

胰岛素衍生物

技术领域

本发明涉及治疗性肽领域，具体涉及新型胰岛素衍生物，其药物制剂、其与长效 GLP-1 化合物的药物组合物、其与快速起效的胰岛素的药物组合物、及所述胰岛素衍生物、药物制剂和药物组合物的医药用途。

背景技术

胰岛素是由胰的 β 细胞分泌的多肽激素。胰岛素由命名为 A 链和 B 链的 2 条多肽链组成，所述 A 链和 B 链通过 2 个链间二硫键连接在一起。在人、猪和牛胰岛素中，A 链和 B 链分别包含 21 和 30 个氨基酸残基。然而，不同物种之间，在 2 条链的不同位置中存在的氨基酸残基存在差异。基因工程改造的广泛使用已使得可以通过替换、缺失和添加一个或多个氨基酸残基来制备天然存在的胰岛素的类似物。

胰岛素能够用于治疗糖尿病和与之关联或起因于其的疾病，在维持正常代谢调节中是必需的。但是人胰岛素等天然胰岛素作用时间较短，使得病人必须频繁注射，使患者产生许多注射相关的不适。因此，人们一直致力于获得药效好、作用时间更长、注射频率更低的胰岛素衍生物或类似物来改善因较高频率的胰岛素注射所带来的不便和不适。

WO1995007931A1 公开了已上市的长效胰岛素地特胰岛素，其分子结构特点是去掉人胰岛素 B 链 30 位的苏氨酸，并在 B 链的第 29 位赖氨酸残基上连接有 14 碳脂肪单酸。WO2005012347A2 公开了已上市的另一种长效胰岛素德谷胰岛素，德谷胰岛素是一种比地特胰岛素作用时间更长的新型超长效胰岛素，其分子结构特点是去掉人胰岛素 B 链 30 位苏氨酸，通过 1 个谷氨酸分子将 16 碳脂肪二酸侧链连接在 B29 位赖氨酸残基。CN101573133B 和 WO2009/010428 公开了 PEG (PEGylated) 化延长的胰岛素，与常规的未修饰的胰岛素相比，PEG 化延长的胰岛素具有更长的作用时间。WO2013086927A1 和 WO2018/024186 公开一种长效的人胰岛素类似物的酰化衍生物。

然而，迄今为止，尚未有比每日皮下注射一次的频率更低的基础胰岛素产品获批上市。

因此,目前仍然需要相比于已上市的胰岛素(例如德谷胰岛素)或已知的胰岛素衍生物,具有更好的药效或功效、更长的作用时间、更低的施用频率、更优异的理化性质的胰岛素衍生物或类似物。

发明内容

本发明提供了新型胰岛素衍生物(例如酰化胰岛素)。发明人通过大量试验,出乎意料地发现所述新型胰岛素衍生物(例如酰化胰岛素)相比于已上市的德谷胰岛素(商品名“诺和达”)或其它某些胰岛素衍生物,具有预料不到的显著增加的功效或药效、更长的持续作用时间、更长的体内半衰期、良好的生物利用率、更好的安全性、及具有更令人满意的物理稳定性、化学稳定性、和溶解度。

在一个方面,本发明提供了胰岛素衍生物,所述胰岛素衍生物包含胰岛素母体、白蛋白结合残基、和连接基团 Lin,所述胰岛素母体为天然存在的胰岛素或胰岛素类似物,所述白蛋白结合残基经由连接基团 Lin 与所述胰岛素母体连接,其中,

所述连接基团 Lin 是具有至少 10 个、优选至少 15 个、优选至少 25 个、优选至少 30 个、优选至少 36 个、优选 15-100 个、优选 25-90 个、优选 30-80 个、优选 30-59 个、优选 30-54 个碳原子的亲水性连接基团;或者,所述连接基团 Lin 包含至少 5 个中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基;优选所述连接基团 Lin 包含至少 6 个中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基;优选所述连接基团 Lin 包含 5-9 个中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基;或者,所述连接基团 Lin 包含具有至少 15 个、优选至少 20 个、优选至少 24 个、优选 15-50 个、优选 20-39 个碳原子的亚烷基二醇,和

所述白蛋白结合残基包含 20-40 个碳原子,优选所述白蛋白结合残基是包含具有 20-40 个碳原子的线性或分支的亲脂性基团,优选所述白蛋白结合残基是包含 20-26 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸(更优选 20-24 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸),其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基和所述脂肪族二酸的羧基之一中去除。

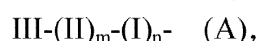
发明人通过大量实验,意外发现,本发明的胰岛素衍生物中的一些长度的白蛋白结合残基和一定长度的亲水性连接基团的组合,使得本发明的胰岛素衍生物相对于已有的胰岛素衍生物,在具有相当或更长的作用时间的同时,

还具有预料不到的显著增加的药效、并且在白蛋白存在时，对胰岛素受体的结合能力受白蛋白的影响显著降低，对胰岛素受体具有显著提高的结合能力。

在一些实施方案中，所述胰岛素母体包含至少一个赖氨酸残基，所述白蛋白结合残基经由连接基团 Lin 与所述胰岛素母体的赖氨酸残基或 N 末端氨基酸残基的氨基相连接。

在一些实施方案中，所述胰岛素衍生物还包含一个或多个连接基团 II，所述连接基团 II 是酸性的氨基酸残基，所述连接基团 II 连接在所述白蛋白结合残基与所述连接基团 Lin 之间、和/或连接在所述连接基团 Lin 和所述胰岛素母体之间；优选，所述连接基团 II 连接在所述白蛋白结合残基与所述连接基团 Lin 之间。

在本发明的另一个方面，提供了胰岛素衍生物，其是酰化胰岛素，所述酰化胰岛素的胰岛素母体为天然存在的胰岛素或胰岛素类似物，且包含至少一个赖氨酸残基，所述酰化胰岛素的酰基部分与所述胰岛素母体的赖氨酸残基或 N 末端氨基酸残基的氨基相连接，所述酰基部分如式(A)所示：



其中，

m 为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10, n 为 5、6、7、8 或 9；

I 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基；

II 是酸性的氨基酸残基；

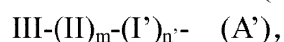
III 是包含 20-26 个（优选 20-24 个）碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸，其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基和所述脂肪族二酸的羧基之一中去除；

III、II、和 I 之间以酰胺键连接；和

II 和 I 在式(A)中出现的顺序可以独立地互换；

或者

所述酰基部分如式(A')所示：



其中，

m 为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10, n' 为整数；

I' 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基；

II 是酸性的氨基酸残基；

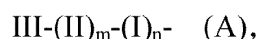
III 是包含 20-26 个(优选 20-24 个)碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸, 其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基和所述脂肪族二酸的羧基之一中去除;

III、II、和 I' 之间以酰胺键连接;

II 和 I' 在式(A')中出现的顺序可以独立地互换; 和

(I')_n 的总碳原子数为 15-100 个、优选 20-100 个、优选 25-90 个、优选 30-80 个、优选 30-59 个、优选 30-54 个。

在本发明的另一个方面, 提供了胰岛素衍生物, 其是酰化胰岛素, 所述酰化胰岛素的胰岛素母体为天然存在的胰岛素或胰岛素类似物, 且包含至少一个赖氨酸残基, 所述酰化胰岛素的酰基部分与所述胰岛素母体的赖氨酸残基或 N 末端氨基酸残基的氨基相连接, 所述酰基部分如式(A)所示:



其中,

m 为 0 或 1-10 的整数, n 为 5、6、7、8 或 9;

I 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基;

II 是酸性的氨基酸残基;

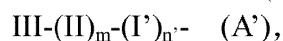
III 是包含 20-26 个(优选 20-24 个)个碳原子的脂肪族二酸, 其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除;

III、II、和 I 之间以酰胺键连接; 和

II 和 I 在式(A)中出现的顺序可以独立地互换;

或者

所述酰基部分如式(A')所示:



其中,

m 为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10, n' 为整数;

I' 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基;

II 是酸性的氨基酸残基;

III 是包含 20-26 个(优选 20-24 个)碳原子的脂肪族二酸, 其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除;

III、II、和 I' 之间以酰胺键连接;

II 和 I' 在式(A')中出现的顺序可以独立地互换; 和

(I')_n 的总碳原子数为 25-90 个、优选 30-80 个、优选 30-59 个、优选 30-54 个。

在一些实施方案中, n 为优选地, n 为 5、6、7、或 8; 和/或

m 为 1-6 的整数, 优选地, m 为 1、2、3、或 4, 优选地, m 为 1 或 2, 优选地, m 为 1; 和/或

III 是包含 20-26 个(优选 20-23 个)碳原子的脂肪族二酸, 优选 III 是包含 20、21、或 22 个碳原子的脂肪族二酸, 其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除; 和/或

所述胰岛素母体包含一个赖氨酸残基。

在一些实施方案中, I 是: $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ 、或 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; 优选 I 是 $\text{-HN-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$; 或者, I' 是 $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{10}\text{-CH}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{11}\text{-CH}_2\text{-CO-}$ 、
 $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{12}\text{-CH}_2\text{-CO-}$ 、或 $\text{-HN-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_8\text{-CH}_2\text{-CO-}$; 和/或

II 是选自下述的氨基酸残基: γGlu 、 αGlu 、 βAsp 、 αAsp 、 $\gamma\text{-D-Glu}$ 、 $\alpha\text{-D-Glu}$ 、 $\beta\text{-D-Asp}$ 或 $\alpha\text{-D-Asp}$, 优选地, II 选自 γGlu 或 βAsp ; 和/或

III 是 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO-}$ 、 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{19}\text{-CO-}$ 、 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{20}\text{-CO-}$ 、 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{21}\text{-CO-}$ 、 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{22}\text{-CO-}$ 、或 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{24}\text{-CO-}$, 优选, III 是 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO-}$ 、 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{19}\text{-CO-}$ 、 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{20}\text{-CO-}$ 、 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{21}\text{-CO-}$ 或 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{22}\text{-CO-}$, 优选地 III 是 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO-}$ 、 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{20}\text{-CO-}$ 或 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{22}\text{-CO-}$ 。

在一些实施方案中,式(A)通过I的C末端与所述胰岛素母体的赖氨酸残基或N-末端氨基酸残基的氨基连接或者式(A')通过I'的C末端与所述胰岛素母体的赖氨酸残基或N-末端氨基酸残基的氨基连接。

在一些实施方案中,所述酰基部分与所述胰岛素母体的赖氨酸残基的 ϵ 氨基相连接。

在一些实施方案中,所述胰岛素母体的赖氨酸残基位于B29位处。

在一些实施方案中,所述胰岛素母体选自下述胰岛素或胰岛素类似物: desB30人胰岛素(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,分别表示A链和B链);A14E, B16H, B25H, desB30人胰岛素(SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4,分别表示A链和B链);A14E, B16E, B25H, desB30人胰岛素(SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,分别表示A链和B链);人胰岛素(SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,分别表示A链和B链);A21G人胰岛素(SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10,分别表示A链和B链);A21G, desB30人胰岛素(SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12,分别表示A链和B链);或B28D人胰岛素(SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14,分别表示A链和B链);优选地,所述胰岛素母体为desB30人胰岛素;A14E, B16H, B25H, desB30人胰岛素;或A14E, B16E, B25H, desB30人胰岛素。

在一些实施方案中,所述酰化胰岛素选自下述胰岛素: B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-6xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基

- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-7xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-8xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-8xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-7xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十

二烷二酰基-8xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; 或 B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素

岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-7xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-8xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-8xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-7xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H,

B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二

酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一
烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二
十一烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H,
B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H,
B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E,
B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛
素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人
胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-6xOEG),
desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基
- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二
酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二
烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二
十烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二
十六烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H,
B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H,
B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H,
B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E,
B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E,
B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E,
B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E,
B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人
胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30
人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-6xOEG),
desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-5xOEG),
desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-6xOEG),
desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基
- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷
二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H,
B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H,

B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-7xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-8xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-8xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-7xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-6xOEG),

desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E,

B25H, B29K(N(ε)-二十三烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十四烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十四烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十四烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十四烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素; 或 B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-13xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-13xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-14xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-14xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-15xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-15xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-16xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-16xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-17xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-17xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-18xPEG), desB30 人胰岛素; 或 B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-18xPEG), desB30 人胰岛素。

在一些实施方案中, 所述酰化胰岛素选自下述胰岛素: B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E,

B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十六烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素;
A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素;
B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素。

在一些实施方案中, 所述酰化胰岛素选自下述胰岛素: B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十六烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; 或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素。

在本发明的另一个方面, 提供了药物组合物, 其包含本发明如上所述的

胰岛素衍生物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含至少 1.5 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；优选包含至少 2.2 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；优选包含至少 3.5 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；优选包含至少 4.5 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；优选包含 4.5-12 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；更优选包含 4.5-10 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；更优选包含 4.5-8 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；更优选包含 4.5-7.5 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；更优选包含 4.5-7.0 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；更优选包含 4.5-6.5 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物；和/或

所述药物组合物具有的 pH 为 6.5-8.5；优选 pH 为 6.8-8.2；优选 pH 为 7.0-8.2；优选 pH 为 7.2-7.6；更优选 pH 为 7.4 或 7.6。

在一些实施方案中，所述药物组合物进一步包含甘油、苯酚、间甲酚、NaCl、和/或 Na_2HPO_4 ；优选，所述药物组合物进一步包含甘油、苯酚、和 NaCl；优选，所述药物组合物进一步包含甘油、苯酚、间甲酚、和 NaCl；优选，所述药物组合物进一步包含甘油、苯酚、NaCl 和 Na_2HPO_4 ；更优选，所述药物组合物进一步包含甘油、苯酚、间甲酚、NaCl 和 Na_2HPO_4 。

在一些实施方案中，所述甘油的含量不超过约 2.5%(重量/重量)，优选不超过约 2%(重量/重量)，优选为约 0.3%至约 2% (重量/重量)，优选为约 0.5%至约 1.8% (重量/重量)，优选为约 0.7%至约 1.8% (重量/重量)，更优选为约 1%至约 1.8% (重量/重量)；和/或

所述苯酚的含量为约 16 至 80 mM，优选为约 25-75 mM，优选为约 45-70 mM，优选为约 45-65 mM；优选为约 45mM、约 46mM、约 47mM、约 48mM、约 49mM、约 50mM、约 51mM、约 52mM、约 53mM、约 54mM、约 55mM、约 56mM、约 57mM、约 58mM、约 59mM、约 60mM、约 61mM、约 62mM、约 63mM、约 64mM、或约 65mM；和/或

所述间甲酚的含量为约 0-35 mM，优选为约 0-19 mM，优选为约 0-15 mM，优选为约 0mM、约 1mM、约 2mM、约 3mM、约 4mM、约 5mM、约 6mM、约 7mM、约 8mM、约 9mM、约 10mM、约 11mM、约 12mM、约 13mM、约 14mM、或约 15mM；和/或

所述 NaCl 的含量为约 0-150mM，优选为约 5-120 mM，优选为约 10-120 mM，优选为约 10-100 mM，更优选为约 10-75 mM，更优选为约 10-50mM，

更优选为约 10-30mM；和/或

所述 Na_2HPO_4 的含量为约 0-75mM，优选为约 5-60 mM，优选为低于约 50 mM，更优选为低于约 25mM，更优选为低于约 15mM；和/或

所述酰化的胰岛素的含量高于约 0.3 mM、优选高于约 0.6mM、优选为约 0.3-12 mM、优选为约 0.6-9.0 mM、优选为约 0.6-8.4 mM、优选为约 0.6-7.2 mM、优选为约 0.6-6.0 mM、优选为约 0.6-4.2 mM、优选为约 0.6-3.6mM、优选为约 0.6-3.0mM、优选为约 0.6-2.4mM、优选为约 0.6-2.1mM、优选为约 0.6-1.2mM。

在一些实施方案中，所述胰岛素衍生物为 B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素。

在本发明的另一个方面，提供了药物组合物，其包含约 0.6-4.2 mM 的本发明如上所述的胰岛素衍生物、约 1%至约 1.8% (重量/重量)的甘油、约 45-65 mM 的苯酚、约 4.5-6.5 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物、约 10-120 mM 的氯化钠、约 0-15 mM 间甲酚、和具有约 7.0-8.2 的 pH 值，优选，所述胰岛素衍生物为 B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素。

