,
21 - 25 min: 10% B.

HPLC: Rt = 13.09 min。柱: "Phenomenex, Jupiter", C4 5 μ , 150x4-60mm, 上样: 25 μ l。溶剂: A: 0.1% TFA, 10%CH₃CN, 89.9 % 水; B: 0.1% TFA, 80 % CH₃CN, 19.9% 水, 流速: 1.5 ml/min, 使用以下梯度:

0 - 17 min: 20 - 90% B,

- 17 - 21 min: 90% B,
 21 - 23 min: 90 - 20% B,
 23 - 30 min: 20% B.

对人胰岛素受体的亲和性

实施例	用 % 表示的相对于人胰岛素的 IC ₅₀
2	2%
3	0.1%
4	0.7%

药理学方法

检测 (I) 本发明单链胰岛素的胰岛素受体结合

使用 SPA 检测 (Scintillation Proximity Assay) 微量滴定板抗体捕获检测, 测定本发明单链胰岛素对人胰岛素受体的亲和性。SPA-PVT 抗体结合小株、抗小鼠试剂 (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) 与 25ml 结合缓冲液 (100 mM HEPES pH 7.8; 100 mM 氯化钠, 10 mM MgSO₄, 0.025% Tween-20) 混合。对一个 Packard Optiplate (Packard No. 6005190) 的试剂混合物含有 2.4 μ l 1:5000 稀释的纯化的重组人胰岛素受体 - 外显子 11、一定量的储液 A14 Tyr [¹²⁵I]-人胰岛素 (相当于试剂混合物每 100 μ l 5000 cpm)、12 μ l 1:1000 稀释的 F12 抗体、3ml SPA-小珠以及结合缓冲液至总量 12ml。加入总量 100 μ l, 从适当的样品制备系列稀释。然后向稀释系列中加入 100 μ l 试剂混合物, 样品温育 16 小时同时轻轻振荡。离心 1min 分相, 在 Topcounter 中对平板的放射性计数。用 GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) 中的非线性回归算法对结合数据进行拟合。

单克隆 mIR 抗体的制备

通过单克隆技术产生特异的抗体 (F12) : RBF 小鼠皮下注射含有

弗氏完全佐剂 (FCA) 的 50 μg 纯化的 mIR, 之后注射两次含有弗氏不完全佐剂 (FIA) 的 20 μg mIR。产生高应答的小鼠静脉内注射 25 μg 的 mIR 加强免疫, 3 天后收获脾脏。脾细胞与骨髓瘤 Fox 细胞系 (Köhler, G & Milstein C. (1976), *European J. Immunology*, 6: 511-19; Taggart RT 等人 (1983), *Science* 219: 1228-30) 融合。在 mIR 特异的 ELISA 中筛选上清中抗体的产生。克隆阳性孔, 并且用 Western 印迹检测。

检测 (II)

另外一种用 hIRBHK 膜检测对胰岛素结合进行的检测如下:

[^{125}I]-人胰岛素与膜结合的重组人胰岛素受体异构体 A (hIR-A) 的结合

试剂:

^{125}I -胰岛素: Novo Nordisk A/S, 单 ^{125}I -(Tyr A14) 人胰岛素

人胰岛素: Novo Nordisk A/S,

人血清白蛋白: Dade Behring, ORHA 194 C30, lot 455077

塑料制品: Packard OptiPlateTM-96, #6, 005, 290

闪烁体: Amersham Biosciences, WGA 包被的 PVT 微球, # RPNQ0001

细胞: 表达重组人胰岛素受体异构体 A (hIR12-14) 的 BHK tk⁻ ts13 细胞。

膜结合的胰岛素受体的提取: 从 10 层细胞工厂中收获 BHK 细胞, 在 25ml 冰冷的缓冲液 (25 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 250 mg/l 杆菌肽, 0.1 mM Pefablock) 中匀浆。将匀浆物仔细地铺层于 41% 蔗糖 cushion 上, 在超速离心机中 95,000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 75 分钟, 转子是 Beckman SW28 转子。从蔗糖 cushion 上层中收集质膜, 用缓冲液 1:4 稀释, 用 Beckman SW28 转子 40,000g 离心 45min。沉淀用缓冲液 (25 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 250 mg/l

