



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101389650 B

(45) 授权公告日 2012.10.10

(21) 申请号 200680053516.6

A61K 38/28(2006.01)

(22) 申请日 2006.12.21

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

05113021.9 2005.12.28 EP

CN 1284876 , 2001.02.21,

US 20040006000 , 2004.01.08,

US 20040006000 , 2004.01.08,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.08.27

WO 2005012347 , 2005.02.10,

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2006/070104 2006.12.21

审查员 唐慧

(87) PCT申请的公布数据

W02007/074133 EN 2007.07.05

(73) 专利权人 诺沃-诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 S·哈夫伦德 F·休巴莱克

H·B·奥尔森 I·乔纳森

T·霍格-詹森 A·普卢姆

U·里贝尔-马德森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 刘冬 李炳爱

(51) Int. Cl.

C07K 14/62(2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 66 页 附图 7 页

(54) 发明名称

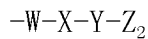
包含酰化胰岛素和锌的组合物以及制备所述组合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及具有高锌原子含量/6分子酰化胰岛素的胰岛素组合物。本发明胰岛素是酰化胰岛素,可与速效胰岛素 Asp B28 人胰岛素等其它胰岛素类似物相混合。

1. 可溶性药物组合物,其包含酰化胰岛素,并且还包含多于 4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,

其中所述酰化胰岛素包含胰岛素分子及其任何  $Zn^{2+}$  复合物,所述胰岛素分子及其任何  $Zn^{2+}$  复合物具有连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的侧链,所述侧链具有下列通式:



其中 W 为:

•在侧链上具有羧酸基团的  $\alpha$ -氨基酸残基,该残基用其一个羧酸基团与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基一起形成酰胺基团;

•由 2、3 或 4 个  $\alpha$ -氨基酸残基通过酰胺羰基键连接在一起所组成的链,该链通过酰胺键连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上, W 的氨基酸残基选自具有中性侧链的氨基酸残基和在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基,使得 W 具有至少一个在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基;或者

•自 X 至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的共价键;

X 为:

- $-\underline{C}O-$ ;
- $-\underline{C}H(COOH)\underline{C}O-$ ;
- $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)\underline{C}H_2\underline{C}O-$ ;
- $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)\underline{C}H_2CON(CH_2COOH)\underline{C}H_2\underline{C}O-$ ;
- $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)\underline{C}H_2CH_2\underline{C}O-$ ;
- $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)\underline{C}H_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)\underline{C}H_2CH_2\underline{C}O-$ ;
- $-\underline{C}O-NHCH(COOH)(CH_2)_4NH\underline{C}O-$ ;
- $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)\underline{C}H_2\underline{C}O-$ ;或者
- $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)\underline{C}H_2CH_2\underline{C}O-$ ,

其中

a) 如果 W 是氨基酸残基或氨基酸残基链,则通过下划线碳上的键与 W 上的氨基形成酰胺键,或者

b) 如果 W 是共价键,则通过下划线羰基碳上的键与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键;

Y 为:

- $-(CH_2)_m-$ ,其中 m 是 6-32 范围内的整数;
- 包含 1、2 或 3 个  $-CH=CH-$  基团和多个  $-CH_2-$  基团的二价烃基链,所述  $-CH_2-$  基团足以在链中提供范围为 10-32 个的碳原子总数;和

$Z_2$  为:

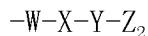
- $-COOH$ ;
- $-CO-Asp$ ;
- $-CO-Glu$ ;
- $-CO-Gly$ ;
- $-CO-Sar$ ;

- $-\text{CH}(\text{COOH})_2$  ;
- $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ;
- $-\text{SO}_3\text{H}$  ;或者
- $-\text{PO}_3\text{H}$ ,

前提条件是如果 W 是共价键且 X 为  $-\text{CO}-$ , 则 Z 不是  $-\text{COOH}$ 。

2. 权利要求 1 的药物组合物, 其包含多达 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
3. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 其包含 4.3 个至 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
4. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 其包含 4.5 个至 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
5. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 其中至少 85% 的酰化胰岛素以复合物存在, 所述复合物是酰化胰岛素十二聚体或者是分子量大于酰化胰岛素十二聚体的复合物。
6. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 其中所述组合物包含表面活性剂。
7. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 其中所述母体胰岛素是脱 B30 人胰岛素类似物。
8. 权利要求 1 或 2 的药物组合物, 其还包含速效胰岛素。
9. 权利要求 8 的药物组合物, 其中至少 85% 的速效胰岛素以速效胰岛素六聚体或者分子量小于速效胰岛素六聚体的复合物存在。
10. 权利要求 8 的药物组合物, 其中所述速效胰岛素是 AspB28 人胰岛素、LysB3GluB29 人胰岛素和 / 或 LysB28ProB29 人胰岛素。

11. 一种生产包含酰化胰岛素的药物组合物的方法, 其中将每 6 分子酰化胰岛素多于 4 个锌原子加到组合物中, 其中所述酰化胰岛素及其任何  $\text{Zn}^{2+}$  复合物具有连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的侧链, 所述侧链具有下列通式;



其中 W 为:

• 在侧链上具有含羧酸基团的  $\alpha$ -氨基酸残基, 该残基用其一个羧酸基团与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基一起形成酰胺基团;

• 由 2、3 或 4 个  $\alpha$ -氨基酸残基通过酰胺羰基键连接在一起所组成的链, 该链通过酰胺键连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上, W 的氨基酸残基选自具有中性侧链的氨基酸残基和在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基, 使得 W 具有至少一个在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基; 或者

• 自 X 至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的共价键;

X 为:

- $-\text{CO}-$  ;
- $-\text{CH}(\text{COOH})\text{CO}-$  ;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}-$  ;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}-$  ;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$  ;
- $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NHCO}-$  ;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}-$  ; 或者
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ ,

其中

a) 如果 W 是氨基酸残基或氨基酸残基链, 则通过下划线碳上的键与 W 上的氨基形成酰胺键, 或者

b) 如果 W 是共价键, 则通过下划线羰基碳上的键与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键;

Y 为:

- $-(\text{CH}_2)_m-$ , 其中 m 是 6-32 范围内的整数;
- 包含 1、2 或 3 个  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基团和多个  $-\text{CH}_2-$  基团的二价烃基链, 所述  $-\text{CH}_2-$  基团足以在链中提供范围为 10-32 个的碳原子总数; 和

$Z_2$  为:

- $-\text{COOH}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Glu}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Gly}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Sar}$ ;
- $-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ;
- $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;
- $-\text{SO}_3\text{H}$ ; 或者
- $-\text{PO}_3\text{H}$ ,

前提条件是如果 W 是共价键且 X 为  $-\text{CO}-$ , 则 Z 不是  $-\text{COOH}$ 。

12. 权利要求 11 的方法, 其中将每 6 分子酰化胰岛素多达 12 个锌原子加到组合物中。

13. 权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中将每 6 分子酰化胰岛素 4.3 个至 12 个锌原子加到组合物中。

14. 权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中在加入防腐剂之前将锌加到组合物中。

15. 权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中在加入防腐剂之后将锌加到组合物中。

16. 权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中部分锌是在加入防腐剂之前加入的, 部分锌是在加入防腐剂之后加入的。

17. 权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中所述防腐剂是苯酚和 / 或间甲酚。

18. 权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中表面活性剂与药物组合物相混合。

19. 权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中所述母体胰岛素是脱 B30 人胰岛素类似物。

20. 权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中速效胰岛素与所述组合物相混合。

21. 权利要求 20 的方法, 其中速效胰岛素是 AspB28 人胰岛素、LysB3GluB29 人胰岛素和 / 或 LysB28ProB29 人胰岛素。

22. 权利要求 1-10 中任一项的组合物在制备用于治疗糖尿病的药物中的用途。

23. 一种治疗需要这种治疗的患者的糖尿病的药物组合物, 所述药物组合物包含治疗有效量的权利要求 1-10 中任一项的药物组合物以及药学上可接受的载体。

24. 权利要求 1-10 中任一项的组合物在制备用于治疗需要这种治疗的患者的糖尿病的药物中的用途, 包括给予患者治疗有效量的权利要求 1-10 中任一项的药物组合物以及药学上可接受的载体。

25. 用于糖尿病肺部治疗的权利要求 24 的用途。

26. 权利要求 1-10 中任一项的药物组合物在制备用于治疗以下疾病的药物组合物中的用途：I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症。

## 包含酰化胰岛素和锌的组合物以及制备所述组合物的方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及具有长效特性和高锌含量的酰化胰岛素的药物组合物。本发明还涉及用于具有长效特性和高锌含量的组合物的制备方法以及用于治疗糖尿病的组合物制备方法。

[0002] 发明背景

[0003] 目前,糖尿病(I型糖尿病和II型糖尿病)的治疗越来越依赖于所谓的强化胰岛素治疗。根据该方案,患者每日多次用胰岛素注射治疗,包括每日一次或每日两次注射长效胰岛素以满足基础胰岛素需求,另补充推注速效胰岛素以满足餐时相关的胰岛素需求。

[0004] 长效胰岛素组合物是本领域众所周知的。因此,长效胰岛素组合物的一种主要类型包含胰岛素结晶或无定形胰岛素的注射用水性混悬剂。在这些组合物中,通常所使用的胰岛素化合物是鱼精蛋白胰岛素、锌胰岛素或鱼精蛋白锌胰岛素。

[0005] 使用胰岛素混悬剂存在某些缺点。例如,为了确保精确的剂量,从小瓶抽取或者从针筒推出规定体积的混悬剂前,必须轻轻摇动使胰岛素颗粒均匀地悬浮。同样,为了保存胰岛素混悬剂,为了避免形成块状或凝结物,必须将温度保持在比胰岛素溶液温度极限还窄的范围内。

[0006] 虽然较早前认为鱼精蛋白是非免疫原性的,但是现在的结果是鱼精蛋白胰岛素结晶在人体内可能具有免疫原性,用于医用目的时可导致抗体形成。同样,已经发现鱼精蛋白结晶本身具有免疫原性的证据。因此,一些患者必须避免使用含有鱼精蛋白的长效胰岛素组合物。

[0007] 另一种类型的长效胰岛素组合物是pH值低于生理pH值的溶液剂,因为在注射溶液剂时pH值升高,所以组合物中的胰岛素将会沉淀。这些溶液剂的缺点是注射时在组织中所形成的沉淀物的粒径分布,因此药物的释放特征取决于注射部位的血流量和不太可预知的其它参数。另一个缺点是胰岛素的固体颗粒可能起着局部刺激物的作用,引起注射部位组织发炎。

[0008] 胰岛素是胰腺中的胰岛所产生的51个氨基酸肽激素。它最初的功能是通过与跨膜受体结合并激活跨膜受体而促进葡萄糖分子跨脂肪组织和肌肉组织的细胞膜转运,作为单体发挥作用。

[0009] 胰岛素的一个独特性质是其缔合成为六聚体的能力,在生物合成和贮存期间,这样的形式保护了激素不受化学降解和物理降解。胰岛素的X射线晶体学研究显示,六聚体由3个二聚体组成,二聚体通过3折轴的旋转相连接。这些二聚体通过位于3折轴中心上2个锌离子的相互作用紧密缔合在一起。

[0010] 如果将人胰岛素以高浓度自我缔合药物制剂的形式注射到皮下组织,则相对较慢地解离为单体。胰岛素的六聚体和二聚体要比单体渗透到毛细血管壁慢一些。

[0011] 锌和酚添加剂常用于治疗用胰岛素制品中以促进六聚体形成,防止保存期间的降解。然而在这种形式下,在六聚体通过皮下组织扩散并且解离成二聚体和单体时,所注射的胰岛素的作用延迟。

[0012] 通常在酸性条件下将胰岛素溶于少量水中来制备胰岛素制剂。然后将锌添加到制剂中后,中和并加入防腐剂如苯酚和间甲酚。已给出的这些胰岛素的药物制剂为每六聚体胰岛素约 2、3 或 4 个锌原子。

[0013] WO 2005/012347 公开了另一类酰化胰岛素衍生物,所述酰化胰岛素衍生物与 WO 95/07931 所公开的酰化胰岛素相比,包含额外的负电荷。所给出的这些酰化胰岛素的药物制剂为每六聚体胰岛素 2、3 或 4 个锌原子。

[0014] WO 2003/094956 公开了将单体胰岛素和可溶性酰化胰岛素类似物相混合而制备的稳定的胰岛素制剂。该制剂中每六聚体胰岛素含有约 2.3 个至约 4.5 个  $Zn^{2+}$ 。该发明的酰化胰岛素类似物是地特胰岛素。

[0015] 由 WO 2003/094951 得知如何配制稳定的既是速效又是长效的可溶性胰岛素制剂。该制剂中每六聚体胰岛素的锌含量范围约 2.3 个至约 4.5 个  $Zn^{2+}$ 。该发明的酰化胰岛素类似物是地特胰岛素。

[0016] WO 99/21888 涉及人胰岛素衍生物的聚集体,其每 6 分子胰岛素衍生物含有多达 5 个锌原子。

[0017] 人胰岛素具有三个主要氨基:A 链和 B 链的 N 端氨基和 Lys<sup>B29</sup> 的  $\epsilon$ -氨基。这些基团的一个或多个被取代的几种胰岛素衍生物为现有技术所知。因此,美国专利第 3,528,960 号 (Eli Lilly) 涉及 N-羧基芳酰基胰岛素,其中胰岛素分子的 1、2 或 3 个主要氨基具有羧基芳酰基。

[0018] EP 894095 公开了其中 B 链的 N 端基团和 / 或 B28、B29 或 B30 位 Lys 的  $\epsilon$ -氨基具有式  $-CO-W-COOH$  取代基的胰岛素衍生物,其中 W 可为长链烃基。这些胰岛素衍生物具有长效特性,并且在生理 pH 值下是可溶解的。

[0019] WO 95/07931 公开了长效性胰岛素衍生物,其中亲脂侧链连接至 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基上,或者连接至母体胰岛素 B 链上存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上。

[0020] Havelund 等人对地特胰岛素吸收减缓的机制进行了研究 (The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting acylated analog of human insulin (一种人胰岛素的长效酰化类似物地特胰岛素的延效机制), *Pharmaceutical Research*, 21 (2004) 1498-1504)。该胰岛素制剂通过每六聚体胰岛素加入 2 个锌原子后,再加入甘油、苯酚、间甲酚和磷酸钠来制备。

[0021] Whittingham 等人制备出酰化胰岛素类似物制剂 (Whittingham 等, *Crystallographic and solution studies of N-Lithocholyl insulin: a new generation of prolonged-acting human insulin (N-石胆酰胰岛素的结晶和溶液研究:新一代的长效人胰岛素)*, *Biochemistry* 2004, 43, 5987-5995)。该胰岛素制剂通过每六聚体胰岛素加入 2-2.5 个锌原子后,再加入甘油和苯酚来制备。该胰岛素的结构用大小排阻色谱法测定。

[0022] 本发明涉及某些酰化胰岛素的药物组合物,解决了现有技术中的问题。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明涉及包含酰化胰岛素的可溶性药物组合物,该酰化胰岛素中每 6 分子酰化胰岛素包含多于 4 个锌原子。

[0025] 每 6 分子酰化胰岛素的锌含量可多达约 12 个锌原子。锌含量的上限是可以引起胰岛素沉淀并且使溶液转化成混悬液的锌含量。

[0026] 在本发明的一个方面,药物组合物包含约 4.3 个至约 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,或者药物组合物包含约 4.5 个至约 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。在本发明的另一个方面,药物组合物包含约 5 个至约 11.4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,或者药物组合物包含约 5.5 个至约 10 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。另一方面,药物组合物包含约 6 个至约 10.5 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,或者药物组合物包含约 6.5 个至约 10 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,或者药物组合物包含约 7 个至约 9 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。另一方面,药物组合物包含锌浓度约  $\frac{1}{3}$  倍至约 3 倍的柠檬酸盐。

[0027] 本发明的胰岛素分子彼此缔合形成包含锌的复合物。这些胰岛素-锌复合物可以六聚体、十二聚体或分子量大于十二聚体的复合物存在于药物制剂中。所有胰岛素都与锌形成复合物,例如人胰岛素、酰化胰岛素(胰岛素衍生物)和胰岛素类似物。

[0028] 在本发明的一个方面,至少 85% 的酰化胰岛素以复合物存在,该复合物是酰化胰岛素十二聚体或者是分子量大于酰化胰岛素十二聚体的复合物。

[0029] 在本发明的一个方面,至少 90%、92%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 的酰化胰岛素以复合物存在,该复合物是酰化胰岛素十二聚体或者是分子量大于酰化胰岛素十二聚体的复合物。

[0030] 在本发明的一个方面,药物组合物包含表面活性剂。表面活性剂存在的量可占药物组合物重量的 0.0005-0.01%。一方面,表面活性剂存在的量可占组合物重量的 0.0005-0.007%。表面活性剂的实例可为聚山梨酯 20 (polysorbate 20),在组合物中存在的量占组合物重量的 0.001-0.003%。另一个实例是泊洛沙姆 188,其含量占组合物重量的 0.002-0.006%。

[0031] 胰岛素分子可在胰岛素分子的不同位置上被酰化。一方面,胰岛素在母体胰岛素分子 B 链 Lys 残基位置的  $\epsilon$ -氨基上被酰化,特别是在人胰岛素分子 B29 赖氨酸基团的  $\epsilon$ -氨基上被酰化。然而,根据本发明的其它方面,酰化可发生在胰岛素分子的其它位置上,例如 B1 位的  $\alpha$ -氨基上或者在胰岛素分子中天然氨基酸残基被赖氨酸残基取代的位置上,前提条件是 B29 的赖氨酸被转化为另一种氨基酸残基。

[0032] 因此,一方面,酰化胰岛素在 B1 位的  $\alpha$ -氨基上被酰化,或者在胰岛素分子 A 链或 B 链的赖氨酸残基的游离  $\epsilon$ -氨基上被酰化。

[0033] 一方面,胰岛素在胰岛素分子 B29 位赖氨酸残基的游离  $\epsilon$ -氨基上被酰化。

[0034] 酰基可以是亲脂基团,通常为具有约 6 个至约 32 个碳原子的脂肪酸部分,包含至少一个游离羧酸基团或者在中性 pH 时带有负电荷的基团。脂肪酸部分更常常具有 6-24、8-20、12-20、12-16、10-16、10-20、14-18 或 14-16 个碳原子。

[0035] 一方面,药物组合物包含至少一个游离羧酸基团或者在中性 pH 时带有负电荷的基团。一方面,药物组合物包含从具有 4-32 个碳原子的二羧基脂肪酸衍生的酰基。

[0036] 另一方面,脂肪酸部分是从具有约 6 至约 32、6-24、8-20、12-20、12-16、10-16、10-20、14-18 或 14-16 个碳原子的二羧基脂肪酸衍生的。

[0037] 一方面,药物组合物包含通过连接基由酰胺键连接至胰岛素的酰基。

[0038] 酰基可以直接连接到所述游离氨基上。然而,酰基还可通过酰胺键由连接胰岛素分子的游离氨基和所述酰基的连接基连接。

[0039] 酰化胰岛素与人胰岛素相比常常具有至少一个或两个额外的净的负电荷,更常常



具有两个额外的负电荷。额外的负电荷可通过脂肪酸的游离羧酸基团或连接基提供,该连接基可包含一个或多个氨基酸残基,其中至少一个含有游离羧酸基团或者在中性 pH 时带有负电荷的基团。另一方面,酰基是从二羧基脂肪酸衍生的。

[0040] 一方面,药物组合物包含胰岛素,其中胰岛素具有侧链和可能的一个或多个连接基,所述侧链通过酰胺键连接至 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基上,或者连接至母体胰岛素部分 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上,所述侧链包含至少一个游离羧酸基团或者在中性 pH 时带有负电荷的基团,这是一种碳链中具有约 4 个至约 32 个碳原子的脂肪酸部分;所述连接基通过酰胺键将侧链各个组分连接在一起。

[0041] 一方面,胰岛素分子及其任何  $Zn^{2+}$  复合物具有连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的侧链,该侧链具有下列通式:

[0042]  $-W-X-Y-Z_2$

[0043] 其中 W 为:

[0044] ● 在侧链上具有羧酸基团的  $\alpha$ -氨基酸残基,该残基用其一个羧酸基团与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基一起形成酰胺基团;

[0045] ● 由 2、3 或 4 个  $\alpha$ -氨基酸残基通过酰胺羰基键连接在一起所组成的链,该链通过酰胺键连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上,W 的氨基酸残基选自具有中性侧链的氨基酸残基和在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基,使得 W 具有至少一个在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基;或者

[0046] ● 自 X 至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的共价键;

[0047] X 为:

[0048] ●  $-\underline{C}O-$ ;

[0049] ●  $-\underline{C}H(COOH)\underline{C}O-$ ;

[0050] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)CH_2\underline{C}O-$ ;

[0051] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)CH_2CON(CH_2COOH)CH_2\underline{C}O-$ ;

[0052] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{C}O-$ ;

[0053] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{C}O-$ ;

[0054] ●  $-\underline{C}O-NHCH(COOH)(CH_2)_4NH\underline{C}O-$ ;

[0055] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)CH_2\underline{C}O-$ ;或者

[0056] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{C}O-$ ,

[0057] 其中

[0058] a) 如果 W 是氨基酸残基或氨基酸残基链,则通过下划线碳上的键与 W 上的氨基形成酰胺键,或者

[0059] b) 如果 W 是共价键,则通过下划线羰基碳上的键与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键;

[0060] Y 是:

[0061] ●  $-(CH_2)_m-$ ,其中 m 是 6-32 范围内的整数;

[0062] ● 包含 1、2 或 3 个  $-CH=CH-$  基团和多个  $-CH_2-$  基团的二价烃基链,所述  $-CH_2-$  基团足以为链中提供范围为 10-32 个的碳原子总数;和

[0063] ●  $Z_2$  为:

- [0064] ● -COOH ;
- [0065] ● -CO-Asp ;
- [0066] ● -CO-Glu ;
- [0067] ● -CO-Gly ;
- [0068] ● -CO-Sar ;
- [0069] ● -CH(COOH)<sub>2</sub> ;
- [0070] ● -N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub> ;
- [0071] ● -SO<sub>3</sub>H ;或者
- [0072] ● -PO<sub>3</sub>H,
- [0073] 前提条件是如果 W 是共价键且 X 是 -CO-, 则 Z 不是 -COOH。
- [0074] 一方面, B30 氨基酸残基缺失, 酰化胰岛素是脱 B30 胰岛素 (desB30insulin)。
- [0075] 一方面, W 是具有 4-10 个碳原子的 α-氨基酸残基, 另一方面, W 选自 α-Asp、β-Asp、α-Glu、γ-Glu、α-hGlu 和 δ-hGlu。
- [0076] 一方面, X 是 -CO-。
- [0077] 一方面, Z<sub>2</sub> 是 -COOH。
- [0078] 侧链 -W-X-Y-Z<sub>2</sub> 的亚结构 Y 可为式 -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- 基团, 其中 m 是 6-32、8-20、12-20 或 12-16 范围内的整数。
- [0079] 一方面, Y 是包含 1、2 或 3 个 -CH = CH- 基团和多个 -CH<sub>2</sub>- 基团的二价烃基链, 所述 -CH<sub>2</sub>- 基团足以为链中提供范围为 6-32、10-32、12-20 或 12-16 个碳原子总数。
- [0080] 一方面, Y 为式 -(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>- 的二价烃基链, 其中 v 和 w 是整数, 或者其中之一为 0 致使 v 与 w 之和的范围为 6-30、10-20 或 12-16。
- [0081] 另一方面, W 选自 α-Asp、β-Asp、α-Glu 和 γ-Glu ; X 为 -CO- 或 -CH(COOH)CO ; Y 为 -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, 其中 m 是 12-18 范围内的整数, Z<sub>2</sub> 为 -COOH 或 -CH(COOH)<sub>2</sub>。
- [0082] 酰化胰岛素化合物的非限制性实例为
- [0083] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0084] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0085] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0086] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0087] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0088] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-γ-Glu-N-(γ-Glu)) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0089] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0090] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0091] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0092] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0093] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-α-Glu-N-(β-Asp)) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0094] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Gly-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0095] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Sar-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0096] N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-γ-Glu) 脱 B30 人胰岛素 ;
- [0097] (N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-β-Asp) 脱 B30 人胰岛素 ;

[0098]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\alpha\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；

[0099]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-D-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；

[0100]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素

[0101]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；

[0102]  $N^{\epsilon B29}-(\text{N-HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；

[0103]  $N^{\epsilon B29}-(\text{N-HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-IDA})$  脱 B30 人胰岛素；

[0104]  $N^{\epsilon B29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{Gly}]$  脱 B30 人胰岛素；

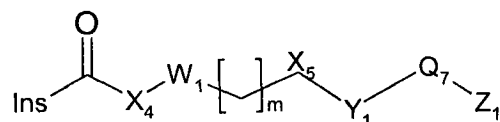
[0105]  $N^{\epsilon B29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{Gly}]$  脱 B30 人胰岛素；和

[0106]  $N^{\epsilon B29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧甲基})-\beta\text{-Ala}]$  脱 B30 人胰岛素。

[0107] 一方面，侧链可包含至少一个芳基或至少一个双官能 PEG 基团。下文中，聚乙二醇使用缩写词“PEG”。

[0108] 在本发明的一个方面，用于药物组合物的酰化胰岛素及其任何  $\text{Zn}^{2+}$  复合物具有下列结构式：

[0109]



[0110] 其中 Ins 为母体胰岛素部分，通过 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基或胰岛素部分 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基通过酰胺键与侧链上的 CO- 基团结合；

[0111]  $X_4$  为：

[0112] ●  $-(\text{CH}_2)_n$ ，其中 n 为 1、2、3、4、5 或 6；

[0113] ● NR，其中 R 为氢或  $-(\text{CH}_2)_p\text{-COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-SO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-PO}_3\text{H}_2$ 、被 1 或 2 个  $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-COOH}$  基团取代的亚芳基、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-四唑基}$ ，其中 p 是 1-6 范围内的整数；

[0114] ●  $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_q\text{-NR-CO-}$ ，其中  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  彼此独立并且独立于 q 的各个取值，可为 H、 $-\text{COOH}$  或 OH，q 为 1-6，R 如上定义；

[0115] ●  $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}\text{-NR-CO)}_{2-4}$ ，其中  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  彼此独立并且独立于  $q_1$  的各个取值，可为 H、 $-\text{COOH}$  或 OH， $q_1$  为 1-6，R 如上定义；

[0116] 或者

[0117] ● 化学键

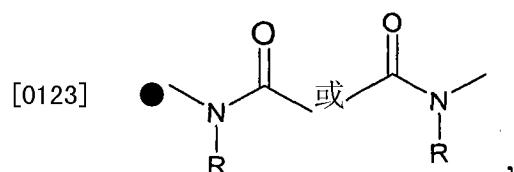
[0118]  $W_1$  为亚芳基或亚杂芳基，可被一个或两个选自以下的基团取代：

[0119]  $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$  和四唑基，或者  $W_1$  为化学键；

[0120] m 为 0、1、2、3、4、5 或 6；

[0121]  $X_5$  为：

[0122] ●  $-\text{O}-$ ；



[0124] 其中 R 如上定义；或者

[0125] ●化学键；

[0126]  $Y_1$  为：

[0127] ●  $-(CR_1R_2)_q-NR-CO-$ ，其中  $R_1$  和  $R_2$  彼此独立并且独立于  $q$  的各个取值，可为 H、 $-COOH$ 、化学键或 OH， $q$  为 1-6；R 如上定义；

[0128] ● NR，其中 R 如上定义；

[0129] ●  $-((CR_3R_4)_{q_1}-NR-CO)_{2-4}-$ ，其中  $R_3$  和  $R_4$  彼此独立并且独立于  $q_1$  的各个取值，可为 H、 $-COOH$  或 OH， $q_1$  为 1-6，R 如上定义；

[0130] 或者

[0131] ●化学键；

[0132]  $Q_7$  为：

[0133] ●  $-(CH_2)_r-$ ，其中  $r$  为 4-22 的整数；

[0134] ●包含 1、2 或 3 个  $-CH=CH-$  基团和多个  $-CH_2-$  基团的二价烃基链，所述  $-CH_2-$  基团足以为链中提供范围为 4-22 个的碳原子总数；

[0135] 或者

[0136] ●下式的二价烃基链：

[0137]  $-(CH_2)_s-Q_8-(C_6H_4)_{v_1}-Q_9-(CH_2)_w-Q_{10}-(C_6H_4)_{v_2}-Q_{11}-(CH_2)_t-Q_{12}-(C_6H_4)_{v_3}-Q_{13}-(CH_2)_z-$ ，其中  $Q_8-Q_{13}$  可彼此独立地为 0、S 或化学键；其中  $s$ 、 $w$ 、 $t$  和  $z$  彼此独立地为 0，或者为 1-10 的整数致使  $s$ 、 $w$ 、 $t$  与  $z$  之和的范围为 4-22， $v_1$ 、 $v_2$  和  $v_3$  可彼此独立地为 0 或 1，前提条件是如果  $W_1$  为化学键，则  $Q_7$  不是式  $-(CH_2)_{v_4}C_6H_4(CH_2)_{w_1}-$  的二价烃基链，其中  $v_4$  和  $w_1$  为整数，