在本发明的另一个方面，提供了药物组合物，其包含约 0.6mM 或 1.2mM 的本发明如上所述的胰岛素衍生物、1.7% (重量/重量)的甘油、约 45mM 的苯酚、约 10mM 的间甲酚、约 6.5 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物、约 20 mM

的氯化钠、和具有约 7.0-8.0 的 pH 值, 优选, 所述胰岛素衍生物为 B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素;

优选地, 所述胰岛素衍生物为 B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素。

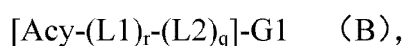
在本发明的另一个方面, 提供了药物组合物, 其包含约 0.6-4.2 mM 的本发明如上所述的胰岛素、约 1%至约 2% (优选约 1.5%-1.7%) (重量/重量) 的甘油、约 15mM-60mM (优选约 30mM-60mM、更优选约 45mM-60mM) 的苯酚、约 1.5-7.0 (优选约 2.2-4.5) 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物、约 10-120 mM (优选约 20-50 mM) 的氯化钠、约 0-25 mM (优选约 0-10mM) 间甲酚、和具有约 7.0-8.2 的 pH 值, 优选, 所述胰岛素衍生物为 B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; 或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素。

在本发明的另一个方面, 提供了药物组合物, 其包含约 0.6-4.2 mM 的本发明如上所述的胰岛素、约 1.5%-1.7% (重量/重量) 的甘油、约 45-60 mM 的苯酚、约 2.2-4.5 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物、约 20 mM 的氯化钠、约 0-10mM 间甲酚、和具有约 7.0-8.0 的 pH 值, 优选, 所述胰岛素衍生物为

B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; 或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素。

在一些实施方案中, 所述药物组合物还包含促胰岛素 GLP-1 化合物; 优选地, 所述药物组合物还包含选自下述的促胰岛素 GLP-1 化合物: N-ε²⁶-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、N-ε²⁶-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基][Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽。

在一些实施方案中, 所述药物组合物还包含式(B)所示的促胰岛素 GLP-1 化合物、或其药学上可接受的盐、酰胺或酯:



其中 G1 为在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO: 15)的位置 34 处具有 Arg、及位置 8 处具有 Ala 或 Gly 的 GLP-1 类似物, [Acy-(L1)_r-(L2)_q]是连接至所述 GLP-1 类似物的位置 26 的 Lys 残基的 ε 氨基上的取代基, 其中 r 为 1-10 的整数, q 为 0 或 1-10 的整数;

Acy 是包含 20-24 个碳原子的脂肪族二酸, 其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除;

L1 是选自下述的氨基酸残基: γGlu、αGlu、βAsp、αAsp、γ-D-Glu、α-D-Glu、β-D-Asp 或 α-D-Asp;

L2 是中性的、含亚烷基二醇的氨基酸残基;

Acy、L1、和 L2 之间以酰胺键连接; 和

L1 和 L2 在式(B)中出现的顺序可以独立地互换。

26. 如权利要求 25 所述的药物组合物, 其中,

G1 为 [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽 (SEQ ID NO: 16) 或 [Arg34]GLP-1-(7-37) 肽 (SEQ ID NO: 17), 优选为 [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽; 和/或

r 为 1、2、3、4、5 或 6, 优选地, r 为 1、2、3 或 4, 优选地, r 为 1 或 2, 优选地, r 为 1; 和/或

q 为 0、1、2、3、4、5、6、7 或 8, 优选地, q 为 0、1、2、3 或 4, 更优选, q 为 0、1、或 2; 和/或

Acy 是包含 20-23 个碳原子的脂肪族二酸, 优选 Acy 是包含 20、21、或 22 个碳原子的脂肪族二酸, 其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除。

在一些实施方案中, L2 是: -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₃-O-CH₂-CO-、或 -HN-(CH₂)₄-O-(CH₂)₄-O-CH₂-CO-; 优选 L2 是 -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-; 和/或

L1 选自 γGlu 或 βAsp, 优选 L1 为 γGlu; 和/或

Acy 是 HOOC-(CH₂)₁₈-CO-、HOOC-(CH₂)₁₉-CO-、HOOC-(CH₂)₂₀-CO-、HOOC-(CH₂)₂₁-CO- 或 HOOC-(CH₂)₂₂-CO-, 优选地, Acy 是 HOOC-(CH₂)₁₈-CO-、HOOC-(CH₂)₂₀-CO- 或 HOOC-(CH₂)₂₂-CO-。

在一些实施方案中, 式(B)中 Acy、L1、和 L2 之间依次以酰胺键连接,

L2 的 C 末端连接至所述 GLP-1 类似物的位置 26 的 Lys 残基的 ϵ 氨基上。

在一些实施方案中，所述促胰岛素 GLP-1 化合物选自下述化合物：

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[21-羧基二十一烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-羧基二十三烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[23-羧基二十三烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(23-羧基二十三烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[21-羧基二十一烷酰基氨基])-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-羧基二十三烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[23-羧基二十三烷酰基氨基])-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(23-羧基二十三烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(20-羧基二十烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[20-羧基二十烷酰基氨基])-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(22-羧基二十二烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[22-羧基二十二烷酰基氨基])-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(20-羧基二十烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(22-羧基二十二烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(20-羧基二十烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[20-羧基二十烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(22-羧基二十二烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[22-羧基二十二烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(20-羧基二十烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、或

$N-\epsilon^{26}$ -(22-羧基二十二烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽。

在一些实施方案中，所述促胰岛素 GLP-1 化合物选自下述化合物：

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、或

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[21-羧基二十一烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽；

优选地，所述促胰岛素 GLP-1 化合物为：

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、或
 $N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8,

Arg34]GLP-1-(7-37)肽。

发明人出乎意料地发现，本发明所述的胰岛素衍生物（例如酰化胰岛素）和促胰岛素 GLP-1 化合物的药物组合物或组合制剂不仅不会削弱所述胰岛素衍生物（例如酰化胰岛素）的物理稳定性，而且，组合制剂具有比单药制剂更好的物理稳定性。与其他长效胰岛素衍生物（例如德谷胰岛素和利拉鲁肽）的组合制剂相比，本发明的组合制剂的物理稳定性是出乎意料的。此外，组合制剂相比于单药制剂，还使得所述胰岛素衍生物（例如酰化胰岛素）的化学稳定性增加。

在一些实施方案中，所述药物组合物还包含快速起效的胰岛素。

在一些实施方案中，所述快速起效的胰岛素选自 Asp^{B28} 人胰岛素、Lys^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素、Lys^{B3}Glu^{B29} 人胰岛素、人胰岛素和 desB30 人胰岛素中的一种或多种；优选，所述快速起效的胰岛素为 Asp^{B28} 人胰岛素、Lys^{B28}Pro^{B29} 人胰岛素、Lys^{B3}Glu^{B29} 人胰岛素、人胰岛素或 desB30 人胰岛素。

在一些实施方案中，所述胰岛素衍生物与所述快速起效的胰岛素的摩尔比为约 60:3 至约 0.5:3、优选为约 57:3 至约 1:3、优选为约 55:3 至约 1.2:3、优选为约 50:3 至约 1.5:3、优选为约 40:3 至约 1.5:3、优选为约 30:3 至约 1.5:3、优选为约 27:3 至约 1.5:3、优选为约 25:3 至约 1.5:3、优选为约 22:3 至约 1.5:3、优选为约 20:3 至约 1.5:3、优选为约 17:3 至约 1.5:3、优选为约 15:3 至约 1.5:3、优选为约 12:3 至约 1.5:3、优选为约 10:3 至约 1.5:3、优选为约 9:3 至约 1.5:3、优选为约 8:3 至约 1.5:3、优选为约 7:3 至约 1.5:3、优选为约 6.9:3 至约 1.5:3、优选为约 6.8:3 至约 1.5:3、优选为约 6.5:3 至约 1.5:3、优选为约 6.3:3 至约 1.5:3、优选为约 6:3 至约 1.5:3、优选为约 5.8:3 至约 1.5:3、优选为约 5.5:3 至约 1.5:3、优选为约 5.3:3 至约 1.5:3、优选为约 5:3 至约 1.5:3、优选为约 4.8:3 至约 1.5:3、优选为约 4.5:3 至约 1.5:3、优选为约 4.2:3 至约 1.5:3、优选为约 4:3 至约 1.5:3、优选为约 3.9:3 至约 1.5:3、优选为约 3.8:3 至约 1.5:3、优选为约 3.5:3 至约 1.5:3、优选为约 3.2:3 至约 1.5:3、优选为约 3:3 至约 1.5:3、优选为约 2.8:3 至约 1.5:3、优选为约 2.5:3 至约 1.5:3、优选为约 15:3 至约 2:3、优选为约 12:3 至约 2:3、优选为约 10:3 至约 2:3、优选为约 9:3 至约 2:3、优选为约 8:3 至约 2:3、优选为约 7:3 至约 2:3、优选为约 6.9:3 至约 2:3、优选为约 6.8:3 至约 2:3、优选为约 6.5:3 至约 2:3、优选为约 6.3:3 至约 2:3、优选为约 6:3 至约 2:3、优选为约 5.8:3 至约 2:3、优选为约 5.5:3 至约 2:3、优选为约 5.3:3 至约 2:3、优选为约

5:3 至约 2:3、优选为约 4.8:3 至约 2:3、优选为约 4.5:3 至约 2:3、优选为约 4.2:3 至约 2:3、优选为约 4:3 至约 2:3、优选为约 3.9:3 至约 2:3、优选为约 3.8:3 至约 2:3、优选为约 3.5:3 至约 2:3、优选为约 3.2:3 至约 2:3、优选为约 3:3 至约 2:3、优选为约 15:3 至约 2.4:3、优选为约 12:3 至约 2.4:3、优选为约 10:3 至约 2.4:3、优选为约 9:3 至约 2.4:3、优选为约 8:3 至约 2.4:3、优选为约 7:3 至约 2.4:3、优选为约 6.9:3 至约 2.4:3、优选为约 6.8:3 至约 2.4:3、优选为约 6.5:3 至约 2.4:3、优选为约 6.3:3 至约 2.4:3、优选为约 6:3 至约 2.4:3、优选为约 5.8:3 至约 2.4:3、优选为约 5.5:3 至约 2.4:3、优选为约 5.3:3 至约 2.4:3、优选为约 5:3 至约 2.4:3、优选为约 4.8:3 至约 2.4:3、优选为约 4.5:3 至约 2.4:3、优选为约 4.2:3 至约 2.4:3、优选为约 4:3 至约 2.4:3、优选为约 3.9:3 至约 2.4:3、优选为约 3.8:3 至约 2.4:3、优选为约 3.5:3 至约 2.4:3、优选为约 3.2:3 至约 2.4:3、优选为约 3:3 至约 2.4:3、更优选为约 1.5:3、更优选为约 2:3、更优选为约 2.5:3、更优选为约 2.75:3、更优选为约 3:3。

发明人出乎意料地发现，包含本发明的胰岛素衍生物（例如酰化胰岛素）和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物给药后，相比于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的双胰岛素组分的药物组合物，具有预料不到的增加的降糖药效，在本发明的胰岛素衍生物（例如酰化胰岛素）与门冬胰岛素的用量比远小于德谷胰岛素与门冬胰岛素的用量比时，仍能达到更好或相当的降糖效果。

在一些实施方案中，所述胰岛素衍生物为本发明如上所述的胰岛素衍生物；优选，所述胰岛素衍生物为 B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-9xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二

烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; 或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; 更优选, 所述酰化胰岛素为 B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; 或 B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素。

在一些实施方案中, 所述药物组合物包含约 0.09-0.36mM 的胰岛素衍生物、约 0.18mM 的 Asp^{B28} 人胰岛素、约 0.85%至约 2.0% (重量/重量)的甘油、约 15-70 mM 的苯酚、约 8-14 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物、约 10-120 mM 的氯化钠、约 0-15 mM 间甲酚、和具有约 7.0-8.2 的 pH 值, 其中所述胰岛素衍生物为 B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; 或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素。

在一些实施方案中, 所述药物组合物包含约 0.165-0.18mM 的胰岛素衍生物、约 0.18mM 的 Asp^{B28} 人胰岛素、约 1.5%-1.7% (重量/重量)的甘油、约 20mM-30mM 的苯酚、约 9-12 摩尔锌离子/6 摩尔的胰岛素衍生物、约 20 mM-75 mM 的氯化钠、约 10 mM -15 mM 间甲酚、和具有约 7.0-8.2 的 pH 值, 其中所述胰岛素衍生物为 B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-8xOEG),

desB30 人胰岛素；或 B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素。

在另一方面，本发明如上所述的胰岛素衍生物或所述的药物组合物，其用作药物。

在另一方面，本发明如上所述的胰岛素衍生物或所述的药物组合物，其用于治疗或预防糖尿病、高血糖症、和/或葡萄糖耐量削弱的药物。

在另一方面，本发明如上所述的胰岛素衍生物或所述的药物组合物，其用于治疗或预防糖尿病、高血糖症、和/或葡萄糖耐量削弱。

在另一个方面，提供了本发明如上所述胰岛素衍生物或所述的药物组合物在制备药物中的用途；优选地，所述药物用于治疗或预防糖尿病、高血糖症、和/或葡萄糖耐量削弱。

在一些实施方案中，所述药物用于治疗糖尿病，所述胰岛素衍生物以每隔一天或更低频率给予同一患者，并且平均起来，在至少 1 个月、6 个月或 1 年的时间期间，所述胰岛素不以更高频率给予同一患者。

在一些实施方案中，所述药物用于治疗糖尿病，所述胰岛素衍生物以一周两次或更低频率给予，并且平均起来，在至少 1 个月、6 个月或 1 年的时间期间，所述胰岛素衍生物不以更高频率给予同一患者。

在一些实施方案中，所述药物用于治疗糖尿病，所述胰岛素衍生物以每周一次或更低频率给予，并且平均起来，在至少 1 个月、6 个月或 1 年的时间期间，所述胰岛素衍生物不以更高频率给予同一患者。

本发明的胰岛素衍生物（例如酰化胰岛素）具有长的药代动力学(下文也称 PK)特征，使得对糖尿病患者一周两次、一周一次或更低频率的皮下治疗成为可能。

在另一个方面，本发明提供了治疗或预防糖尿病、高血糖症、和/或葡萄糖耐量削弱的方法，包括施用治疗有效量的本发明如上所述的胰岛素衍生物或所述的药物组合物。

在另一个方面，本发明提供了一种使胰岛素衍生物在白蛋白存在时，对胰岛素受体结合能力提高的方法，包括：

经由连接基团 Lin 将白蛋白结合残基与天然存在的胰岛素或胰岛素类似物连接而得到所述胰岛素衍生物，其中所述连接基团 Lin 是具有至少 10 个、优选至少 15 个、优选至少 25 个、优选至少 30 个、优选至少 36 个、优选 15-100

个、优选 25-90 个、优选 30-80 个、优选 30-59 个、优选 30-54 个碳原子的亲水性连接基团；所述白蛋白结合残基包含 20-40 个碳原子，优选所述白蛋白结合残基包含具有 20-40 个碳原子的线性或分支的亲脂性基团，优选所述白蛋白结合残基是包含 20-26 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸（更优选 20-24 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸），其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基或所述脂肪族二酸的羧基之一中去除，或者

用式(A)或式(A')修饰天然存在的胰岛素或胰岛素类似物而得到所述衍生物，

III-(II)_m-(I)_n- (A)，其中，

m 为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10, n 为 5、6、7、8 或 9；

I 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基；

II 是酸性的氨基酸残基；

III 是包含具有 20-40 个碳原子的线性或分支的亲脂性基团的白蛋白结合残基，优选 III 是包含 20-26 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸（更优选 20-24 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸），其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基和所述脂肪族二酸的羧基之一中去除；

III、II、和 I 之间以酰胺键连接；和

II 和 I 在式(A)中出现的顺序可以独立地互换；

(A')为 III-(II)_m-(I')_n- (A')，

其中，

m 为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10, n' 为整数；

I' 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基；

II 是酸性的氨基酸残基；

III 是包含具有 20-40 个碳原子的线性或分支的亲脂性基团的白蛋白结合残基，优选 III 是包含 20-26 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸（更优选 20-24 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸），其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基和所述脂肪族二酸的羧基之一中去除；