杆菌肽, 0.1 mM Pefablock) 重悬并储存于-80℃。

在 96 孔 OptiPlates 中进行放射性配基与膜结合的胰岛素受体结合, 每个样品做两个平行。膜蛋白在 25℃ 下与 50 pM [¹²⁵I-Tyr^{A14}]-人胰岛素 (于总体积 200ml 检测缓冲液 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, 0.01% Triton X-100, 0.1% HSA, Complete™ 无 EDTA 的蛋白酶抑制剂) 中) 以及浓度增加的人胰岛素或者胰岛素类似物 (通常在 0.01 和 300nM 之间) 温育 150 分钟。通过加入 50 μl WGA-包被的 PVT 微球 (20 mg/ml) 悬液终止检测。轻轻振荡 5 分钟之后, 平板在 1500rpm 离心 6 分钟, 延迟 60 分钟后, 在 Packard TopCount NXT 中计数, 对结合的放射性进行定量。

结果表示为用%表示的 IC₅₀ 与人胰岛素的相对值。

检测 (III)

本发明单链胰岛素衍生物相对于人胰岛素的效力

使用 Wistar 大鼠, 检测静脉内推注 SCI 降低血糖的效力。给服 SCI 或者人胰岛素之后, 监测血糖浓度。

检测 (IV)

在猪中测定本发明单链胰岛素的 T50%。

T50% 是 A14 Tyr [¹²⁵I] 标记的待测胰岛素注射量的 50% 从注射位点消失的时间, 使用外源 γ-计数器测定。

遵守实验室动物管理的规定。在药代动力学和药物动力学研究中使用无特异病原的 LYYD, Danish Landrace, Yorkshire 和 Duroc 的杂种非糖尿病雌性猪 (Holmenlund, Haarloev, Denmark)。猪保持神智清醒, 4-5 个月大, 体重 70-95kg。实验前动物禁食过夜 18h。

根据以前的描述 (Ribøl, U., Jørgensen, K, Brange, J 和 Henriksen, U. The pig as a model for subcutaneous insulin

absorption in man. Serrano-Rios, M 和 Lefèbvre, P. J. 891-896. 1985. Amsterdam; New York; Oxford, Elsevier Science Publishers. 1985 (Conference Proceeding)), 在猪中皮下注射配制好的 ^{125}I 标记 TyrA14 的胰岛素衍生物制剂。

实验开始时 60nmol 剂量的根据本发明的胰岛素衍生物(测试化合物)以及 60nmol 剂量的胰岛素(都用 ^{125}I 标记 TyrA14)注射于每只猪的颈部两个不同的位置。

使用传统的外部 γ 计数方法的修改方法(Ribel, U. Subcutaneous absorption of insulin analogues. Berger, M. 和 Gries, F. A. 70-77 (1993). Stuttgart; New York, Georg Thime Verlag (Conference Proceeding))对皮下注射位置放射性标记的消失进行监测。使用这个修改的方法可以使用无绳的便携装置(Scancys Laboratorieteknik, Værløse, DK-3500, Denmark)连续几天对皮下放射性积存的消失进行连续测定。测定每隔一分钟进行,计数的数值对背景活性进行校正。

IGF-1 受体结合

使用与确定本发明胰岛素衍生物的胰岛素受体结合时使用的方法相似的 SPA 检测(Scintillation Proximity Assay)微量滴定板抗体捕获检测,测量单链胰岛素与 IGF-1 受体的结合,区别在于使用 IGF1 受体而不是胰岛素受体、 ^{125}I -人 IGF-1 而不是 ^{125}I -人胰岛素以及对 IGF-1 受体有特异性的抗体。