[0138] 或者其中之一为 0 致使  $v_4$  与  $w_1$  之和的范围为 6-22；和

[0139]  $Z_1$  为：

[0140]  $-COOH$ ；

[0141]  $-CO-Asp$ ；

[0142]  $-CO-Glu$ ；

[0143]  $-CO-Gly$ ；

[0144]  $-CO-Sar$ ；

[0145]  $-CH(COOH)_2$ ；

[0146]  $-N(CH_2COOH)_2$ ；

[0147]  $-SO_3H$ ；

[0148]  $-PO_3H_2$ ；

[0149]  $-O-SO_3H$ ；

[0150]  $-O-PO_3H_2$ ；

[0151] -四唑基；或者

[0152]  $-O-W_2$ ，

[0153] 其中  $W_2$  为被一个或两个选自以下基团取代的亚芳基或亚杂芳基： $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-PO_3H_2$  和四唑基；

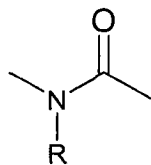
[0154] 前提条件是如果  $W_1$  为化学键， $v_1$ 、 $v_2$  和  $v_3$  均为 0，且  $Q_{1-6}$  均为化学键，则  $Z_1$  为  $0-W_2$ 。

[0155] 在本发明的一个方面， $W_1$  为亚苯基。一方面， $W_1$  为含有氮、氧或硫的 5-7 元杂环环系。一方面， $W_1$  为含有至少一个氧的 5 元杂环环系。

[0156] 在本发明的一个方面,  $Q_7$  为  $-(CH_2)_r-$ , 其中  $r$  为 4-22、8-20、12-20 或 14-18 范围的整数。一方面,  $Q_8$ 、 $Q_9$ 、 $Q_{12}$  和  $Q_{13}$  均为化学键,  $v_2$  为 1,  $v_1$  和  $v_3$  为 0。一方面,  $Q_{10}$  和  $Q_{11}$  为氧。

[0157] 在本发明的一个方面,  $X_4$  和  $Y_1$  为化学键,  $X_5$  为:

[0158]



[0159] 其中  $R$  为  $-(CH_2)_p-COOH$ , 其中  $p$  为 1-4。

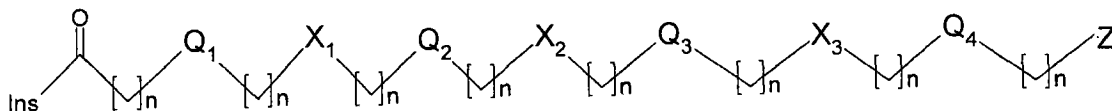
[0160] 一方面,  $Z_1$  为  $-COOH$ 。

[0161] 在本发明的一个方面, 药物组合物的酰化胰岛素选自:

[0162]  $N^{\epsilon B29}-[N-(HOO C(CH_2)_{14}CO)-N-(\text{羧乙基})-CH_2-C_6H_4CO]$  脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}-[N-(HOO C(CH_2)_{13}CO)-N-(\text{羧乙基})-CH_2-C_6H_4CO]$  脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}[N-(HOO C(CH_2)_{15}CO)-N-(\text{羧乙基})-CH_2-C_6H_4CO]$  脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}-[N-(HOO C(CH_2)_{16}CO)-N-(\text{羧乙基})-CH_2-C_6H_4CO]$  脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}-[N-(HOO C(CH_2)_{14}CO)-N-(\text{羧甲基})-C_6H_4CO]$  脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}[N-(HOO C(CH_2)_{14}CO)-N-(\text{羧乙基})-CH_2-(\text{亚吡喃基})CO]$  脱 B30 人胰岛素和  $N^{\epsilon B29}-\{4-\text{羧基}-4-[10-(4-\text{羧基}-\text{苯氧基})-\text{癸酰氨基}]-\text{丁酰基}\}$  脱 B30 人胰岛素。

[0163] 在本发明的一个方面, 药物组合物中存在的酰化胰岛素及其任何  $Zn^{2+}$  复合物具有下列结构式:

[0164]



[0165] 其中  $Ins$  为母体胰岛素部分, 通过 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基或胰岛素部分 B 链中存在的  $Lys$  残基的  $\epsilon$ -氨基通过酰胺键与侧链上的  $CO$ -基团结合;

[0166] 每个  $n$  独立地为 0、1、2、3、4、5 或 6;

[0167]  $Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$  和  $Q_4$  可彼此独立地为:

[0168] ●  $(CH_2CH_2O)_s-$ 、 $(CH_2CH_2CH_2O)_s-$ 、 $(CH_2CH_2CH_2CH_2O)_s-$ 、 $(CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2CH_2O)_s-$  或  $(CH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2CH_2O)_s-$ , 其中  $s$  为 1-20;

[0169] ●  $-(CH_2)_r-$ , 其中  $r$  为 4-22 的整数; 或者为包含 1、2 或 3 个  $-CH=CH-$  基团和多个  $-CH_2-$  基团的二价烃基链, 所述  $-CH_2-$  基团足以在链中提供范围为 4-22 个的碳原子总数;

[0170] ●  $-(CH_2)_t-$  或  $-(CH_2OCH_2)_t-$ , 其中  $t$  为 1-6 的整数;

[0171] ●  $-(CR_1R_2)_q-$ , 其中  $R_1$  和  $R_2$  可彼此独立地为  $H$ 、 $-COOH$ 、 $(CH_2)_{1-6}COOH$ , 且每个碳上的  $R_1$  和  $R_2$  可以不同,  $q$  为 1-6,

[0172] ●  $-((CR_3R_4)_{q_1})_1-(NHC O-(CR_3R_4)_{q_1}-NHC O)_{1-2}-((CR_3R_4)_{q_1})_1-$ 、 $-((CR_3R_4)_{q_1})_1-(CONH-(CR_3R_4)_{q_1}-CONH)_{1-2}-((CR_3R_4)_{q_1})_1-$ 、 $-((CR_3R_4)_{q_1})_1-(NHC O-(CR_3R_4)_{q_1}-CONH)_{1-2}-((CR_3R_4)_{q_1})_1$  或  $-((CR_3R_4)_{q_1})_1-(CONH-(CR_3R_4)_{q_1}-NHC O)_{1-2}-((CR_3R_4)_{q_1})_1$ , 其中  $R_3$  和  $R_4$  可彼此独立地为  $H$ 、 $-COOH$ , 且每个碳上的  $R_3$  和  $R_4$  可以不同,  $q_1$  为 1-6, 或者

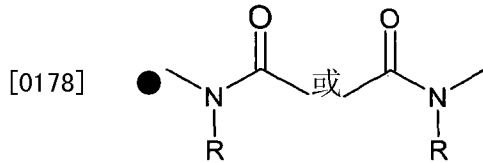
[0173] ● 化学键;

[0174] 前提条件是  $Q_1-Q_4$  不相同；

[0175]  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  独立地为：

[0176] ● 0；

[0177] ● 化学键；或



[0179] 其中 R 为氢或  $-(CH_2)_p-COOH$ 、 $-(CH_2)_p-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_p-PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_p-O-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_p-O-PO_3H_2$  或  $-(CH_2)_p$ -四唑-5-基, 其中每个 p 与其它 p 相互独立为 1-6 范围的整数；和

[0180] Z 为：

[0181]  $-COOH$ ；

[0182]  $-CO-Asp$ ；

[0183]  $-CO-Glu$ ；

[0184]  $-CO-Gly$ ；

[0185]  $-CO-Sar$ ；

[0186]  $-CH(COOH)_2$ ；

[0187]  $-N(CH_2COOH)_2$ ；

[0188]  $-SO_3H$ ；

[0189]  $-OSO_3H$ ；

[0190]  $-OPO_3H_2$ ；

[0191]  $-PO_3H_2$ ；或

[0192] -四唑-5-基。

[0193] 在本发明的一个方面, s 的范围为 2-12、2-4 或 2-3。一方面, s 优选为 1。

[0194] 在本发明的一个方面, Z 为  $-COOH$ 。

[0195] 在本发明的一个方面, 药物组合物的酰化胰岛素选自  $N^{\epsilon B29}$ (3-[2-{2-(2-[ $\omega$ -羧基-十五烷酰基- $\gamma$ -谷氨酰基-(2-氨基-乙氧基)]-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基]-丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-{2-(2-[ $\omega$ -羧基-十七烷酰基- $\gamma$ -谷氨酰基-(2-氨基-乙氧基)]-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基]-丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基-十五烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ ( $\omega$ -[2-(2-{2-[2-(2-羧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙基氨基甲酰基]-十七烷酰基- $\alpha$ -谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -( $\omega$ -[2-(2-{2-[2-(2-羧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙基氨基甲酰基]-十七烷酰基- $\gamma$ -谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基-十七烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{2-[2-(3-[7-羧基庚酰氨基] 丙氧基) 乙氧基] 乙氧基} 丙基氨基甲酰基) 丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-{4-[3-(7-羧基庚酰氨基) 丙氧基] 丁氧基} 丙基氨基甲酰基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{2-[2-(3-[9-羧基壬酰氨基] 丙氧基) 乙氧基] 乙氧基} 丙基氨基甲酰基) 丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-(9-羧基壬酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[4-[3-(9-羧基壬酰氨基)丙氧基]丁氧基]-丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(2-[3-(2-(2-[2-(7-羧基庚酰氨基)乙氧基]乙氧基)-乙基氨基甲酰基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -羧基十五烷酰氨基)乙氧基]乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基))脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-( $\omega$ -羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-( $\omega$ -羧基-十五烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙基氨基甲酰基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[2-(3-[ $\omega$ -羧基十五烷酰氨基]丙氧基)乙氧基]-乙氧基]丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[4-[3-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)丙氧基]-丁氧基丙基氨基甲酰基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[4-[3-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)丙氧基]-丁氧基丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基-十五烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -D-谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-(7-羧基庚酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-(9-羧基壬酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素。

[0196] 母体胰岛素分子是人胰岛素或其类似物。人胰岛素的非限制性类似物是脱 B30 类似物、其中 B30 位的氨基酸残基是 Lys 且 B29 位的氨基酸残基是除 Cys、Met、Arg 和 Lys 以外的任何可编码氨基酸的胰岛素类似物、其中 A21 位的氨基酸残基是 Asn 的胰岛素类似物以及其中 B3 位的氨基酸残基是 Lys 且 B29 位的氨基酸残基是 Glu 的胰岛素类似物。

[0197] 在另一组母体胰岛素类似物中，B28 位的氨基酸残基是 Asp。该组母体胰岛素类似物的一个具体实例是 EP 214826 中所公开的 AspB28 人胰岛素。

[0198] 在另一组母体胰岛素类似物中，B28 位的氨基酸残基是 Lys 且 B29 位的氨基酸残基是 Pro。该组母体胰岛素类似物的一个具体实例是  $Lys^{B28}Pro^{B29}$  人胰岛素。

[0199] 在另一组母体胰岛素类似物中，B30 位的氨基酸残基是 Lys 且 B29 位的氨基酸残基是除 Cys、Met、Arg 和 Lys 以外的任何可编码氨基酸。一个实例是其中 B29 位的氨基酸残基是 Thr 且 B30 位的氨基酸残基是 Lys 的胰岛素类似物。该组母体胰岛素类似物的一个具

体实例是 Thr<sup>B29</sup>Lys<sup>B30</sup> 人胰岛素。

[0200] 在另一组母体胰岛素类似物中, B3 位的氨基酸残基是 Lys 且 B29 位的氨基酸残基是 Glu。该组母体胰岛素类似物的一个具体实例是 Lys<sup>B3</sup>Glu<sup>B29</sup> 人胰岛素。

[0201] 本发明的药物组合物可包含治疗有效量的酰化胰岛素以及药学上可接受的载体, 用于治疗需要这种治疗的患者的 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症。

[0202] 在本发明的另一个方面, 提供用于治疗需要这种治疗的患者的 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症的药物组合物, 该药物组合物包含治疗有效量的如上定义的酰化胰岛素衍生物与快速起效的胰岛素或胰岛素类似物的混合物, 以及药学上可接受的载体和添加剂。

[0203] 因此, 药物组合物可包含两种胰岛素组分的混合物: 一种是延缓胰岛素作用的基础胰岛素, 另一种是快速起效的推注用胰岛素 (bolusinsulin)。这种混合物的实例是门冬胰岛素, 一种 AspB28 人胰岛素与对应于 WO 2005/012347 中所公开的 Lys<sup>B29</sup>N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基 (hexadecandioyl)-γ-Glu 脱 B30 人胰岛素的 N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(H<sub>2</sub>C<sub>16</sub>)<sub>2</sub>CO)-γ-Glu 脱 B30 人胰岛素的混合物。这种混合物的另一个实例是赖脯胰岛素, 即 Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup> 人胰岛素与 Lys<sup>B29</sup>N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 人胰岛素的混合物。这种混合物的第三个实例是赖谷胰岛素 (Glulisine), 即 Lys<sup>B3</sup>Glu<sup>B29</sup>-人胰岛素与 Lys<sup>B29</sup>N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 人胰岛素的混合物。

[0204] 在本发明的一个方面, 至少 85% 的速效胰岛素以速效胰岛素六聚体或者分子量小于速效胰岛素六聚体的复合物存在。

[0205] 在本发明的一个方面, 至少 90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 的速效胰岛素以速效胰岛素六聚体或者分子量小于速效胰岛素六聚体的复合物存在。

[0206] 酰化胰岛素衍生物和速效胰岛素类似物可按以下摩尔比相混合: 约 90%/10%、约 75%/25%、约 70%/30%、约 50%/50%、约 25%/75%、约 30%/70% 或约 10%/90%。

[0207] 一方面, 本发明的药物组合物的 pH 可介于约 6.5 至约 8.5 之间。另一方面, pH 为约 7.0 至约 8.2, pH 约为 7.2-8.0, pH 为约 7.4 至约 8.0 或 pH 为约 7.4 至约 7.8。

[0208] 本发明还包括包含酰化胰岛素的药物组合物的制备方法, 其中将每 6 分子酰化胰岛素多于约 4 个锌原子加到组合物中。

[0209] 在本发明的另一个方面, 将每 6 分子酰化胰岛素多于约 4.3 个锌原子加到组合物中, 或者将每 6 分子酰化胰岛素多于约 4.5 个锌原子加到组合物中, 或者将每 6 分子酰化胰岛素多于约 5 个锌原子加到组合物中。另一方面, 将每 6 分子酰化胰岛素多于约 5.5 个锌原子、或多于约 6.5 个锌原子、或多于约 7.0 个锌原子或多于约 7.5 个锌原子加到组合物中。

[0210] 在本发明的一个方面, 该方法包括将每 6 分子酰化胰岛素多达约 12 个锌原子加到组合物中。

[0211] 在本发明的一个方面, 该方法包括将每 6 分子酰化胰岛素约 4.3 个至约 12 个锌原子加到组合物中。

[0212] 在本发明的另一个方面, 将每 6 分子酰化胰岛素约 4.5 个至约 12 个锌原子加到组合物中, 或者将每 6 分子酰化胰岛素约 5 个至约 11.4 个锌原子加到组合物中, 或者将每 6 分子酰化胰岛素约 5.5 个至约 10 个锌原子加到组合物中。

[0213] 另一方面, 将每 6 分子酰化胰岛素约 6 个至约 10.5 个锌原子、或者每 6 分子酰化



胰岛素约 6.5 个至约 10 个锌原子、或者每 6 分子酰化胰岛素约 7 个至约 9 个锌原子加到组合物中。

[0214] 在本发明的一个方面,本发明的方法包括在加入防腐剂之前将锌加到组合物中。在本发明的另一个方面,在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 1 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,或者在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 2 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,或者在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,或者在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,或者在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 5 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0215] 在本发明的另一个方面,在加入防腐剂之前将每 6 分子酰化胰岛素约 4.5 个至约 12 个锌原子加到组合物中,或者在加入防腐剂之前将每 6 分子酰化胰岛素约 5 个至约 11.4 个锌原子加到组合物中,或者甚至更优选在加入防腐剂之前将每 6 分子酰化胰岛素约 5.5 个至约 10 个锌原子加到组合物中。另一方面,在加入防腐剂之前将每 6 分子酰化胰岛素约 6 个至约 10.5 个锌原子、或者每 6 分子酰化胰岛素约 6.5 个至约 10 个锌原子、或者每 6 分子酰化胰岛素约 7 至约 9 个锌原子加到组合物中。

[0216] 在本发明的一个方面,该方法包括在加入防腐剂之后将锌加到组合物中。在本发明的一个方面,在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素至少 0.5 个锌原子加到组合物中,或者在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素至少 1 个锌原子加到组合物中。

[0217] 在本发明的另一个方面,在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素多于约 2 个锌原子加到组合物中,或者在加入防腐剂后将每 6 分子酰化胰岛素多于约 3 个锌原子加到组合物中,或者在加入防腐剂后将每 6 分子酰化胰岛素多于约 4 个锌原子加到组合物中。

[0218] 在本发明的另一个方面,在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 0.5 个至约 12 个、约 1 个至约 11.4 个、约 1.5 个至约 11 个、约 2 个至约 10.5 个、约 3 个至约 10 个或者约 4 个至约 9 个锌原子加到组合物中。

[0219] 在本发明的另一个方面,在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 4.5 个至约 12 个锌原子加到组合物中,或者在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 5 个至约 11.4 个锌原子加到组合物中,或者在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 5.5 个至约 10 个锌原子加到组合物中。

[0220] 另一方面,在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 6 个至约 10.5 个锌原子、或者每 6 分子酰化胰岛素约 6.5 个至约 10 个锌原子、或者每 6 分子酰化胰岛素约 7 个至约 9 个锌原子加到组合物中。

[0221] 在本发明的一个方面,该方法包括在加入防腐剂之前加入部分锌,并且在加入防腐剂之后加入部分锌。

[0222] 一方面,该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 0.5 个锌原子,并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子。一方面,该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 0.5 个锌原子,并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 11 个锌原子。

[0223] 一方面,该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子,或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入

至少 2 个或 3 个锌原子,或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入多达约 11 个锌原子。一方面,该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子,并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 4、5、6、7、8、9、10 或 11 个锌原子。

[0224] 一方面,该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子,或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个或 3 个锌原子,或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入多达约 10 个锌原子。一方面,该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 4、5、6、7、8、9 或 10 个锌原子。

[0225] 一方面,该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 3 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子,或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 3 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个或 3 个锌原子,或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 3 个锌原子并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入多达约 9 个锌原子。

[0226] 在本发明的一个方面,在加入防腐剂之前所加的锌原子数为至少 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,并且在加入防腐剂之后所加的锌原子数为至少 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。一方面,该方法包括在加入防腐剂之前加入至少 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 4、5、6、7、8 或 9 个锌原子。

[0227] 在本发明的一个方面,所加的防腐剂为苯酚和 / 或间甲酚。

[0228] 在本发明的一个方面,该方法包括将全部用量的锌原子在一个步骤中加到药物组合物中。

[0229] 在本发明的一个方面,该方法包括将锌原子在两个或更多步骤中加入药物组合物中。例如,可将锌在 1、2、3、4 或 5 个步骤中加到组合物中,其中各步骤包括加入少量的 max. 1 个锌原子 /6 分子胰岛素 (1Zn/6ins)。可将锌在 1、2、3、4 或 5 个步骤中加到组合物中,其中各步骤包括加入少量的 2 个锌原子 /6 分子胰岛素 (2Zn/6ins)、3 个锌原子 /6 分子胰岛素 (3Zn/6ins)、4 个锌原子 /6 分子胰岛素 (4Zn/6ins)、5 个锌原子 /6 分子胰岛素 (5Zn/6ins) 或 6 个锌原子 /6 分子胰岛素 (6Zn/6ins)。

[0230] 在本发明的一个方面,本发明的方法包括将表面活性剂加入药物组合物中。表面活性剂可按占药物组合物重量 0.0005–0.01% 的量在药物组合物中混匀。一方面,表面活性剂可按占组合物重量 0.0005–0.007% 的量在药物组合物中混匀。表面活性剂的实例可为聚山梨酯 20,它可按占组合物重量 0.001–0.003% 的量在药物组合物中混匀。另一个实例为泊洛沙姆 188,它可按占组合物重量 0.002–0.006% 的量在药物组合物中混匀。

[0231] 在本发明的另一个方面,该方法包括酰化胰岛素及其任何  $Zn^{2+}$  复合物,该胰岛素具有连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的侧链,该侧链具有下列通式:

[0232]  $-W-X-Y-Z_2$

[0233] 其中 W 为:

[0234] ● 在侧链上具有羧酸基团的  $\alpha$ -氨基酸残基,该残基用其一个羧酸基团与母体胰

胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基一起形成酰胺基团；

[0235] ●由 2、3 或 4 个  $\alpha$ -氨基酸残基通过酰胺羰基键连接在一起所组成的链，该链通过酰胺键连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上，W 的氨基酸残基选自具有中性侧链的氨基酸残基和在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基，使得 W 具有至少一个在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基；或者

[0236] ●自 X 至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的共价键；

[0237] X 为：

[0238] ●  $-\underline{\text{C}}\text{O}-$ ；

[0239] ●  $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{O}-$ ；

[0240] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ；

[0241] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$

[0242] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ；

[0243] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ；

[0244] ●  $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\underline{\text{N}}\text{HCO}-$ ；

[0245] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ；或者

[0246] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ，

[0247] 其中

[0248] a) 如果 W 是氨基酸残基或氨基酸残基链，则通过下划线碳上的键与 W 上的氨基形成酰胺键，或者

[0249] b) 如果 W 是共价键，则通过下划线羰基碳上的键与母体胰岛素

[0250] B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键；

[0251] Y 为：

[0252] ●  $-(\text{CH}_2)_m-$ ，其中 m 是 6-32 范围内的整数；

[0253] ●包含 1、2 或 3 个  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基团和多个  $-\text{CH}_2-$  基团的二价烃基链，所述  $-\text{CH}_2-$  基团足以在链中提供范围为 10-32 个的碳原子总数；

[0254] 和

[0255]  $Z_2$  为：

[0256] ●  $-\text{COOH}$ ；

[0257] ●  $-\text{CO}-\text{Asp}$ ；

[0258] ●  $-\text{CO}-\text{Glu}$ ；

[0259] ●  $-\text{CO}-\text{Gly}$ ；

[0260] ●  $-\text{CO}-\text{Sar}$ ；

[0261] ●  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ；

[0262] ●  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ；

[0263] ●  $-\text{SO}_3\text{H}$ ；或者

[0264] ●  $-\text{PO}_3\text{H}$ ，

[0265] 前提条件是如果 W 是共价键且 X 是  $-\text{CO}-$ ，则 Z 不是  $-\text{COOH}$ 。

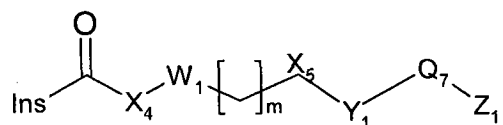
[0266] 在本发明的一个方面，酰化胰岛素选自

[0267]  $\text{N}^{\epsilon\text{B29}}(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素；

- [0268]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{15}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0269]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0270]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{17}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0271]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0272]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu-N}-(\gamma\text{-Glu}))$  脱 B30 人胰岛素；
- [0273]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{Asp-OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0274]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{Glu-OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0275]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{Glu-OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}))$  脱 B 30 人胰岛素；
- [0276]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{Asp-OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}))$  脱 B30 人胰岛素；
- [0277]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\alpha\text{-Glu-N}-(\beta\text{-Asp}))$  脱 B30 人胰岛素；
- [0278]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{Gly-OC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0279]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{Sar-OC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0280]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0281]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\beta\text{-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0282]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\alpha\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0283]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-D-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0284]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0285]  $N^{\epsilon B29}(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0286]  $N^{\epsilon B29}(N\text{-HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0287]  $N^{\epsilon B29}(N\text{-HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-IDA})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0288]  $N^{\epsilon B29}[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})\text{-N}-(\text{羧乙基})\text{-Gly}]$  脱 B30 人胰岛素；
- [0289]  $N^{\epsilon B29}[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})\text{-N}-(\text{羧乙基})\text{-Gly}]$  脱 B30 人胰岛素；和
- [0290]  $N^{\epsilon B29}[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})\text{-N}-(\text{羧甲基})\text{-}\beta\text{-Ala}]$  脱 B30 人胰岛素。

[0291] 在本发明的一个方面,用于药物组合物制备方法的酰化胰岛素及其任何  $\text{Zn}^{2+}$  复合物具有下列结构式:

[0292]



[0293] 其中 Ins 为母体胰岛素部分,通过 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基或胰岛素部分 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基通过酰胺键与侧链上的 CO- 基团结合;

[0294]  $X_4$  为:

[0295] ●  $-(\text{CH}_2)_n$ , 其中 n 为 1、2、3、4、5 或 6;

[0296] ● NR, 其中 R 为氢或  $-(\text{CH}_2)_p\text{-COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-SO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-PO}_3\text{H}_2$ 、被 1 或 2 个  $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-COOH}$  基团取代的亚芳基、 $-(\text{CH}_2)_p$ -四唑基,其中 p 是 1-6 范围内的整数;

[0297] ●  $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_q\text{-NR-CO-}$ , 其中  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  彼此独立并且独立于 q 的各个取值,可为 H、-COOH 或 OH, q 为 1-6, R 如上定义;

[0298] ●  $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q1}\text{-NR-CO)}_{2-4}$ , 其中  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  彼此独立并且独立于  $q_1$  的各个取值,可为

H、-COOH 或 OH,  $q_1$  为 1-6, R 如上定义 ;

[0299] 或者

[0300] ● 化学键

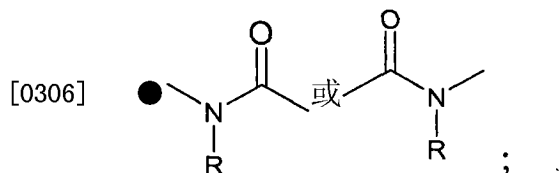
[0301]  $W_1$  为亚芳基或亚杂芳基, 可被一个或两个选自以下的基团取代 :

[0302] -COOH、-SO<sub>3</sub>H、-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 和四唑基, 或者  $W_1$  为化学键 ;

[0303] m 为 0、1、2、3、4、5 或 6 ;

[0304]  $X_5$  为 :

[0305] ● -O- ;



[0307] 其中 R 如上定义 ; 或者

[0308] ● 化学键 ;

[0309]  $Y_1$  为 :

[0310] ●  $-(CR_1R_2)_q-NR-CO-$ , 其中  $R_1$  和  $R_2$  彼此独立并且独立于  $q$  的各个取值, 可为 H、-COOH、化学键或 OH,  $q$  为 1-6 ; R 如上定义 ;

[0311] ● NR, 其中 R 如上定义 ;

[0312] ●  $-((CR_3R_4)_{q_1}-NR-CO)_{2-4}-$ , 其中  $R_3$  和  $R_4$  彼此独立并且独立于  $q_1$  的各个取值, 可为 H、-COOH 或 OH,  $q_1$  为 1-6, R 如上定义 ;

[0313] 或者

[0314] ● 化学键 ;

[0315]  $Q_7$  为 :

[0316] ●  $-(CH_2)_r-$ , 其中  $r$  为 4-22 的整数 ;

[0317] ● 包含 1、2 或 3 个  $-CH=CH-$  基团和多个  $-CH_2-$  基团的二价烃基链, 所述  $-CH_2-$  基团足以为链中提供范围为 4-22 个的碳原子总数 ;

[0318] 或者

[0319] ● 下式的二价烃基链 :

[0320]  $-(CH_2)_s-Q_8-(C_6H_4)_{v_1}-Q_9-(CH_2)_w-Q_{10}-(C_6H_4)_{v_2}-Q_{11}-(CH_2)_t-Q_{12}-(C_6H_4)_{v_3}-Q_{13}-(CH_2)_z-$  其中  $Q_8-Q_{13}$  可彼此独立地为 0、S 或化学键 ; 其中  $s$ 、 $w$ 、 $t$  和  $z$  彼此独立地为 0, 或者为 1-10 的整数致使  $s$ 、 $w$ 、 $t$  与  $z$  之和的范围为 4-22,  $v_1$ 、 $v_2$  和  $v_3$  可彼此独立地为 0 或 1, 前提条件是如果  $W_1$  为化学键, 则  $Q_7$  不是式  $-(CH_2)_{v_4}C_6H_4(CH_2)_{w_1}-$  的二价烃基链, 其中  $v_4$  和  $w_1$  为整数, 或者其中之一为 0 致使  $v_4$  与  $w_1$  之和的范围为 6-22 ; 和