III、II、和 I' 之间以酰胺键连接；

II 和 I' 在式(A')中出现的顺序可以独立地互换；和

(I')_n 的总碳原子数为 15-100 个、优选 20-100 个、优选 25-90 个、优选 30-80 个、优选 30-59 个、优选 30-54 个。

在另一个方面，本发明提供了一种使胰岛素衍生物效力提高的方法，包括：经由连接基团 Lin 将白蛋白结合残基与天然存在的胰岛素或胰岛素类似物连接而得到所述胰岛素衍生物，其中所述连接基团 Lin 是具有至少 10 个、优选至少 15 个、优选至少 25 个、优选至少 30 个、优选至少 36 个、优选 15-100 个、优选 25-90 个、优选 30-80 个、优选 30-59 个、优选 30-54 个碳原子的亲水性连接基团；所述白蛋白结合残基包含 20-40 个碳原子，优选所述白蛋白结合残基包含具有 20-40 个碳原子的线性或分支的亲脂性基团，优选所述白蛋白结合残基是包含 20-26 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸（更优选 20-24 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸），其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基或所述脂肪族二酸的羧基之一中去除，或者

用式(A)或式(A')修饰天然存在的胰岛素或胰岛素类似物而得到所述衍生物，

III-(II)_m-(I)_n- (A)，其中，

m 为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10, n 为 5、6、7、8 或 9；

I 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基；

II 是酸性的氨基酸残基；

III 是包含具有 20-40 个碳原子的线性或分支的亲脂性基团的白蛋白结合残基，优选 III 是包含 20-26 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸（更优选 20-24 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸），其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基和所述脂肪族二酸的羧基之一中去除；

III、II、和 I 之间以酰胺键连接；和

II 和 I 在式(A)中出现的顺序可以独立地互换；

(A')为 III-(II)_m-(I')_{n'}- (A')，

其中，

m 为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10, n'为整数；

I'是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基；

II 是酸性的氨基酸残基；

III 是包含具有 20-40 个碳原子的线性或分支的亲脂性基团的白蛋白结合残基，优选 III 是包含 20-26 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸（更优选 20-24 个碳原子的脂肪酸或脂肪族二酸），其中在形式上羟基已从所述脂肪酸的羧基和所述脂肪族二酸的羧基之一中去除；

III、II、和 I' 之间以酰胺键连接:

II 和 I' 在式(A')中出现的顺序可以独立地互换; 和

(I')_n的总碳原子数为 15-100 个、优选 20-100 个、优选 25-90 个、优选 30-80 个、优选 30-59 个、优选 30-54 个。

在一些实施方案中，m 为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10；和/或

III 是包含 20-24 个碳原子的脂肪族二酸，其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除。

在一些实施方案中，所述天然存在的胰岛素或胰岛素类似物包含至少一个赖氨酸残基，连接基团 Lin、式(A)或式(A')与所述胰岛素母体的赖氨酸残基或 N 末端氨基酸残基的氨基相连接。

在一些实施方案中，n 为 5、6、7、或 8；和/或

m 为 1, 2, 3, 4, 5 或 6, 优选地, m 为 1、2、3、或 4, 优选地, m 为 1 或 2, 优选地, m 为 1; 和/或

III 是包含 20-26 个(优选 20-23 个)碳原子的脂肪族二酸, 优选 III 是包含 20、21、或 22 个碳原子的脂肪族二酸, 其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除; 和/或

所述胰岛素母体包含一个赖氨酸残基。

在一些实施方案中，I 是：

-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-

-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₃-O-CH₂-CO-、或-HN-(CH₂)₄-O-(CH₂)₄-O-CH₂-CO-；优选 I 是 -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-；或者，I' 是 -HN-(CH₂-CH₂-O)₁₀-CH₂-CO-、-HN-(CH₂-CH₂-O)₁₁-CH₂-CO-、-HN-(CH₂-CH₂-O)₁₂-CH₂-CO-、或-HN-(CH₂-CH₂-CH₂-O)₈-CH₂-CO-；和/或

II 是选自下述的氨基酸残基：γGlu、αGlu、βAsp、αAsp、γ-D-Glu、α-D-Glu、β-D-Asp 或 α-D-Asp，优选地，II 选自 γGlu 或 βAsp；和/或

III 是 HOOC-(CH₂)₁₈-CO-、HOOC-(CH₂)₁₉-CO-、HOOC-(CH₂)₂₀-CO-、HOOC-(CH₂)₂₁-CO-、HOOC-(CH₂)₂₂-CO-、或 HOOC-(CH₂)₂₄-CO-，优选地 III 是 HOOC-(CH₂)₁₈-CO-、HOOC-(CH₂)₂₀-CO-或 HOOC-(CH₂)₂₂-CO-。

在一些实施方案中，将式(A)通过 I 的 C 末端与所述天然胰岛素或胰岛素类似物的赖氨酸残基或 N-末端氨基酸残基的氨基连接，或将式(A')通过 I' 的 C 末端与所述天然胰岛素或胰岛素类似物的赖氨酸残基或 N-末端氨基酸残基的氨基连接。

在一些实施方案中，式(A)或式(A')与所述胰岛素母体的赖氨酸残基的 ε 氨基相连接。

在一些实施方案中，所述天然胰岛素或胰岛素类似物的赖氨酸残基位于 B29 位处。

在一些实施方案中，所述天然存在的胰岛素或胰岛素类似物选自下述胰岛素或胰岛素类似物：desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素；A14E, B16E, B25H, desB30 人胰岛素；人胰岛素；A21G 人胰岛素；A21G, desB30 人胰岛素；或 B28D 人胰岛素；优选地，所述胰岛素母体为 desB30 人胰岛素或 A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素。

附图说明

图 1a 示出了本发明实施例 1 和 2 的化合物、德谷胰岛素、和溶媒 (vehicle) 对 db/db 小鼠的降糖效果。

图 1b 与图 1a 相对应地示出了本发明实施例 1 和 2 的化合物、德谷胰岛素和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 2a 示出了本发明实施例 1 和 2 的化合物、对照例 2 的化合物和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果。

图 2b 与图 2a 相对应地示出了本发明实施例 1 和 2 的化合物、对照例 2 的化合物和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 3a 示出了本发明实施例 1-3 的化合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果和作用时间。

图 3b 与图 3a 相对应地示出了本发明实施例 1-3 的化合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 4a 示出了本发明实施例 2 的化合物、对照例 3 的化合物和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果和作用时间。

图 4b 与图 4a 相对应地示出了本发明实施例 2 的化合物、对照例 3 的化合物和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 5a 示出了本发明对照例 3-4 的化合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果和作用时间。

图 5b 与图 5a 相对应地示出了本发明对照例 3-4 的化合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 6a 示出了本发明实施例 2、实施例 4-5 的化合物和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果和作用时间。

图 6b 与图 6a 相对应地示出了本发明实施例 2、实施例 4-5 的化合物和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 7a 示出了本发明实施例 1 的化合物、和溶媒对链脲佐菌素 (STZ) 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠的降糖效果。

图 7b 与图 7a 相对应地示出了本发明实施例 1 的化合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠的降糖效果的 AUC。

图 8a 示出了本发明对照例 5、实施例 15 和 16 的标题化合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠的降糖效果。

图 8b 与图 8a 相对应地示出了本发明对照例 5、实施例 15 和 16 的标题化合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠的降糖效果的 AUC。

图 9a 示出了本发明实施例 2 和 4 的化合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 雌性大鼠的降糖效果。

图 9b 与图 9a 相对应地示出了本发明实施例 2 和 4 的化合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 雌性大鼠的降糖效果的 AUC。

图 10a 示出了本发明对照例 5、实施例 15 和 16 的标题化合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果。

图 10b 与图 10a 相应地示出了本发明对照例 5、实施例 15 和 16 的标题化合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 11a 示出了本发明对照例 5 和实施例 16 的标题化合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠的降糖效果。

图 11b 与图 11a 相应地示出了本发明对照例 5 和实施例 16 的标题化合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠的降糖效果的 AUC。

图 12a 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠的降糖效果。

图 12b 与图 12a 相应地示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 13a 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠的降糖效果。

图 13b 与图 13a 相应地示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 14a 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠第四次给药前小鼠血糖。

图 14b 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠第八

次给药前小鼠血糖。

图 14c 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠第十次给药前小鼠血糖。

图 15a 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠第四次给药后 1 小时小鼠血糖。

图 15b 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠第八次给药后 1 小时小鼠血糖。

图 15c 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠第十次给药后 1 小时小鼠血糖。

图 16 示出了门冬胰岛素、包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠的降 HbA1c 效果。

图 17a 示出了本发明实施例 4 的化合物、德谷胰岛素和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠的降糖效果。

图 17b 与图 17a 相对地示出了本发明实施例 4 的化合物、德谷胰岛素和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠的降糖效果的 AUC。

图 18a 示出了包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠的降糖效果。

图 18b 与图 18a 相应地示出了包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠的

降糖效果的 AUC。

图 19 示出了包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 STZ 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠的降 HbA1c 效果。

图 20a 示出了包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果。

图 20b 与图 20a 相应地示出了包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 21a 示出了注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒后 db/db 小鼠的随机血糖。

图 21b 与 21a 相应地示出了注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒后 db/db 小鼠的随机血糖的 AUC。

图 21c 示出了注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒后 db/db 小鼠的禁食血糖。

图 21d 与 21c 相应地示出了注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素双胰岛素组分的药物组合物、和溶媒后 db/db 小鼠的禁食血糖的 AUC。

图 22 示出了本发明实施例 2 的化合物和对照化合物 2 分别在 2%HSA 和 0%HSA 存在时, 受体结合能力的情况。

具体实施方式

定义

此处, 术语胰岛素包括天然存在的胰岛素, 例如人胰岛素, 以及其胰岛素类似物、胰岛素衍生物。

术语胰岛素类似物包含这样的多肽, 其具有在形式上可以通过缺失和/或置换(替换)在天然胰岛素中存在的一个或多个氨基酸残基和/或添加一个或多

个氨基酸残基，而衍生自天然存在的胰岛素（例如人胰岛素）的结构的分子结构。添加和/或置换的氨基酸残基可以是可编码的氨基酸残基、或其它天然存在的氨基酸残基、或纯粹合成的氨基酸残基。优选地，添加和/或置换的氨基酸残基是可编码氨基酸残基。

此处，术语“胰岛素衍生物”指的是已被化学方式修饰过的天然存在的胰岛素或胰岛素类似物，该修饰可以是例如在胰岛素骨架的一个或多个位置上引入侧链或者氧化或还原胰岛素上氨基酸残基的基团或者将游离羧基转化成酯基或酰化游离氨基或羟基。本发明的酰化胰岛素即属于胰岛素衍生物。

术语“胰岛素母体”是指胰岛素衍生物或酰化胰岛素的胰岛素部分(在本文中也可称作母体胰岛素)，例如在本发明中是指胰岛素衍生物或酰化胰岛素的没有连接侧链或没有附加酰基的部分。胰岛素母体可以为天然存在的胰岛素，诸如人胰岛素或猪胰岛素。另一方面，母体胰岛素可以是胰岛素类似物。

此处，术语“氨基酸残基”包含从其中氢原子已从氨基中去除和/或羟基已从羧基中去除和/或氢原子已从巯基中去除的氨基酸。不精确地，氨基酸残基可以叫做氨基酸。

除非另有说明，本文提及的氨基酸都是 L-氨基酸。

术语“白蛋白结合残基”是指能与人血清白蛋白非共价结合的残基。与胰岛素连接的白蛋白结合残基通常对人血清白蛋白具有低于例如约 10 μ M 或甚至低于约 1 μ M 的结合亲和力。可通过以下文献所述的表面等离子共振测量白蛋白结合性质：J.Biol.Chem.277(38), 35035-35042, (2002)。

本文中，“亲水性连接基团”是指包含至少 6 个非氢原子的化学部分 (moiety) 将胰岛素母体与白蛋白结合残基分开的连接基团，这些非氢原子中的 30-50% 是 N 或 O。

“亲脂性”是指基团溶解于脂肪、油、脂质、以及亲脂性非极性溶剂(如己烷或甲苯)中的能力。亲脂性基团，包括但不限于例如脂肪、脂肪酸、脂肪二酸等，通常具有“脂质尾部”，存在于这些亲脂性基团中的脂质尾部可以为饱和的和饱和的，取决于脂质尾部是否包含双键。脂质尾部也可包含不同长度，例如具有 7-12 个碳之间的尾部(例如，C₇₋₁₂ 烷基或 C₇₋₁₂ 烯基)、具有 13-22 个碳的尾部(例如，C₁₃₋₂₂ 烷基或 C₁₃₋₂₂ 烯基)、或具有 23-30 个碳的尾部(例如，C₂₃₋₃₀ 烷基或 C₂₃₋₃₀ 烯基)。

此处，术语亚烷基二醇包含寡和聚亚烷基二醇部分以及单亚烷基二醇部分。单亚烷基二醇和聚亚烷基二醇包括例如基于单和聚乙二醇、基于单和聚丙二醇和基于单和聚丁二醇的链，即基于重复单位 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 的链。亚烷基二醇部分可以是单分散(具有定义明确的长度/分子量)以及多分散(具有定义较不明确的长度/平均分子量)。单亚烷基二醇部分包括在每个末端处包含不同基团的 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 。

术语“脂肪酸”包括直链或支链脂族羧酸，其具有至少两个碳原子并为饱和或不饱和的。脂肪酸的非限定实例为例如肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和二十烷酸。

此处，术语“脂肪族二酸”包括直链或支链脂族二羧酸，其具有至少两个碳原子并为饱和或不饱和的。脂肪族二酸的非限定实例为己二酸、辛二酸、癸二酸、十二烷二酸、十四烷二酸、十六烷二酸、十七烷二酸、十八烷二酸、二十烷二酸、二十二烷二酸、和二十四烷二酸。

本文中，快速起效的胰岛素包括快速起效的天然存在的胰岛素、胰岛素类似物和胰岛素衍生物。快速起效胰岛素通常在例如 1 至 20 分钟内开始发挥作用，在约一个小时后达到峰值，并且持续作用三至五小时。

术语“基础胰岛素”意指具有比常态或正常人胰岛素更长的作用持续时间的胰岛素。

本文中，术语“化学稳定性”是指，从化学上，本发明的胰岛素衍生物在所需制剂中足够稳定。也就是，仅形成不损害最终药物产物的保质期的量的化学降解产物。化学降解产物包括脱酰胺产物、异天冬氨酸酯形成、二聚体形成、外消旋化产物、从脱水过程等产生的产物。化学稳定性可通过老化样品或制剂的 HPLC 分析测定。

本文中，“对胰岛素受体的结合能力”是指，胰岛素与胰岛素受体之间的相互作用，这种相互作用的大小或强度可以用例如表面等离子共振(SPR)进行测定。例如，在用 SPR 测定时，当含有胰岛素的溶液流过包被有胰岛素受体的芯片时，胰岛素与胰岛素受体所产生的相互作用会导致 SPR 偏转角度发生变化，这种变化通常用相对响应值来体现，通常相对响应值越大，表明对胰岛素受体的结合能力越高。

高物理稳定性意指原纤维化倾向小于人胰岛素原纤维化倾向的 50%。原纤维化可以通过在给定条件下原纤维开始形成之前的滞后时间来描述。

具有胰岛素受体和 IGF-1 受体亲和力的多肽是在合适的结合测定中能够与胰岛素受体和人 IGF-1 受体相互作用的多肽。此种受体测定是本领域众所周知的。

本文中，“药效”或“效力”是指药物或活性化合物产生某种作用或效果（例如降低血糖）的能力。例如，施用同剂量的本发明的胰岛素衍生物，相对于德谷胰岛素或其它已有的胰岛素衍生物，会产生更高的降低血糖的效果或作用。

术语“糖尿病”包括 1 型糖尿病、2 型糖尿病、妊娠糖尿病(在妊娠期间)和引起高血糖症的其它状态。该术语用于代谢紊乱，其中胰腺产生不足量的胰岛素，或其中身体的细胞不能适当地响应胰岛素，从而阻止细胞吸收葡萄糖。结果，葡萄糖在血液中聚集。