<110> Novo Nordisk A/S
Kjeldsen, Thomas

<120> 单链胰岛素

<130> 6807.204-WO

<160> 135

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 1

Gly Gly Gly Pro Gly Lys Arg
1 5

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 2

Arg Arg Gly Pro Gly Gly Gly
1 5

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Gly Lys Arg
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 4

Arg Arg Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 5

Gly Gly Ala Pro Gly Asp Val Lys Arg
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 6

Arg Arg Ala Pro Gly Asp Val Gly Gly
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 7

Gly Gly Tyr Pro Gly Asp Val Lys Arg
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 8

Arg Arg Tyr Pro Gly Asp Val Gly Gly
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 9

Gly Gly His Pro Gly Asp Val Lys Arg
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 10

Arg Arg His Pro Gly Asp Val Gly Gly
1 5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 11

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 12

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 13

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 14

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Thr
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 15

Ala Gly Arg Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 16

Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 17

Val Gly Ser Ser Arg Gly Lys
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 18

Ala Gly Arg Gly Ser Gly Pro
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 19

Thr Gly Leu Gly Lys Gly Gln
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 20

Thr Gly Leu Gly Lys Gly Arg
1 5

<210> 21
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 21

Thr Gly Leu Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 22

Thr Gly Leu Gly Ser Gly Gln
1 5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 23

Thr Gly Leu Gly Arg Gly Lys
1 5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 24

Ala Gly Leu Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 25

Ala Gly Met Gly Ser Gly Pro

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 26

Val Ala Gly Met Gly Ser Gly Pro

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 27

Val Gly Leu Ser Ser Gly Gln

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 28

Val Gly Leu Tyr Ser Gly Lys

1 5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 29

Val Gly Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Lys
1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 30

Val Gly Leu Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 31

Val Gly Arg Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 32

Ala Gly Arg Gly Lys
1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 33

Ala Gly Leu Gly Ser Gly Lys

1 5

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 34

Arg Ser Phe Asp Gly Lys
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 35

Thr Val Gly Ser Ser Arg Gly Lys
1 5

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 36

Thr Gly Ser Ser Arg Gly Lys
1 5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 37

Ala Gly Leu Gly Asp Gly Lys
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 38

Ala Gly Leu Gly Val Gly Lys
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 39

Ala Gly Leu Gly Met Gly Lys
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 40

Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Lys
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 41

Ala Gly Leu Gly Gln Gly Lys
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 42

Ala Gly Leu Gly Gly Lys
1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 43

Ala Gly Leu Gly Arg Gly Lys
1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 44

Ala Gly Leu Gly Ser Gly Gln
1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 45

Ala Gly Met Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 46

Ala Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 47

Trp Ala Ser Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 48

Ala Ser Trp Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 49

Ala Trp Ser Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 50

His Gly Leu Tyr Ser Gly Lys
1 5

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 51

Lys Gly Leu Gly Ser Gly Gln
1 5

<210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 52

Gly Arg Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 53

Val Gly Leu Ser Ser Gly Asp
1 5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 54

Val Gly Leu Ser Ser Gly Gln
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 55

Val Gly Leu Arg Ser Gly Lys
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 56

Val Gly Leu Met Ser Gly Lys
1 5

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 57

Gly Ser Gly Lys
1

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 58

Val Gly Leu Gly Pro Gly Ala Gly Lys
1 5

<210> 59

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 59

Val Gly Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 60

Val Gly Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Lys
1 5 10

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 61

Val Gly Leu Gly Lys Gly Pro Gly Ala Gly Lys
1 5 10

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 62

His Gly Arg Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 63

Lys Gly Leu Ser Ser Gly Gln
1 5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 64

Val Lys Leu Ser Ser Gly Gln
1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 65

Val Gly Met Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 66

Thr Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 67

Thr Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 68

Leu Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 69

Arg Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 70

Gln Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 71

Gly Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 72

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 73

Val Asp Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 74

Val Pro Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 75

Val Glu Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 76

Val Trp Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 77

Val Thr Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 78

Val Ala Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 79

Val Ser Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 80
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 80