[0321]  $Z_1$  为 :

[0322] -COOH ;

[0323] -CO-Asp ;

[0324] -CO-Glu ;

[0325] -CO-Gly ;

[0326] -CO-Sar ;

- [0327]  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$  ;  
 [0328]  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ;  
 [0329]  $-\text{SO}_3\text{H}$  ;  
 [0330]  $-\text{PO}_3\text{H}_2$  ;  
 [0331]  $-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$  ;  
 [0332]  $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$  ;  
 [0333] - 四唑基 ;或者  
 [0334]  $-\text{O}-\text{W}_2$ ,

[0335] 其中  $\text{W}_2$  为被一个或两个选自以下基团取代的亚芳基或亚杂芳基 : $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$  和四唑基 ;

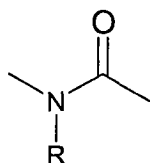
[0336] 前提条件是如果  $\text{W}_1$  为化学键,  $v_1$ 、 $v_2$  和  $v_3$  均为 0, 且  $\text{Q}_{8-13}$  均为化学键, 则  $\text{Z}_1$  为  $\text{O}-\text{W}_2$ 。

[0337] 在本发明的一个方面,  $\text{W}_1$  为亚苯基。一方面,  $\text{W}_1$  为含有氮、氧或硫的 5-7 元杂环环系。一方面,  $\text{W}_1$  为含有至少一个氧的 5 元杂环环系。

[0338] 在本发明的一个方面,  $\text{Q}_7$  为  $-(\text{CH}_2)_r-$ , 其中  $r$  为 4-22、8-20、12-20 或 14-18 范围的整数。一方面,  $\text{Q}_8$ 、 $\text{Q}_9$ 、 $\text{Q}_{12}$  和  $\text{Q}_{13}$  均为化学键,  $v_2$  为 1,  $v_1$  和  $v_3$  为 0。一方面,  $\text{Q}_{10}$  和  $\text{Q}_{11}$  为氧。

[0339] 在本发明的一个方面,  $\text{X}_4$  和  $\text{Y}_1$  均为化学键,  $\text{X}_5$  为 :

[0340]



[0341] 其中  $\text{R}$  为  $-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$ , 其中  $p$  为 1-4。

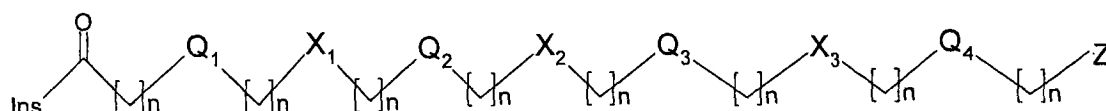
[0342] 一方面,  $\text{Z}_1$  为  $-\text{COOH}$ 。

[0343] 在本发明的一个方面, 本发明方法的酰化胰岛素选自 :

[0344]  $\text{N}^{\epsilon \text{B}29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}]$  脱 B30 人胰岛素、 $\text{N}^{\epsilon \text{B}29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}]$  脱 B30 人胰岛素、 $\text{N}^{\epsilon \text{B}29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{15}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}]$  脱 B30 人胰岛素、 $\text{N}^{\epsilon \text{B}29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}]$  脱 B30 人胰岛素、 $\text{N}^{\epsilon \text{B}29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧甲基})-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}]$  脱 B30 人胰岛素、 $\text{N}^{\epsilon \text{B}29}-[\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{CH}_2-(\text{亚吡喃基})\text{CO}]$  脱 B30 人胰岛素和  $\text{N}^{\epsilon \text{B}29}-\{4-\text{羧基}-4-[10-(4-\text{羧基}-\text{苯氧基})-\text{癸酰氨基}]-\text{丁酰基}\}$  脱 B30 人胰岛素。

[0345] 在本发明的一个方面, 用于本方法的酰化胰岛素及其任何  $\text{Zn}^{2+}$  复合物具有下列结构式 :

[0346]



[0347] 其中  $\text{Ins}$  为母体胰岛素部分, 通过 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基或者胰岛素部分 B 链中存在的  $\text{Lys}$  残基的  $\epsilon$ -氨基通过酰胺键与侧链上的  $\text{CO-}$  基团结合 ;

[0348] 每个  $n$  独立地为 0、1、2、3、4、5 或 6 ;

[0349]  $Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$  和  $Q_4$  可彼此独立地为：

[0350] ●  $(CH_2CH_2O)_s-$ 、 $(CH_2CH_2CH_2O)_s-$ 、 $(CH_2CH_2CH_2CH_2O)_s-$ 、 $(CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2O)_s-$  或  $(CH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2O)_s-$ ，其中  $s$  为 1-20；

[0351] ●  $-(CH_2)_r-$ ，其中  $r$  为 4-22 的整数；或者包含 1、2 或 3 个  $-CH=CH-$  基团和多个  $-CH_2-$  基团的二价烃基链，所述  $-CH_2-$  基团足以为链中提供范围为 4-22 个的碳原子总数；

[0352] ●  $-(CH_2)_t-$  或  $-(CH_2OCH_2)_t-$ ，其中  $t$  为 1-6 的整数；

[0353] ●  $-(CR_1R_2)_q-$ ，其中  $R_1$  和  $R_2$  可彼此独立地为 H、 $-COOH$ 、 $(CH_2)_{1-6}COOH$  且每个碳上的  $R_1$  和  $R_2$  可以不同， $q$  为 1-6，

[0354] ●  $-((CR_3R_4)_{q_1})_1-(NHC(O)-(CR_3R_4)_{q_1}-NHC(O))_{1-2}-((CR_3R_4)_{q_1})_1-$ 、 $-((CR_3R_4)_{q_1})_1-(CONH-(CR_3R_4)_{q_1}-CONH)_{1-2}-((CR_3R_4)_{q_1})_1-$ 、 $-((CR_3R_4)_{q_1})_1-(NHC(O)-(CR_3R_4)_{q_1}-CONH)_{1-2}-((CR_3R_4)_{q_1})_1$  或  $-((CR_3R_4)_{q_1})_1-(CONH-(CR_3R_4)_{q_1}-NHC(O))_{1-2}-((CR_3R_4)_{q_1})_1$ ，其中  $R_3$  和  $R_4$  可彼此独立地为 H、 $-COOH$ ，且每个碳上的  $R_3$  和  $R_4$  可以不同， $q_1$  为 1-6，或者

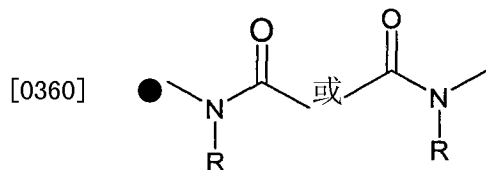
[0355] ● 化学键；

[0356] 前提条件是  $Q_1-Q_4$  不相同；

[0357]  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  独立地为：

[0358] ● 0；

[0359] ● 化学键；或者



[0361] 其中  $R$  为氢或  $-(CH_2)_p-COOH$ 、 $-(CH_2)_p-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_p-PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_p-O-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_p-O-PO_3H_2$  或  $-(CH_2)_p-$  四唑 -5- 基，其中每个  $p$  与其它  $p$  相互独立为 1-6 范围的整数；和

[0362]  $Z$  为：

[0363]  $-COOH$ ；

[0364]  $-CO-Asp$ ；

[0365]  $-CO-Glu$ ；

[0366]  $-CO-Gly$ ；

[0367]  $-CO-Sar$ ；

[0368]  $-CH(COOH)_2$ ；

[0369]  $-N(CH_2COOH)_2$ ；

[0370]  $-SO_3H$ ；

[0371]  $-OSO_3H$ ；

[0372]  $-OPO_3H_2$ ；

[0373]  $-PO_3H_2$ ；或

[0374]  $-$  四唑 -5- 基。

[0375] 在本发明的一个方面， $s$  的范围为 2-12、2-4 或 2-3。一方面， $s$  优选为 1。

[0376] 在本发明的一个方面， $Z$  为  $-COOH$ 。

[0377] 在本发明的一个方面，用于药物组合物制备方法的酰化胰岛素选自

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-(2-[ $\omega$ -羧基-十五烷酰基- $\gamma$ -谷氨酰基-(2-氨基-乙氧基)]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-(2-[ $\omega$ -羧基-十七烷酰基- $\gamma$ -谷氨酰基-(2-氨基-乙氧基)]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-(2-[2-( $\omega$ -羧基-十五烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -( $\omega$ -[2-(2-(2-[2-(2-羧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙基氨基甲酰基]-十七烷酰基- $\alpha$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -( $\omega$ -[2-(2-(2-[2-(2-羧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙基氨基甲酰基]-十七烷酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -羧基-十七烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[2-(3-[7-羧基庚酰氨基]丙氧基)乙氧基]-乙氧基}丙基氨基甲酰基)丙酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-[4-[3-(7-羧基庚酰氨基)丙氧基]丁氧基}丙基氨基甲酰基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-[2-[2-(3-[9-羧基壬酰氨基]丙氧基)乙氧基]乙氧基)-丙基氨基甲酰基)丙酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(2-[2-[2-(9-羧基壬酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[4-[3-(9-羧基壬酰氨基)丙氧基]丁氧基}-丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (2-[3-(2-(2-[2-(7-羧基庚酰氨基)乙氧基]乙氧基)-乙基氨基甲酰基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -羧基十五烷酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙氧基)乙氧基]丙酰基))脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-[2-(2-[2-[2-(2-[2-( $\omega$ -羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基-十五烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基)-乙基氨基甲酰基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-[2-[2-(3-[ $\omega$ -羧基十五烷酰氨基]丙氧基)乙氧基]-乙氧基}丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-[4-[3-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)丙氧基]丁氧基丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[4-[3-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)丙氧基]丁氧基丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -羧基-十五烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -D-谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-(7-羧基庚酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-(9-羧基壬酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、



$N^{\epsilon B29}$ -{3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -{3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素。

[0378] 在本发明的一个方面,该方法包括将速效胰岛素加到组合物中。速效胰岛素是 AspB28 人胰岛素、LysB28ProB29 人胰岛素和 Lys<sup>B3</sup>Glu<sup>B29</sup>-人胰岛素或其混合物。

[0379] 在本发明的一个方面,包含酰化胰岛素的药物组合物用于治疗糖尿病。

[0380] 在本发明的一个方面,包含酰化胰岛素的药物组合物用于制备治疗糖尿病的药物。

[0381] 一方面,本发明涉及本发明的药物组合物以及药学上可接受的载体和/或药学上可接受的添加剂,该组合物可用来治疗需要这种治疗的患者的 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症。

[0382] 在本发明的一个方面,提供用于治疗需要这种治疗的患者的 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症的方法,该方法包括给予患者治疗有效量的药物组合物以及药学上可接受的载体和/或药学上可接受的添加剂。

[0383] 在本发明的一个方面,提供制备用于治疗 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症的药物组合物的方法。

[0384] 在本发明的一个方面,提供用于治疗需要这种治疗的患者的 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症的药物组合物。

[0385] 在本发明的一个方面,提供用于治疗需要这种治疗的患者的 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症的方法,该方法包括给予患者治疗有效量的本发明的药物组合物。

[0386] 在本发明的一个方面,提供制备用于治疗 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症的药物组合物的方法。

[0387] 如本说明书定义的包含酰化胰岛素的药物组合物可与 OAD 或 GLP-1 同时或序贯给药。各要素可以单一剂型提供,其中单一剂型含有两种化合物,或者各要素以套装药盒提供,该药盒包括药物组合物制剂,该药物组合物包含含有酰化胰岛素的药物组合物和含有 OAD 作为第二单位剂型的药物组合物。无论本说明书中提及第一单位剂量或第二单位剂量或第三单位剂量等,都不表示优选的给药顺序,而仅仅是出于方便的目的。

[0388] 所谓“同时”给予包含酰化胰岛素的药物组合物的制剂和 OAD 或 GLP-1 的制剂,是指以单一剂型给予化合物,或者给予第一药物后给予第二药物,时间间隔不超过 15 分钟、10 分钟、5 分钟或 2 分钟。任一要素都可以先给予。

[0389] 所谓“序贯”给药是指给予第一药物后给予第二药物的时间间隔超过 15 分钟。两种单位剂型的任一种都可先给予。优选两种产品通过同一静脉口注射。

[0390] 在本发明的另一个方面,包含酰化胰岛素的药物组合物与 OAD 或 GLP-1 一起,一天一次同时或序贯给药。在更优选的方面,包含酰化胰岛素的药物组合物还包含速效胰岛素,与 OAD 或 GLP-1 一起,一天一次给药。在本发明的一个方面,包含酰化胰岛素的药物组合物可为单独的强化治疗直到每天 5 次才停止。在更优选的方面,药物组合物还包含速效胰岛素,其中强化治疗可为单独治疗直到每天 5 次才停止。

[0391] 以下段落 (paragraph) 对本发明进行了概括:

[0392] 1. 可溶性药物组合物,其包含酰化胰岛素,并且还包含多于 4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0393] 2. 段落 1 的药物组合物,其包含多大约 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0394] 3. 段落 1 或 2 的药物组合物,其包含约 4.3 个至约 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0395] 4. 段落 1-3 中任一项的药物组合物,其包含约 4.5 个至约 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0396] 5. 上述段落中任一项的药物组合物,其中至少 85% 的酰化胰岛素以复合物存在,该复合物是酰化胰岛素十二聚体或者是分子量大于酰化胰岛素十二聚体的复合物。

[0397] 6. 上述段落中任一项的药物组合物,其中至少 92% 的酰化胰岛素以复合物存在,该复合物是酰化胰岛素十二聚体或者是分子量大于酰化胰岛素十二聚体的复合物。

[0398] 7. 上述段落中任一项的药物组合物,其中至少 95% 的酰化胰岛素以复合物存在,该复合物是酰化胰岛素十二聚体或者是分子量大于酰化胰岛素十二聚体的复合物。

[0399] 8. 上述段落中任一项的药物组合物,其中至少 97% 的酰化胰岛素以复合物存在,该复合物是酰化胰岛素十二聚体或者是分子量大于酰化胰岛素十二聚体的复合物。

[0400] 9. 上述段落中任一项的药物组合物,其中该组合物包含表面活性剂。

[0401] 10. 上述段落中任一项的药物组合物,其中酰化胰岛素是在位于母体胰岛素分子 B 链中的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基被酰化的胰岛素。

[0402] 11. 段落 1-10 中任一项的药物组合物,其中酰基包含至少一个游离羧酸基团或者在中性 pH 时带有负电荷的基团。

[0403] 12. 段落 1 或 10-11 的药物组合物,其中酰基是从具有 4-32 个碳原子的二羧基脂肪酸衍生的。

[0404] 13. 段落 1 或 10-12 的药物组合物,其中酰基通过连接基以酰胺键连接至胰岛素分子。

[0405] 14. 段落 1 或 13 的药物组合物,其中所述连接基包含至少一个游离羧基或者在中性 pH 时带有负电荷的基团。

[0406] 15. 段落 1-14 中任一项的药物组合物,其中所述胰岛素分子具有侧链和可能的一个或多个连接基,所述侧链通过酰胺键连接至 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基上,或者连接至母体胰岛素部分 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上,所述侧链包含至少一个游离羧基团或者在中性 pH 时带有负电荷的基团,这是一种碳链中具有约 4 个至约 32 个碳原子的脂肪酸部分;所述连接基通过酰胺键将侧链各个组分连接在一起。

[0407] 16. 段落 1-15 的药物组合物,其中侧链包含至少一个芳基。

[0408] 17. 段落 1-15 的药物组合物,其中侧链包含至少一个双官能 PEG 基团。

[0409] 18. 段落 1-15 中任一项的药物组合物,其中胰岛素分子及其任何  $Zn^{2+}$  复合物具有连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的侧链,该侧链具有下列通式:

[0410]  $-W-X-Y-Z_2$

[0411] 其中 W 为:

[0412] ● 在侧链上具有羧酸基团的  $\alpha$ -氨基酸残基,该残基用其一个羧酸基团与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基一起形成酰胺基团;

[0413] ●由 2、3 或 4 个  $\alpha$ -氨基酸残基通过酰胺羰基键连接在一起所组成的链,该链通过酰胺键连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上, W 的氨基酸残基选自具有中性侧链的氨基酸残基和在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基,使得 W 具有至少一个在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基;或者

[0414] ●自 X 至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的共价键;

[0415] X 为:

[0416] ●  $-\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

[0417] ●  $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

[0418] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

[0419] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{O}\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

[0420] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$

[0421] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

[0422] ●  $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

[0423] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;或者

[0424] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ,

[0425] 其中

[0426] a) 如果 W 是氨基酸残基或氨基酸残基链,则通过下划线碳上的键与 W 上的氨基形成酰胺键,或者

[0427] b) 如果 W 是共价键,则通过下划线羰基碳上的键与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键;

[0428] Y 为:

[0429] ●  $-(\text{CH}_2)_m-$ , 其中 m 是 6-32 范围内的整数;

[0430] ●包含 1、2 或 3 个  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基团和多个  $-\text{CH}_2-$  基团的二价烃基链,所述  $-\text{CH}_2-$  基团足以为链中提供范围为 10-32 个的碳原子总数;

[0431] 和

[0432]  $Z_2$  为:

[0433] ●  $-\text{COOH}$ ;

[0434] ●  $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;

[0435] ●  $-\text{CO}-\text{Glu}$ ;

[0436] ●  $-\text{CO}-\text{Gly}$ ;

[0437] ●  $-\text{CO}-\text{Sar}$ ;

[0438] ●  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ;

[0439] ●  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;

[0440] ●  $-\text{SO}_3\text{H}$ ;或者

[0441] ●  $-\text{PO}_3\text{H}$ ,

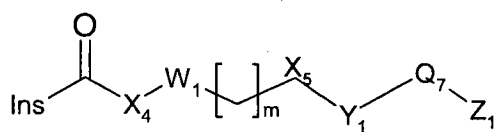
[0442] 前提条件是如果 W 是共价键且 X 为  $-\text{CO}-$ ,则 Z 不是  $-\text{COOH}$ 。

[0443] 19. 段落 1-15 和 18 中任一项的药物组合物,其中  $Z_2$  为  $-\text{COOH}$ 。

[0444] 20. 段落 1-15 和 18-19 的药物组合物,其中酰化胰岛素选自

[0445]  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

- [0446]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{15}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0447]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0448]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{17}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0449]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0450]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu-N}-(\gamma\text{-Glu}))$  脱 B30 人胰岛素；
- [0451]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{Asp-OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0452]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{Glu-OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0453]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{Glu-OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}))$  脱 B30 人胰岛素；
- [0454]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{Asp-OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}))$  脱 B30 人胰岛素；
- [0455]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\alpha\text{-Glu-N}-(\beta\text{-Asp}))$  脱 B30 人胰岛素；
- [0456]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{Gly-OC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0457]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{Sar-OC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0458]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0459]  $(N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\beta\text{-Asp}))$  脱 B30 人胰岛素；
- [0460]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\alpha\text{-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0461]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-D-Glu})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0462]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0463]  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0464]  $N^{\epsilon B29}(\text{N-HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-\beta\text{-D-Asp})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0465]  $N^{\epsilon B29}-(\text{N-HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO-IDA})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0466]  $N^{\epsilon B29}-(\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{Gly})$  脱 B30 人胰岛素；
- [0467]  $N^{\epsilon B29}-(\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧乙基})-\text{Gly})$  脱 B30 人胰岛素；和
- [0468]  $N^{\epsilon B29}-(\text{N}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\text{N}-(\text{羧甲基})-\beta\text{-Ala})$  脱 B30 人胰岛素。
- [0469] 21. 段落 1-16 的药物组合物,其中酰化胰岛素及其任何  $\text{Zn}^{2+}$  复合物具有下列结构式:
- [0470]



[0471] 其中 Ins 为母体胰岛素部分,通过 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基或胰岛素部分 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基通过酰胺键与侧链上的 CO- 基团结合;

[0472]  $X_4$  为:

[0473] ●  $-(\text{CH}_2)_n$ , 其中 n 为 1、2、3、4、5 或 6;

[0474] ● NR, 其中 R 为 氢 或  $-(\text{CH}_2)_p\text{-COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-SO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-PO}_3\text{H}_2$ 、被 1 或 2 个  $-(\text{CH}_2)_p\text{-O-COOH}$  基团取代的亚芳基、 $-(\text{CH}_2)_p\text{-四唑基}$ , 其中 p 是 1-6 范围内的整数;

[0475] ●  $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_q\text{-NR-CO-}$ , 其中  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  彼此独立并且独立于 q 的各个取值,可为 H、 $-\text{COOH}$  或 OH, q 为 1-6, R 如上定义;

[0476] ●  $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q1}\text{-NR-CO)}_{2-4}$ , 其中  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  彼此独立并且独立于  $q_1$  的各个取值,可为

H、-COOH 或 OH,  $q_1$  为 1-6, R 如上定义 ;

[0477] 或者

[0478] ● 化学键

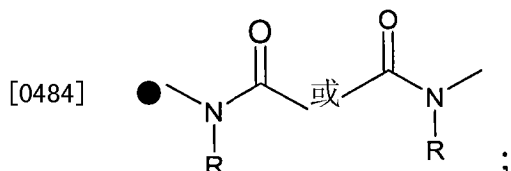
[0479]  $W_1$  为亚芳基或亚杂芳基, 可被一个或两个选自以下的基团取代 :

[0480] -COOH、-SO<sub>3</sub>H、-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 和四唑基, 或者  $W_1$  为化学键 ;

[0481] m 为 0、1、2、3、4、5 或 6 ;

[0482]  $X_5$  为 :

[0483] ● -O- ;



[0485] 其中 R 如上定义 ; 或者

[0486] ● 化学键 ;

[0487]  $Y_1$  为 :

[0488] ●  $-(CR_1R_2)_q-NR-CO-$ , 其中  $R_1$  和  $R_2$  彼此独立并且独立于  $q$  的各个取值, 可为 H、-COOH、化学键或 OH,  $q$  为 1-6 ; R 如上定义 ;

[0489] ● NR, 其中 R 如上定义 ;

[0490] ●  $-((CR_3R_4)_{q_1}-NR-CO)_{2-4}-$ , 其中  $R_3$  和  $R_4$  彼此独立并且独立于  $q_1$  的各个取值, 可为 H、-COOH 或 OH,  $q_1$  为 1-6, R 如上定义 ; 或者

[0491] ● 化学键 ;

[0492]  $Q_7$  为 :

[0493] ●  $-(CH_2)_r-$ , 其中  $r$  为 4-22 的整数 ;

[0494] ● 包含 1、2 或 3 个  $-CH=CH-$  基团和多个  $-CH_2-$  基团的二价烃基链, 所述  $-CH_2-$  基团足以为链中提供范围为 4-22 个的碳原子总数 ;

[0495] 或者

[0496] ● 下式的二价烃基链 :

[0497]  $-(CH_2)_s-Q_8-(C_6H_4)_{v_1}-Q_9-(CH_2)_w-Q_{10}-(C_6H_4)_{v_2}-Q_{11}-(CH_2)_t-Q_{12}-(C_6H_4)_{v_3}-Q_{13}-(CH_2)_z-$  其中  $Q_8-Q_{13}$  可彼此独立地为 0、S 或化学键 ; 其中  $s$ 、 $w$ 、 $t$  和  $z$  彼此独立地为 0, 或者为 1-10 的整数致使  $s$ 、 $w$ 、 $t$  与  $z$  之和的范围为 4-22,  $v_1$ 、 $v_2$  和  $v_3$  可彼此独立地为 0 或 1, 前提条件是如果  $W_1$  为化学键则  $Q_7$  不为下式的二价烃基链 :  $-(CH_2)_{v_4}-C_6H_4-(CH_2)_{w_1}-$ , 其中  $v_4$  和  $w_1$  为整数或者其中之一为 0 致使  $v_4$  与  $w_1$  之和的范围为 6-22 ; 和

[0498]  $Z_1$  为 :

[0499] -COOH ;

[0500] -CO-Asp ;

[0501] -CO-Glu ;

[0502] -CO-Gly ;

[0503] -CO-Sar ;

[0504]  $-CH(COOH)_2$  ;

[0505]  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ;

[0506]  $-\text{SO}_3\text{H}$  ;

[0507]  $-\text{PO}_3\text{H}_2$  ;

[0508]  $-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$  ;

[0509]  $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$  ;

[0510] - 四唑基 ;或者

[0511]  $-\text{O}-\text{W}_2$ ,

[0512] 其中  $\text{W}_2$  为被一个或两个选自以下基团取代的亚芳基或亚杂芳基 :  $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$  和四唑基 ;

[0513] 前提条件是如果  $\text{W}_1$  为化学键,  $v_1$ 、 $v_2$  和  $v_3$  均为 0, 且  $\text{Q}_{8-13}$  均为化学键, 则  $\text{Z}_1$  为  $\text{O}-\text{W}_2$ 。

[0514] 22. 段落 1 或 21 的药物组合物, 其中  $\text{W}_1$  为亚苯基。

[0515] 23. 段落 1 或 21 的药物组合物, 其中  $\text{W}_1$  为含有氮、氧或硫的 5-7 元杂环环系。

[0516] 24. 段落 1、21 和 23 的药物组合物, 其中  $\text{W}_1$  为含有至少一个氧的 5 元杂环环系。

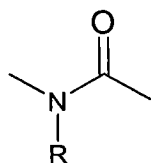
[0517] 25. 段落 21-24 的药物组合物, 其中  $\text{Q}_7$  为  $-(\text{CH}_2)_r-$ , 其中  $r$  为 4-22、8-20、12-20 或 14-18 范围的整数。

[0518] 26. 段落 21-24 的药物组合物, 其中  $\text{Q}_8$ 、 $\text{Q}_9$ 、 $\text{Q}_{12}$  和  $\text{Q}_{13}$  均为化学键,  $v_2$  为 1,  $v_1$  和  $v_3$  为 0。

[0519] 27. 段落 26 的药物组合物, 其中  $\text{Q}_{10}$  和  $\text{Q}_{11}$  为氧。

[0520] 28. 段落 21-27 的药物组合物, 其中  $\text{X}_4$  和  $\text{Y}_1$  为化学键,  $\text{X}_5$  为 :

[0521]

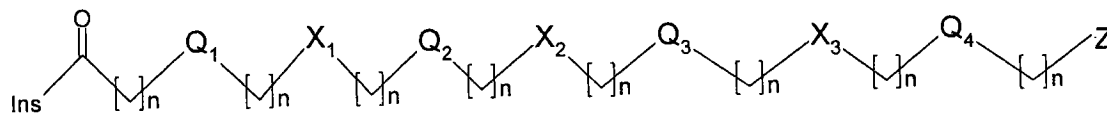


[0522] 其中  $\text{R}$  为  $-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$ , 其中  $p$  为 1-4。

[0523] 29. 段落 21-28 的药物组合物, 其中  $\text{Z}_1$  为  $-\text{COOH}$ 。

[0524] 30. 段落 1-15 和 17 的药物组合物, 其中酰化胰岛素及其任何  $\text{Zn}^{2+}$  复合物具有下列结构式 :

[0525]



[0526] 其中  $\text{Ins}$  为母体胰岛素部分, 通过 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基或胰岛素部分 B 链中存在的  $\text{Lys}$  残基的  $\epsilon$ -氨基通过酰胺键与侧链上的  $\text{CO}$ -基团结合 ;

[0527] 每个  $n$  独立地为 0、1、2、3、4、5 或 6 ;

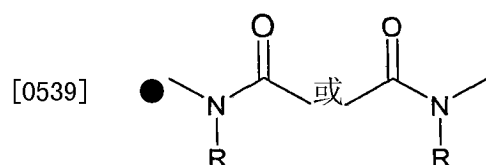
[0528]  $\text{Q}_1$ 、 $\text{Q}_2$ 、 $\text{Q}_3$  和  $\text{Q}_4$  可彼此独立地为 :

[0529] ●  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ 、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ 、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ 、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$  或  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ , 其中  $s$  为 1-20 ;

[0530] ●  $-(\text{CH}_2)_r-$ , 其中  $r$  为 4-22 的整数 ; 或者为包含 1、2 或 3 个  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基团和多个  $-\text{CH}_2-$  基团的二价烃基链, 所述  $-\text{CH}_2-$  基团足以为链中提供范围为 4-22 个的碳原子总数 ;

- [0531] ●  $-(\text{CH}_2)_t-$  或  $-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_t-$ , 其中  $t$  为 1-6 的整数 ;
- [0532] ●  $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_q-$ , 其中  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  可彼此独立地为  $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$  且每个碳上的  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  可以不同,  $q$  为 1-6,
- [0533] ●  $-((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-(\text{NHCO}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}-\text{NHCO})_{1-2}-((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-$ 、 $-((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-(\text{CONH}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}-\text{CONH})_{1-2}-((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-$ 、 $-((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-(\text{NHCO}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}-\text{CONH})_{1-2}-((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1$  或  $-((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-(\text{CONH}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}-\text{NHCO})_{1-2}-((\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1$ , 其中  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  可彼此独立地为  $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ , 且每个碳上的  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  可以不同,  $q_1$  为 1-6, 或者