1 型糖尿病，亦称为胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)和青少年型糖尿病，由 β -细胞破坏引起，通常导致绝对胰岛素缺乏。2 型糖尿病，亦称为非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)和成年型糖尿病，与主要的胰岛素抵抗和由此相对胰岛素缺乏和/或具有胰岛素抵抗的主要胰岛素分泌缺陷有关。

本文所用的术语“GLP-1 类似物”或“GLP-1 的类似物”是指作为人胰高血糖素样肽-1(GLP-1(7-37))变体的肽或化合物，其中 GLP-1(7-37)的一个或多个氨基酸残基被替换、和/或其中一个或多个氨基酸残基被缺失、和/或其中增加了一个或多个氨基酸残基。具体地，GLP-1(7-37)的序列如序列表中的 SEQ ID NO: 15 所示。具有 SEQ ID NO: 15 所示序列的肽也可称为“天然”GLP-1 或“天然”GLP-1(7-37)。

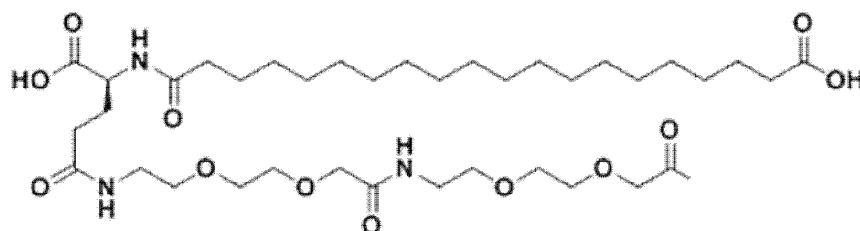
在序列表中，SEQ ID NO: 15 的第一个氨基酸残基(组氨酸)编号为 1。然而，在下文中，依据本领域已建立的习惯，该组氨酸残基编号定为 7，并且其后的氨基酸残基也随之编号，结尾是 37 号甘氨酸。因此，通常，本文所涉及到的 GLP-1(7-37)序列的氨基酸残基编号或位置编号是开始于位置 7 的 His 和结束于位置 37 的 Gly 的序列。

[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽，是在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO: 15)位置 8 和位置 34 的位置处分别具有 Gly 和 Arg 的 GLP-1 类似物。[Arg34]GLP-1-(7-37)肽，是在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO: 15)位置 34

的位置处具有 Arg 的 GLP-1 类似物。具体地, [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽和 [Arg34]GLP-1-(7-37) 肽的氨基酸序列分别如序列表中的 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示。

在 GLP-1 肽或其类似物的情况下, 本文所用的术语“衍生物”是指经化学修饰的 GLP-1 肽或类似物, 其中一个或多个取代基已与所述肽共价连接。取代基也可称为侧链。

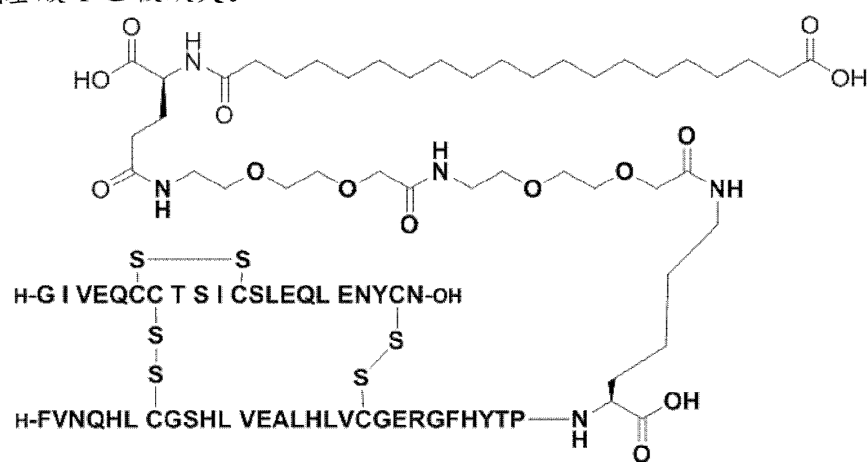
在本文中, 胰岛素或 GLP-1 化合物的命名按照以下原则进行: 按相对于人胰岛素的突变和修饰(例如酰化)、或天然 GLP-1(7-37)的突变和修饰(例如酰化)给予名称。对于酰基部分的命名, 按照 IUPAC 命名法和在其它情况下按肽命名法进行命名。例如, 命名下述酰基部分:



可例如命名为“二十烷二酰基- γ Glu-OEG-OEG”、“二十烷二酰基- γ Glu-2xOEG”或“二十烷二酰基-gGlu-2xOEG”或“19-羧基十九烷酰基- γ Glu-OEG-OEG”, 其中 OEG 表示基团-NH(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₂CO-(即, 2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙酰基)的简写, γ Glu(以及 gGlu)是呈 L 构型的氨基酸 γ 谷氨酸的简写表示。或者, 酰基部分可按照 IUPAC 命名法(OpenEye, IUPAC 格式)命名。根据该命名法, 本发明的上述酰基部分被称为以下名称: [2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基]、或[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷酰基氨基)丁酰基]-氨基]-乙氧基]-乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]。

例如, 本发明对照例 2 的胰岛素(具有下文给出的序列/结构)被称为“B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-2xOEG), desB30 人胰岛素”、“B29K(N ^{ϵ} -二十烷二酰基- γ Glu-2xOEG), desB30 人胰岛素”、或“B29K(N ^{ϵ} -二十烷二酰基-gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素”以表示人胰岛素中位置 B29 的氨基酸 K 已通过 B29 的赖氨酸残基的 ϵ 氮(称为 N ^{ϵ} 或(N(ϵ)))上被残基二十烷二酰基-gGlu-2xOEG 酰化而修饰, 且人胰岛素中位置 B30 的氨基酸 T 已被缺失。又

例如，对照例 5 的胰岛素(具有下文给出的序列/结构)被称为“A14E,B16H,B25H,B29K(N^ε-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),desB30 人胰岛素”或“A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素”，表示人胰岛素中位置 A14 的氨基酸 Y 已被突变为 E，人胰岛素中位置 B16 的氨基酸 Y 已被突变为 H，人胰岛素中位置 B25 的氨基酸 F 已被突变为 H，人胰岛素中位置 B29 的氨基酸 K 已通过在其赖氨酸残基的 ε 氮(称为 N^ε)上被残基二十烷二酰基-gGlu-2xOEG 酰化而修饰，和人胰岛素中位置 B30 的氨基酸 T 已被缺失。



本中，“nxPEG”表示基团-NH(CH₂CH₂O)_nCH₂CO-，其中，n 为整数。例如，“12xPEG”表示基团-NH(CH₂CH₂O)₁₂CH₂CO-。

胰岛素是由胰脏中 β-细胞分泌的多肽激素，由 A 和 B 两条多肽链构成，所述 A 链和 B 链由两个链间二硫键连接。此外，所述 A 链特征为有一个链内二硫键。

主要有三种方法用于在微生物中制备人胰岛素。两种涉及大肠杆菌，一种通过在细胞质中表达融合蛋白(Frank et al. (1981) in Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium (Rich & Gross, eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. 第 729-739 页)，另一种是使用信号肽以使之能够分泌至周质空间(Chan et al. (1981) PNAS 78:5401-5404)。第三种方法是利用酿酒酵母使胰岛素前体分泌到培养基中(Thim et al. (1986) PNAS 83:6766-6770)。现有技术公开了许多在大肠杆菌或酿酒酵母中表达的胰岛素前体的方法，参照例如美国专利第 5,962,267 号、WO95/16708、EP0055945、EP0163529、EP0347845 和 EP0741188。

胰岛素类似物的载体的构建、表达、处理和纯化可使用本领域技术人

员公知的技术进行。例如可以通过美国专利第 6500645 号中所公开的众所周知的技术,通过在合适的宿主细胞中表达编码目标胰岛素类似物的 DNA 序列来制备所述胰岛素类似物。例如也可以通过下述文献中报道的方法来制备胰岛素类似物: Glendorf T, Sørensen AR, Nishimura E, Pettersson I, & Kjeldsen T: Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B Chain α -Helix for Receptor Binding; *Biochemistry* 2008 47 4743-4751。该文献中使用重叠延伸 PCR 将突变引入胰岛素编码载体。胰岛素类似物作为具有 Ala-Ala-Lys 小 C-肽的前胰岛素样融合蛋白在酿酒酵母菌株 MT663 中表达。使用水解无色杆菌(*A. lyticus*)内切蛋白酶,单链前体经酶促转化为双链 desB30 类似物。

经过分离的胰岛素类似物可通过本领域公知的酰化方法在所需位置酰化,这样的胰岛素类似物的实例在例如公布号为 CN1029977C、CN1043719A 和 CN1148984A 的中国专利申请中已有描述。

编码的各胰岛素类似物多肽的核酸序列可由已建立的标准方法通过合成来制备,例如由 Beaucage 等(1981)*Tetrahedron Letters* 22: 1859-1869 中所描述的方法、或 Matthes 等(1984)*EMBO Journal* 3: 801-805 中描述的方法。

术语"赋形剂"在广义上是指除了活性治疗成分之外的任何组分。赋形剂可以是惰性物质、无活性物质和/或无药用活性物质。

赋形剂可用于各种目的,这取决于药物组合物,例如作为载体、溶媒、稀释剂、片剂助剂,和/或用于改善活性物质的给予和/或吸收。赋形剂的实例包括但不限于稀释剂、缓冲剂、防腐剂、张力调节剂(亦称为张度剂或等渗剂)、螯合剂、表面活性剂、蛋白酶抑制剂、湿润剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、金属离子、油性溶媒、蛋白质和/或两性离子和稳定剂。

药学活性成分与各种赋形剂的药物组合物是本领域已知的,参见例如 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*(例如第 19 版(1995)和任何后来的版本)。

为患者的便利,假定患者偏好从给予本发明的酰化胰岛素至下一次给予本发明的酰化胰岛素的时间间隔(时间延迟)具有相同的长度或近似相同的长度,以天数计。甚至可预期,患者将偏好给予酰化胰岛素每周发生一次,即在一周的同一天,例如每个星期天。在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平

均计算，这将是每隔 6 天和不以更高频率给予酰化胰岛素。对于一些患者，在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，可能需要每隔 5 天或近似每隔 5 天和不以更高频率给予酰化胰岛素。对于其它患者，在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，可能需要每隔 4 天或近似每隔 4 天和不以更高频率给予酰化胰岛素。对于其它患者，在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，可能需要每隔 3 天或近似每隔 3 天和不以更高频率给予酰化胰岛素。甚至其它患者可发现有利的是，在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，按每周两次，例如在各次给予之间以大约 3-4 天的间隔给予酰化胰岛素。对于一些患者，在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，可能需要每隔 2 天或近似每隔 2 天和不以更高频率给予酰化胰岛素。对于其它患者，在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，可能需要每隔 1 天或近似每隔 1 天和不以更高频率给予酰化胰岛素。对于一些患者，在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，可能需要每隔 7 天或近似每隔 7 天和不以更高频率给予酰化胰岛素。甚至其它患者可能在每周、每月或每年，不以准确相同长度的时间间隔(以天计)给予酰化胰岛素。在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，一些患者有时可以每隔 5 天至每隔 7 天的时间间隔和不以更高频率给予酰化胰岛素。在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，其它患者有时可以每隔 4 天至每隔 6 天的时间间隔和不以更高频率给予酰化胰岛素。在 1 个月、6 个月或 1 年的时间内按平均计算，甚至其它患者有时可以每隔 3 天至每隔 7 天的时间间隔和不以更高频率给予酰化胰岛素。

作为本发明的主要靶标的疾病和病况是糖尿病(1 型或 2 型)或特征为高血糖症的其它病况，但还是大体上其中胰岛素的代谢作用具有临床相关性或具有益处的代谢疾病和病况，例如前糖尿病、葡萄糖耐量受损、代谢综合征、肥胖、恶病质、体内 β -细胞受损/死亡、食欲过盛和炎症。已知或认为所有这些类型的病况获益于患有所述疾病或病况的受试者的稳定代谢状态。无论如何，其中包括给予胰岛素的任何治疗方案可通过实施本发明的教导而改变，意思是这样的疗法将包括给予根据本文提供的延长作用的胰岛素。

实施例

以示例而非限制地提供下列实施例。

本文中所用的缩写如下：

OEG 是氨基酸残基-NH(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₂CO-

OSu 是琥珀酰亚胺基-1-基氧基-2,5-二氧化-吡咯烷-1-基氧基;

OtBu 是氧叔丁基

HCl 是氯化氢;

γGlu 或 gGlu 是 γL-谷氨酰基;

NHS 是 N-羟基琥珀酰亚胺;

DCC 是二环己基碳二亚胺;

AEEA 是 2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙酸;

OH 是氢氧根;

CH₃CN 是乙腈;

Gly 是甘氨酸;

Arg 是精氨酸;

TFA 是三氟乙酸;

HbA1c 是糖化血红蛋白;

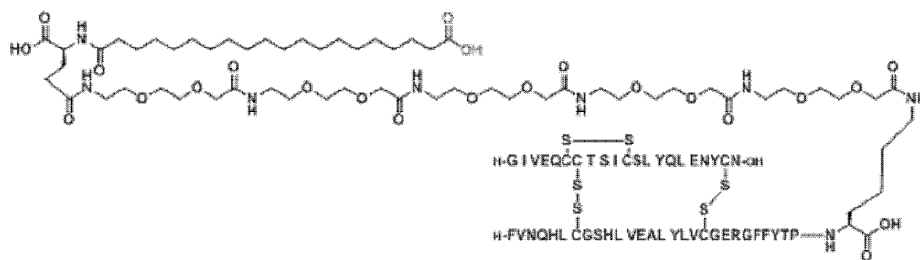
AUC 是时间-血糖曲线的曲线下面积;

RU 是响应单位 (Response unit)

以下实施例和通用方法针对说明书和合成方案中确定的中间化合物和最终产物。采用以下实施例对本发明化合物的制备进行详细描述,但描述的化学反应根据它们对本发明化合物制备的一般适用性来公开。有时,所述反应可能不能适用于如所述的本发明范围内的每种化合物。本领域技术人员容易识别会发生这种情况的化合物。在这些情况下,所述反应可成功地通过本领域技术人员已知的常规改进进行,也就是说,通过合适保护干扰基团,通过改变为其它常规试剂,或通过反应条件的常规改进。在所有制备方法中,所有原料都是已知的或能容易地采用已知原料制备。所有温度都以摄氏度给出,除非另外明确指出,当提到产率时,所有份和百分比都以重量计,当提到溶剂和洗脱液时,所有份都以体积计。

实施例 1

B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 1)



1、des (B30) 人胰岛素的合成

des (B30) 人胰岛素根据中国专利 [CN1056618C](#) 实施例 11 中所述方法制备。

2、目标胰岛素的制备

将 desB30 人胰岛素(5g, 0.876mmol)溶解于 100mM Na_2HPO_4 水溶液(150mL)中, 并且加入乙腈(100mL), 并用 1N NaOH 将 pH 调整至 pH 10-12.5。使叔丁基二十烷二酰- $\gamma\text{Glu}-(5\text{xOEG-OSu})\text{-OtBu}$ (1.36g, 0.964mmol)溶解于乙腈(50mL)中, 并且缓慢加入胰岛素溶液中。使 pH 维持在 10-12.5。在 120 分钟后, 将反应混合物加入水(150mL)中, 并且用 1N HCl 水溶液将 pH 调整至 5.0。通过离心分离沉淀, 并冻干。将粗产物加入三氟乙酸(60mL)与二氯甲烷 (60ml) 混合溶液中, 并且在室温下搅拌 30 分钟。将混合物浓缩至约 30ml, 倾注到冰冷的正庚烷(300mL)中, 并且通过过滤分离沉淀的产物, 并且用正庚烷洗涤 2 次。真空干燥后, 通过离子交换层析((Resource Q, 在 42.5%乙醇中的 0.25%-1.25%乙酸铵梯度, pH7.5)、反相层析(乙腈, 水, TFA)纯化, 将纯化的级分合并, 用 1N HCl 将 pH 调整至 5.2, 并分离沉淀物, 冻干、得到标题化合物 1。

LC-MS(电喷雾): $m/z = 1377.53[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$