Val Arg Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 81

Gln Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 82

Glu Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 83

Ser Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 84

Ieu Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys

1

5

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 85

Pro Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys

1

5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 86

Val Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys

1

5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 87

Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys

1

5

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 88

Val Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 89

Val Gly Ser Ser Ser Ala Lys
1 5

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 90

Val Gly His Ser Arg Gly Lys
1 5

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 91

His Gly Ser Ser Arg Gly Lys
1 5

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 92

Val Gly Ser Ala Ser Gly Lys

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 97

Val Gly Ser Tyr Ser Gly Lys
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 98

Val Gly Ser Met Ser Gly Lys
1 5

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 99

Val Gly Pro Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 100

Val Gly Thr Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 101
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 101

Val Gly Gln Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 102

Val Gly Tyr Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 103

Val Gly Lys Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 104

Val Gly Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 105

Val Gly Arg Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 106

Val Gly Met Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 107

Val Gly Val Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 108

Val Gly His Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 109

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 109

Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 110

Gln Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 111

Thr Arg Ser Ser Ser Gly Arg
1 5

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<220>
<221> 氨基酸可变的
<222> (3)..(3)
<223> X可以是任何可编码的氨基酸残基

<220>
<221> misc_特征
<222> (3)..(5)
<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<220>
<221> 氨基酸可变的
<222> (4)..(4)
<223> X可以是任何可编码的氨基酸残基

<220>
<221> 氨基酸可变的

<222> (5)..(5)
<223> X可以是任何可编码的氨基酸残基

<400> 112

Thr Arg Xaa Xaa Xaa Gly Arg
1 5

<210> 113
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 113

Leu Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 114
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 114

Arg Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 115
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 115

Gln Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 116
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 116

Gly Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 117

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 117

Ser Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 118

Val Gly Ser Ser Asn Gly Lys
1 5

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 119

Val Gly Ser Ser Ala Gly Lys
1 5

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工的

<400> 120

Arg Gly Ser Ser Ser Gly Lys

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<220>
<221> MISC_特征
<222> (5)..(5)
<223> X 可以是 S, R, A, T, K, P, N, M, H, Q, V, G
<400> 124

Val Gly Ser Ser Xaa Gly Lys
1 5

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<220>
<221> MISC_特征
<222> (4)..(4)
<223> R, A, Y, M, S, N, H, G

<400> 125

Val Gly Ser Xaa Ser Gly Lys
1 5

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<220>
<221> MISC_特征
<222> (3)..(3)
<223> X 可以是 L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G, P
<400> 126

Val Gly Xaa Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 127

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工的

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (2)..(2)
 <223> X 可以是 W, G, S, A, H, R, T, P
 <400> 127

Val Xaa Ser Ser Ser Gly Lys
 1 5

<210> 128
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工的

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (1)..(1)
 <223> X 可以是 L, R, T, A, H, V, Q, G, S
 <400> 128

Xaa Gly Ser Ser Ser Gly Lys
 1 5

<210> 129
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工的

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (1)..(1)
 <223> X 可以是 L, R, T, A, H, Q, G, S, V.

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (2)..(2)
 <223> X 可以是 W, G, S, A, H, R, 和 T
 <220>

<221> MISC_特征
 <222> (3)..(3)
 <223> X 可以是 L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G 和 P

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (4)..(4)
 <223> X 可以是 R, A, Y, M, S, N, H, 和 G

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (5)..(5)
 <223> X 可以是 S, R, A, T, K P, N M, H, Q, V, 和 G

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (6)..(6)
 <223> X 可以是 G 和 A

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (7)..(7)
 <223> X 可以是 K, R, P, H, F, T, I, Q, W, 和 A
 <400> 129

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 130
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工的

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (3)..(3)