- [0534] ● 化学键 ;
- [0535] 前提条件是  $\text{Q}_1-\text{Q}_4$  不相同 ;
- [0536]  $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$  和  $\text{X}_3$  独立地为 :
- [0537] ● 0 ;
- [0538] ● 化学键 ; 或者



- [0540] 其中  $\text{R}$  为氢或  $-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$  或  $-(\text{CH}_2)_p-$  四唑 -5- 基, 其中每个  $p$  与其它  $p$  相互独立为 1-6 范围的整数 ; 和

- [0541]  $Z$  为 :
- [0542]  $-\text{COOH}$  ;
- [0543]  $-\text{CO}-\text{Asp}$  ;
- [0544]  $-\text{CO}-\text{Glu}$  ;
- [0545]  $-\text{CO}-\text{Gly}$  ;
- [0546]  $-\text{CO}-\text{Sar}$  ;
- [0547]  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$  ;
- [0548]  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ;
- [0549]  $-\text{SO}_3\text{H}$  ;
- [0550]  $-\text{OSO}_3\text{H}$  ;
- [0551]  $-\text{OPO}_3\text{H}_2$  ;
- [0552]  $-\text{PO}_3\text{H}_2$  ; 或
- [0553]  $-\text{四唑}-5-$  基。
- [0554] 31. 段落 1 或 30 的药物组合物, 其中  $s$  的范围为 2-12、2-4 或 2-3。
- [0555] 32. 段落 1 或 30 的药物组合物, 其中  $s$  优选为 1。
- [0556] 33. 段落 30-32 的药物组合物, 其中  $Z$  为  $-\text{COOH}$ 。
- [0557] 34. 上述段落中任一项的药物组合物, 其中母体胰岛素是脱 B30 人胰岛素类似物。
- [0558] 35. 上述段落中任一项的药物组合物, 其中母体胰岛素选自人胰岛素、脱 B1 人胰岛素、脱 B30 人胰岛素、GlyA21 人胰岛素、GlyA21 脱 B30 人胰岛素、AspB28 人胰岛素、猪胰岛素、LysB28ProB29 人胰岛素、GlyA21ArgB31ArgB32 人胰岛素和 LysB3GluB29 人胰岛素或 AspB28 脱 B30 人胰岛素。

[0559] 36. 段落 1-16、21-29 和 34-35 的药物组合物, 其中酰化胰岛素选自  $N^{\epsilon B29}$ -[N-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -[N-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -[N-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -[N-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素;  $N^{\epsilon B29}$ -[N-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)N-(羧甲基)-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -[N-(HOOCC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-(亚呋喃基)CO] 脱 B30 人胰岛素和  $N^{\epsilon B29}$ -{4-羧基-4-[10-(4-羧基-苯氧基)-癸酰氨基]-丁酰基} 脱 B30 人胰岛素。

[0560] 37. 段落 1-15、17 和 30-35 的药物组合物, 其中酰化胰岛素选自  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-{2-(2-[ω-羧基-十五烷酰基-γ-谷氨酰基-(2-氨基-乙氧基)]-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基]-丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-{2-(2-[ω-羧基-十七烷酰基-γ-谷氨酰基-(2-氨基-乙氧基)]-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基]-丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基-十五烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (ω-[2-(2-{2-[2-(2-羧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙基氨基甲酰基]-十七烷酰基-α-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(ω-[2-(2-{2-[2-(2-羧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙基氨基甲酰基]-十七烷酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(2-(2-{2-[2-(ω-羧基-十七烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{2-[2-(3-[7-羧基庚酰氨基]丙氧基)乙氧基]-乙氧基}丙基氨基甲酰基)丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{4-[3-(7-羧基庚酰氨基)丙氧基]丁氧基}丙基氨基甲酰基)-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-{2-[2-(3-[9-羧基壬酰氨基]丙氧基)乙氧基]乙氧基}-丙基氨基甲酰基)丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-(9-羧基壬酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{4-[3-(9-羧基壬酰氨基)丙氧基]丁氧基}-丙基氨基甲酰基)丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(2-[3-(2-(2-{2-(7-羧基庚酰氨基)乙氧基}乙氧基)-乙基氨基甲酰基]丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基十五烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基)) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(2-{2-[2-(ω-羧基-十五烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙基氨基甲酰基)-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-{2-[2-(3-[ω-羧基十五烷酰氨基]丙氧基)乙氧基]-乙氧基}丙基氨基甲酰基)丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{4-[3-(ω-羧基十一烷酰氨基)丙氧基]丁氧基}丙基氨基甲酰基)丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30



人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-(3-(3-{4-[3-(ω-羧基十三烷酰氨基)丙氧基]丁氧基丙基氨基甲酰基}丙酰基-γ-谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-(3-(2-{2-[2-(ω-羧基十一烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基-γ-谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-(3-(2-{2-[2-(ω-羧基十三烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基-γ-谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基-十五烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基-γ-D-谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-{3-[2-(2-{2-[2-(7-羧基庚酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基-γ-谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-{3-[2-(2-{2-[2-(9-羧基壬酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基-γ-谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基十一烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基-γ-谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基十三烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基-γ-谷氨酰基}脱 B30 人胰岛素。

[0561] 38. 上述段落中任一项的药物组合物,该组合物的 pH 介于约 6.5 和 8.5 之间。

[0562] 39. 上述段落中任一项的药物组合物,其还包含速效胰岛素。

[0563] 40. 段落 1 和 39 的药物组合物,其中至少 85%的速效胰岛素以速效胰岛素六聚体或者分子量小于速效胰岛素六聚体的复合物存在。

[0564] 41. 段落 1 和 39-40 的药物组合物,其中至少 92%的速效胰岛素以速效胰岛素六聚体或者分子量小于速效胰岛素六聚体的复合物存在。

[0565] 42. 段落 1 和 39-41 的药物组合物,其中至少 95%的速效胰岛素以速效胰岛素六聚体或者分子量小于速效胰岛素六聚体的复合物存在。

[0566] 43. 段落 1 和 39-42 的药物组合物,其中至少 97%的速效胰岛素以速效胰岛素六聚体或者分子量小于速效胰岛素六聚体的复合物存在。

[0567] 44. 段落 1 和 39-43 的药物组合物,其中至少 99%的速效胰岛素以速效胰岛素六聚体或者分子量小于速效胰岛素六聚体的复合物存在。

[0568] 45. 段落 39-44 的药物组合物,其中速效胰岛素是 AspB28 人胰岛素、LysB3GluB29 人胰岛素和 / 或 LysB28ProB29 人胰岛素。

[0569] 46. 生产包含酰化胰岛素的药物组合物的方法,其中将每 6 分子酰化胰岛素多于约 4 个锌原子加到组合物中。

[0570] 47. 段落 46 的方法,其中将每 6 分子酰化胰岛素多达约 12 个锌原子加到组合物中。

[0571] 48. 段落 46-47 中任一项的方法,其中将每 6 分子酰化胰岛素约 4.3 个至约 12 个锌原子加到组合物中。

[0572] 49. 段落 46-48 的方法,其中在加入防腐剂之前将锌加到组合物中。

[0573] 50. 段落 46-49 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 1 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0574] 51. 段落 46-50 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 2 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0575] 52. 段落 46-51 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0576] 53. 段落 46-52 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0577] 54. 段落 46-53 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 5 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0578] 55. 段落 46-48 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之后将锌加到组合物中。

[0579] 56. 段落 46-48 和 55 的方法,其中在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素至少 0.5 个锌原子加到组合物中。

[0580] 57. 段落 46-48 和 55-56 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素至少 1 个锌原子加到组合物中。

[0581] 58. 上述方法段落中任一项的方法,其中部分锌是在加入防腐剂之前加入的,部分锌是在加入防腐剂之后加入的。

[0582] 59. 上述方法段落中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数为至少 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素,并且在加入防腐剂之后所加的锌原子数为至少 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0583] 60. 上述方法段落中任一项的方法,其中防腐剂是苯酚和 / 或间甲酚。

[0584] 61. 上述方法段落中任一项的方法,其中表面活性剂与药物组合物相混合。

[0585] 62. 上述方法段落中任一项的方法,其中酰化胰岛素及其任何  $Zn^{2+}$  复合物具有连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的侧链,该侧链具有下列通式:

[0586]  $-W-X-Y-Z_2$

[0587] 其中 W 为:

[0588] ● 在侧链上具有羧酸基团的  $\alpha$ -氨基酸残基,该残基用其一个羧酸基团与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基一起形成酰胺基团;

[0589] ● 由 2、3 或 4 个  $\alpha$ -氨基酸残基通过酰胺羰基键连接在一起所组成的链,该链通过酰胺键连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上, W 的氨基酸残基选自具有中性侧链的氨基酸残基和在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基,使得 W 具有至少一个在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基;或者

[0590] ● 自 X 至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的共价键;

[0591] X 为:

[0592] ●  $-\underline{C}O-$ ;

[0593] ●  $-\underline{C}H(COOH)\underline{C}O-$ ;

[0594] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)CH_2\underline{C}O-$ ;

[0595] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)CH_2CON(CH_2COOH)CH_2\underline{C}O-$ ;

[0596] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{C}O-$ ;

[0597] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{C}O-$ ;

[0598] ●  $-\underline{C}O-NHCH(COOH)(CH_2)_4NH\underline{C}O-$ ;

[0599] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2CH_2COOH)CH_2\underline{C}O-$ ;或者

[0600] ●  $-\underline{C}O-N(CH_2COOH)CH_2CH_2\underline{C}O-$ ,

[0601] 其中

[0602] a) 如果 W 是氨基酸残基或氨基酸残基链,则通过下划线碳上的键与 W 上的氨基形

成酰胺键,或者

[0603] b) 如果 W 是共价键,则通过下划线羰基碳上的键与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键;

[0604] Y 为:

[0605] ●  $-(\text{CH}_2)_m-$ , 其中 m 是 6-32 范围内的整数;

[0606] ● 包含 1、2 或 3 个  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基团和多个  $-\text{CH}_2-$  基团的二价烃基链,所述  $-\text{CH}_2-$  基团足以为链中提供范围为 10-32 个的碳原子总数;

[0607] 和

[0608]  $Z_2$  为:

[0609] ●  $-\text{COOH}$ ;

[0610] ●  $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;

[0611] ●  $-\text{CO}-\text{Glu}$ ;

[0612] ●  $-\text{CO}-\text{Gly}$ ;

[0613] ●  $-\text{CO}-\text{Sar}$ ;

[0614] ●  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ;

[0615] ●  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;

[0616] ●  $-\text{SO}_3\text{H}$ ;或者

[0617] ●  $-\text{PO}_3\text{H}$ ,

[0618] 前提条件是如果 W 为共价键且 X 为  $-\text{CO}-$ ,则 Z 不是  $-\text{COOH}$ 。

[0619] 63. 上述方法段落中任一项的方法,其中酰化胰岛素选自

[0620]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0621]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{15}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0622]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0623]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{17}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0624]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0625]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma-\text{Glu}-\text{N}(-\gamma-\text{Glu}))$  脱 B30 人胰岛素;

[0626]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Asp}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0627]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Glu}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0628]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Glu}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-))$  脱 B30 人胰岛素;

[0629]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Asp}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-))$  脱 B30 人胰岛素;

[0630]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\alpha-\text{Glu}-\text{N}-(\beta-\text{Asp}))$  脱 B30 人胰岛素;

[0631]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Gly}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0632]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Sar}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0633]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0634]  $(\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\beta-\text{Asp})$  脱 B30 人胰岛素;

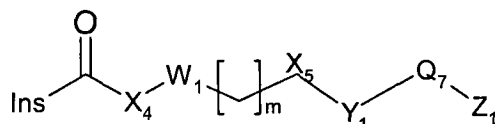
[0635]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\alpha-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0636]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma-\text{D}-\text{Glu})$  脱 B30 人胰岛素;

[0637]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta-\text{D}-\text{Asp})$  脱 B30 人胰岛素;

[0638]  $\text{N}^{\epsilon \text{ B29}}(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta-\text{D}-\text{Asp})$  脱 B30 人胰岛素;

- [0639]  $N^{\epsilon B29}$  (N-HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO-β-D-Asp) 脱 B30 人胰岛素；  
 [0640]  $N^{\epsilon B29}$  (N-HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO-IDA) 脱 B30 人胰岛素；  
 [0641]  $N^{\epsilon B29}$  [N-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-N-(羧乙基)-Gly] 脱 B30 人胰岛素；  
 [0642]  $N^{\epsilon B29}$ -[N-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N-(羧乙基)-Gly] 脱 B30 人胰岛素；和  
 [0643]  $N^{\epsilon B29}$  [N-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N-(羧甲基)-β-Ala] 脱 B30 人胰岛素。  
 [0644] 64. 段落 46-61 的方法，其中酰化胰岛素及其任何 Zn<sup>2+</sup> 复合物具有下列结构式：  
 [0645]



[0646] 其中 Ins 为母体胰岛素部分，通过 B 链 N 端氨基酸残基的 α-氨基或胰岛素部分 B 链中存在的 Lys 残基的 ε-氨基通过酰胺键与侧链上的 CO- 基团结合；

[0647] X<sub>4</sub> 为：

[0648] ● -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>，其中 n 为 1、2、3、4、5 或 6；

[0649] ● NR，其中 R 为氢或 -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-COOH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-SO<sub>3</sub>H、-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-O-SO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-O-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、被 1 或 2 个 -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-O-COOH 基团取代的亚芳基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-四唑基，其中 p 是 1-6 范围内的整数；

[0650] ● -(CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NR-CO-，其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 彼此独立并且独立于 q 的各个取值，可为 H、-COOH 或 OH，q 为 1-6，R 如上定义；

[0651] ● -((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub>-NR-CO)<sub>2-4</sub>-，其中 R<sub>3</sub> 和 R<sub>4</sub> 彼此独立并且独立于 q<sub>1</sub> 的各个取值，可为 H、-COOH 或 OH，q<sub>1</sub> 为 1-6，R 如上定义；

[0652] 或者

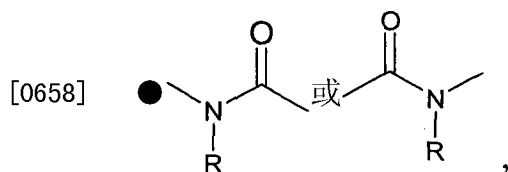
[0653] ● 化学键；

[0654] W<sub>1</sub> 为亚芳基或亚杂芳基，可被一个或两个选自以下的基团取代：-COOH、-SO<sub>3</sub>H、-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 和四唑基，或者 W<sub>1</sub> 为化学键；

[0655] m 为 0、1、2、3、4、5 或 6；

[0656] X<sub>5</sub> 为：

[0657] ● -O-；



[0659] 其中 R 如上定义；或者

[0660] ● 化学键；

[0661] Y<sub>1</sub> 为：

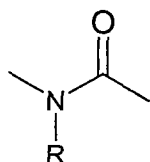
[0662] ● -(CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NR-CO-，其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 彼此独立并且独立于 q 的各个取值，可为 H、-COOH、化学键或 OH，q 为 1-6；R 如上定义；

[0663] ● NR，其中 R 如上定义；

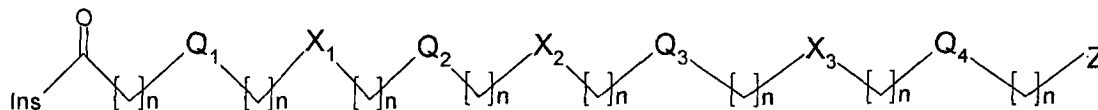
[0664] ● -((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub>-NR-CO)<sub>2-4</sub>-，其中 R<sub>3</sub> 和 R<sub>4</sub> 彼此独立并且独立于 q<sub>1</sub> 的各个取值，可为 H、-COOH 或 OH，q<sub>1</sub> 为 1-6，R 如上定义；

- [0665] 或者
- [0666] ●化学键；
- [0667]  $Q_7$  为：
- [0668] ●  $-(CH_2)_r-$ ，其中  $r$  为 4-22 的整数；
- [0669] ●包含 1、2 或 3 个  $-CH=CH-$  基团和多个  $-CH_2-$  基团的二价烃基链，所述  $-CH_2-$  基团足以为链中提供范围为 4-22 个的碳原子总数；
- [0670] 或者
- [0671] ●下式的二价烃基链：
- [0672]  $-(CH_2)_s-Q_8-(C_6H_4)_{v_1}-Q_9-(CH_2)_w-Q_{10}-(C_6H_4)_{v_2}-Q_{11}-(CH_2)_t-Q_{12}-(C_6H_4)_{v_3}-Q_{13}-(CH_2)_z-$  其中  $Q_8-Q_{13}$  可彼此独立地为 0、S 或化学键；其中  $s$ 、 $w$ 、 $t$  和  $z$  彼此独立地为 0，或者为 1-10 的整数致使  $s$ 、 $w$ 、 $t$  与  $z$  之和的范围为 4-22， $v_1$ 、 $v_2$  和  $v_3$  可彼此独立地为 0 或 1，前提条件是如果  $W_1$  为化学键则  $Q_7$  不为下式的二价烃基链： $-(CH_2)_{v_4}C_6H_4(CH_2)_{w_1}-$ ，其中  $v_4$  和  $w_1$  为整数或者其中之一为 0 致使  $v_4$  与  $w_1$  之和的范围为 6-22；和
- [0673]  $Z_1$  为：
- [0674]  $-COOH$ ；
- [0675]  $-CO-Asp$ ；
- [0676]  $-CO-Glu$ ；
- [0677]  $-CO-Gly$ ；
- [0678]  $-CO-Sar$ ；
- [0679]  $-CH(COOH)_2$ ；
- [0680]  $-N(CH_2COOH)_2$ ；
- [0681]  $-SO_3H$ ；
- [0682]  $-PO_3H_2$ ；
- [0683]  $O-SO_3H$ ；
- [0684]  $O-PO_3H_2$ ；
- [0685] -四唑基；或者
- [0686]  $-O-W_2$ ，
- [0687] 其中  $W_2$  为被一个或两个选自以下基团取代的亚芳基或亚杂芳基： $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-PO_3H_2$  和四唑基；
- [0688] 前提条件是如果  $W_1$  为化学键， $v_1$ 、 $v_2$  和  $v_3$  均为 0，且  $Q_{8-13}$  均为化学键，则  $Z_1$  为  $O-W_2$ 。
- [0689] 65. 段落 46 和 64 的方法，其中  $W_1$  为亚苯基。
- [0690] 66. 段落 46 和 64 的方法，其中  $W_1$  为含有氮、氧或硫的 5-7 元杂环环系。
- [0691] 67. 段落 66 的方法，其中  $W_1$  为含有至少一个氧的 5 元杂环环系。
- [0692] 68. 段落 46 和 64-67 的方法，其中  $Q_7$  为  $-(CH_2)_r-$ ，其中  $r$  为 4-22、8-20、12-20 或 14-18 范围的整数。
- [0693] 69. 段落 46 和 64-68 的方法，其中  $Q_8$ 、 $Q_9$ 、 $Q_{12}$  和  $Q_{13}$  均为化学键， $v_2$  为 1， $v_1$  和  $v_3$  为 0。
- [0694] 70. 段落 69 的方法，其中  $Q_{10}$  和  $Q_{11}$  为氧。
- [0695] 71. 段落 64 的方法，其中  $X_4$  和  $Y_1$  为化学键， $X_5$  为：

[0696]

[0697] 其中 R 为  $-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$ , 其中 p 为 1-4。[0698] 72. 段落 64-71 的方法, 其中  $Z_1$  为  $-\text{COOH}$ 。[0699] 73. 段落 46-61 的方法, 其中酰化胰岛素及其任何  $\text{Zn}^{2+}$  复合物具有下列结构式:

[0700]

[0701] 其中 Ins 为母体胰岛素部分, 通过 B 链 N 端氨基酸残基的  $\alpha$ -氨基或胰岛素部分 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基通过酰胺键与侧链上的 CO- 基团结合;

[0702] 每个 n 独立地为 0、1、2、3、4、5 或 6;

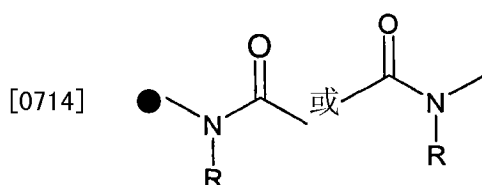
[0703]  $Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$  和  $Q_4$  可彼此独立地为:[0704] ●  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ 、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ 、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ 、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$  或  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ , 其中 s 为 1-20;[0705] ●  $-(\text{CH}_2)_r-$ , 其中 r 为 4-22 的整数; 或为包含 1、2 或 3 个  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基团和多个  $-\text{CH}_2-$  基团的二价烃基链, 所述  $-\text{CH}_2-$  基团足以提供范围为 4-22 个的碳原子总数;[0706] ●  $-(\text{CH}_2)_t-$  或  $-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_t-$ , 其中 t 为 1-6 的整数;[0707] ●  $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_q-$ , 其中  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  可彼此独立地为 H、 $-\text{COOH}$ 、 $(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$ , 且每个碳上的  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  可以不同, q 为 1-6,[0708] ●  $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-(\text{NHCO}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}-\text{NHCO})_{1-2}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1$ 、 $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-(\text{CONH}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}-\text{CONH})_{1-2}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1$ 、 $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-(\text{NHCO}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}-\text{CONH})_{1-2}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1$  或  $-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1-(\text{CONH}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1}-\text{NHCO})_{1-2}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q_1})_1$ , 其中  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  可彼此独立地为 H、 $-\text{COOH}$ , 且每个碳上的  $\text{R}_3$  和  $\text{R}_4$  可以不同,  $q_1$  为 1-6, 或者

[0709] ● 化学键;

[0710] 前提条件是  $Q_1-Q_4$  不相同;[0711]  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  独立地为:

[0712] ● 0;

[0713] ● 化学键; 或者

[0714] ● 其中 R 为氢或  $-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$  或  $-(\text{CH}_2)_p-$  四唑-5-基, 其中每个 p 与其它 p 相互独立为 1-6 范围的整数; 和

[0716] Z 为:

[0717]  $-\text{COOH}$ ;

- [0718] -CO-Asp ;
- [0719] -CO-Glu ;
- [0720] -CO-Gly ;
- [0721] -CO-Sar ;
- [0722] -CH(COOH)<sub>2</sub> ;
- [0723] -N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub> ;
- [0724] -SO<sub>3</sub>H ;
- [0725] -OSO<sub>3</sub>H ;
- [0726] -OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> ;
- [0727] -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> ;或
- [0728] - 四唑 -5- 基。
- [0729] 74. 段落 73 的方法, 其中 s 的范围为 2-12、2-4 或 2-3。
- [0730] 75. 段落 73 的方法, 其中 s 优选为 1。
- [0731] 76. 段落 73-75 的方法, 其中 Z 为 -COOH。
- [0732] 77. 上述方法段落中任一项的方法, 其中母体胰岛素是脱 B30 人胰岛素类似物。
- [0733] 78. 上述方法段落中任一项的方法, 其中母体胰岛素选自人胰岛素、脱 B1 人胰岛素、脱 B30 人胰岛素、GlyA21 人胰岛素、GlyA21 脱 B30 人胰岛素、AspB28 人胰岛素、猪胰岛素、LysB28ProB29 人胰岛素、GlyA21ArgB31ArgB32 人胰岛素和 LysB3GluB29 人胰岛素或 AspB28 脱 B30 人胰岛素。
- [0734] 79. 段落 46-61、64-72 或 77-78 的方法, 其中酰化胰岛素选自 N<sup>ε</sup>B29-[N-(H00C(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-[N-(H00C(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-[N-(H00C(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-[N-(H00C(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-[N-(H00C(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N-(羧甲基)-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-[N-(H00C(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-N-(羧乙基)-CH<sub>2</sub>-(亚呋喃基)CO] 脱 B30 人胰岛素和 N<sup>ε</sup>B29-[4-羧基-4-[10-(4-羧基-苯氧基)-癸酰氨基]-丁酰基] 脱 B30 人胰岛素。
- [0735] 80. 段落 46-61 或 73-78 中任一项的方法, 其中酰化胰岛素选自 N<sup>ε</sup>B29-(3-[2-{2-(2-[ω-羧基-十五烷酰基-γ-谷氨酰基-(2-氨基-乙氧基)]-乙氧基)-乙氧基}-丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-(3-[2-{2-(2-[ω-羧基-十七烷酰基-γ-谷氨酰基-(2-氨基-乙氧基)]-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基]-丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基-十五烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29(ω-[2-(2-{2-[2-(2-羧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙基氨基甲酰基]-十七烷酰基-α-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-(ω-[2-(2-{2-[2-(2-羧基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙基氨基甲酰基]-十七烷酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-3-[2-(2-{2-[2-(ω-羧基-十七烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-丙酰基-γ-谷氨酰基) 脱 B30 人胰岛素、N<sup>ε</sup>B29-(3-(3-{2-[2-(3-[7-羧基庚酰氨基]丙氧基)乙氧基]-乙氧基}丙基氨基甲酰基)丙酰基) 脱 B30 人胰岛素、

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{4-[3-(7-羧基庚酰氨基)丙氧基]丁氧基}丙基氨基甲酰基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-{2-[2-(3-[9-羧基壬酰氨基]丙氧基)乙氧基]乙氧基}-丙基氨基甲酰基)丙酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-(9-羧基壬酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-{4-[3-(9-羧基壬酰氨基)丙氧基]丁氧基}-丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (2-[3-(2-(2-{2-(7-羧基庚酰氨基)乙氧基}乙氧基)-乙基氨基甲酰基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基十五烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基))脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基-十三烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基-十五烷酰氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙基氨基甲酰基)-丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{2-[2-(3-[ $\omega$ -羧基十五烷酰氨基]丙氧基)乙氧基]-乙氧基}丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{4-[3-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)丙氧基]丁氧基丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(3-{4-[3-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)丙氧基]丁氧基丙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ (3-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基-十五烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -D-谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(7-羧基庚酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(9-羧基壬酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基十一烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素、 $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-( $\omega$ -羧基十三烷酰氨基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)乙氧基]丙酰基- $\gamma$ -谷氨酰基)脱 B30 人胰岛素。

[0736] 81. 上述方法段落中任一项的方法,其中速效胰岛素与所述组合物相混合。

[0737] 82. 段落 46 和 80 的方法,其中速效胰岛素是 AspB28 人胰岛素、LysB3GluB29 人胰岛素和 / 或 LysB28ProB29 人胰岛素。

[0738] 83. 段落 1-45 中任一项的组合物在制备用于治疗糖尿病的药物中的用途。

[0739] 84. 一种治疗需要这种治疗的患者的糖尿病的药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的段落 1-45 的药物组合物以及药学上可接受的载体。

[0740] 85. 一种治疗需要这种治疗的患者的糖尿病的方法,该方法包括给予患者治疗有效量的段落 1-45 的药物组合物以及药学上可接受的载体。



- [0741] 86. 用于糖尿病肺部治疗的段落 85 的方法。
- [0742] 87. 段落 1-45 的药物组合物在制备用于治疗以下疾病的药物组合物中的用途：I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症。
- [0743] 88. 实施例记载的组合物。
- [0744] 以下段落概括了本发明的另一方面。
- [0745] 91. 可溶性药物组合物，其包含酰化胰岛素，并且还包含多于 4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0746] 92. 段落 91 的可溶性药物组合物，其包含酰化胰岛素，并且还包含多于 5 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0747] 93. 段落 91-92 的药物组合物，其包含多达约 14 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0748] 94. 段落 91-93 的药物组合物，其包含约 5 个至约 14 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0749] 95. 段落 91-94 中任一项的药物组合物，其包含约 5 个至约 13 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0750] 96. 段落 91-95 中任一项的药物组合物，其包含约 5 个至约 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0751] 97. 段落 91-96 中任一项的药物组合物，其包含约 5.3 个至约 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0752] 98. 段落 91-97 中任一项的药物组合物，其包含约 5.5 个至约 11.4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0753] 99. 段落 91-98 中任一项的药物组合物，其包含约 5.5 个至约 10 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。
- [0754] 100. 段落 91-99 中任一项的药物组合物，其中酰化胰岛素是 LysB29(N $\epsilon$ -十四烷酰基)脱 B30 人胰岛素或 Lys<sup>B29</sup>N $\epsilon$ -石胆酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素。
- [0755] 101. 段落 91-100 中任一项的药物组合物，前提条件是酰化胰岛素不具有连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的侧链，该侧链具有下列通式：
- [0756] -W-X-Y-Z
- [0757] 其中 W 为：
- [0758] ● 在侧链上具有羧酸基团的  $\alpha$ -氨基酸残基，该残基用其一个羧酸基团与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基一起形成酰胺基团；
- [0759] ● 由 2、3 或 4 个  $\alpha$ -氨基酸残基通过酰胺羰基键连接在一起所组成的链，该链通过酰胺键连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上，W 的氨基酸残基选自具有中性侧链的氨基酸残基和在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基，使得 W 具有至少一个在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基；或者
- [0760] ● 自 X 至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的共价键；
- [0761] X 为：
- [0762] ● -CO-；
- [0763] ● -CH(COOH)CO-；
- [0764] ● -CO-N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CO-；