3、中间体叔丁基二十烷二酰- $\gamma\text{Glu}-(5\text{xOEG-OSu})\text{-OtBu}$ 的制备

3.1 叔丁基二十烷二酰-OSu

氮气保护条件下, 将二十烷二酸单叔丁酯(20g, 50.17mmol)和 NHS(5.77g, 50.17mmol)在二氯甲烷中混合, 加入三乙胺(13.95mL), 使得到的浑浊混合物在室温下搅拌, 然后加入 DCC(11.39g, 55.19mmol), 并进一步搅拌过夜。过滤, 将得到的滤液浓缩至几乎干燥, 将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合, 搅拌 20 分钟, 分液, 上层有机相加入饱和食盐水洗涤,

分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜,得到 24.12g(收率 97%)的叔丁基二十烷二酰-OSu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=496.36(M+1)^+$

3.2 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu

将叔丁基二十烷二酰-OSu(24.12g, 48.66mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌,依次加入 H-Glu-OtBu(10.88g, 53.53mmol),三乙胺(12.49mL),水,将其加热得到澄清溶液,将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL),分液,下层有机相加入饱和盐水洗,分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜。得到 27.27g(收率 96%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=584.44(M+1)^+$

3.3 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu。

氮气保护条件下,将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu(27.27g, 46.71mmol)溶于二氯甲烷(300mL),依次加入三乙胺(11.99mL)搅拌 10min, NHS(5.38g, 50.17mmol),和 DCC(10.60g, 51.38mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤,将得到的滤液浓缩至几乎干燥,将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合,搅拌 20 分钟,分液,上层有机相加入饱和食盐水洗,分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,加入甲基叔丁基醚,搅拌 30min,抽滤,滤饼真空干燥过夜,得到 25.76g(收率 81%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

3.4 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu

将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu (25.76g, 37.83mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌,依次加入 2xAEEA (11.66g, 37.83mmol),三乙胺(9.71mL),水(25mL),将其加热得到澄清溶液,将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL),分液,下层有机相加入饱和盐水洗,分液后下层层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜。得到 30.75g(收率 93%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=874.59(M+1)^+$

3.5 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

氮气保护条件下，将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu (30.75g, 35.18mmol)溶于二氯甲烷(300mL)，加入三乙胺(9.03mL)搅拌 10 分钟，再加入 NHS(4.05g, 35.18mmol)，接着加入 DCC(7.98g, 38.70mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤，将得到的滤液浓缩至几乎干燥，将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水洗，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜，得到 31.09g(收率 91%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=971.61(M+1)^+$

3.6 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OH)-OtBu

将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu (31.09g, 32.01mmol)溶于二氯甲烷(350mL)搅拌，依次加入 3xAEEA (14.52g, 32.01mmol)，三乙胺(8.90mL)，水 (25mL)，将其加热得到澄清溶液，将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL)，分液，下层有机相加入饱和盐水洗涤，分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜。得到 38.99g(收率 93%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG- OH)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1309.81(M+1)^+$

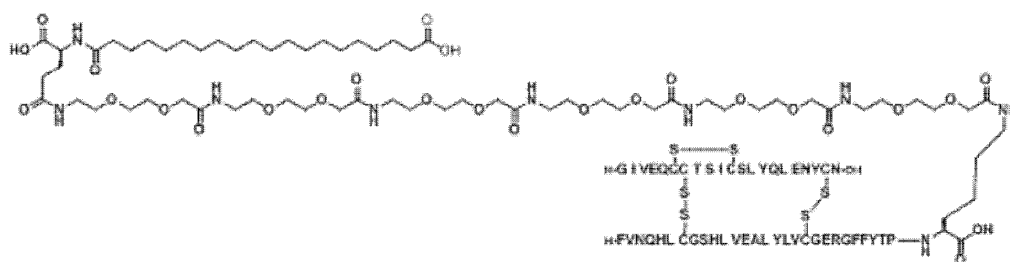
3.7 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OSu)-OtBu。

氮气保护条件下，将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OH)-OtBu (38.99g, 29.77mmol)溶于二氯甲烷(400mL)，加入三乙胺(8.28mL)搅拌 10 分钟，再加入 NHS(3.43g, 29.77mmol)，接着加入 DCC(6.76g, 32.75mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤，将得到的滤液浓缩至几乎干燥，将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水洗涤，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜，得到 38.11g(收率 91%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1406.83(M+1)^+$

实施例 2:

B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 2)



以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备化合物 2。

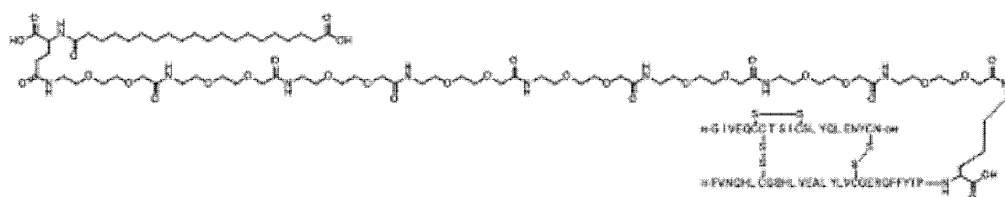
LC-MS(电喷雾): $m/z = 1406.28[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(6xOEG-OSu)-OtBu 以与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z = 1551.90(M+1)^+$

实施例 3:

B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 3)



以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备化合物 3。

LC-MS(电喷雾): $m/z = 1464.30[M+5H]^{5+}$

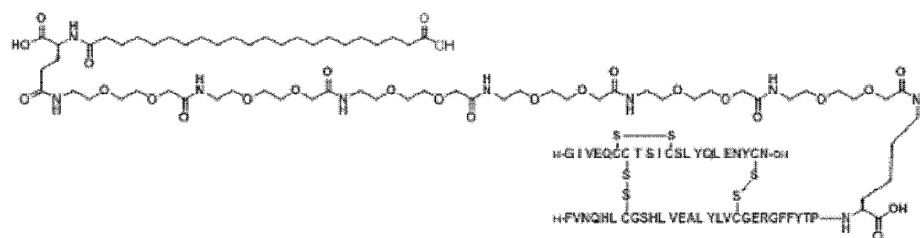
中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(8xOEG-OSu)-OtBu 以与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z = 1814.02(M+1)^+$

实施例 4:

B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物

4)



以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备化合物 4。

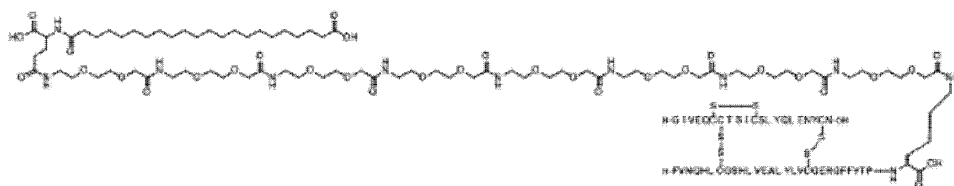
LC-MS(电喷雾): $m/z = 1411.88[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰基- γ Glu-(6xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z = 1579.94(M+1)^+$

实施例 5:

B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 5)



以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备化合物 5。

LC-MS(电喷雾): $m/z = 1469.91[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰基- γ Glu-(8xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z = 1870.08(M+1)^+$

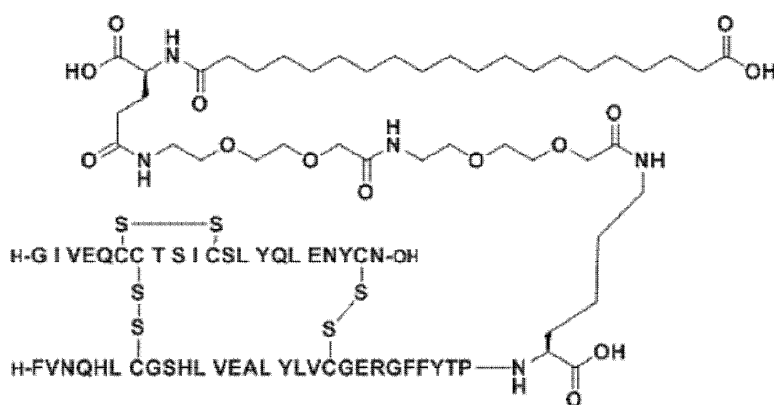
对照例 1

B29K(N(ϵ)-十六烷二酰基- γ Glu), desB30 人胰岛素 (德谷胰岛素, 对照化合物 1)

对照化合物德谷胰岛素, 按照专利 CN105820233A 的实施例 4 进行制备。

对照例 2

B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-2xOEG), desB30 人胰岛素 (对照化合物 2)



以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备对照化合物 2。

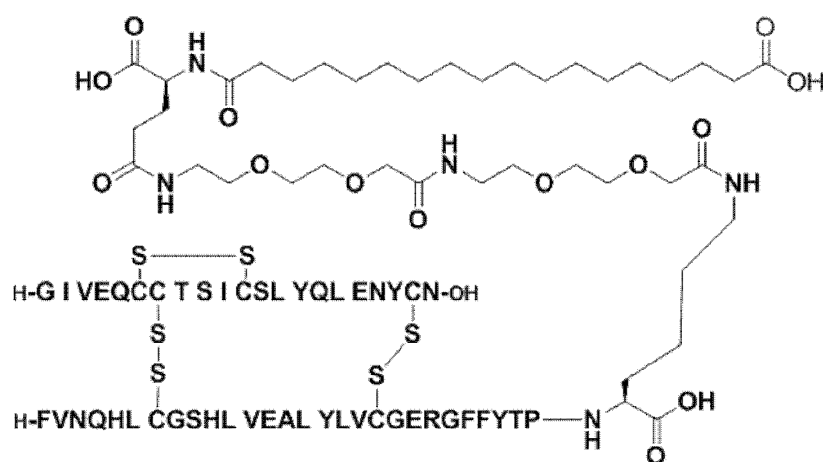
LC-MS(电喷雾): $m/z=1290.22[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十烷二酰基- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z=971.61(M+1)^+$

对照例 3

B29K(N ϵ)-十八烷二酰基- γ Glu-2xOEG, desB30 人胰岛素 (对照化合物 3)

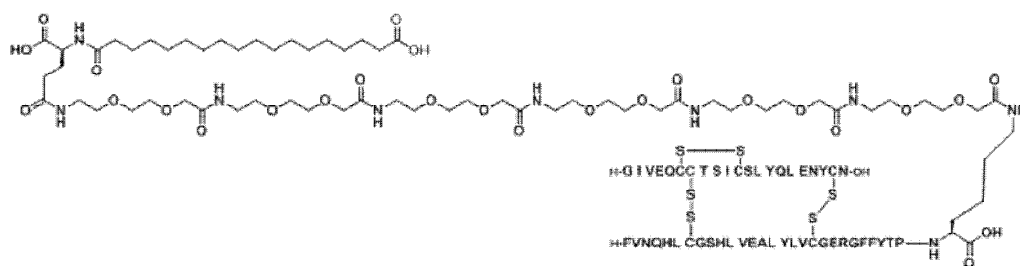


以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备对照化合物 3。

LC-MS(电喷雾): $m/z=1284.61[M+5H]^{5+}$

对照例 4

B29K(N ϵ)-十八烷二酰基- γ Glu-6xOEG, desB30 人胰岛素 (对照化合物 4)



以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备对照化合物 4。

LC-MS(电喷雾): $m/z=1400.68[M+5H]^{5+}$

实施例 6

在 db/db 小鼠中的药效学研究

本研究的目的在于在糖尿病情况下证实本发明酰化胰岛素对血糖(BG)的调节效应。

在肥胖的糖尿病小鼠模型(db/db 小鼠)上,在单剂量研究中测试实施例 1-5 的酰化胰岛素和对照例 1-4 的对照化合物。以 9U/kg 或 10U/kg 的不同剂量测试所述酰化胰岛素的降低血糖效果。

将 8-9 周龄雄性 db/db (BKS/Lepr) 小鼠于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中,自由获取标准食物和纯化水,环境条件控制在相对湿度 40%-60%,温度为 22°C-24°C。1-2 周的适应期后,开始用于实验。

于当日实验开始前,在时间-1/1h(上午 9:30)评估基础血糖,并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠匹配分配到溶媒组或治疗组,接受如下处理:皮下注射溶媒,或皮下注射酰化胰岛素 9U/kg 或 10U/kg,其中溶媒包含:甘油 19.6mg/ml、苯酚 1.5mg/ml,间甲酚 1.72mg/ml,锌离子浓度 55μg/ml, pH 值为 7.6。

将所述酰化胰岛素溶解在溶媒中至 1.8 或 2 U/ml 的给药浓度,给药体积为 5ml/kg(即 50μl/10g 体重)。采用皮下给药(S.C.)方式,颈背部皮下注射给药一次。在大约上午 10:30(时间 0)给予酰化胰岛素,给药期间动物禁食不禁水,评估给药后 3、6、9、12、15 小时小鼠血糖。为模拟进餐,试验中在检测完 15 小时点血糖后,开始口服糖耐量实验(OGTT),于灌胃给予葡萄糖溶液(100 mg/mL, 10 mL/kg)后 30 min、60 min、120 min 和 180 min 测定血糖,连续开展 OGTT 实验三次。根据预实验结果,末次 OGTT 实验时,受试化合物药效接近消失,评估 30 小时血糖后终止。

用酒精棉球清洁鼠尾部,使用一次性采血针从尾巴采集血滴,用血糖仪及配套试纸(罗氏)进行测定。对于每个单剂量的酰化胰岛素绘制血糖对时间的剂量响应曲线。

为了说明本发明的酰化胰岛素对血糖的影响,对于每个单独的剂量响应曲线,计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。其中,AUC 值越小,表明降糖效果越好,药效越好。

试验结果:

本发明的酰化胰岛素及对照化合物在 db/db 小鼠中的降糖效果如图 1a 至图 6b、及表 1 所示,具体地:

图 1a 和图 1b 显示了本发明的酰化胰岛素例如化合物 1、和化合物 2 对 db/db 小鼠的降糖效果明显优于德谷胰岛素，且有效作用时间相比于德谷胰岛素有延长。

图 2a 和图 2b 显示了本发明的酰化胰岛素例如化合物 1 和化合物 2 对 db/db 小鼠的降糖效果也明显优于对照化合物 2，本发明的化合物 1 和化合物 2 相对于对照化合物 2 药效在给药的 0~16.5 小时区间内分别增加了 39.5%和 45.1%，如表 1 所示：

表 1 本发明的酰化胰岛素相对于对照化合物 2 增加的药效

化合物/对照化合物	实施例	相对于对照化合物 2 的药效增加的百分比
化合物 1	实施例 1	39.5%
化合物 2	实施例 2	45.1%
对照化合物 2	对照例 2	0%

相对于对照化合物 2 的药效增加的百分比=[(AUC (测试化合物)-AUC (溶媒))/(AUC (对照化合物 2)-AUC (溶媒))-1]*100%，其中，测试化合物是指本发明的酰化胰岛素

图 3a-3b 显示了本发明的化合物 1、化合物 2 和化合物 3 均具有非常好的药效，且在 db/db 小鼠中，监测至 30 小时时仍然有效，具有明显延长的降糖作用时间。

图 4a-5b 显示了本发明的酰化胰岛素例如化合物 2 对 db/db 小鼠的降糖效果明显优于对照化合物 3 和对照化合物 4。

图 6a-6b 显示了本发明的化合物 4、化合物 5 和化合物 2 均具有非常好的药效，且在 db/db 小鼠中，监测至 41 小时时仍然有效，具有明显延长的降糖作用时间。

实施例 7

在链脲佐菌霉素 (STZ) 诱导 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠中的药效学研究

8w 周龄雄性 wistar 大鼠，体重 180-220g。于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中 (5 只/盒)，自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相对湿度 40%~60%，温度为 22℃~24℃。4 天适应期后，禁食 12h，大鼠按照 60mg/kg 腹腔注射链脲佐菌霉素 (sigma) 溶液 (10mg/mL，于 0.1M 柠檬酸缓冲液)。给药后防止大鼠突发血糖过低，饮水中适当补充葡萄糖 (20%)，12h 后撤去补糖。给予链脲佐菌霉素 4d 后，进行随机血糖检测，