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<220>
 <221> MISC_特征

```

<222> (5)..(5)
<220>
<221> misc_特征
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<220>
<221> MISC_特征
<222> (7)..(7)
<220>
<221> misc_特征
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸
<400> 130

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa
1           5

<210> 131
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 131

Gly Ser Gly Lys
1

<210> 132
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 132

Ser Ser Ser Gly Lys
1           5

<210> 133
<211> 57
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工的

<400> 133

```


Gly Lys Gly Gln Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser
35 40 45

Leu Tyr Gln Leu Glu Gln Tyr Cys Asn
50 55

图 1

正常Wistar大鼠中的血糖
HI: 6 nmol/kg IV
SCI: nmol/kg IV

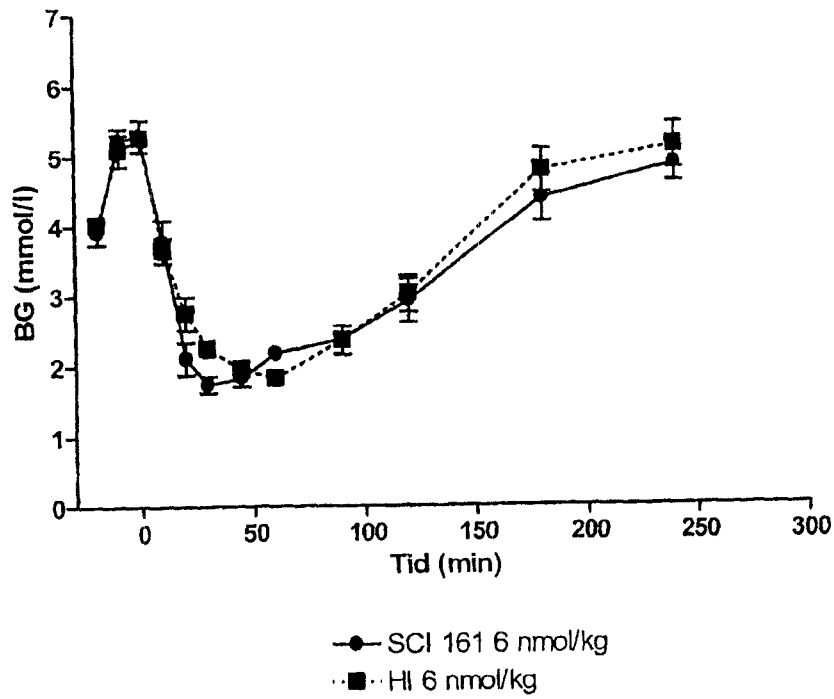
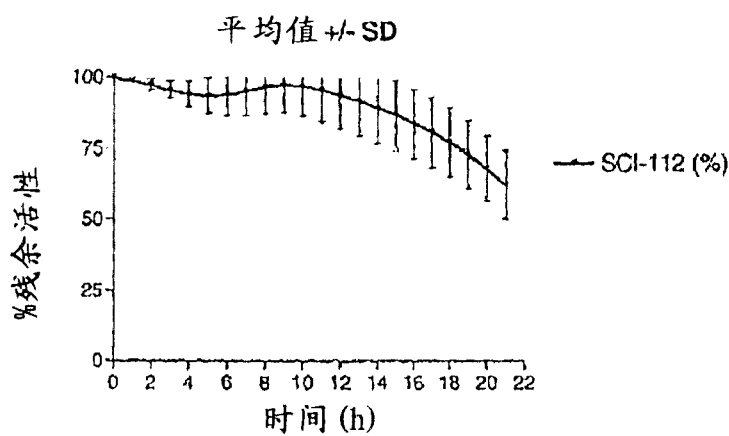


图 2

S. C给药后猪AnP中SCI-112的消失



N= 6只猪

NNC 0100-0000	浓度	Zn/ha x	等渗	Phe/Cr e	白蛋白	磷酸盐	Inj.vo l
SCI-112	600 μm	7	甘油1.6%	16 mM	0	0 pH 5.0	100 μm

图 3

S. C. 给药后猪中SCI的消失
平均值 \pm SEM