- [0765] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}-$  ;
- [0766] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$  ;
- [0767] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$  ;
- [0768] ●  $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NHCO}-$  ;
- [0769] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}-$  ;或者
- [0770] ●  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$  ,
- [0771] 其中
- [0772] a) 如果 W 是氨基酸残基或氨基酸残基链,则通过下划线碳上的键与 W 上的氨基形成酰胺键,或者
- [0773] b) 如果 W 是共价键,则通过下划线羰基碳上的键与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键 ;
- [0774] Y 为 :
- [0775] ●  $-(\text{CH}_2)_m-$ , 其中 m 是 6-32 范围内的整数 ;
- [0776] ● 包含 1、2 或 3 个  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基团和多个  $-\text{CH}_2-$  基团的二价烃基链,所述  $-\text{CH}_2-$  基团足以为链中提供范围为 10-32 个的碳原子总数 ;
- [0777] 和
- [0778] Z 为 :
- [0779] ●  $-\text{COOH}$  ;
- [0780] ●  $-\text{CO}-\text{Asp}$  ;
- [0781] ●  $-\text{CO}-\text{Glu}$  ;
- [0782] ●  $-\text{CO}-\text{Gly}$  ;
- [0783] ●  $-\text{CO}-\text{Sar}$  ;
- [0784] ●  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$  ;
- [0785] ●  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$  ;
- [0786] ●  $-\text{SO}_3\text{H}$  ;或者
- [0787] ●  $-\text{PO}_3\text{H}$ 。
- [0788] 101. 段落 91-101 中任一项的药物组合物,前提条件是酰化胰岛素不是  $\text{Lys}^{\text{B29}}\text{N}^\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素。
- [0789] 102. 上述段落中任一项的药物组合物,该药物组合物的 pH 介于约 6.5 和 8.5 之间。
- [0790] 103. 上述段落中任一项的药物组合物,其还包含速效胰岛素。
- [0791] 104. 段落 103 的药物组合物,其中速效胰岛素是 AspB28 人胰岛素和 / 或  $\text{LysB28ProB29}$  人胰岛素。
- [0792] 109. 生产包含酰化胰岛素的药物组合物的方法,其中将每 6 分子酰化胰岛素多于约 4 个锌原子加到组合物中。
- [0793] 在本发明的另一个方面,将每 6 分子酰化胰岛素多于约 4.3 个锌原子加到组合物中,或者将每 6 分子酰化胰岛素多于约 4.5 个锌原子加到组合物中,或者将每 6 分子酰化胰岛素多于约 5 个锌原子加到组合物中。
- [0794] 110. 段落 109 的方法,其中将每 6 分子酰化胰岛素多达约 14 个锌原子加到组合物

中。

[0795] 111. 段落 109-110 中任一项的方法,其中将每 6 分子酰化胰岛素多达约 4.3 个至约 14 个锌原子加到组合物中。

[0796] 在本发明的另一个方面,将每 6 分子酰化胰岛素约 4.5 个至约 12 个锌原子加到组合物中,或者更优选将每 6 分子酰化胰岛素约 5 个至约 11.4 个锌原子加到组合物中,或者甚至更优选将每 6 分子酰化胰岛素介于约 5.5 个至约 10 个锌原子加到组合物中

[0797] 112. 段落 109-111 的方法,其中在加入防腐剂之前将锌加到组合物中。

[0798] 113. 段落 109-112 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 1 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0799] 114. 段落 109-113 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 2 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0800] 115. 段落 109-114 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0801] 116. 段落 109-115 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0802] 117. 段落 109-116 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数多于 5 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素。

[0803] 在本发明的另一个方面,在加入防腐剂之前将每 6 分子酰化胰岛素约 4.5 个至约 12 个锌原子加到组合物中,或者更优选在加入防腐剂之前将每 6 分子酰化胰岛素约 5 个至约 11.4 个锌原子加到组合物中,或者甚至更优选在加入防腐剂之前将每 6 分子酰化胰岛素约 5.5 个至约 10 个锌原子加到组合物中。

[0804] 118. 段落 109-111 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之后将锌加到组合物中。

[0805] 119. 段落 118 的方法,其中在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素至少 0.5 个锌原子加到组合物中。

[0806] 120. 段落 118-119 中任一项的方法,其中在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素至少 1 个锌原子加到组合物中。

[0807] 在本发明的另一个方面,在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 2 个以上的锌原子加到组合物中,或者在加入防腐剂后将每 6 分子酰化胰岛素约 3 个以上的锌原子加到组合物中,或者在加入防腐剂后将每 6 分子酰化胰岛素约 4 个以上的锌原子加到组合物中。

[0808] 在本发明的另一个方面,在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 4.5 个至约 12 个锌原子加到组合物中,或者更优选在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 5 个至约 11.4 个锌原子加到组合物中,或者甚至更优选在加入防腐剂之后将每 6 分子酰化胰岛素约 5.5 个至约 10 个锌原子加到组合物中。

[0809] 121. 段落 109-120 中任一项的方法,其中部分锌是在加入防腐剂之前加入的,部分锌是在加入防腐剂之后加入的。

[0810] 一方面,该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子,并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子;或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子,并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加

入至少 2-3 个锌原子；或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子，并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入多达约 11 个锌原子。

[0811] 一方面，该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个锌原子，并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子；或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个锌原子，并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2-3 个锌原子；或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2 个锌原子，并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入多达约 10 个锌原子。

[0812] 一方面，该方法包括在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 3 个锌原子，并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 1 个锌原子；或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 3 个锌原子，并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入至少 2-3 个锌原子；或者在加入防腐剂之前每 6 分子酰化胰岛素加入至少 3 个锌原子，并且在加入防腐剂之后每 6 分子酰化胰岛素加入多达约 9 个锌原子。

[0813] 122. 段落 121 中任一项的方法，其中在加入防腐剂之前所加的锌原子数为至少 3 个锌原子/6 分子酰化胰岛素，并且在加入防腐剂之后所加的锌原子数为至少 3 个锌原子/6 分子酰化胰岛素。

[0814] 123. 段落 112-122 中任一项的方法，其中防腐剂是苯酚和 / 或间甲酚。

[0815] 124. 段落 109-123 中任一项的方法，其中酰化胰岛素是 LysB29(N $\epsilon$ -十四烷酰基)脱 B30 人胰岛素或 Lys<sup>B29</sup>N $\epsilon$ -石胆酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素。

[0816] 125. 段落 109-124 中任一项的方法，前提条件是酰化胰岛素不具有连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的侧链，该侧链具有下列通式：

[0817] -W-X-Y-Z

[0818] 其中 W 为：

[0819] ● 在侧链上具有羧酸基团的  $\alpha$ -氨基酸残基，该残基用其一个羧酸基团与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基一起形成酰胺基团；

[0820] ● 由 2、3 或 4 个  $\alpha$ -氨基酸残基通过酰胺羰基键连接在一起所组成的链，该链通过酰胺键连接至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上，W 的氨基酸残基选自具有中性侧链的氨基酸残基和在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基，使得 W 具有至少一个在侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基；或者

[0821] ● 自 X 至母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基上的共价键；

[0822] X 为：

[0823] ● -C(=O)-；

[0824] ● -CH(COOH)C(=O)-；

[0825] ● -N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>C(=O)-；

[0826] ● -N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>C(=O)-；

[0827] ● -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-；

[0828] ● -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-；

[0829] ● -NHCH(COOH)(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=O)-；

[0830] ● -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>C(=O)-；或者

[0831] ● -N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-，

[0832] 其中

[0833] a) 如果 W 是氨基酸残基或氨基酸残基链, 则通过下划线碳上的键与 W 上的氨基形成酰胺键, 或者

[0834] b) 如果 W 是共价键, 则通过下划线羰基碳上的键与母体胰岛素 B 链中存在的 Lys 残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键;

[0835] Y 为:

[0836] ●  $-(\text{CH}_2)_m-$ , 其中 m 是 6-32 范围内的整数;

[0837] ● 包含 1、2 或 3 个  $-\text{CH}=\text{CH}-$  基团和多个  $-\text{CH}_2-$  基团的二价烃基链, 所述  $-\text{CH}_2-$  基团足以为链中提供范围为 10-32 个的碳原子总数; 和

[0838] Z 为:

[0839] ●  $-\text{COOH}$ ;

[0840] ●  $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;

[0841] ●  $-\text{CO}-\text{Glu}$ ;

[0842] ●  $-\text{CO}-\text{Gly}$ ;

[0843] ●  $-\text{CO}-\text{Sar}$ ;

[0844] ●  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ;

[0845] ●  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;

[0846] ●  $-\text{SO}_3\text{H}$ ; 或者

[0847] ●  $-\text{PO}_3\text{H}$ 。

[0848] 126. 段落 125 中任一项的方法, 前提条件是酰化胰岛素不是  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素。

[0849] 127. 段落 109-126 中任一项的方法, 其中将速效胰岛素加到组合物中。

[0850] 128. 段落 127 的方法, 其中速效胰岛素是 AspB28 人胰岛素和 / 或  $\text{LysB28ProB29}$  人胰岛素。

[0851] 129. 段落 91-104 中任一项的组合物在制备用于治疗糖尿病的药物中的用途。

[0852] 附图简述

[0853] 所有附图均为 Superose 6HR 柱上段 (the upper panel) 在  $37^\circ\text{C}$  下用等渗盐水洗脱的  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素制剂和 / 或门冬胰岛素制剂大小排阻色谱法的结果, 下段中相应 14 种流分的内容物包括由高分子量流分至低分子量流分或胰岛素单体流分。

[0854] 附图中使用下列缩写词:

[0855] Aspart: 门冬胰岛素

[0856] Zn/6Ins: 锌原子 /6 分子胰岛素

[0857] Zn/Acyl-ins: 锌原子 /6 分子酰化胰岛素

[0858] Acyl-ins: 酰化胰岛素

[0859] 图 1: 具有 3 个锌原子 /6 分子门冬胰岛素的门冬胰岛素  $600 \mu\text{M}$ 。

[0860] 图 2: 具有 6 个锌原子 /6 分子门冬胰岛素的门冬胰岛素  $600 \mu\text{M}$ 。

[0861] 图 3: 具有 3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素  $600 \mu\text{M}$ 。

[0862] 图 4:具有 4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu\text{M}$ 。

[0863] 图 5:具有 6 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu\text{M}$ 。

[0864] 图 6:具有 8 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu\text{M}$ 。

[0865] 图 7:具有含锌总量为 3.6 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的门冬胰岛素 180  $\mu\text{M}$  与  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 840  $\mu\text{M}$  的混合物。

[0866] 图 8:具有含锌总量为 4.3 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的门冬胰岛素 180  $\mu\text{M}$  与  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 420  $\mu\text{M}$  的混合物。

[0867] 图 9:具有含锌总量为 4.5 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的门冬胰岛素 300  $\mu\text{M}$  与  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu\text{M}$  的混合物。

[0868] 图 10:具有含锌总量为 8.6 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的门冬胰岛素 180  $\mu\text{M}$  与  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 420  $\mu\text{M}$  的混合物。

[0869] 图 11:具有含锌总量为 11.4 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的门冬胰岛素 180  $\mu\text{M}$  与  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 420  $\mu\text{M}$  的混合物。

[0870] 图 12:具有含锌总量为 12 个锌原子 /6 分子酰化胰岛素的门冬胰岛素 300  $\mu\text{M}$  与  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 300  $\mu\text{M}$  的混合物。

[0871] 图 13:门冬胰岛素单独给予 (IV, 短划线,  $N = 8$ ) 及与  $\text{B29N}^\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素混合按低锌浓度给予 (I, 3.38Zn/6 胰岛素衍生物, 实线,  $N = 8$ ) 以及按高锌浓度给予 (II, 6Zn/6 胰岛素衍生物, 点划线,  $N = 7$ ) 的血浆分布图。

[0872] 图 14:  $\text{B29N}^\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素单独给予 (III, 短划线,  $N = 8$ ) 及与门冬胰岛素按低锌浓度给予 (I, 3.38Zn/6 胰岛素衍生物, 实线,  $N = 8$ ) 和按高锌浓度给予 (II, 6Zn/6 胰岛素衍生物, 点划线,  $N = 7$ ) 的血浆分布图。

[0873] 发明详述

[0874] 本发明基于以下预料不到的发现: 锌含量增加超过平常水平 (每 6 分子酰化胰岛素 2-4 个锌原子) 时, 某些酰化胰岛素衍生物、特别是酰化胰岛素  $\text{Lys}^{\text{B29N}^\epsilon}$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素中的中等分子量和高分子量胰岛素复合物的比例增加。

[0875] 根据本发明, 可设计出含有具备所需缔合程度的胰岛素的胰岛素制剂。

[0876] 此外, 当酰化胰岛素与速效胰岛素类似物混合时, 因为不出现钝化, 因此会得到真正的双相作用特征。因此, 本发明提供具有速效胰岛素类似物和长效酰化胰岛素的混合物的可溶性组合物, 其中速效胰岛素和酰化胰岛素从注射部位消失的速度与组合物单独注射时的速度一致。通过给予作为双相药物组合物的胰岛素, 可减少注射次数, 成为更方便更安全的疗法。

[0877] 本发明还基于以下预料不到的发现: 当制备胰岛素制剂时, 锌可以在加入防腐剂后加到制剂中。常常通过向胰岛素制剂中加入乙酸锌、氯化锌或柠檬酸锌而提供锌。

[0878] 本发明的酰化胰岛素组合物可通过吸入法递送以达到快速吸收。通过吸入法给药产生的药代动力学特性可与胰岛素皮下给药的相当。本发明酰化胰岛素组合物的吸入导致循环胰岛素水平快速上升, 进而导致血糖水平快速降低。当对相似粒径和相似肺沉积水平

进行比较时,不同的吸入装置常常提供相似的药代动力学特性。

[0879] 根据本发明,可通过本领域已知的用于吸入法给予治疗药物的各种吸入装置的任一种,来递送本发明的酰化胰岛素组合物。这些装置包括定量吸入器、雾化吸入器、干粉产生器(dry powder generator)、喷雾器等。优选本发明的酰化胰岛素组合物通过干粉吸入器或喷雾器递送。用于本发明酰化胰岛素组合物给药的吸入装置有几个所需要的特征。例如,通过吸入装置递药最好是可靠、可再现及精确的。为了顺畅的呼吸,吸入装置应当递送小颗粒,例如约  $10\ \mu\text{m}$  以下,例如约  $1\text{-}5\ \mu\text{m}$ 。适于实施本发明的市售吸入装置的一些具体实例是 Turbohaler™(Astra)、Rotahaler®(Glaxo)、Diskus®(Glaxo)、Spiros™吸入器(Dura)、Inhale Therapeutics 公司出售的装置、AERx™(Aradigm)、Ultravent®雾化吸入器(Mallinckrodt)、Acorn II®雾化吸入器(Marquest Medical Products)、Ventolin®定量吸入器(Glaxo)、Spinhaler®干粉吸入装置(Fisons)、C-haler©(Microdrug)、E-flex©(Microdrug)等。

[0880] 正如本领域技术人员所了解的一样,本发明的酰化胰岛素组合物的制剂、制剂的递药量和单剂量给药的持续时间取决于所使用的吸入装置类型。对于一些气雾剂递送系统(例如雾化吸入器),给药频率和启动该系统的时间长短将主要取决于气雾剂中胰岛素缀合物的浓度。例如,雾化吸入器溶液剂中较高浓度的胰岛素缀合物可使用较短的给药时间。定量吸入器等装置可产生较高的气雾剂浓度,在较短时间操作便可递送所需用量的胰岛素缀合物。干粉吸入器等装置递送活性药物直到规定的药物用量从装置中排出。在这种类型的吸入器中,在指定的干粉量中本发明胰岛素衍生物的含量决定了单剂量给药时所递送的剂量。

[0881] 在通过吸入装置递送的制剂中,本发明胰岛素衍生物的粒径对于使胰岛素达到肺部、优选进入下呼吸道或肺泡的能力十分关键。优选将本发明酰化胰岛素组合物制成使所递送的胰岛素缀合物至少约 10%、优选约 10%至约 20%或者更多沉积在肺部。已知约  $2\ \mu\text{m}$  至约  $3\ \mu\text{m}$  的粒径对于人口腔吸入时可得到最大效率的肺沉积。如果粒径超过约  $5\ \mu\text{m}$ ,则肺沉积大为降低。小于约  $1\ \mu\text{m}$  的粒径使肺沉积降低,并且不利于递送具有对治疗有效的足够质量的颗粒。因此,经吸入法递送的酰化胰岛素组合物颗粒的粒径优选小于约  $10\ \mu\text{m}$ ,更优选范围约为  $1\ \mu\text{m}$  至约  $5\ \mu\text{m}$ 。选择胰岛素衍生物制剂以便在所选用的吸入装置中产生所需要的粒径。

[0882] 按粒径小于约  $10\ \mu\text{m}$ ,优选约  $1\ \mu\text{m}$  至约  $5\ \mu\text{m}$  的微粒形式来制备本发明的酰化胰岛素组合物,最好作为干粉给药。优选的粒径是有效递送至患者肺泡的粒径。优选干粉大多由如此制备的颗粒组成,即大多数颗粒具有所需的尺寸范围。最好至少约 50%的干粉由直径小于约  $10\ \mu\text{m}$  的颗粒构成。可通过含有胰岛素缀合物和其它所需成分的溶液的喷雾干燥、研磨或者临界点浓缩而得到这种制剂。同样适于产生用于本发明颗粒的其它方法为本领域所知。

[0883] 颗粒通常从容器内的干粉制剂中涌出,然后通过载气流送入患者肺部。通常,在现有的干粉吸入器中,仅通过患者吸入来提供用于固体的分散力。在另一种类型的吸入器中,通过患者吸入所产生的气流启动叶轮运动(impeller motor)从而使颗粒分散。

[0884] 用干粉吸入器给药的本发明酰化胰岛素制剂常常包括含有酰化胰岛素的微细干

粉,但是该干粉还可包括填充剂、载体、赋形剂、其它添加剂等等。胰岛素缀合物干粉制剂可包含的添加剂例如,按需要稀释干粉以便从特定干粉吸入装置递药,有利于制剂加工,提供对制剂有利的粉末特性,促进粉末从吸入装置中分散,使制剂稳定(例如抗氧化剂或缓冲剂),为制剂提供味道等等。添加剂最好不对患者气道产生不利影响。酰化胰岛素可以在分子水平与添加剂相混合,或者固体制剂可包括与添加剂颗粒相混合的胰岛素缀合物颗粒或者涂在添加剂颗粒上的胰岛素缀合物颗粒。典型的添加剂包括单糖、二糖和多糖;糖醇和其它多元醇,例如乳糖、葡萄糖、棉子糖、松三糖、乳糖醇、麦芽糖醇、海藻糖、蔗糖、甘露醇、淀粉或其组合;表面活性剂,例如山梨糖醇、二磷脂酰胆碱或卵磷脂等。有效地用于上述目的添加剂(例如填充剂)的含量通常占制剂重量的约 50% 至约 90%。本领域已知的用于蛋白质制剂(例如胰岛素类似物蛋白质)的其它成分也可包括在制剂中。

[0885] 通过迫使胰岛素缀合物的混悬剂或溶液剂通过压力喷嘴,可以产生包括本发明酰化胰岛素组合物的喷雾剂。可以选择喷嘴大小和结构、施加压力和液体进料速度以达到所需的排出量和粒径。例如通过电场与毛细管或喷嘴进料口连接,可产生电喷雾。由喷雾器所递送的胰岛素缀合物颗粒的粒径最好小于约  $10\ \mu\text{m}$ , 优选范围为约  $1\ \mu\text{m}$  至约  $5\ \mu\text{m}$ 。

[0886] 适用于喷雾器的本发明酰化胰岛素制剂常常包括胰岛素衍生物的水性溶液剂,浓度为约  $1\text{mg}$  至约  $20\text{mg}$  胰岛素缀合物 /  $\text{ml}$  溶液剂。该剂型可包括赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂等成分,优选包括锌。该剂型还可包括赋形剂或用于稳定胰岛素衍生物的成分,例如缓冲剂、还原剂、大蛋白质或糖。用于配制胰岛素缀合物的大蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等等。用于配制胰岛素缀合物典型的糖包括蔗糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等等。该胰岛素衍生物剂型还可包括表面活性剂,表面活性剂可减少或防止表面引起的胰岛素缀合物聚集,这是在形成气雾剂时由溶液雾化而引起的。可以使用各种常用的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇类以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。用量范围通常占制剂重量的约 0.001% 至约 4%。

[0887] 可以胃肠外给予需要这种治疗的患者本发明的药物组合物。可通过皮下、肌内或静脉内注射(通过注射器、任选笔形注射器或其它方便的给药装置)实施胃肠外给药。或者,可通过输注泵实施胃肠外给药。

[0888] 本发明一方面涉及本发明的药物组合物以及药学上可接受的载体和 / 或药学上可接受的添加剂,可供用于经肺治疗需要这种治疗的患者的 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症。

[0889] 在本发明的一个方面,提供制备用于治疗 I 型糖尿病、II 型糖尿病和引起高血糖症的其它病症的药物组合物的方法,该组合物用于肺部,包含治疗有效量的本发明药物组合物以及药学上可接受的载体和 / 或药学上可接受的添加剂。

[0890] 酰化胰岛素衍生物的注射用组合物可以用制药工业的常规技术来制备,它包括将合适的成分溶解并混匀以得到所需的终产物。因此,按照一种方法,将胰岛素衍生物溶于适量的水中,水的体积比待制备组合物的最终体积略少。可按需要加入等渗剂、防腐剂或防腐剂的混合物、锌(乙酸锌、柠檬酸锌或氯化锌或其混合物)和缓冲剂,此外,可加入表面活性剂,如有需要,用酸(例如盐酸)或碱(例如氢氧化钠水溶液)按需要调节溶液的 pH 值。最后,用水调节溶液体积以得到各成分的所需浓度。

[0891] 缓冲剂可选自乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷



酸氢二钠、磷酸钠、ADA(N-[2-乙酰氨基]-2-亚氨基二乙酸)、ACES(N-[2-乙酰氨基]-2-氨基乙磺酸)、BES(N,N-二[2-羟乙基]-2-氨基乙磺酸)、bicine(N,N-二-[2-羟乙基]甘氨酸)、BIS-TRIS(二[2-羟乙基]亚氨基三[羟甲基]-甲烷)、DIPSO(3[N,N-二(2-羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸)、乙二胺二盐酸盐、甘氨酸甘氨酸、HEPES(N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-乙磺酸])、HEPPSO(N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-羟基丙磺酸])、咪唑、MOBS(4-[N-吗啉代]丁磺酸)、MOPS(3-[N-吗啉代]丙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N'-二[2-乙磺酸])、TAPSO(3-[N-三(羟甲基)甲氨基]-2-羟基丙磺酸)、THAM(三[羟甲基]-氨基甲烷)、TES(N-三[羟甲基]甲基-2-氨基乙磺酸)、tricine(N-三[羟甲基]甲基甘氨酸)、己二酸、门冬氨酸、戊二酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸和/或其盐和/或其混合物。

[0892] 在本发明的另一个方面,制剂还包含药学上可接受的防腐剂,可选自苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、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、三氯叔丁醇和溴硝丙二醇、苯甲酸、咪脲、氯己定(chlorohexidine)、脱氢醋酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苜蓿氯铵、氯苯甘醚(chlorophenesine)(3-(4-氯苯氧基)丙-1,2-二醇)或其混合物。在本发明的另一个方面,防腐剂存在的浓度为0.1mg/ml至20mg/ml。在本发明的另一个方面,防腐剂存在的浓度为0.1mg/ml至5mg/ml。在本发明的另一个方面,防腐剂存在的浓度为5mg/ml至10mg/ml。在本发明的另一个方面,防腐剂存在的浓度为10mg/ml至20mg/ml。这些具体防腐剂的每一种均构成本发明的一个替代方面。药物组合物中防腐剂的使用为本领域技术人员所熟知。为方便起见,可参照 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版,1995。

[0893] 在本发明的另一个方面,制剂还包含等渗剂,等渗剂可选自盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、门冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇、聚乙二醇(例如PEG400)或其混合物。可以使用单糖、二糖或多糖等任何糖或水溶性葡聚糖,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、普鲁兰多糖、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。一方面,糖添加剂是蔗糖。糖醇被定义为具有至少一个-OH的C4-C8烃,它包括甘露醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿糖醇。一方面,糖醇添加剂是甘露醇。上面所提及的糖或糖醇可以单独使用或联用。使用量没有固定的限制,只要糖或糖醇溶于液体组合物中,并且不会对用本发明方法所获得的稳定性作用产生不利影响。一方面,糖或糖醇浓度介于约1mg/ml和约150mg/ml之间。在本发明的另一个方面,等渗剂存在的浓度为1mg/ml至50mg/ml。在本发明的另一个方面,等渗剂存在的浓度为1mg/ml至7mg/ml。在本发明的另一个方面,等渗剂存在的浓度为8mg/ml至24mg/ml。在本发明的另一个方面,等渗剂存在的浓度为25mg/ml至50mg/ml。这些具体等渗剂中的每一种均构成本发明的一个替代方面。药物组合物中等渗剂的使用为本领域技术人员所熟知。为方便起见,可参照 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版,1995。

[0894] 在本发明的另一个方面,制剂包含表面活性剂以防止尤其当胰岛素衍生物与速效胰岛素(如门冬胰岛素)混合时的纤维性颤动。可以使用各种常用的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇类,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。用量范围一般占制剂重量的约0.001%和约0.1%之间。

[0895] 典型的等渗剂为氯化钠、甘露醇、二甲砷、1,2-丙二醇和甘油,典型的防腐剂为苯

酚、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯和苯甲醇。

[0896] 合适缓冲剂的实例为乙酸钠、甘氨酸甘氨酸、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、三羟甲基-氨基甲烷、乙二胺二盐酸盐和磷酸钠。

[0897] 本发明的药物组合物可用于治疗对胰岛素敏感的症状。因此,可用于治疗 I 型糖尿病、II 型糖尿病和高血糖症(例如不时见于严重受伤人员和进行大手术的人员)。对于任何患者的最佳剂量水平都将取决于各种因素,包括具体酰化胰岛素或酰化胰岛素与所使用的速效胰岛素的混合物的功效、患者年龄、体重、体力活动和饮食、与其它药物可能的组合以及待治疗症状的严重程度。我们建议本发明胰岛素衍生物的日剂量应由本领域技术人员按类似于已知胰岛素组合物的方式为每位患者制定。

[0898] 可以通过众所周知的肽合成法,或者通过众所周知的在合适转化微生物中的重组生产,来生产用于制备包含在本发明组合物中的酰化胰岛素或胰岛素类似物的原料。因此,胰岛素原料可用以下方法生产,该方法包括将含有多肽编码 DNA 序列并且能够表达多肽的宿主细胞,在允许肽表达的条件下在合适的营养培养基进行培养后,从培养物中回收所得到的肽。

[0899] 培养细胞所用的培养基可以是适于宿主细胞生长的任何常规培养基,例如基本培养基或含有适当补充剂的复合培养基。合适的培养基可获自供应商,或者可按照已公布的配方制备(例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)目录)。然后,通过常规方法从培养基中回收细胞所产生的肽,所述方法包括通过离心或过滤从培养基中分离出宿主细胞,通过盐(例如硫酸铵)的方式使上清液或滤液的蛋白质组分析出,用各种层析法(例如离子交换层析法、凝胶过滤层析法、亲和层析法等等)进行纯化,这取决于所述肽的类型。

[0900] 编码胰岛素多肽的 DNA 序列适宜为基因组或 cDNA 源,例如通过制备基因组或 cDNA 库,并按照标准技术用合成寡核苷酸探针通过杂交筛选编码完整或部分多肽的 DNA 序列而获得(参见例如 Sambrook, J, Fritsch, EF 和 Maniatis, T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York, 1989)。还可通过已建立的标准方法经合成制备编码多肽的 DNA 序列,例如亚磷酰胺法,参见 Beaucage 和 Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22(1981), 1859-1869, 或 Matthes 等人描述的方法(Matthes 等, *EMBO Journal* 3(1984), 801-805)。还可用特定的引物通过聚合酶链式反应制备 DNA 序列,例如参见 US4, 683, 202 或 Saiki 等, *Science* 239(1988), 487-491。