血糖值在 20mmol/L 以上的选为 T1DM 模型大鼠用于后续试验。

于当日实验开始前, 在时间-1/1h(上午 9:30)评估基础血糖, 并对大鼠称重。根据随机血糖和体重将大鼠匹配分配到溶媒组或治疗组, 接受如下处理: 皮下注射溶媒, 或皮下注射酰化胰岛素, 3U/kg, 其中溶媒包含: 甘油 19.6mg/ml, 苯酚 1.5mg/ml, 间甲酚 1.72mg/ml, 锌离子浓度 55 μ g/ml, 所述溶媒的 pH 值为 7.6。

将所述酰化胰岛素溶解在溶媒中至 1.5U/ml 的给药浓度, 给药体积为 2ml/kg(即 0.2ml/100g 体重)。采用皮下给药方式, 颈背部皮下给药一次。在大约上午 9:30(时间 0)给予酰化胰岛素, 在给药后 2、4 小时评估大鼠血糖。4 小时和 7 小时分别进行一次口服糖耐量实验 (OGTT) 实验 (具体见下文)。

口服糖耐量实验 (OGTT)

检测时间: 于指定时间点尾尖采血测定空腹血糖 (0 min), 之后灌胃给予葡萄糖溶液 (100 mg/mL 或 200 mg/mL, 10 mL/kg), 然后于糖负荷后 30 min、60 min、120 min 和 180 min 测定血糖。

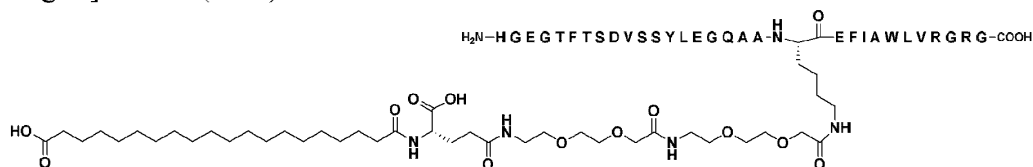
用酒精棉球清洁鼠尾部, 使用一次性采血针从尾巴采集血滴, 用血糖仪 (罗氏) 及配套试纸进行测定。

对于每个单剂量的酰化胰岛素绘制血糖对时间的剂量响应曲线。为了说明酰化胰岛素对血糖的影响, 对于每个单独的剂量响应曲线, 计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。

图 7a-7b 显示了本发明的酰化胰岛素在 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠中也具有非常好的降糖效果, 即具有非常好的药效。

实施例 8

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基][Gly8, Arg34]GLP-1(7-37)肽 (化合物 6)



1、N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽的制备

通过一般的蛋白质重组表达方法制备[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽(具体方法参见 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*, Michael R. Green, Cold Spring Harbor Press, 2012)。使[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽(5g, 1.48mmol)溶解于 100mM Na₂HPO₄ 水溶液(150mL)中, 并且加入乙腈(100mL), 并用 1N NaOH 将 pH 调整至 pH 10-12.5。使叔丁基二十烷二酰-γGlu(2xOEG-OSu)-OtBu(1.59g, 1.63mmol)溶解于乙腈(50mL)中, 并且缓慢加入[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽溶液中。使 pH 维持在 10-12.5。在 120 分钟后, 将反应混合物加入水(150mL)中, 并且用 1N HCl 水溶液将 pH 调整至 5.0。通过离心分离沉淀, 并且冻干。将粗产物加入三氟乙酸(60mL)与二氯甲烷(60ml)混合溶液中, 并且在室温下搅拌 30 分钟。将混合物浓缩至约 30ml, 倾注到冰冷的正庚烷(300mL)中, 通过过滤分离沉淀的产物, 并用正庚烷洗涤 2 次。真空干燥后, 真空干燥后, 产物通过离子交换层析(Ressource Q, 在 42.5%乙醇中的 0.25%-1.25%乙酸铵梯度, pH7.5)、反相层析(乙腈, 水, TFA)纯化, 将纯化的级分合并, 用 1N HCl 将 pH 调整至 5.2, 分离沉淀物, 并冻干得到标题化合物。

LC-MS(电喷雾): m/z=1028.79[M+4H]⁴⁺

2、中间体叔丁基二十烷二酰-γGlu-(2xOEG-OSu)-OtBu 的制备

2.1 叔丁基二十烷二酰-OSu

氮气保护条件下, 将二十烷二酸单叔丁酯(20g, 50.17mmol)和 NHS(5.77g, 50.17mmol)在二氯甲烷(400mL)中混合, 加入三乙胺(13.95mL), 将得到的浑浊混合物在室温下搅拌, 然后加入 DCC(11.39g, 55.19mmol), 将其进一步搅拌过夜。过滤, 将得到的滤液浓缩至几乎干燥, 将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合, 搅拌 20 分钟, 分液, 上层有机相加入饱和食盐水进行水洗, 分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥, 真空干燥过夜, 得到 24.12g(收率 97%)的叔丁基二十烷二酰-OSu。

LC-MS(Sciex100API): m/z=496.36(M+1)⁺

2.2 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu

将叔丁基二十烷二酰-OSu(24.12g, 48.66mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌, 依次加入 H-Glu-OtBu(10.88g, 53.53mmol), 三乙胺(12.49mL), 水(25mL), 将其加热得到澄清溶液, 将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL), 分液, 下层有机相加入饱和盐水进行水洗, 分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥, 真空干燥过夜。得到 27.27g(收率 96%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=584.44(M+1)^+$

2.3 叔丁基二十烷二酰- γ Glu(OSu)-OtBu。

氮气保护条件下, 将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu(27.27g, 46.71mmol)溶于二氯甲烷(300mL), 加入三乙胺(11.99mL)搅拌 10 分钟, 再加入 NHS(5.38g, 50.17mmol), 接着加入 DCC(10.60g, 51.38mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤, 将得到的滤液浓缩至几乎干燥, 将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合, 搅拌 20 分钟, 分液, 上层有机相加入饱和食盐水进行水洗, 分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥, 加入甲基叔丁基醚, 搅拌 30 分钟, 抽滤, 滤饼真空干燥过夜, 得到 25.76g(收率 81%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

2.4 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu

将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu (25.76g, 37.83mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌, 依次加入 2xAEEA (11.66g, 37.83mmol), 三乙胺(9.71mL), 水(25mL), 将其加热得到澄清溶液, 将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL)分液, 下层有机相加入饱和盐水进行水洗, 分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥, 真空干燥过夜。得到 30.75g(收率 93%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=874.59(M+1)^+$

2.5 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

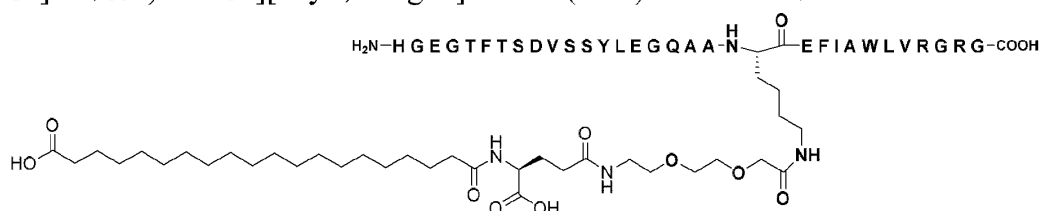
氮气保护条件下, 将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu (30.75g, 35.18mmol)溶于二氯甲烷(300mL), 加入三乙胺(9.03mL)搅拌 10

分钟, 再加入 NHS(4.05g, 35.18mmol), 接着加入 DCC(7.98g, 38.70mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤, 将得到的滤液浓缩至几乎干燥, 将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合, 搅拌 20 分钟, 分液, 上层有机相加入饱和食盐水进行水洗, 分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥、过滤, 将滤液减压浓缩至几乎干燥, 真空干燥过夜, 得到 31.09g(收率 91%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

LC-MS(Sciex100API): $m/z=971.61(M+1)^+$

实施例 9

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (化合物 7)



以与实施例 8 第 1 部分类似的步骤制备 $N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

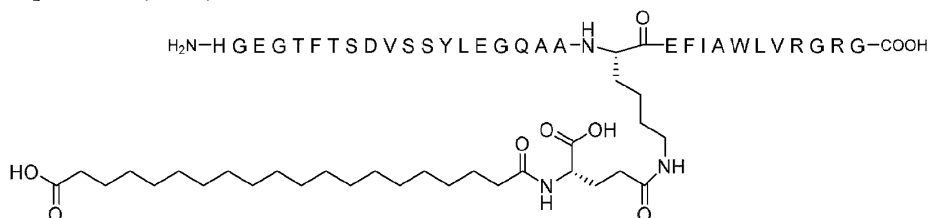
LC-MS(电喷雾): $m/z=992.52[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OEG-OSu)-OtBu 以与实施例 8 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Sciex100API): $m/z=826.54(M+1)^+$

实施例 10

$N-\epsilon^{26}$ -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (化合物 8)



以与实施例 8 第 1 部分类似的步骤制备 $N-\epsilon^{26}$ -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

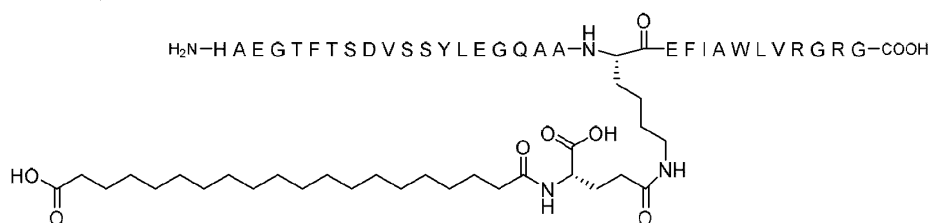
LC-MS(电喷雾): $m/z=956.25[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu 以与实施例 8 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

实施例 11

$N-\epsilon^{26}$ -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37) 肽 (化合物 9)



以与实施例 8 第 1 部分类似的步骤制备 $N-\epsilon^{26}$ -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37) 肽

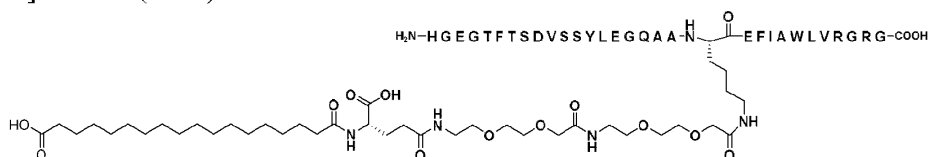
LC-MS(电喷雾): $m/z=959.75[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu 以与实施例 8 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

实施例 12

$N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽 (化合物 10)



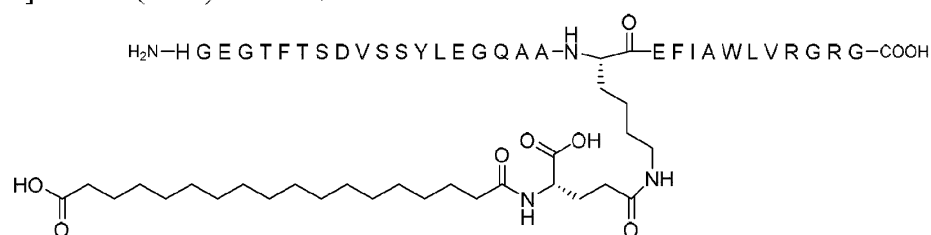
以与实施例 8 第 1 部分类似的步骤制备 $N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽

LC-MS(电喷雾): $m/z=1021.78[M+4H]^{4+}$

实施例 13

$N-\epsilon^{26}$ -(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8,

Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (化合物 11)



以与实施例 8 第 1 部分类似的步骤制备 N- ϵ^{26} -(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

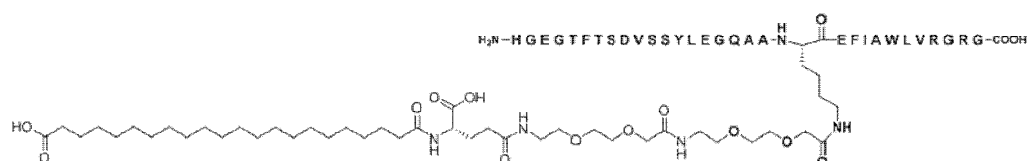
LC-MS(电喷雾): $m/z=949.24[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基十八烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu 以与实施例 8 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=653.43 (M+1)^+$

实施例 14:

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (化合物 12)



以与实施例 8 第 1 部分类似的步骤制备 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

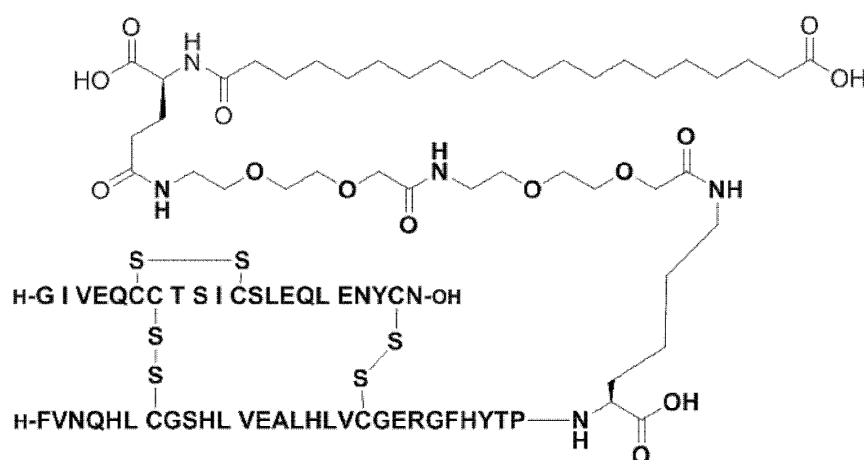
LC-MS(电喷雾): $m/z=1035.80[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu 以与实施例 8 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=999.64(M+1)^+$

对照例 5

A14E, B16H, B25H, B29K(N ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-2xOEG), desB30 人胰岛素(对照化合物 5)



1、A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素的制备

通过常规的制备胰岛素类似物的方法制备 A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素(具体方法参见 Glendorf T, Sørensen AR, Nishimura E, Pettersson I, & Kjeldsen T: Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B Chain α-Helix for Receptor Binding; Biochemistry 2008 47 4743-4751)。将 A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素(5g, 0.888mmol)溶解于 100mM Na₂HPO₄ 水溶液(150mL)中, 并且加入乙腈(100mL), 并用 1N NaOH 将 pH 调整至 pH 10-12.5。使叔丁基二十烷二酰-γGlu-(2xOEG-OSu)-OtBu(0.948g, 0.976mmol)溶解于乙腈(50mL)中, 并且缓慢加入胰岛素溶液中。使 pH 维持在 10-12.5。在 120 分钟后, 将反应混合物加入水(150mL)中, 并且用 1N HCl 水溶液将 pH 调整至 5.0。通过离心分离沉淀, 并冻干。将冻干的粗产物加入三氟乙酸(60mL)与二氯甲烷(60ml)混合溶液中, 并在室温下搅拌 30 分钟。将混合物浓缩至约 30ml, 倾注到冰冷的正庚烷(300mL)中, 并且通过过滤分离沉淀的产物, 并且用正庚烷洗涤 2 次。真空干燥后, 通过离子交换层析((Ressource Q, 在 42.5%乙醇中的 0.25%-1.25%乙酸铵梯度, pH7.5)、反相层析(乙腈, 水, TFA)纯化, 将纯化的级分合并, 用 1N HCl 将 pH 调整至 5.2, 并分离沉淀物, 冻干、得到对照化合物 5。

LC-MS(电喷雾): $m/z = 1063.6852[M+6H]^{6+}$

2、中间体叔丁基二十烷二酰-γGlu-(2xOEG-OSu)-OtBu 的制备: 以与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

2.1 叔丁基二十烷二酰-OSu

氮气保护条件下,将二十烷二酸单叔丁酯(20g, 50.17mmol)和 NHS(5.77g, 50.17mmol)在二氯甲烷中混合,加入三乙胺(13.95mL),使得到的浑浊混合物在室温下搅拌,然后加入 DCC(11.39g, 55.19mmol),并进一步搅拌过夜。过滤,将得到的滤液浓缩至几乎干燥,将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合,搅拌 20 分钟,分液,上层有机相加入饱和食盐水洗涤,分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜,得到 24.12g(收率 97%)的叔丁基二十烷二酰-OSu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=496.36(M+1)^+$