[0901] 可将 DNA 序列插入可方便进行重组 DNA 方法的任何载体中,载体的选择常常取决于载体将被导入的宿主细胞。因此,载体可以是自主复制载体,也就是说以染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如质粒。或者,载体可以是当被导入宿主细胞时便整合到宿主细胞基因组中的载体,与其所整合的染色体一起复制。

[0902] 载体优选为表达载体,其中编码肽的 DNA 序列与 DNA 转录所需要的另外的区段操作性连接,例如启动子。启动子可以是在所选宿主细胞中显示转录活性的任何 DNA 序列,可以衍生自与宿主细胞同源或异源的蛋白质编码基因。用于指导本发明肽的编码 DNA 在各种宿主细胞中转录的合适启动子的实例是本领域众所周知的,参见例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning—a laboratory manual*, 第 2 版, 1989。

[0903] 必要时,编码肽的 DNA 序列同样可与合适的终止子、聚腺苷酸化信号、转录增强子

序列和翻译增强子序列操作性连接。本发明的重组载体还可包含使载体能够在所述宿主细胞中复制的 DNA 序列。

[0904] 载体还可包含选择标记,例如其产物代偿宿主细胞缺陷的基因,或者赋予药物抗性的基因,药物例如氨苄西林、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素、潮霉素或甲氨蝶呤。

[0905] 为了指导胰岛素肽进入宿主细胞的分泌途径,可以在重组载体中提供分泌信号序列(亦称前导序列、前原序列或前序列)。将分泌信号序列在正确阅读框中加入到编码肽的 DNA 序列上。分泌信号序列通常位于编码肽的 DNA 序列的 5' 端。分泌信号序列正常可与肽缔合,或者可得自编码其它分泌蛋白的基因。

[0906] 分别连接编码本发明肽的 DNA 序列、启动子和任选终止子和 / 或分泌信号序列,将它们插入含有复制所需信息的合适载体内所使用的方法,为本领域技术人员所熟知(参见例如 Sambrook 等,同上)。

[0907] 向其中导入 DNA 序列或重组载体的宿主细胞可以是能够产生本发明肽的任何细胞,包括细菌、酵母、真菌和高等真核细胞。

[0908] 本领域众所周知和采用的合适宿主细胞的实例为大肠杆菌 (*E. coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或者哺乳动物 BHK 或 CHO 细胞系,但并不限于此。

[0909] 定义

[0910] 本文所用术语“有效量”是指与未治疗相比足以有效治疗患者的剂量。

[0911] 本文所用术语“药物组合物”是指包含活性化合物或其盐以及药物赋形剂的产品,药物赋形剂例如缓冲剂、防腐剂和张力调节剂 (tonicity modifier),所述药物组合物通过将其给予个体而用于治疗、预防疾病或病症或降低疾病或病症的严重程度。因此,药物组合物本领域亦称药物制剂。应当理解的是,待重配的药物组合物的 pH 是在室温下于规定的重配液体中重配而产生的重配组合物中所测得的 pH 值。

[0912] 本文所用术语“药学上可接受(的)”是指适于正常的药物应用,也就是说不会在患者体内引起不利反应,等等。

[0913] 本文所用术语“缓冲剂”是指在药物组合物中降低组合物可能由于化学反应而随时间发生 pH 变化倾向的化合物。缓冲剂包括磷酸钠、TRIS、甘氨酸甘氨酸和柠檬酸钠等化学试剂。

[0914] 本文所用术语“防腐剂”是指加到药物组合物中防止或延迟微生物活性(生长和代谢)的化合物。药学上可接受的防腐剂的实例为苯酚、间甲酚以及苯酚与间甲酚两者的混合物。

[0915] 所使用的术语“等渗剂”是指药物组合物中用作调节药物组合物渗透压使得渗透压更接近人血浆渗透压的化合物。等渗剂包括 NaCl、甘油、甘露醇等

[0916] 本文所用术语“稳定剂”是指为了使肽稳定,也就是说为了增加药物组合物的保存期限和 / 或使用时间而加到含肽药物组合物中的化学试剂。用于药物制剂的稳定剂的实例为 L- 甘氨酸、L- 组氨酸、精氨酸、聚乙二醇和羧甲基纤维素。此外,苯酚、锌离子和氯化钠也可用作稳定剂。

[0917] 本文所用术语“表面活性剂”是指药物组合物中以从界面上置换或部分置换胰岛素、胰岛素类似物和胰岛素衍生物的方式,用作调节空气与疏水表面界面的化合物。可以使用各种常用的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇类以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸

酯。一个实例为聚山梨酯 20。

[0918] 本文所用术语“治疗疾病”是指治疗和治愈已有疾病、病症或障碍表现的患者。治疗的目的是抗击疾病、病症或障碍。治疗包括给予活性化合物以消除或控制疾病、病症或障碍以及缓解与疾病、病症或障碍有关的症状或并发症。

[0919] 本文所用术语“预防疾病”是指治疗和治愈在疾病临床发作前有疾病发生风险的个体。预防的目的是抗击疾病、病症或障碍的发生，包括给予活性化合物以预防或延迟症状或并发症发作，并且预防或延迟相关疾病、病症或障碍的发生。

[0920] 本文所用术语“人胰岛素”是指其结构和性质是众所周知的人激素。人胰岛素具有通过半胱氨酸残基之间的二硫键连接的两条多肽链，即 A 链和 B 链。A 链为 21 个氨基酸肽，B 链为 30 个氨基酸肽，两条链通过 3 个二硫键连接起来：一个在 A 链 6 位和 11 位的半胱氨酸之间，第二个在 A 链 7 位的半胱氨酸与 B 链 7 位的半胱氨酸之间，第三个在 A 链 20 位的半胱氨酸与 B 链 19 位的半胱氨酸之间。

[0921] 本文所用术语“基础胰岛素”是指在糖尿病标准模型中时效超过 15 小时并且适于满足夜晚和两餐之间对胰岛素需求的胰岛素制剂。优选基础胰岛素的时效为至少 20 小时。优选基础胰岛素的时效为至少 10 小时。优选基础胰岛素的时效范围为 15-48 小时。优选基础胰岛素的时效类似于市售药物组合物 NPH 胰岛素或 N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-十四烷酰基脱 B30 人胰岛素的时效。

[0922] 本文所用术语“推注用胰岛素 (bolus insulin)”、“餐时胰岛素 (meal-related insulin)”或“速效胰岛素 (rapid acting insulin)”是指适于满足餐时和餐后对胰岛素需求的速效胰岛素肽。

[0923] 本文所用术语“双相胰岛素”是指包含“推注用胰岛素”与“基础胰岛素”的混合物的药物组合物。

[0924] 对于“脱 B30 (desB30)”或“B (1-29)”是指缺乏 B30 氨基酸残基的胰岛素 B 链或其类似物，“A (1-21)”是指天然胰岛素 A 链或其类似物。C-肽及其氨基酸序列用三字母氨基酸代码表示。脱 B30、脱 B29 人胰岛素是缺乏 B29 和 B30 的人胰岛素。

[0925] 对于“B1”、“A1”等分别是指胰岛素 B 链 1 位的氨基酸残基（从 N 端起计）和胰岛素 A 链 1 位的氨基酸残基（从 N 端起计）。具体位置上的氨基酸残基还可表示为例如 Phe<sup>B1</sup>，这是指 B1 位的氨基酸残基是苯丙氨酸残基。

[0926] 本文所用的所谓“胰岛素类似物”是指多肽，该多肽具有可正常衍生自天然存在的胰岛素结构的分子结构，例如通过天然存在的胰岛素中缺失和 / 或交换至少一个氨基酸残基和 / 或添加至少一个氨基酸残基的人胰岛素。

[0927] 所添加和 / 或交换的氨基酸残基可以是可编码的氨基酸残基或其它天然存在的残基或纯属合成的氨基酸残基。胰岛素类似物可以是这样的胰岛素类似物，其中 B 链 28 位的天然 Pro 残基可被修饰成 Asp、Lys 或 Ile 之一。另一方面，B29 位的 Lys 被修饰成 Pro。一方面，B30 可为 Lys，而 B29 可为任何可编码氨基酸，但 Cys、Met、Arg 和 Lys 除外。

[0928] 同样，A21 位的 Asn 可被修饰成 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，B3 位的 Asn 可被修饰成 Lys 或 Asp。胰岛素类似物的其它实例为脱 B30 人胰岛素、脱 B30 人胰岛素类似物、其中 PheB1 缺失的胰岛素类似物、其中 A 链和 / 或 B 链具有 N 端延伸的胰岛素类似物和其中 A 链和 /

或 B 链具有 C 端延伸的胰岛素类似物。因此,一个或两个 Arg 可添加到 B1 位或 B30 位上。

[0929] 一方面,胰岛素类似物包含相对于天然肽的修饰(取代、缺失、添加)少于 6 个。另一方面,类似物包含相对于天然肽的修饰(取代、缺失、添加)少于 5 个。另一方面,类似物包含相对于天然肽的修饰(取代、缺失、添加)少于 4 个。另一方面,类似物包含相对于天然肽的修饰(取代、缺失、添加)少于 3 个。另一方面,类似物包含相对于天然肽的修饰(取代、缺失、添加)少于 2 个。另一方面,类似物包含相对于天然肽的修饰(取代、缺失、添加)仅有一个。

[0930] 本文所用的所谓“胰岛素衍生物”是指经过化学修饰的天然存在的胰岛素或胰岛素类似物,例如通过在胰岛素主链的一个或多个位置上引入侧链,或者通过氧化或还原胰岛素的氨基酸残基上的基团,或者通过将游离羧基转化成酯基或者使游离氨基或羟基酰化。

[0931] 本文所用的所谓“酰化胰岛素”是指经过化学修饰使游离氨基或羟基酰化的天然存在的胰岛素,例如经酰化的人胰岛素、胰岛素分子、胰岛素衍生物或胰岛素类似物。

[0932] 本文所用术语“不钝化”是指当配制成一种制剂时,速效胰岛素和酰化胰岛素都具有与按单独制剂给予速效胰岛素和酰化胰岛素时相同或基本相同的作用特征。

[0933] 本文所用术语“OAD”或“OAD(s)”是指一种或多种口服抗糖尿病药。OAD 的非限制性示例可为磺酰脲(SU)、双胍例如二甲双胍(Melformin)或噻唑烷二酮类(thiozolidindiones, TZD)。

[0934] 术语“可编码氨基酸”或“可编码氨基酸残基”用来指可由三个一组(“密码子”)的核苷酸编码的氨基酸或氨基酸残基。

[0935] hGlu 是高谷氨酸。

[0936]  $\alpha$ -Asp 是 L 型  $\text{-HNCH(CO-)}\text{CH}_2\text{COOH}$ 。

[0937]  $\beta$ -Asp 是 L 型  $\text{-HNCH(COOH)}\text{CH}_2\text{CO-}$ 。

[0938]  $\alpha$ -Glu 是 L 型  $\text{-HNCH(CO-)}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 。

[0939]  $\gamma$ -Glu 是 L 型  $\text{-HNCH(COOH)}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ 。

[0940]  $\alpha$ -hGlu 是 L 型  $\text{-HNCH(CO-)}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 。

[0941]  $\delta$ -hGlu 是 L 型  $\text{-HNCH(COOH)}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ 。

[0942]  $\beta$ -Ala 为  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ 。

[0943] Sar 是肌氨酸(N-甲基甘氨酸)。

[0944] 术语“侧链上具有羧酸基团的氨基酸残基”是指 Asp、Glu 和 hGlu 等氨基酸残基。氨基酸可以是 L-构型或 D-构型。如未具体指明则应当理解为该氨基酸残基是 L 构型。

[0945] 术语“具有中性侧链的氨基酸残基”是指 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Pro、Ser、Thr、Cys、Met、Tyr、Asn 和 Gln 等氨基酸残基。

[0946] 如果本发明胰岛素衍生物被称为“在生理 pH 值时可溶的”,则是指可用于制备在生理 pH 值下完全溶解的胰岛素组合物注射液的胰岛素衍生物。这种有利的溶解性或是由于胰岛素衍生物自身的内在性质所致,或是胰岛素衍生物与溶媒中所包含的一种或多种成分之间有益相互作用的结果。

[0947] 术语“高分子量胰岛素”或“hmw”是指人胰岛素复合物、胰岛素类似物复合物或胰岛素衍生物复合物的分子量超过人血清白蛋白,超过胰岛素类似物或胰岛素衍生物的十二

聚体复合物的分子量,即大于约 72 千道尔顿。

[0948] 术语“中等分子量胰岛素”或“mmw”是指人胰岛素复合物、胰岛素类似物复合物或胰岛素衍生物复合物的分子量为约胰岛素六聚体分子量至约胰岛素十二聚体分子量之间,即介于 24 千道尔顿和 80 千道尔顿之间。

[0949] 术语“低分子量胰岛素”或“lmw”是指人胰岛素、胰岛素类似物或胰岛素衍生物的分子量小于 24 千道尔顿。

[0950] 术语“净电荷”是指分子的总电荷。pH 7.4 时,人胰岛素带有负的净电荷约 -3,或者如果形成六聚体,则约为 -2.5/胰岛素单体。

[0951] 本说明书和实施例中使用了下列缩写词:

[0952] hGlu 高谷氨酸

[0953] Sar: 肌氨酸(N-甲基-甘氨酸)

[0954] S. c. 皮下

[0955] Acylins 酰化胰岛素

[0956] Ins 胰岛素

[0957] 本文所引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利都通过引用全部结合到本文中,其程度正如每个参考文献具体而单独指明通过引用全部结合到本文中并将其全文公开(至法律允许的最大程度)于本文一样。

[0958] 本文所用的所有标题和副标题仅为了方便,不应理解为以任何方式限制本发明。

[0959] 任何和所有实例的使用,或者本文所用的示例性语言(例如“例如”),仅仅是为了更好地说明本发明,并不限制本发明的范围,除非另有要求。本说明书中的任何语言都不应理解为规定任何非要求保护要素是实施本发明所必需的。

[0960] 本文对专利文献的引用和结合仅为方便起见,并不影响这些专利文献的有效性、专利性和/或强制性。

[0961] 根据适用法律的许可,本发明包括所附权利要求书中所述主题的所有的修改和等同内容。

[0962] 实施例

[0963] 实施例 1

[0964] A:门冬胰岛素 600  $\mu$ M、3Zn/6 胰岛素、1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl、pH 7.5,体积 8ml:

[0965] 将 31mg 门冬胰岛素悬浮于 2ml 水中,加入 30  $\mu$ l 1N HCl 得到溶液。然后加入 240  $\mu$ l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub> 后再加入 3200  $\mu$ l 4%甘油、400  $\mu$ l 0.32M 苯酚、800  $\mu$ l 间甲酚、560  $\mu$ l 0.1M 三羟甲基氨基甲烷、160  $\mu$ l 0.5M NaCl,然后用 1N NaOH 调节 pH 至 7.5,最后用水调整体积至 8ml。使溶液通过 0.22  $\mu$ M 过滤器过滤除菌。

[0966] B:LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 1200  $\mu$ M、3Zn/6ins、1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl、pH 7.5,体积 7ml:

[0967] 将 58mg LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素悬浮并溶解于 2ml 水中,随后加入 420  $\mu$ l 110mM Zn(AcO)<sub>2</sub>、2800  $\mu$ l 4%甘油、350  $\mu$ l 0.32M 苯酚、700  $\mu$ l 间甲酚、490  $\mu$ l 0.1M 三羟甲基氨基甲烷、140  $\mu$ l 0.5M NaCl,最后加入 1N NaOH 调节至 pH 7.5,加水至 7ml。使溶液通过 0.22  $\mu$ M 过滤器过滤除菌。

[0968] C:门冬胰岛素 600  $\mu$  M、4Zn/6ins、1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl、pH 7.5, 体积 15ml:

[0969] 本制剂按类似于制剂 A 的方法制备。

[0970] D:LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 1200  $\mu$  M、4Zn/6ins、1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl、pH 7.5, 体积 20ml:本制剂按类似于制剂 B 的方法制备。

[0971] E:门冬胰岛素 600  $\mu$  M、6Zn/6ins、1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl、pH 7.5:

[0972] 本制剂按 C 的方法制备,最后加入 20  $\mu$  l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>/ml,调节 pH 至 7.5。

[0973] F:LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 1200  $\mu$  M、6Zn/6ins、1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl, pH 7.5:

[0974] 本制剂按 D 的方法制备,最后加入 40  $\mu$  l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>/ml,调节 pH 至 7.5。

[0975] G:门冬胰岛素 600  $\mu$  M、8Zn/6ins、1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl、pH 7.5:

[0976] 本制剂按 C 的方法制备,最后加入 40  $\mu$  l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>/ml,调节 pH 至 7.5。

[0977] H:LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 1200  $\mu$  M、8Zn/6ins、1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl、pH 7.5:

[0978] 本制剂按 D 的方法制备,最后加入 80  $\mu$  l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>/ml,调节 pH 至 7.5。

[0979] 介质:1.6%甘油、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、7mM 三羟甲基氨基甲烷、10mM NaCl、pH 7.5。

[0980] 用等量的介质稀释上述制剂 B、D、F 和 H,得到 LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$  M 和 Zn/6 酰化胰岛素在 3、4、6 和 8 间变化的制剂。用大小排阻色谱法测试制剂形成高分子量胰岛素的能力(Superose 6HR 柱,用 140mM NaCl、10mM 三羟甲基氨基甲烷(pH 7.4)和 0.01% NaN<sub>3</sub> 在 37°C 下按 0.25ml/分钟洗脱)。自高分子量排除极限开始每 4 分钟收集流分,在最后一个单体峰时结束,共计 14 个流分。胰岛素类似物的流分浓度用反相色谱法准确定量,在 pH 2.5 漂移时加入发色的锌整合剂 terpy 后,测定锌浓度(图 3、4、5 和 6)。在 3、4、6 和 8Zn/6 胰岛素时测得尺寸大于白蛋白的 LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素(流分 [1-8])的相对含量分别为 67.4%、88.9%、98.0% 和 97.9%。此外,尤其是高分子尺寸流分的 LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素之后为锌浓度。

[0981] 包含门冬胰岛素 600  $\mu$  M 且在 3 和 6 个锌原子/胰岛素间变化的制剂(A 和 E)才作为单体被洗脱出来(流分 [12-13]),继之出现小部分被加入的锌,见图 1-2。

[0982] 胰岛素类似物和酰化胰岛素相混合

[0983] 将按类似方式将上述贮备液 A-H 和上述介质相混合,得到包括 180  $\mu$  M 门冬胰岛素和 420  $\mu$  M LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素和锌浓度在 3、6 和 8Zn/6 胰岛素间变化的制剂。计算浓度为锌/6 酰化胰岛素的实例是将 180  $\mu$  M 具有 3Zn/6 胰岛素的门冬胰岛素与 420  $\mu$  M 具有 3Zn/6 酰化胰岛素(3Zn/6acyl-ins)的 LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素相混合,制成 4.3Zn/6 酰化胰岛素 [(180\*3+420\*3)/420 = 4.3Zn/6 酰化胰岛素]。用大小排阻色谱法测定制剂形成高分子量胰岛素的能力(Superose

6HR 柱, 同样收集流分用于胰岛素类似物和锌的定量测定)。如图 8 所示, 与对应于 4. 3Zn/6 酰化胰岛素制剂的 3Zn/6 胰岛素相混合的类似物显示出主要为 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 (72.5% 的 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素) 和高分子量流分 [1-8] 中的锌, 但也有门冬胰岛素, 虽然在其余流分 [9-14] 中测得相同含量的门冬胰岛素和 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素较为平均 (图 8)。包含 6Zn/6ins 的门冬胰岛素和 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素的测定分别见图 2 和图 5。将 6Zn/6ins 的 2 种制剂 (图 2 和图 5) 混合成对应于 8. 6Zn/6 酰化胰岛素的门冬胰岛素 180  $\mu$  M+LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 420  $\mu$  M, 显示出高分子量的 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素和低分子量的门冬胰岛素的流分完全分开 (图 10)。将门冬胰岛素和 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素按等浓度混合成 12Zn/6 酰化胰岛素, 同样也显示出流分分开 (图 12)。再增加各个制剂锌浓度至 8Zn/6ins, 对于 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素见图 6, 对于门冬胰岛素 180  $\mu$  M+LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 420  $\mu$  M 混合物见图 11。

[0984] 从图中清楚可见, 锌含量的增加预料不到地引起药物制品门冬胰岛素和 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素的分离, 从而使类似物之间无显著的钝化。

[0985] 锌含量的增加以类似物实际上不出现钝化的方式, 引起药物制剂中门冬胰岛素和 LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素的分离。

[0986] 实施例 2

[0987] 2A: 加入苯酚和间甲酚之前加入 3Zn/6 酰化胰岛素

[0988] LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$  M, 3Zn/6 胰岛素, 1.6% 甘油, 16mM 苯酚和 16mM 间甲酚, 20mM NaCl, 7mM 磷酸盐, pH 7.5, 1.5  $\mu$  Ci  $^{125}$ I-Tyr $^{A14}$ -LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素示踪物, 体积 2ml。

[0989] 将 8.2mg LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素溶于 400  $\mu$  l 水, 加入 3  $\mu$  Ci  $^{125}$ I-Tyr $^{A14}$ -LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素示踪物后, 再加入 800  $\mu$  l 4% 甘油, 在真空离心机中处理 10-15 分钟以除去所加入的示踪物溶液中所包含的乙醇。加入 60  $\mu$  l 10mM Zn(AcO) $_2$ , 间隔 2 分钟后加入 100  $\mu$  l 0.32M 苯酚、200  $\mu$  l 0.16M 间甲酚、80  $\mu$  l 0.5M NaCl 和 140  $\mu$  l 0.1M 磷酸钠, 调节 pH 至 pH 7.5, 总体积至 2ml。溶液经 0.22  $\mu$  M 过滤器过滤除菌, 用于给猪皮下注射后的消失研究 (disappearance study)。经测定 T $_{50\%}$   $\pm$  SEM (小时) 为 9.6  $\pm$  0.7 小时, 如制剂实施例 2A-2D 的交叉研究实验中所描述。

[0990] 2B: 加入苯酚和间甲酚之前加入 3Zn/6 酰化胰岛素与加入苯酚和间甲酚之后加入 3Zn/6 酰化胰岛素

[0991] LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$  M, 前后所加入的 3Zn/6 酰化胰岛素, 1.6% 甘油, 16mM 苯酚和 16mM 间甲酚, 20mM NaCl, 7mM 磷酸盐, pH 7.5, 1.5  $\mu$  Ci  $^{125}$ I-Tyr $^{A14}$ -LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素示踪物, 体积 2ml。

[0992] 将 8.2mg LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素溶于 400  $\mu$  l 水, 加入 3  $\mu$  Ci  $^{125}$ I-Tyr $^{A14}$ -LysB29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素示踪物后, 再加入 800  $\mu$  l 4% 甘油, 在真空离心机中处理 10-15 分钟除去所加入的示踪物溶液中所包含的乙



醇。加入 60  $\mu$ l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>, 间隔 2 分钟后加入 100  $\mu$ l 0.32M 苯酚、200  $\mu$ l 0.16M 间甲酚、60  $\mu$ l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>、80  $\mu$ l 0.5M NaCl 和 140  $\mu$ l 0.1M 磷酸钠, 调节至 pH 7.5, 总体积至 2ml。溶液经 0.22  $\mu$ M 过滤器过滤除菌, 用于给猪皮下注射后的消失研究。经测定 T<sub>50%</sub>  $\pm$  SEM(小时) 为 11.9  $\pm$  1.0 小时, 如制剂实施例 2A-2D 的交叉研究实验中所描述。

[0993] 2C: 加入苯酚和间甲酚之前加入 3Zn/6 酰化胰岛素与加入苯酚和间甲酚之后加入 3Zn/6 酰化胰岛素且不包括缓冲剂

[0994] LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$ M, 前后所加入的 3Zn/6 酰化胰岛素, 1.6% 甘油, 16mM 苯酚和 16mM 间甲酚, 20mM NaCl, pH 7.5, 1.5  $\mu$ Ci <sup>125</sup>I-Tyr<sup>A14</sup>-LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素示踪物, 体积 2ml。

[0995] 将 8.2mg LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素溶于 400  $\mu$ l 水, 加入 3  $\mu$ Ci <sup>125</sup>I-Tyr<sup>A14</sup>-LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素示踪物后, 再加入 800  $\mu$ l 4% 甘油, 在真空离心机中处理 10-15 分钟以除去所加入的示踪物溶液中包含的乙醇。加入 60  $\mu$ l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>, 间隔 2 分钟后加入 100  $\mu$ l 0.32M 苯酚、200  $\mu$ l 0.16M 间甲酚、60  $\mu$ l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>、80  $\mu$ l 0.5M NaCl, 调节至 pH 7.5。溶液经 0.22  $\mu$ M 过滤器过滤除菌, 用于给猪皮下注射后的消失研究。经测定 T<sub>50%</sub>  $\pm$  SEM(小时) 为 14.4  $\pm$  2.4 小时, 如制剂实施例 2A-2D 的交叉研究实验中所描述。

[0996] 2D: 加入苯酚和间甲酚之后加入 6Zn/6 酰化胰岛素且不包括缓冲剂

[0997] LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$ M, 后加入的 6Zn/6 酰化胰岛素, 1.6% 甘油, 16mM 苯酚和 16mM 间甲酚, 20mM NaCl, 7mM 磷酸盐, pH 7.5, 1.5  $\mu$ Ci <sup>125</sup>I-Tyr<sup>A14</sup>-LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素示踪物, 体积 2ml。

[0998] 将 8.2mg LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素溶于 400  $\mu$ l 水, 加入 3  $\mu$ Ci <sup>125</sup>I-Tyr<sup>A14</sup>-LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素示踪物后, 再加入 800  $\mu$ l 4% 甘油, 在真空离心机中处理 10-15 分钟以除去所加入的示踪物溶液中包含的乙醇。加入 100  $\mu$ l 0.32M 苯酚, 间隔 2 分钟后加入 200  $\mu$ l 0.16M 间甲酚、120  $\mu$ l 10mM Zn(AcO)<sub>2</sub>、80  $\mu$ l 0.5M NaCl, 调节至 pH 7.5, 总体积至 2ml。溶液经 0.22  $\mu$ M 过滤器过滤除菌, 用于给猪皮下注射后的消失研究。经测定 T<sub>50%</sub>  $\pm$  SEM(小时) 为 13.5  $\pm$  1.7 小时, 如制剂实施例 2A-2D 的交叉研究实验中所描述。

[0999] 实施例 3

[1000] 通过结晶析出 LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素

[1001] LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素可与锌含量为 2-6mol 锌/6mol 胰岛素和过量的苯酚类分子(优选苯酚)结晶为六聚体。作为沉淀剂, 离子盐优先使用 NaCl。此外, 加入少量有机溶剂(乙醇)可促进结晶。

[1002] 蛋白质溶液(溶液 A)的制备:

[1003] 将 0.5mg 冷冻干燥的 LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素悬浮于 4ml 0.02mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲剂(用 HCl 调节至 pH7.0)。

[1004] 向 1.8ml LysB29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素溶液中加入 69.5  $\mu$ l 含有 0.010mol/L Zn(OAc)<sub>2</sub> 的水溶液和 8  $\mu$ l 含有 2mol/L 苯酚的乙醇溶液。

[1005] 沉淀剂溶液(溶液 B)的制备:

[1006] 向 5ml 含有 0.1M 三羟甲基氨基甲烷的溶液(用 HCl 调节至 pH 7.5)中加入 1.75g

NaCl 和 1ml 乙醇,将最终体积调整至 10ml。

[1007] 结晶:

[1008] 将等量(通常为 500  $\mu$ l)的溶液 A 和溶液 B 在玻璃小瓶中混匀。室温下 12 小时后完成结晶,所得结晶可通过过滤或离心分离出。

[1009] 实施例 4

[1010] 制剂:

[1011] B29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素(至 600  $\mu$ M)悬浮于水并通过加入氢氧化钠使之溶解,依次加入:甘油 1.6%、苯酚 16mM、间甲酚 16mM、乙酸锌 0-6Zn/6ins、氯化钠 10mM、磷酸盐 7mM, pH7.5,用水调至规定体积。

[1012] SEC 法:

[1013] 用大小排阻色谱法 (SEC) 在 37  $^{\circ}$ C 和 pH 7.3 下进行分析, Superose 6PC 柱 (0.32\*30cm), 使用任选加入 2mM 苯酚的等渗 10mM tris 缓冲盐水, 注射体积 20  $\mu$ l, 流速 0.05ml/分钟, 过柱时间 130 分钟。第一参比的蓝葡聚糖 (>> 5MDa,  $K_{AV}$  0.0)、甲状腺球蛋白 (669kDa,  $K_{AV}$  0.28)、铁蛋白 (440kDa,  $K_{AV}$  0.39)、卵清蛋白 (44.5kDa,  $K_{AV}$  0.56)、核糖核酸酶 (13.7kDa,  $K_{AV}$  0.69) 和第二参比的白蛋白 (66kDa,  $K_{AV}$  0.53)、Co (III) 胰岛素六聚体 (35kDa,  $K_{AV}$  0.61) 和单体胰岛素 X2 (6kDa,  $K_{AV}$  0.73)。蓝葡聚糖的保留时间为 17.9 分钟 ( $t_0$ ) 和无柱 0.74 分钟 ( $t_d$ ), 白蛋白 (HSA) 的保留时间约为 34.1 分钟。

[1014]  $K_{AV} = (t-t_0)/(V/f+t_d-t_0)$ , 其中

[1015] t:保留时间(分钟)

[1016]  $t_0$ :蓝葡聚糖的保留时间(排除极限)

[1017]  $t_d$ :蓝葡聚糖无柱时的保留时间(空隙体积)

[1018]  $V_t$ :柱总体积(ml)

[1019] f:流速(ml/分钟)

[1020] 数据模式:

[1021]  $K_{AV}$  峰 1            x. xx

[1022] 峰面积 1(%)        xxx

[1023]  $K_{AV}$  峰 2            x. xx

[1024] 峰面积 2(%)        xxx

[1025] 由  $K_{AV} = 0$  至  $K_{AV} = 0.46$  (32 分钟) 测得  $K_{AV}$  峰 1 面积, 表示为总面积的相对面积%, 对于  $K_{AV} < 0.46$ , 对应于大于白蛋白的自我缔合。对于峰 1  $K_{AV}$  约 0.56 (白蛋白大小), 积分分割 (integration cut) 介于白蛋白大小和胰岛素六聚体大小之间。

[1026] 对于长效胰岛素衍生物与速效门冬胰岛素混合物的采用具体检测峰流分的 SEC 法:

[1027] 门冬胰岛素 (3Zn/6ins) 与长效胰岛素衍生物 50:50 的混溶性, 正如从 SEC 收集流分并且用 HPLC 定量所测定的高分子量流分 (峰 1) 中和低分子量流分 (峰 2) 中存在速效和长效胰岛素的一样。流分分割按照上述积分分割进行。

[1028] 对于不含苯酚的 SEC 法, 洗脱峰 1 中含有大于白蛋白的缔合形式, 峰 2 含有双六聚体形式 (dihexameric form)、六聚体形式、二聚体形式和单体形式的胰岛素。

[1029] 对于包括 2mM 苯酚的 SEC 法, 洗脱峰 1 中含有双六聚体和其它较大型的胰岛素, 峰

2 含有六聚体形式、二聚体形式和单体形式的胰岛素。

[1030] 胰岛素衍生物和门冬胰岛素具体检测用 HPLC 反相色谱法, Zorbax Eclipse XDB-C182. 1\*15mm(1. 8  $\mu$  M), 用 A :0. 2M 硫酸钠、0. 04M 磷酸钠、10% 乙腈 (pH 7. 2) 和 B :70% 乙腈于 30 $^{\circ}$ C 梯度洗脱, 19-34% B 4. 5 分钟线性梯度洗脱, 突发起始条件 5 分钟, 过柱时间 7 分钟, 流速 0. 5ml/ 分钟, 注射体积 14  $\mu$  l, 对于两种类似物, 用门冬胰岛素参比物在 276nm 下进行 UV 检测。

[1031] 数据模式 :

[1032] 胰岛素衍生物峰 1 面积 (%)      xxx

[1033] 门冬胰岛素峰 2 面积 (%)      xxx

[1034] 结果 :

[1035] 表 1 :

[1036]

制剂: 中性溶解的胰岛素、甘油 1.6%、16mM 苯酚和 16mM 间甲 酚、添加锌、氯化钠 10mM、磷 酸盐 7mM, pH 7.5	SEC 洗 脱液:	Kav 峰 1	相对面 积% 峰 1	Kav 峰 2	相对面 积% 峰 2
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 0 Zn/6ins	不含 苯酚	-	1	0.73	99
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 1 Zn/6ins	不含 苯酚	0.11	25	0.73	75
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 2 Zn/6ins	不含 苯酚	0.08	48	0.73	52
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 3 Zn/6ins	不含 苯酚	0.07	69	0.73	31
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 4 Zn/6ins	不含 苯酚	0.06	86	0.74	14
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 5 Zn/6ins	不含 苯酚	0.01	93	0.74	7
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 6 Zn/6ins	不含 苯酚	0.00	96	0.74	4
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 0 Zn/6ins	苯酚 2mM	0.54	17	0.72	83
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 1 Zn/6ins	苯酚 2mM	0.54	56	0.73	44
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 2 Zn/6ins	苯酚 2mM	0.54	85	0.73	15
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 3 Zn/6ins	苯酚 2mM	0.54	94	0.73	6
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 4 Zn/6ins	苯酚 2mM	0.54	97	-	3
B29Ne-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 600 $\mu$ M, 5 Zn/6ins	苯酚 2mM	0.54	98	-	2

[1037]

B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 6 Zn/6ins	苯酚 2mM	0.54	98	-	2
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 0 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	不含 苯酚	0.33	衍生物 33	0.73	门冬胰 胰岛素 94
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 1 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	不含 苯酚	0.41	衍生物 34	0.74	门冬胰 胰岛素 89
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 2 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	不含 苯酚	0.41	衍生物 39	0.74	门冬胰 胰岛素 91
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	不含 苯酚	0.01	衍生物 89	0.74	门冬胰 胰岛素 98
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 4 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	不含 苯酚	0.00	衍生物 98	0.73	门冬胰 胰岛素 100
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 5 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	不含 苯酚	0.00	衍生物 98	0.73	门冬胰 胰岛素 100
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 6 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	不含 苯酚	0.00	衍生物 97	0.73	门冬胰 胰岛素 100

[1038]

B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 0 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	苯酚 2mM	0.55	衍生物 71	0.73	门冬胰 胰岛素 77
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 1 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	苯酚 2mM	0.55	衍生物 80	0.73	门冬胰 胰岛素 69
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 2 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	苯酚 2mM	0.55	衍生物 88	0.73	门冬胰 胰岛素 57
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	苯酚 2mM	0.55	衍生物 91	0.72	门冬胰 胰岛素 73
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 4 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	苯酚 2mM	0.54	衍生物 98	0.67	门冬胰 胰岛素 99
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 5 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	苯酚 2mM	0.54	衍生物 98	0.66	门冬胰 胰岛素 99
B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600μM, 6 Zn/6ins 与 门冬胰岛素 600μM, 3 Zn/6ins 1:1 相混合	苯酚 2mM	0.54	衍生物 98	0.66	门冬胰 胰岛素 99

[1039] 结论:在体温下使用等渗盐水洗脱液的 SEC(大小排阻色谱法)被用作皮下组织注射后当酚类防腐剂消失时胰岛素自我缔合的模型。洗脱液包含苯酚的 SEC 评价药物制剂中以及注射后短小时内胰岛素自我缔合的状态。

[1040] B29Nε-十六烷二酰基-γ-Glu 脱 B30 胰岛素 600 μ M 用锌浓度从 0Zn/6ins 递增至 6Zn/6ins 进行配制,SEC 法显示自我缔合至非常高的分子量,且当锌浓度为 5Zn/6ins 时大于人白蛋白的超过 90%。SEC 洗脱液中包含苯酚的,在胰岛素双六聚体大小和胰岛素单体大小处观察到在两个尖峰,并且在 4Zn/6ins 中超过 95%为双六聚体大小。

[1041] 所有制剂均与门冬胰岛素 (3Zn/6ins) 按相等浓度相混合, 对所收集峰的体积和内容物进行具体分析。在 4Zn/6ins 时发现超过 95% 的 B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素的分子量非常高, 并发现超过 95% 的门冬胰岛素为单体大小。洗脱液包括苯酚的, 在胰岛素双六聚体大小和胰岛素单体大小处观察到的 2 个峰, 在 4Zn/6ins 时超过 95% 的长效胰岛素为双六聚体大小, 是从位于单体和六聚体大小之间超过 95% 的门冬胰岛素中分离出来的。

[1042] 当长效类似物制剂包含少于 5% 的单体形式时, 未发现等摩尔制剂混合物钝化。

[1043] 实施例 5

[1044] B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素与门冬胰岛素的混溶性: 猪的正常血糖钳夹术研究

[1045] 制剂

[1046] 将 B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 (胰岛素衍生物) (至 1200  $\mu$ M) 悬浮于水, 溶解后加入甘油 1.6% 与 16mM 苯酚和 16mM 间甲酚。添加锌前用氢氧化钠调节 pH 至 7.5, 分批少量加入乙酸锌至 1Zn/6ins, 至 3Zn/6ins (添加 I), 至 5.62Zn/6ins (添加 II) 及至 6Zn/6ins (III)。然后加入氯化钠至 10mM 后, 用氢氧化钠调节 pH 至 7.5, 并用水调整体积。

[1047] 将门冬胰岛素 (600  $\mu$ M) 悬浮于水, 加入盐酸至约 pH 2.5, 依次加入乙酸锌至 3Zn/6ins、甘油至 1.6%、16mM 苯酚和 16mM 间甲酚、氯化钠 10mM 至 pH 7.5, 并加水至最终体积 (IV)。

[1048] 最后, 将门冬胰岛素 (IV) 与 B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素按 1:8 摩尔比相混合, 锌总浓度为 3.38Zn/6 胰岛素衍生物 (I) (低 Zn 混合物) 和 6Zn/6 胰岛素衍生物 (II) (高 Zn 混合物)。

[1049] 动物实验

[1050] 研究前 18 小时, 使母猪 (N = 8, 平均体重 80kg) 禁食。为了研究混合的门冬胰岛素和 B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素的作用, 经皮下随机给予每头猪低 Zn 混合物 (I) 或高 Zn 混合物 (II), 或者单独给予同一头猪 2 种类似物 (III 和 IV)。剂量为 0.9nmol/kg 门冬胰岛素和 7.2nmol/kg B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素。通过输注 20% 葡萄糖溶液, 使猪保持在各自禁食时的正常葡萄糖水平。根据血浆葡萄糖浓度的变化, 凭经验调整葡萄糖输注速率。0-24 小时时间采集血样用于免疫反应胰岛素的特异性 ELISA 血浆分析, 药代动力学特征见图 13 和图 14。

[1051] 结论

[1052] 对两个混合制品中两个胰岛素组分的钝化程度进行了测试。在低锌浓度的混合物中 (3.38Zn/6 胰岛素衍生物), 门冬胰岛素和胰岛素 454 中均观察到明显的钝化。然而, 当锌浓度增加至 6 锌/6 胰岛素衍生物时, 未观察到药代动力学特征的钝化。葡萄糖输注速率好于各个胰岛素类似物的药代动力学特征之和。

[1053] 实施例 6. 柠檬酸盐作为锌缓冲剂

[1054] 将 B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 (B30) 胰岛素 (胰岛素衍生物) (至 600  $\mu$ M) 悬浮于水, 溶解后加入甘油 1.6%、苯酚 16mM 和间甲酚 16mM。用氢氧化钠调节 pH 至 7.5, 在三种制剂中分别将柠檬酸盐加至 0.6mM、1.8mM 和 6mM, 将乙酸锌加至 6 锌/6 胰岛素衍生物。

然后加入氯化钠至 10mM、磷酸钠 (pH 7.5) 至 5mM 后,用氢氧化钠调节 pH 至 7.5 或 7.8,用水调整体积。

[1055] 在 37°C 下贮存 2 周后,与贮存于 5°C 的相比,按实施例 4 所述用 SEC 法采用 2mM 苯酚洗脱,对制剂进行研究。包括不含柠檬酸盐的 3、5 和 6Zn/6 胰岛素衍生物参比制剂。

[1056] 门冬胰岛素 (3Zn/6ins) 和长效胰岛素衍生物 30 : 70 的混溶性,如从 SEC 收集流分并用 HPLC 定量测定高分子量流分 (峰 1) 以及低分子量流分 (峰 2) 中存在速效和长效胰岛素一样。流分分割和定量参照实施例 4。

[1057] 结果 :

[1058] 表 2 :

[1059]

制剂: 中性溶解的胰岛素衍生物 600 $\mu$ M, 甘油 1.6%, 苯酚 16mM, 间甲酚 16mM, 柠檬酸盐和添加锌, 氯化钠 10mM, 磷酸盐 5mM, pH 7.5	SEC 洗脱液:	Kav 峰 1	相对面积% 峰 1	Kav 峰 2	相对面积% 峰 2
柠檬酸盐 0.6mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	97	0.73	3
柠檬酸盐 1.8mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	96	0.73	4
柠檬酸盐 6.0mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	96	0.73	4
柠檬酸盐 0mM, 3 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	94	0.73	6
柠檬酸盐 0mM, 5 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	98	0.73	2
柠檬酸盐 0mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	98	0.73	2
柠檬酸盐 0.6mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	96	0.73	4

[1060]



柠檬酸盐 1.8mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	96	0.73	4
柠檬酸盐 6.0mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	95	0.73	5
柠檬酸盐 0mM, 3 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	93	0.73	7
柠檬酸盐 0mM, 5 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	98	0.73	2
柠檬酸盐 0mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	98	0.73	2
柠檬酸盐 0.6mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, pH 7.8, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	96	0.73	4
柠檬酸盐 0.6mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 98	0.73	门冬胰岛素 97
柠檬酸盐 1.8mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 97	0.73	门冬胰岛素 98
柠檬酸盐 6.0mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 97	0.73	门冬胰岛素 98
柠檬酸盐 0mM, 3 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 95	0.73	门冬胰岛素 96
柠檬酸盐 0mM, 5 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 98	0.73	门冬胰岛素 99
柠檬酸盐 0mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 5°C 保存	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 97	0.73	门冬胰岛素 97

[1061]

柠檬酸盐 0.6mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 97	0.73	门冬胰岛素 96
柠檬酸盐 1.8mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 97	0.73	门冬胰岛素 97
柠檬酸盐 6.0mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 96	0.73	门冬胰岛素 97
柠檬酸盐 0mM, 3 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 93	0.73	门冬胰岛素 79
柠檬酸盐 0mM, 5 Zn/6 胰岛素衍生物, 37°C 保存 2 周	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 98	0.73	门冬胰岛素 97
柠檬酸盐 0mM, 6 Zn/6 胰岛素衍生物, 贮存 2 周 37°C	+苯酚	0.54	胰岛素衍生物 98	0.73	门冬胰岛素 96

[1062] 结论：

[1063] 使用包含 2mM 苯酚的 SEC 等渗盐水洗脱液, 长效胰岛素衍生物主要缔合成白蛋白大小, 这对应于双六聚体形式 (以及不是更高的缔合形式), 而且锌浓度由 3Zn/6 胰岛素衍生物增加至 5 和 6Zn/6 胰岛素衍生物时, 单体形式的胰岛素衍生物含量降低。加入相当于 6Zn/6 胰岛素衍生物锌浓度 1、3 或 10 倍的柠檬酸盐, 与 3Zn/ 胰岛素衍生物对照相比, 显示出单体胰岛素衍生物的含量较低。在 37°C 保存 2 周后自我缔合模式不发生改变。

[1064] 在 5°C 保存后和在 37°C 保存 2 周后, 不含柠檬酸盐所配制的门冬胰岛素 (3Zn/6ins) 与在本实施例上述配制的一系列长效胰岛素衍生物的混溶性 (30 : 70 摩尔比) 如表中所示。包含 3 个水平的柠檬酸盐和 6Zn/6ins 的胰岛素衍生物制剂在 37°C 保存 2 周后显示可与门冬胰岛素可相混合, 虽然在 3Zn/6ins 的正常锌水平下, 门冬胰岛素部分包含在分子量流分中。

[1065] 实施例 7. 加入柠檬酸锌

[1066] 将 B29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 (胰岛素衍生物) (600  $\mu$ M) 悬浮于水, 溶解 (需要时加入氢氧化钠), 加入甘油 1.6%、苯酚 16mM 和间甲酚 16mM。用氢氧化钠调节 pH 至 7.5, 加入柠檬酸锌至 0.6mM 锌离子。然后氯化钠加至 10mM, 磷酸钠 (pH 7.5) 加至 5mM 后, 调节 pH 至 7.5, 并用水调整体积。

[1067] 实施例 8. 加入表面活性剂以及与速效类似物的混合物

[1068] 将 B29N  $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素 (胰岛素衍生物) (至 600  $\mu$ M) 悬浮于水, 溶解后加入甘油 1.6% 和 16mM 苯酚和 16mM 间甲酚。用氢氧化钠调节 pH 至 7.5,

乙酸锌至 6 锌 /6 胰岛素衍生物 (任选锌为柠檬酸盐)。然后氯化钠加至 10mM, 表面活性剂例如泊洛沙姆 188 或聚山梨酯 20 至约 0.002%, 磷酸钠 (pH 7.5) 加至 5mM 后, 调节 pH 至 7.5, 并用水调整体积。

[1069] 将门冬胰岛素 (AspB28 人胰岛素) 或赖脯胰岛素 (LysB28ProB29 人胰岛素) 或赖谷胰岛素 (LysB3GluB29 人胰岛素) (均为 600  $\mu$ M) 与 B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素按摩尔比约 3/7 至约 7/3 混合, B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 胰岛素按照实施例 7 和实施例 8 所述方法配制。

[1070] 实施例 9

[1071] 表 3 表示按实施例 4 所述用 2Zn(II)/6 胰岛素或 6Zn(II)/6 胰岛素所测的 SEC。

[1072] 对于表中所列化合物的制品, 可参见 W02006/082204 和 W02006/082205。

[1073] 表 3:

[1074]

制剂: 中性溶解的 600 $\mu$ M 胰岛素, 甘油 1.6%, 苯酚 16mM, 间甲酚 16mM, 2 或 6 锌/六聚体, 氯化钠 10mM, 磷酸盐 7mM, pH 7.5	Kav 2 Zn 峰 1	相对面积 %峰 1	Kav 6 Zn 峰 1	相对面积 %峰 1
B29N $\epsilon$ -(4-[(2-羧基-乙基)-(15-羧基-十五烷酰基)-氨基]-甲基)-苯甲酰基) 脱 B30 人胰岛素	0.01	84	0.00	98
B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基 - $\gamma$ -Glu-(3-(2-{2-[2-(2-氨基-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-丙酰基) 脱 B30 人胰岛素	0.09	79	0.06	89
B29N $\epsilon$ -(4-[(2-羧基-乙基)-(14-羧基-十四烷酰基)-氨基]-甲基)-苯甲酰基) 脱 B30 人胰岛素	0.09	55	0.00	96
B29N $\epsilon$ -[(5-[(2-羧基-乙基)-(15-羧基-十五烷酰基)-氨基]-甲基)-咪喃-2-羧基) 脱 B30 人胰岛素	0.02	81	0.03	96
B29N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu-(4-氨基甲基-苯甲酰基) 脱 B30 人胰岛素	0.15	48	0.00	97
B29N $\epsilon$ -(2-[(2-羧基-乙基)-(15-羧基-十五烷酰基)-氨基]-甲基)-苯甲酰基) 脱 B30 人胰岛素	0.16	54	0.03	93

[1075] 实施例 10

[1076] 1,16-十六烷二酸一苄酯的制备

[1077] 将十六烷二酸 (20.0g, 69.8mmol)、正辛烷和 Dowex<sup>R</sup> 悬浮并加热至回流。加入甲酸苄酯 (22.0g, 162mmol)。6 小时后再加入甲酸苄酯 (22.0g, 162mmol)。持续加热 50 小时。使反应混合物在 80℃ 下过滤。使滤液冷却至 20℃, 经过滤收集沉淀。将粗产物 (20.2g) 在 20℃ 下悬浮于二氯甲烷 (220ml) 4 小时。将悬浮液过滤, 将滤液在 20-30℃ 下抽真空至干。将所得固体 (13.9g) 从 2-丙醇 (140ml) 中重结晶出来。

[1078] 产物经过滤离析, 在 30-40℃ 下减压干燥至恒重。产量: 10.2g (39%, 白色材料)。

[1079] L-2-(15-苄氧基羰基-十五烷酰氨基)-戊二酸 5-苄酯 1-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基)酯的制备

[1080] 将 1,16-十六烷二酸一苄酯 (20.0g, 53.1mmol) 在 35-40℃ 下溶于丙酮。加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (6.42g/55.8mmol)。向所得溶液中加入二环己基碳二亚胺 (DCC) (12.1g/58.4mmol)。将反应混合物在 35℃ 下搅拌 3-4 小时。向所得悬浮液中加入三乙胺 (7.40ml, 53.1mmol) 或 L-谷氨酸  $\alpha$ -苄酯 (12.6g/53.1mmol)。将反应混合物在 35-40℃ 下搅拌 8-16 小时。使反应混合物冷却至 20-25℃。加入甲磺酸 (3.45ml/53.1mmol) 和 DCC (12.1g/53.1mmol)。将反应混合物在 20-25℃ 下搅拌 8-16 小时。反应混合物过滤后, 抽真空至干。使残余物在水 (100ml) 和甲苯 (200ml) 之间分配。水经蒸馏后使甲苯相不含水。将硅胶 (20g) 加到残余物中。将悬浮液在 20-25℃ 下搅拌 30 分钟后过滤。通过减压蒸发使滤液体积减少至约 100-120ml。在 15-30 分钟时间内加入正庚烷 (150ml)。将所得悬浮液搅拌 2 小时。产物经过滤离析, 在 20-25℃ 下减压干燥至恒重。产量: 21g (58%, 白色材料)。

[1081] L-2-(15-羧基-十五烷酰氨基)-戊二酸 5-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基)酯 (PC2414) 的制备

[1082] 将 L-2-(15-苄氧基羰基-十五烷酰氨基)-戊二酸 5-苄酯 1-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基)酯 (5.0g, 7.3mmol) 溶于含有三氟乙酸 (95  $\mu$ l) 的丙酮 (95ml) 中。加入披钼碳 10% (0.50g)。在 30-35℃ 搅拌下加入氢。当氢消耗停止时, 将反应混合物过滤。使滤液冷却至 20℃ 后, 在 15-30 分钟时间内加入正庚烷 (140ml)。使所得悬浮液冷却至 0-5℃ 2-3 小时。产物经过滤离析, 在 20-25℃ 下减压干燥至恒重。产量: 3g (84%, 白色材料)。

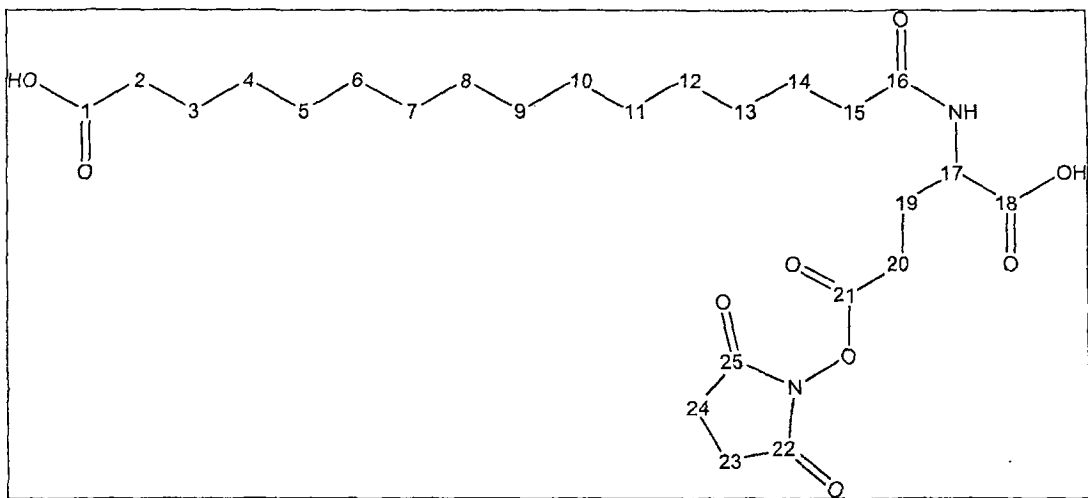
[1083] 用丙酮-d<sub>6</sub> 为溶剂, 通过质子 NMR (Bruker 600MHz) 分析产物。

[1084] 1D 光谱的质子 NMR 定位测定 (内标为 TMS,  $\delta$  0.0ppm)

[1085]

$^1\text{H}$	化学位移 $\delta$ (ppm)	积分	耦合模式	耦合常数 $^n\text{J}_{\text{HH}}$ (Hz)
H2	2.28	2H	t	$^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.5$
H3/H14	1.60	4H	m	ND
H4-H13	1.29	20H	m	ND
H15	2.26	2H	dt	$^2\text{J}_{\text{HH}} = 2.5$ , $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.5$
H17	4.59	1H	ddd	$^3\text{J}_{\text{HH}} = 8.0/7.5/5.2$
H19	2.31/2.10	2H	m	ND
H20	2.82/2.75	2H	ddd	$^2\text{J}_{\text{HH}} = 16.5$ , $^3\text{J}_{\text{HH}} = 10.0/6.0$
H23/H24	2.88	4H	s	-
NH	7.37	1H	d	$^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.5$

[1086]



[1087] 用 PC2414 使人胰岛素脱 B30  $\epsilon$ -氨基在 B29 位的赖氨酸酰化

[1088] 将 4g 脱 B30 人胰岛素悬浮于 64g 纯净水。加入 1.85ml 三乙胺 (TEA) 溶解脱 B30 人胰岛素, 并将 pH 升至 11.4-12.0。使溶液冷却至 2-5 $^{\circ}\text{C}$ 。

[1089] 将 448mg PC2414 溶于用 10  $\mu\text{l}$  5% 硫酸稳定的 3.5g NMP (N-甲基-2-吡咯烷酮) 中。

[1090] 在保持低温的情况下, 在 20 分钟时间内, 搅拌脱 B30 人胰岛素溶液并加入 PC2414 溶液。

[1091] 加入 PC2414 后, 反应混合物用 2.5 重量份的溶液稀释, 溶液的组成为: 三羟甲基氨基甲烷 (20mmol/kg)、乙酸铵 (30mmol/kg)、乙醇 42.5% (重量/重量), 余量为纯净水, pH 7.5。

[1092] 稀释后, 在搅拌的同时, 慢慢加入 1M 乙酸调节 pH 至 7.5。

[1093] HPLC 分析表明形成了 72.11% Lys<sup>B29</sup> (N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素, 残留 14.22% 的脱 B30 人胰岛素。

[1094] 分析型 HPLC 法:

[1095] 用辛基二甲基甲硅烷基取代的硅胶填充的柱子 (150x 4.6mm 内径), 硅胶孔径约 100 $\text{\AA}$ , 颗粒直径约 3.5  $\mu\text{m}$ , 在 40 $^{\circ}\text{C}$  下以 1ml/分钟 的流速用含有以下成分的混合物平衡: 1:

缓冲剂, 20mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和 100mmol  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 在含有 7.8% (重量/重量) 的水性缓冲液中使用 NaOH 调节至 pH 5.9; 2: 含有 42.8% (重量/重量) 乙腈的乙腈溶剂, 以制备 25% (重量/重量) 乙腈溶液。

[1096] 约 20 分钟后,  $\text{Lys}^{\text{B29}}$  (N $\epsilon$ -十六烷二酰基- $\gamma$ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素从柱中洗脱出。约 6 分钟后脱 B30 人胰岛素从柱中洗脱出。

[1097] 实验 (II)

[1098] 本发明胰岛素衍生物相对于人胰岛素的功效

[1099] 实验当天, 将重量为 238-383g 的 Sprague Dawley 雄性大鼠用于钳夹实验。大鼠在控制环境条件下自由饮食, 在钳夹实验前禁食过夜 (从下午 3:00 起)。

[1100] 实验方案

[1101] 手术前使大鼠适应动物设施至少 1 周。钳夹实验前大约 1 周, 在氟烷麻醉下将 Tygon 导管插入颈静脉 (用于输注) 和颈动脉 (用于采血样), 使导管外露并固定在颈后。手术后给予大鼠兽用 Streptocilin (Boehringer Ingelheim; 0.15ml/大鼠, 肌内), 在恢复期将动物放入监护室 (25°C)。为了获得痛觉缺失, 麻醉期间给予 Anorphin (0.06mg/大鼠, 皮下), 从麻醉中完全复原后 (2-3 小时) 给予卡洛芬 (Rimadyl) (1.5mg/kg, 皮下), 同样两天, 一天一次。

[1102] 根据 (1) 修改所要使用的钳夹技术。实验当天上午 7:00, 给禁食过夜 (从前一天下午 3:00 起) 的大鼠称重, 再接上采样注射器和输注系统 (Harvard 22Basic 泵, Harvard, Perfectum Hypodermic 玻璃注射器, Aldrich), 然后开始实验前, 放入各自的钳夹笼, 在其中休息大约 45 分钟。整个实验期间, 大鼠在其通常的垫料上能够自由活动, 自由饮水。在 30 分钟基础时间内, 每隔 10 分钟测量血浆葡萄糖水平后, 以恒速注入 (静脉内) 待测胰岛素衍生物和人胰岛素 (1 剂量水平/大鼠,  $n = 6-7$ /剂量水平) 300 分钟。整个过程中每隔 10 分钟测定血浆葡萄糖水平, 为了维持血糖正常, 因而调节 20% 葡萄糖水溶液的输注。从每只大鼠中收集重新悬浮的红细胞样品, 大约  $\frac{1}{2}$ ml 的体积通过颈动脉导管再输回。