2.2 叔丁基二十烷二酰-γGlu-OtBu

将叔丁基二十烷二酰-OSu(24.12g, 48.66mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌,依次加入 H-Glu-OtBu(10.88g, 53.53mmol),三乙胺(12.49mL),水,将其加热得到澄清溶液,将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL),分液,下层有机相加入饱和盐水洗,分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜。得到 27.27g(收率 96%)的叔丁基二十烷二酰-γGlu-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=584.44(M+1)^+$

2.3 叔丁基二十烷二酰-γGlu-(OSu)-OtBu。

氮气保护条件下,将叔丁基二十烷二酰-γGlu-OtBu(27.27g, 46.71mmol)溶于二氯甲烷(300mL),加入三乙胺(11.99mL)搅拌 10min,再加入 NHS(5.38g, 50.17mmol),接着加入 DCC(10.60g, 51.38mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤,将得到的滤液浓缩至几乎干燥,将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合,搅拌 20 分钟,分液,上层有机相加入饱和食盐水洗,分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,加入甲基叔丁基醚,搅拌 30min,抽滤,滤饼真空干燥过夜,得到 25.76g(收率 81%)的叔丁基二十烷二酰-γGlu-(OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

2.4 叔丁基二十烷二酰-γGlu-(2xOEG-OH)-OtBu

将叔丁基二十烷二酰-γGlu-(OSu)-OtBu (25.76g, 37.83mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌,依次加入 2xAEEA(11.66g, 37.83mmol),三乙胺(9.71mL),水 (25mL),将其加热得到澄清溶液,将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后

加入 10%柠檬酸水溶液(200mL),分液,下层有机相加入饱和盐水洗,分液后下层层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜。得到 30.75g(收率 93%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=874.59(M+1)^+$

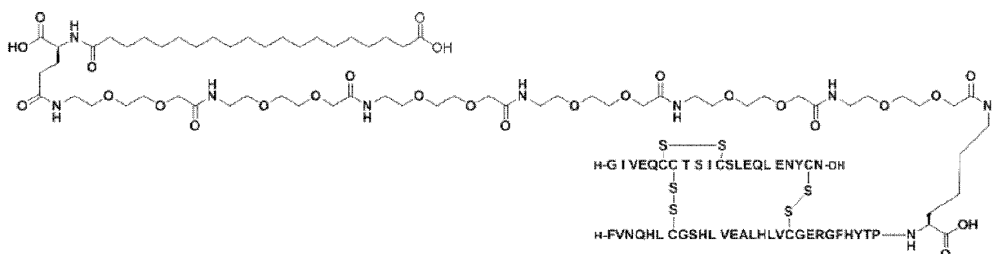
2.5 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

氮气保护条件下,将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu (30.75g, 35.18mmol)溶于二氯甲烷(300mL),加入三乙胺(9.03mL)搅拌 10 分钟,再加入 NHS(4.05g, 35.18mmol),接着加入 DCC(7.98g, 38.70mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤,将得到的滤液浓缩至几乎干燥,将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合,搅拌 20 分钟,分液,上层有机相加入饱和食盐水洗,分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜,得到 31.09g(收率 91%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=971.61(M+1)^+$

实施例 15

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素(化合物 13)



与对照例 5 第 1 部分类似的步骤制备化合物 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素

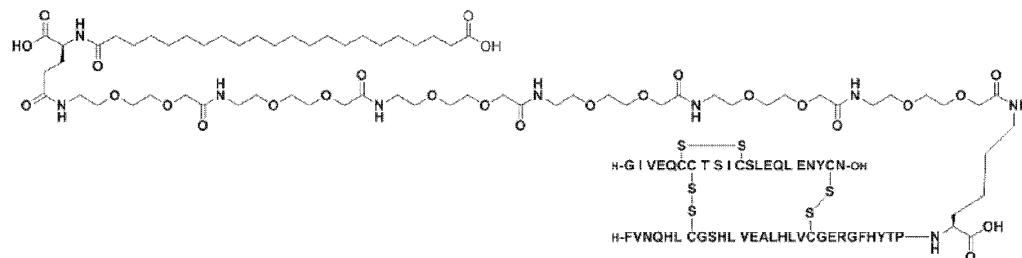
LC-MS(电喷雾): $m/z=1160.3997[M+6H]^{6+}$

中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(6xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与对照例 5 第 2 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1551.90(M+1)^+$

实施例 16

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素(化合物 14)



与对照例 5 第 1 部分类似的步骤制备化合物 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素

LC-MS(电喷雾): $m/z = 1165.0674[M+6H]^{6+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰-γGlu-(6xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与对照例 5 第 2 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z = 1579.94(M+1)^+$

实施例 17

参照实施例 7 类似的实验步骤, 在链脲佐菌霉素 (STZ) 诱导 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠中进行药效学研究。

于当日实验开始前, 在时间-1h(上午 9:30)评估基础血糖, 并对大鼠称重。根据随机血糖和体重将大鼠分配到溶媒组或治疗组, 接受如下处理: 皮下注射溶媒, 或皮下分别注射对照例 5、实施例 15 和 16 的标题化合物 (对照化合物 5、化合物 13 和化合物 14), 剂量: 33.5U/kg, 其中溶媒包含: 苯酚 5.65mg/ml, 甘油 15mg/ml, 磷酸氢二钠 0.708mg/ml, 氯化钠 0.585mg/ml, 所述溶媒的 pH 值为 7.6。

将所述酰化胰岛素溶解在溶媒中至 33.5U/ml 给药浓度, 给药体积为 1ml/kg(即 0.1ml/100g 体重)。采用皮下给药方式(s.c.), 颈背部皮下给药一次。在大约上午 9:30-10:00(时间 0)给予酰化胰岛素, 在给药后 3h、6h、9h、24h、48h、72h、96h、120h 监测大鼠血糖。

对于每个单剂量的酰化胰岛素 (对照化合物 5、化合物 14、化合物 13) 绘制血糖对时间的剂量响应曲线。为了说明酰化胰岛素对血糖的影响, 对于每个单独的剂量响应曲线, 计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。其中, AUC 值越小, 表明降糖效果越好, 药效越好。

图 8a-图 8b 显示了本发明的酰化胰岛素具有预料不到的增加的药效, 例

如，相对于对照例 5 的化合物，实施例 15 和 16 的标题化合物化合物 13 和化合物 14 对 STZ 诱导 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠均具有更好的降糖效果，即具有更好的药效。

实施例 18

参照实施例 17 的类似的实验步骤，在链脲佐菌霉素 (STZ) 诱导的 I 型糖尿病 (T1DM) 雌性大鼠中进行药效学研究，不同之处在于，所用的酰化胰岛素是实施例 2 和 4 的标题化合物 (化合物 2 和化合物 4)，给药剂量为 67U/kg。

实验结果如图 9a-图 9b 所示，显示了本发明的酰化胰岛素化合物 2 和化合物 4 在 I 型糖尿病 (T1DM) 雌性大鼠中也均具有非常好的降糖效果，即具有非常好的药效。

实施例 19

在 db/db 小鼠中的药效学研究

参照实施例 6 的类似的实验步骤，在肥胖的糖尿病小鼠模型(db/db 小鼠)上，在单剂量研究中测试对照例 5、及实施例 15 和 16 的标题化合物 (即，对照化合物 5、化合物 13 和化合物 14)。以 9U/kg 的剂量测试所述酰化胰岛素的降低血糖效果。

将 8-9 周龄雄性 db/db (BKS/Lepr) 小鼠于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中，自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相对湿度 40%-60%，温度为 22°C-24°C。1-2 周的适应期后，开始用于实验。

于当日实验开始前，在时间-1/1h(上午 9:30)评估基础血糖，并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠匹配分配到溶媒组或治疗组，接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下注射酰化胰岛素 9U/kg，其中所用溶媒包含：苯酚 5.65mg/ml，甘油 15mg/ml，磷酸氢二钠 0.708mg/ml，氯化钠 0.585mg/ml，所述溶媒的 pH 值为 7.6。

将所述酰化胰岛素溶解在溶媒中至 1.8 U/ml 的给药浓度，给药体积为 5ml/kg(即 50 μ l/10g 体重)。采用皮下给药 (S.C.) 方式，颈背部皮下注射给药一次。在大约上午 10:30(时间 0)给予酰化胰岛素，给药期间动物禁食不禁水，评估给药后 3h、6h、9h、21.5h 小鼠血糖。为模拟进餐，试验中在检测完 21.5h 点血糖后，开始口服糖耐量实验 (OGTT)，于灌胃给予葡萄糖溶液 (100 mg/mL, 7.5 mL/kg) 后 30 min、60 min、120 min 和 360 min 测定血糖；首次

OGTT 测完 330 min 血糖后开始第二次 OGTT 实验，于灌胃给予葡萄糖溶液（50 mg/mL，10 mL/kg）后 30 min、90 min、210 min 和 360 min 测定血糖。第二次 OGTT 测完 360 min 血糖后开始第三次 OGTT 实验，于灌胃给予葡萄糖溶液（50 mg/mL，10 mL/kg）后 30 min、60 min、120 min 测定血糖，末次 OGTT 实验时，受试化合物药效尚未消失，评估 36 小时血糖后终止实验。

用酒精棉球清洁鼠尾部，使用一次性采血针从尾巴采集血滴，用血糖仪及配套试纸（罗氏）进行测定。对于每个单剂量的酰化胰岛素绘制血糖对时间的剂量响应曲线。为了说明酰化胰岛素对血糖的影响，对于每个单独的剂量响应曲线，计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。其中，AUC 值越小，表明降糖效果越好，药效越好。

图 10a-图 10b 显示，相对于对照化合物 5，本发明的酰化胰岛素化合物 14、化合物 13 在 II 型糖尿病 db/db 小鼠中具有明显提高的降糖效果。

实施例 20

在链脲佐菌霉素（STZ）诱导 I 型糖尿病（T1DM）大鼠中的药效学研究

8 周龄 SD 大鼠（雌雄各半），体重 180-220g。于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中（5 只/盒），自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相对湿度 40%~60%，温度为 22℃~24℃。4 天适应期后，禁食 12h，大鼠按照 60mg/kg 腹腔注射链脲佐菌霉素（sigma）溶液（10mg/mL，于 0.1M 柠檬酸缓冲液）。给予链脲佐菌霉素 3 天后，进行随机血糖检测，血糖值在 20mmol/L 以上的选为 T1DM 模型大鼠用于后续试验。

造模 14 天后开始试验，于当日实验开始前，在时间-1/1h(上午 9:30) 评估基础血糖，并对大鼠称重。根据随机血糖和体重将大鼠匹配分配到溶媒组或治疗组，接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下分别注射对照例 5、实施例 16 的标题化合物（即对照化合物 5、化合物 14），剂量为 25 U/kg，其中溶媒包含：苯酚 5.65mg/ml，甘油 15mg/ml，磷酸氢二钠 0.708mg/ml，氯化钠 0.585mg/ml，所述溶媒的 pH 值为 7.6。

将所述酰化胰岛素溶解在溶媒中至 25 U/ml 的给药浓度，给药体积为 1ml/kg(即 0.1ml/100g 体重)。采用皮下给药方式，颈背部皮下给药，重复给药 4 次，每次间隔 4 天，试验期间 SD 大鼠自由饮食。在大约上午

9:30-10:00(时间 0)给予酰化胰岛素, 在首次给药 3h、6h、9h、24h、48h、72h、96h 后监测大鼠血糖, 之后每次给药后 6h 以及每 24h 监测一次大鼠血糖。

对于每个单剂量的酰化胰岛素绘制血糖对时间的剂量响应曲线。为了说明酰化胰岛素对血糖的影响, 对于每个单独的剂量响应曲线, 计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。

如图 11a-11b 所显示, 相对于对照化合物 5, 本发明的酰化胰岛素给药后在 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠中有预料不到的增加的降糖药效, 化合物 14 的降糖效果明显优于对照化合物 5。

实施例 21

在链脲佐菌霉素 (STZ) 诱导 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠中的药效学研究

本研究的目的在于证实包含本发明的酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合物在链脲佐菌霉素 (STZ) 诱导 I 型糖尿病 (T1DM) C57/6J 小鼠中对血糖 (BG) 的调节效应。

将 4-6 周龄雄性 C57/6J 小鼠 (购自维通利华) 于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中, 自由获取标准食物和纯化水, 环境条件控制在相对湿度 40%-60%, 温度为 22°C-24°C。1-2 周的适应期后, 开始用于实验。

适应期过后, 动物禁食 12 小时, 小鼠按照 150mg/kg 腹腔注射链脲佐菌霉素 (sigma) 溶液 (10mg/mL, 于 0.1M 柠檬酸缓冲液)。给予链脲佐菌霉素 3 天后, 进行随机血糖检测, 血糖值在 20mmol/L 以上的选为 T1DM 模型小鼠用于后续试验。

当日实验开始前, 检测小鼠随机血糖, 并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠分配到溶媒组或治疗组, 共 5 组, 每组 8 只, 各组分别接受如下处理: 皮下注射溶媒, 或皮下注射门冬胰岛素 (0.36U/kg)、或皮下注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物, 其中德谷胰岛素和门冬胰岛素的注射剂量分别为 0.84U/kg 和 0.36U/kg, 或皮下注射包含本发明实施例 4 的标题化合物化合物 4 和门冬胰岛素的两种药物组合物, 其中在注射所述两种药物组合物时, 化合物 4 的注射剂量分别为 0.82U/kg 和 0.64U/kg, 门冬胰岛素的注射剂量均为 0.36U/kg, 其中所述溶媒包含: 甘油 19.6mg/ml、苯酚 1.5mg/ml, 间甲酚 1.72mg/ml, 锌离子浓度 55µg/ml, 上述溶媒的 pH

值为 7.6。

将化合物 4 与门冬胰岛素的预混液溶解在溶媒中至 0.072U/mL 给药浓度(以预混液中门冬胰岛素浓度计),给药体积为 5ml/kg(即 50 μ l/10g 体重)。采用皮下给药(S.C.)方式,颈背部皮下注射给药一次。在大约下午 16:00(时间 0)给予药物,给药期间动物禁食不禁水,评估给药后 0.5、1、2、3、6 和 15 时小鼠血糖。

用酒精棉球清洁鼠尾部,使用一次性采血针从尾巴采集血滴,用血糖仪及配套试纸(罗氏)进行测定。并绘制血糖对时间的剂量响应曲线。为了说明本发明的预混胰岛素对血糖的影响,对于每个单独的剂量响应曲线,计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。其中,AUC 值越小,表明降糖效果越好,药效越好。

图 12a-12b 显示,包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物给药后,相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物,在 I 型糖尿病(T1DM)小鼠中有预料不到的增加的降糖药效,在化合物 4 与门冬胰岛素的用量比小于德谷胰岛素与门冬胰岛素的用量比时,仍能达到更好或相当的降糖效果。

实施例 22

以与实施例 21 相似的步骤,测试包含本发明的酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合物在链脲佐菌霉素(STZ)诱导 I 型糖尿病(T1DM) C57/6J 小鼠中对血糖(BG)的调节效应。

当日实验开始前,检测小鼠随机血糖,并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠分配到溶媒组或治疗组,共 7 组,每组 8 只,各组分别接受如下处理:皮下注射溶媒,或皮下注射门冬胰岛素(3U/kg)、或皮下注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物,其中德谷胰岛素和门冬胰岛素的注射剂量分别为 7U/kg 和 3U/kg,或皮下注射包含本发明实施例 4 的标题化合物化合物 4 和门冬胰岛素的四种药物组合物,其中在注射所述四种药物组合物时,化合物 4 的注射剂量分别为 6.79U/kg、5.34U/kg、3.84U/kg 和 2.39U/kg,门冬胰岛素的注射剂量均为 3U/kg,其中所述溶媒包含:甘油 19.6mg/ml、苯酚 1.5mg/ml,间甲酚 1.72mg/ml,锌离子浓度 55 μ g/ml,上述溶媒的 pH 值为 7.6。

将化合物 4 与门冬胰岛素预混液溶解在溶媒中至 0.6U/mL 给药浓度

(以预混液中门冬胰岛素浓度计), 给药体积为 5ml/kg(即 50 μ l/10g 体重)。采用皮下给药(S.C.)方式, 颈背部皮下注射给药。在每天下午大约 17:00(时间 0)给予药物, 连续给药 10 天, 给药期间小鼠自由饮食, 评估第四、八、十次给药前(0h) 小鼠血糖, 以及第四、八、十次给药后 1 小时小鼠随机血糖, 对第八次给药前(0h)血糖及给药后 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、16、24 小时随机血糖进行检测。最后一次给药后小鼠禁食 1h, 眼眶取血, 检测全血中糖化血红蛋白(Hb1Ac) 百分比。