[1103] 每次实验当天, 在钳夹实验前和结束时, 取各个待测胰岛素衍生物溶液的样品和人胰岛素溶液, 用 HPLC 确定肽浓度。在研究前相应时间点和研究结束时, 测定大鼠胰岛素和 C-肽以及待测胰岛素衍生物和人胰岛素的血浆浓度。在实验结束时用过量戊巴比妥处死大鼠。

[1104] 实验 (III)

[1105] 测定猪体内本发明胰岛素衍生物的  $T_{50\%}$

[1106]  $T_{50\%}$  是当 A14Tyr [ $^{125}\text{I}$ ] 标记的待测胰岛素衍生物注射量的 50% 从注射部位消失的时间, 用外部  $\gamma$ -计数器测量。

[1107] 遵照实验室动物福利原则, 采用无特定病原体的 LYDD 非糖尿病母猪 (Danish Landrace, Yorkshire 与 Duroc 的杂交后代) (Holmenlund, Haarloev, Denmark), 用于药代动力学和药效动力学研究。猪处于清醒状态, 4-5 月龄, 重 70-95kg。实验前 18 小时使动物禁食过夜。

[1108] 用 Tyr<sup>A14</sup> 经  $^{125}\text{I}$  标记的胰岛素衍生物配制的制品给猪皮下注射, 见 Ribel, U., Jørgensen, K, Brange, J. 和 Henriksen, U. The pig as a model for subcutaneous insulin absorption in man (用作人类皮下胰岛素吸收模型的猪). Serrano-Rios,

M. 和 Lefèbvre, P. J. 891-896. 1985. Amsterdam ;New York ;Oxford, Elsevier Science Publishers. 1985(会议录))。

[1109] 实验开始时,在每头猪颈部2个不同部位注射60nmol剂量的本发明胰岛素衍生物(试验化合物)和60nmol剂量的地特胰岛素(两者TyrA14上都用<sup>125</sup>I标记)。

[1110] 采用传统的外部 $\gamma$ 计数方法(Ribel, U. Subcutaneous absorption of insulin analogues(胰岛素类似物的皮下吸收). Berger, M. 和 Gries, F. A. 70-77(1993). Stuttgart ;New York, Georg Thime Verlag(会议录))的改进方法,监测皮下注射部位放射性标记的消失。用这种改进的方法,可用无线便携式装置(Scancys Laboratorieteknik, Værløse, DK-3500, Denmark),连续测量几天内皮下药库放射性的消失。以1分钟的间隔进行测量,统计值用本底活性进行校正。

门冬胰岛素 600  $\mu\text{M}$ ,  
3 个锌原子/6 分子胰岛素

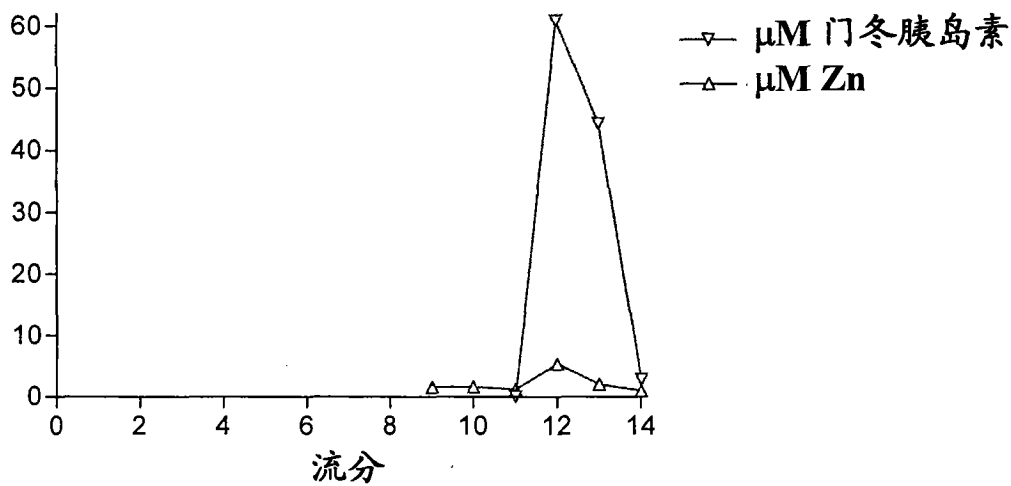


图 1

门冬胰岛素 600  $\mu\text{M}$ ,  
6 个锌原子/6 分子胰岛素

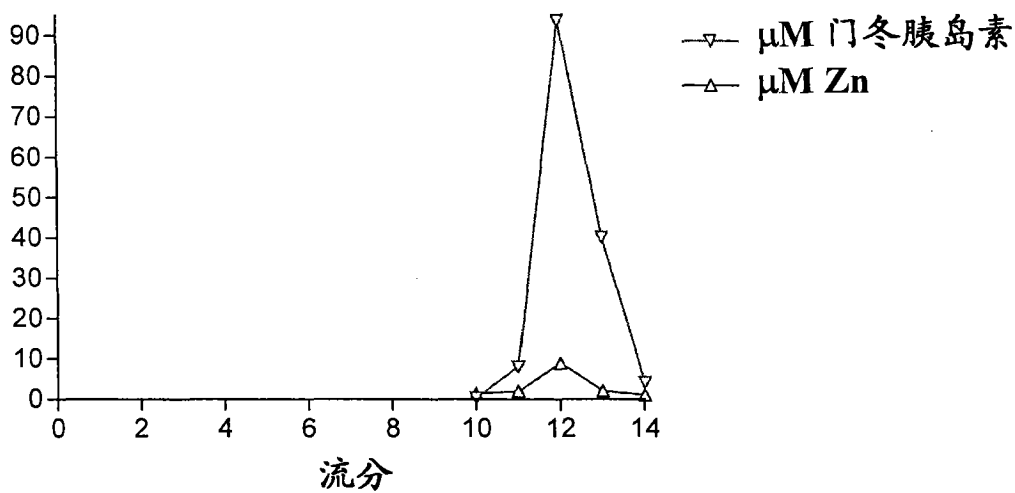


图 2



**Lys<sup>B29</sup>N<sup>E</sup>-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$ M,  
3 个锌原子/6 分子酰化胰岛素**

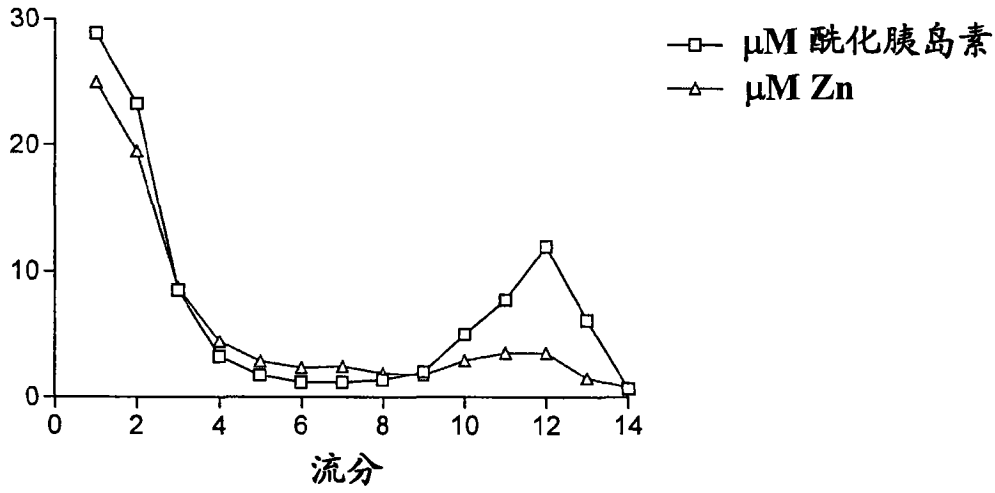


图 3

**Lys<sup>B29</sup>-N<sup>E</sup>-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$ M,  
4 个锌原子/6 分子酰化胰岛素**

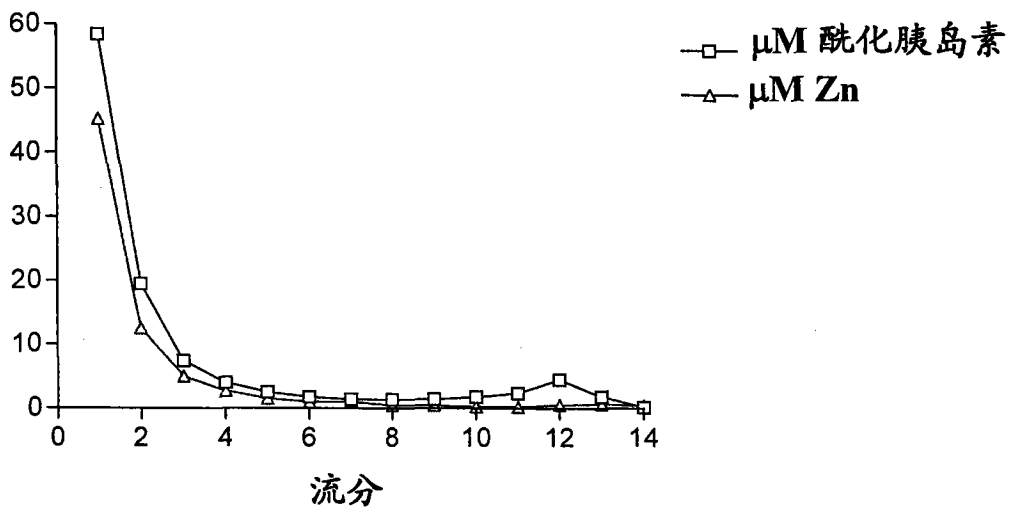


图 4

Lys<sup>B29</sup>N<sup>E</sup>-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$ M,  
6 个锌原子/6 分子酰化胰岛素

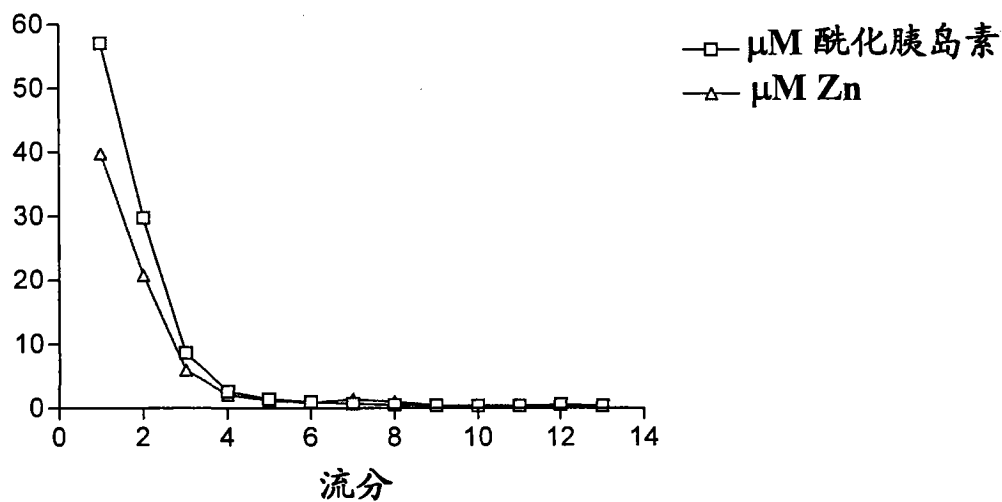


图 5

Lys<sup>B29</sup>N<sup>E</sup>-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu$ M,  
8 个锌原子/6 分子酰化胰岛素

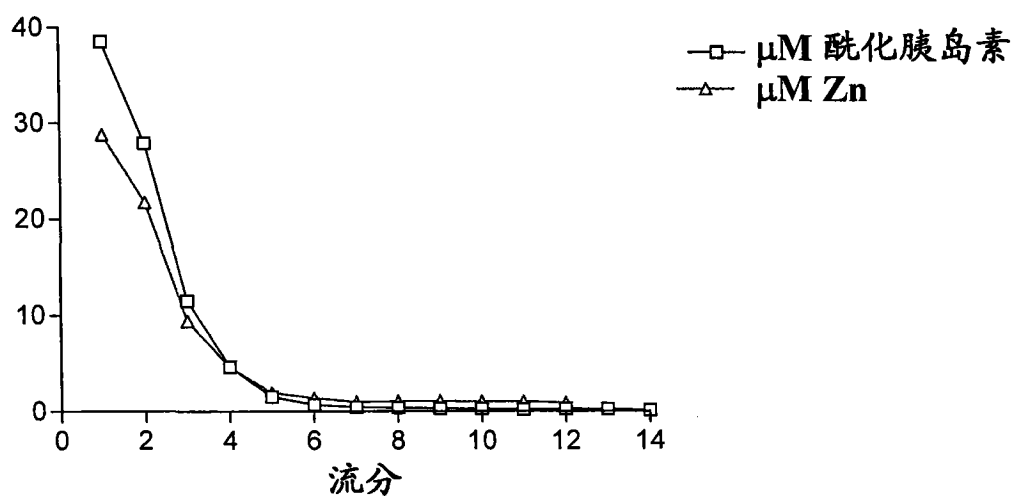


图 6

门冬胰岛素 180  $\mu\text{M}$ /Lys<sup>B29</sup>-N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素  
 素 840  $\mu\text{M}$ , 3.6 个锌原子/6 分子酰化胰岛素

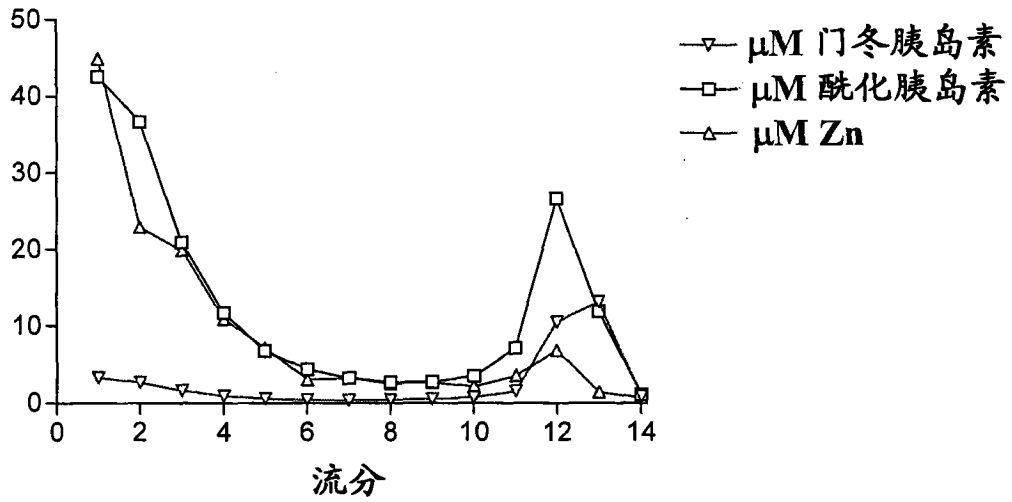


图 7

门冬胰岛素 180  $\mu\text{M}$ /Lys<sup>B29</sup>-N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基  
 $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 420  $\mu\text{M}$ ,  
 4.3 个锌原子/6 分子酰化胰岛素

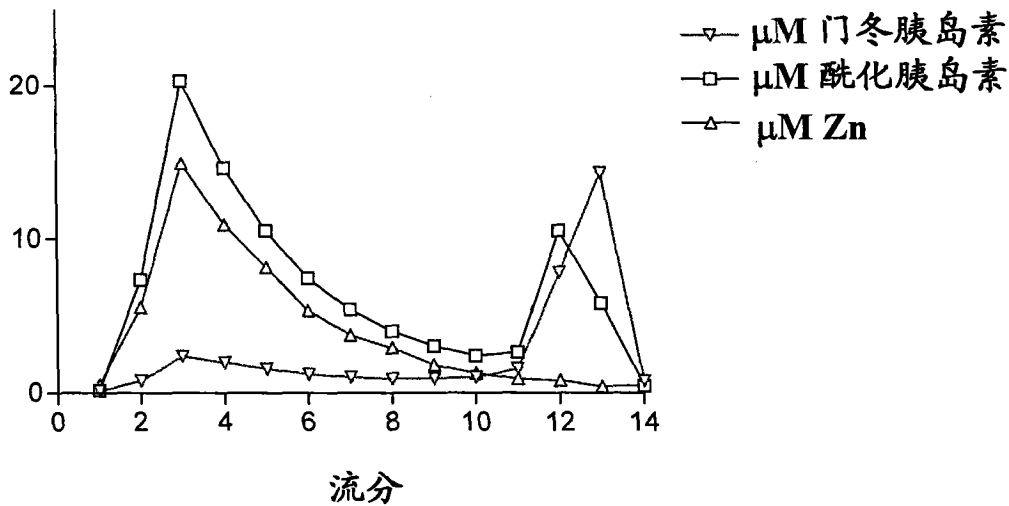


图 8

门冬胰岛素 300  $\mu\text{M}$ /Lys<sup>B29</sup>-N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基  
 $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 600  $\mu\text{M}$ ,  
 4.5 个锌原子/6 分子酰化胰岛素

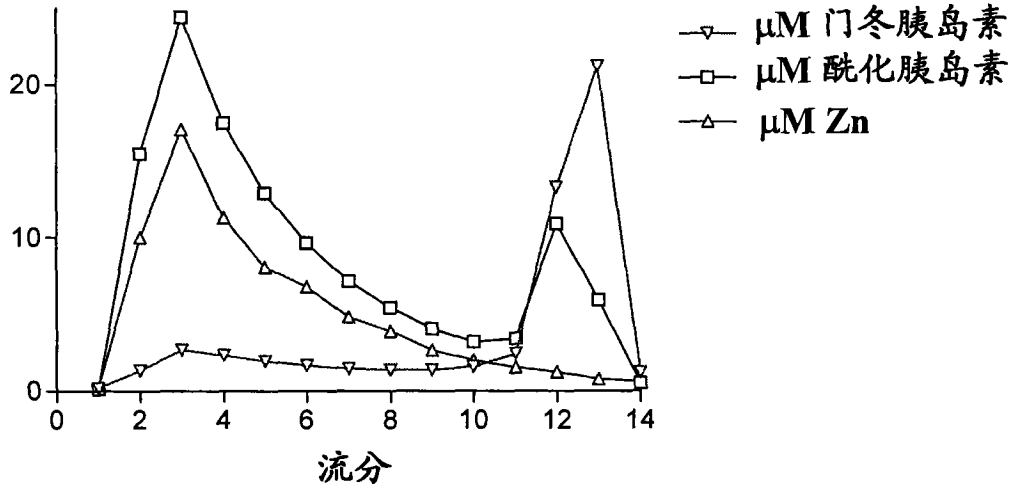


图 9

门冬胰岛素 180  $\mu\text{M}$ /Lys<sup>B29</sup>-N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基- $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素  
 420  $\mu\text{M}$ , 8.6 个锌原子/6 分子酰化胰岛素

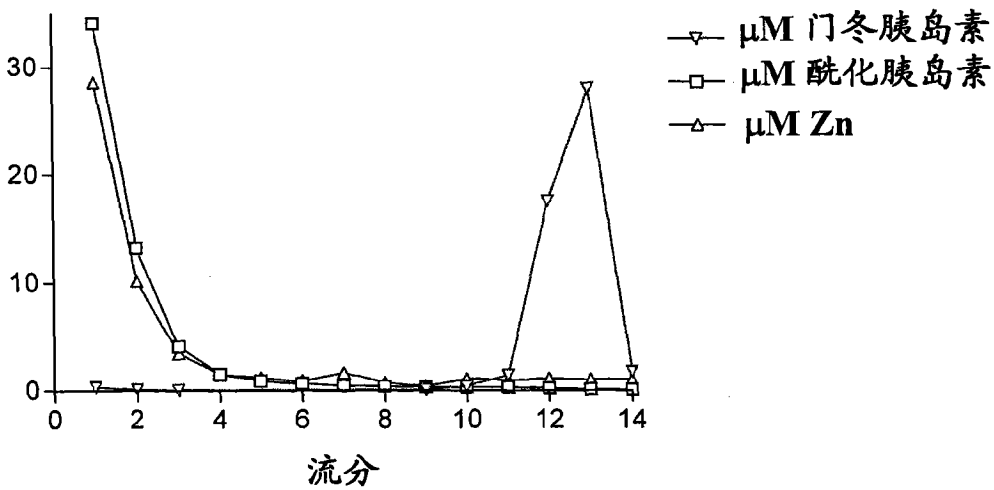


图 10

门冬胰岛素 180 $\mu\text{M}$ /Lys<sup>B29</sup>-N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基  
 $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 420  $\mu\text{M}$ ,  
 11.4 个锌原子/6 分子酰化胰岛素

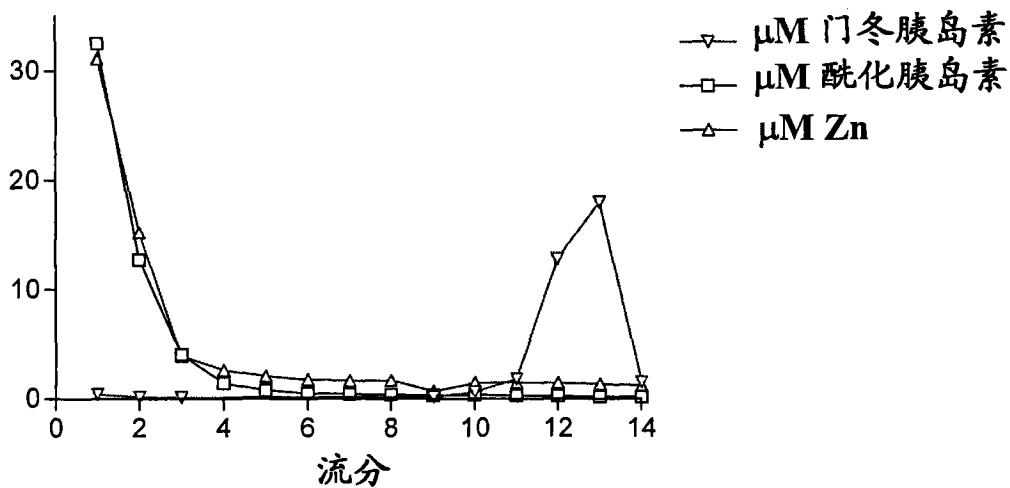


图 11

门冬胰岛素 300  $\mu\text{M}$ /Lys<sup>B29</sup>-N<sup>ε</sup>-十六烷二酰基  
 $\gamma$ -Glu 脱 B30 人胰岛素 300  $\mu\text{M}$ ,  
 12 个锌原子/6 分子酰化胰岛素

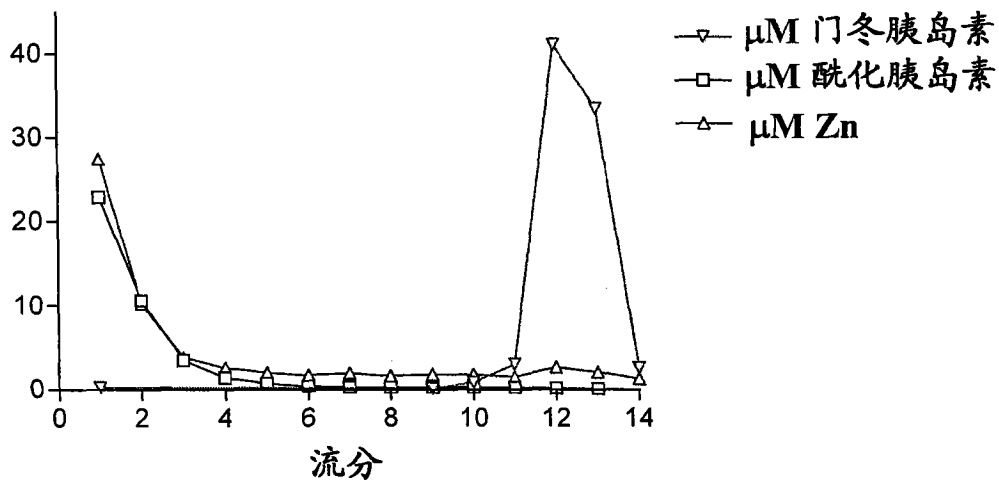


图 12

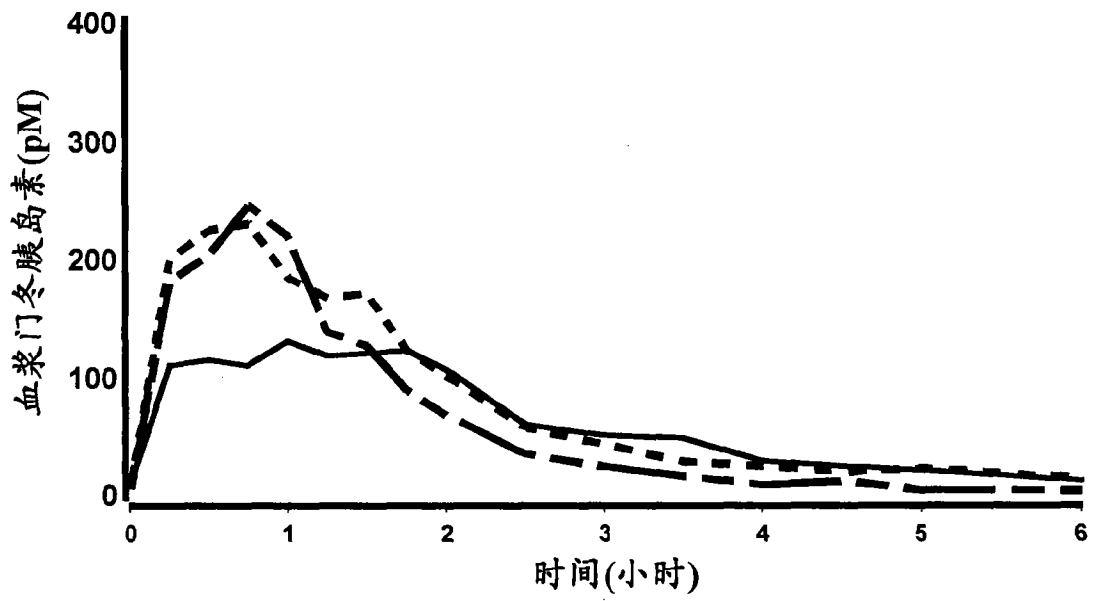


图 13

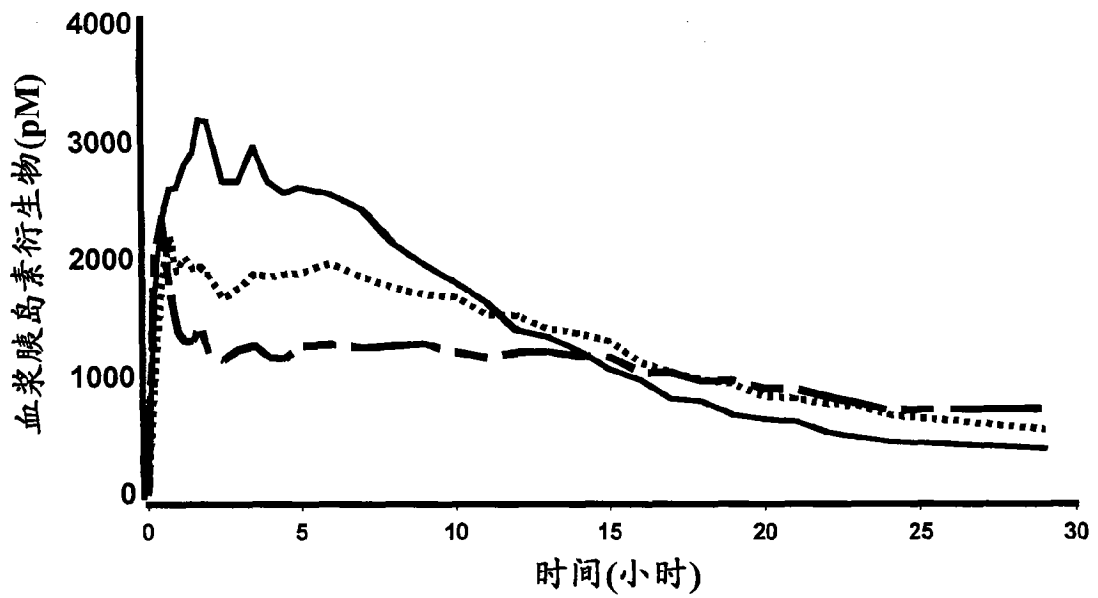


图 14