用酒精棉球清洁鼠尾部, 使用一次性采血针从尾巴采集血滴, 用血糖仪及配套试纸(罗氏)进行测定。并绘制第八次给药后血糖对时间的剂量响应曲线。为了说明本发明的预混胰岛素对血糖的影响, 对第八次给药后每个单独的剂量响应曲线, 计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。其中, AUC 值越小, 表明降糖效果越好, 药效越好。

图 13a-图 16 显示了包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的组合物给药后, 相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物, 在 I 型糖尿病(T1DM) 小鼠中有预料不到的增加的降糖药效, 具有更优异的降糖累积效果。

具体地, 图 13a 和图 13b 显示, 包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的组合物, 在给药后, 相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物, 在 I 型糖尿病(T1DM) 小鼠中有预料不到的增加的降糖药效, 在化合物 4 与门冬胰岛素的用量比远小于德谷胰岛素与门冬胰岛素的用量比时, 仍能达到更好的降糖效果。

图 14a-图 14c 分别显示了在第四、八、十次给药前(0h)各个给药组小鼠血糖情况, 表明相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物, 包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物具有更好的药效, 和更优异的降血糖的累积效果。

图 15a-图 15c 分别显示了在第四、八、十次给药后 1 小时小鼠的血糖情况, 表明相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物, 包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物具有更好的药效, 和更优异的降血糖的累积效果。

图 16 显示包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的组合物, 在给药后, 相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物, 具有更好地降低

Hb1Ac 的效果，在化合物 4 与门冬胰岛素的用量比远小于德谷胰岛素与门冬胰岛素的用量比时，仍能达到更好地降低 Hb1Ac 的效果。

实施例 23

本实验的目的在于测量本发明的酰化胰岛素制剂的化学稳定性。

酰化胰岛素制剂

将实施例 4 的标题化合物化合物 4 溶解于 0.1%NaOH 溶液中，至 4.8mM 的终浓度（pH 值约为 10-11），根据在下表中各个组分的量，依次加入苯酚、间甲酚、醋酸锌、甘油和氯化钠，产生最终胰岛素浓度为 1.2mM（200U/ml 或 8.46mg/ml）的酰化胰岛素制剂，其中 Zn 的含量以 Zn/6 摩尔的酰化的胰岛素（简称为“Zn/6ins”）来表示。

本实施例中制剂的化学稳定性能够在 25℃和 37℃存储 14 天和 20 天后，高分子量蛋白（HMWP）相对于第 0 天时的变化来显示，同时也能够在 25℃和 37℃存储 14 天和 20 天后有关物质的量的变化来表示。

高分子量蛋白（HMWP）的测定

通过高效液相色谱法（HPLC）测定高分子量蛋白（HMWP）的含量，在型号和规格为：Waters Xbride BEH 200A（7.8*300mm），5μm 柱上，在柱温为 30℃、样品池温度为 5℃时，用流动相以 0.5ml/min 的流速进行测试，其中，所述流动相包含 600ml 的 0.1%精氨酸溶液、150ml 冰醋酸和 250ml 乙腈。检测波长为 276nm，进样量为 10ul。表 2 示出了，在 25℃和 37℃时，第 14 天和第 20 天相对于第 0 天时 HMWP 的增加量。

表 2

1.2mM 化合物 4 10mM 间甲酚 17mg/ml 甘油 pH7.4	25℃ 第 14 天时 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)	25℃ 第 20 天时 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)	37℃ 第 14 天时 相对于第 0 天时 HMWP 的 增加量 (%)	37℃ 第 20 天时 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量 (%)
30mM 苯酚+5.5 Zn/6ins+10mMNaCl	0.06	0.13	0.37	0.57
30mM 苯酚+6.5	0.03	0.07	0.2	0.35

Zn/6ins+10mMNaCl				
30mM 苯酚+5.5 Zn/6ins+30mMNaCl	0.05	0.07	0.34	0.56
30mM 苯酚+6.5 Zn/6ins+30mMNaCl	0.03	0.04	0.16	0.28
60mM 苯酚+5.5 Zn/6ins+10mMNaCl	0.05	0.09	0.41	0.66
60mM 苯酚+6.5 Zn/6ins+10mMNaCl	0.06	0.06	0.30	0.49
60mM 苯酚+5.5 Zn/6ins+30mMNaCl	0.08	0.08	0.36	0.56
60mM 苯酚+6.5 Zn/6ins+30mMNaCl	0.04	0.08	0.24	0.43
45mM 苯酚 +6.0Zn/6ins+20mMNaCl	0.04	0.06	0.28	0.42

由上表可知，本发明的上述酰化胰岛素制剂中 HMWP 的量随着时间的变化增加非常缓慢，表明上述酰化胰岛素制剂均具有优异的化学稳定性。特别是，当 Zn 含量为 6.5 Zn/6ins 时，相对于 5.5 Zn/6ins 时，HMWP 的量增加更为缓慢。

有关物质的量的测定

通过高效液相色谱法（HPLC）测定胰岛素有关物质的含量，在 Waters Kromasil 300A-5 μ m-C8（4.6*250mm）柱上，在柱温为 40℃、样品池温度为室温时，用洗脱相以 1.0ml/min 的流速进行测试。洗脱相由以下组成的流动相进行：

A 相包含 0.1M 无水硫酸钠、0.1M 二水合磷酸二氢钠、10%乙腈（v/v），用 NaOH 调节 pH 值至为 5.0；

B 相为 50%乙腈（v/v）。

梯度：0-45 min 的 45%/55% A/B 至 35%/65% A/B 的线性变化，45-50min 至 20%/80% A/B 的线性变化，50-60min 至 20%/80% A/B 的等度梯度，60-60.1 min 的 45%/55% A/B 的线性变化，60.01-70min 至 45%/55% A/B 的等度梯度。

表 3 示出了, 在 37°C 时, 第 14 天和第 20 天相对于第 0 天时有关物质的增加量。

表 3

1.2mM 化合物 4 10mM 间甲酚 17mg/ml 甘油 pH7.4	37°C 第 14 天 相对于第 0 天时有 关物质的 增加 (%)	37°C 第 20 天 相对于第 0 天时有 关物质的 增加 (%)
30mM 苯酚+5.5 Zn/6ins+10mMNaCl	1.49	2.46
30mM 苯酚+6.5 Zn/6ins+10mMNaCl	1.61	2.79
30mM 苯酚+5.5 Zn/6ins+30mMNaCl	1.55	2.4
30mM 苯酚+6.5 Zn/6ins+30mMNaCl	1.58	2.63
60mM 苯酚+5.5 Zn/6ins+10mMNaCl	1.74	2.71
60mM 苯酚+6.5 Zn/6ins+10mMNaCl	1.69	2.94
60mM 苯酚+5.5 Zn/6ins+30mMNaCl	1.52	2.58
60mM 苯酚+6.5 Zn/6ins+30mMNaCl	1.56	2.8
45mM 苯酚+6.0Zn/6ins+20mMNaCl	1.46	2.58

由上表可知, 本发明的上述酰化胰岛素制剂中胰岛素有关物质的量随着时间的变化增加也非常缓慢, 表明上述酰化胰岛素制剂非常稳定。

实施例 24

本实验的目的是测量本发明的酰化胰岛素制剂的化学稳定性。根据下述表 4-6 中各组分的量, 按照与实施例 23 类似地步骤, 配制表 4-6 中的酰化胰岛素制剂。并按照与实施例 23 类似的步骤测定 HMWP 和有关物质的变化。下表 4-6 示出了不同配方的酰化胰岛素制剂的 HMWP 和有关物质的变化。

表 4

2.1mM 化合物 4 60mM 苯酚 10mM 间甲酚 20mMNaCl 15mg/ml 甘油 pH7.4	37°C 第 26 天时 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)	37°C 第 65 天时 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)	37°C 储存 65 天 HMWP 每 天的增长率 (%)
2.2 Zn/6ins	0.98	2.18	0.032
2.5 Zn/6ins	0.99	2.42	0.037
3 Zn/6ins	0.79	1.68	0.026
4.5 Zn/6ins	0.43	1.2	0.018

表 5

2.1 mM 化合物 4 60mM 苯酚 10mM 间甲酚 15mg/ml 甘油 pH7.4	37°C 第 26 天时 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量 (%)	37°C 第 65 天时 相对于第 0 天时 HMWP 的 增加量 (%)	37°C 储存 65 天 HMWP 每 天的增长 率 (%)
10mM Na ₂ HPO ₄ +2.2 Zn/6ins	0.88	1.84	0.028
10mM Na ₂ HPO ₄ +4.5Zn/6ins	0.20	0.55	0.008
30mM Na ₂ HPO ₄ +2.2 Zn/6ins	0.67	1.47	0.023
30mM Na ₂ HPO ₄ +4.5Zn/6ins	0.27	0.61	0.009
2.2 Zn/6ins	0.96	2.16	0.033
4.5 Zn/6ins	0.46	1.33	0.020

表 6

0.6mM 化合物 2 60mM 苯酚 15mg/ml 甘油 5mM 磷酸二氢钠 10mM NaCl pH7.6	37°C 第 30 天时 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量 (%)	37°C 储存 30 天 HMWP 每 天的增长率 (%)	37°C 第 30 天 相对于第 0 天时有物 质的增加 (%)	37°C 储存 30 天 有关物质 每天的增 长率 (%)
---	---	---	---	--

5.5 Zn/6ins	0.45	0.0153	1.91	0.0637
6.5 Zn/6ins	0.42	0.0140	1.50	0.0500
7 Zn/6ins	0.44	0.0147	1.58	0.0527
7.5 Zn/6ins	0.51	0.0170	1.75	0.0583

由上表可知，本发明的上述酰化胰岛素制剂中 HMWP 的量、及有关物质的量随着时间的变化均增加较缓慢，特别是在 Zn 离子含量增加或添加 Na₂HPO₄ 时，HMWP 的量、及有关物质的量增加更为缓慢，表明本发明所获得的酰化胰岛素制剂均具有良好的化学稳定性。

实施例 25

本实验的目的是测量本发明的酰化胰岛素制剂的化学稳定性。根据下述表 7 中各组分的量，按照与实施例 23 类似地步骤，配制表 8 中的酰化胰岛素制剂。并按照与实施例 26 类似的步骤测定 HMWP 和有关物质的变化。下表示出了不同配方的酰化胰岛素制剂的 HMWP 和有关物质的变化。

表 7

60mM 苯酚 4.5Zn/6ins 15mg/ml 甘油 5mM 磷酸二氢钠 10mM 间甲酚 10mM NaCl	37°C 第 14 天时 相对于第 0 天时 HMWP 的增加 量 (%)	37°C 储存 14 天 相对于第 0 天时 有关物质的增加 (%)
0.6mM (100U) 化合物 4	0.77	1.62
2.1mM (350U) 化合物 4	0.57	1.08
3.0mM (500U) 化合物 4	0.53	1.03
4.2mM (700U) 化合物 4	0.45	1.29

由上表可知，本发明的上述酰化胰岛素制剂中 HMWP 的量、及有关物质的量随着时间的变化均增加较缓慢，表明本发明所获得的酰化胰岛素制剂均具有良好的化学稳定性。

实施例 26

在链脲佐菌霉素 (STZ) 诱导 I 型糖尿病 (T1DM) 大鼠中的药效学研究
8 周龄 SD 大鼠 (雌雄各半)，体重 170-250g。于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中 (4 只/盒)，自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相

对湿度 40%~70%，温度为 22°C~26°C。4 天适应期后，禁食 12h，大鼠按照 60mg/kg 腹腔注射链脲佐菌霉素（sigma）溶液（10mg/mL，于 0.1M 柠檬酸缓冲液）。给予链脲佐菌霉素 4 天和 8 天后，进行随机血糖检测，血糖值在 20mmol/L 以上的选为 T1DM 模型大鼠用于后续试验。

造模 8 天后开始试验，于给药前一天，监测基础血糖并对大鼠称重。根据随机血糖和体重将大鼠匹配分配到溶媒组或治疗组，接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下分别注射德谷胰岛素（50 U/kg）、化合物 4（25 U/kg 或 40U/kg），其中溶媒包含：苯酚 60mM，甘油 15mg/ml，间甲酚 10mM，氯化钠 0.585mg/ml，所述溶媒的 pH 值为 7.4。

将所述酰化胰岛素溶解在溶媒中至 25 U/ml 或 40U/ml 的给药浓度，给药体积为 1ml/kg（即 0.1ml/100g 体重）。采用皮下给药方式，颈背部皮下给药，隔天给药一次，重复给药 11 次，试验期间 SD 大鼠自由饮食。在大约上午 9:30-10:30 给予酰化胰岛素，在首次给药 3h、4h、5h、6h、24h、48h 后监测大鼠血糖，之后每次给药后 4h、24h、48h 监测一次大鼠血糖。

对于每个单剂量的酰化胰岛素绘制血糖对时间的剂量响应曲线。为了说明酰化胰岛素对血糖的影响，对于每个单独的剂量响应曲线，计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。

如图 17a-17b 显示，相对于德谷胰岛素，本发明的酰化胰岛素给药后在 I 型糖尿病（T1DM）大鼠中有预料不到的增加的降糖药效，化合物 4 的降糖效果明显优于德谷胰岛素。

实施例 27

以与实施例 21 相似的步骤，测试包含本发明的酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合物在链脲佐菌霉素（STZ）诱导 I 型糖尿病（T1DM）C57/6J 小鼠中对血糖(BG)的调节效应。

当日实验开始前，检测小鼠随机血糖，并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠分配到溶媒组或治疗组，共 8 组，每组 9 只（雄性 5 只，雌性 4 只），各组分别接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物，其中德谷胰岛素和门冬胰岛素的注射剂量分别为 7U/kg 和 3U/kg，或皮下注射包含本发明实施例 4 的标题化合物 4 和门冬胰岛素的六种药物组合物，其中在注射所述六种药物组合物时，化合物 4 的注射剂量分别为 1.49U/kg、1.99U/kg、2.45U/kg、2.85U/kg、

3.43U/kg、和 3.92U/kg，门冬胰岛素的注射剂量均为 3U/kg，其中所述溶媒包含：60mM 苯酚，10mM 间甲酚，15mg/ml 甘油，15mM Na₂HPO₄，上述溶媒的 pH 值为 7.6。

将化合物 4 与门冬胰岛素预混液溶解在溶媒中至 0.6U/mL 给药浓度（以预混液中门冬胰岛素浓度计），给药体积为 5ml/kg（即 50 μ l/10g 体重）。采用皮下给药（S.C.）方式，颈背部皮下注射给药。在每天下午大约 16:00（时间 0）给予药物，连续给药 15 天，给药期间小鼠自由饮食，评估第一、二、五、八、十五次给药前（0h）和给药后 1 小时小鼠随机血糖，以及对第二、五、八、十五次给药前（0h）血糖及给药后 0.5、1、2、4、6、16、20、24 小时随机血糖进行检测。最后一次给药后小鼠禁食 2h，眼眶取血，检测全血中糖化血红蛋白（Hb1Ac）百分比。

用酒精棉球清洁鼠尾部，使用一次性采血针从尾巴采集血滴，用血糖仪及配套试纸（罗氏）进行测定。并绘制第十五次给药后血糖对时间的剂量响应曲线。为了说明本发明的预混胰岛素对血糖的影响，对第十五次给药后每个单独的剂量响应曲线，计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积（AUC）。其中，AUC 值越小，表明降糖效果越好，药效越好。

图 18a 和图 18b 显示了包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的组合物在给药后，相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物，在 I 型糖尿病（T1DM）小鼠中有预料不到的增加的降糖药效，在化合物 4 与门冬胰岛素的用量比远小于德谷胰岛素与门冬胰岛素的用量比时，仍能达到更好的降糖效果。

图 19 显示包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的组合物，在给药后，相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物，具有更好地降低 Hb1Ac 的效果，在化合物 4 与门冬胰岛素的用量比远小于德谷胰岛素与门冬胰岛素的用量比时，仍能达到更好地降低 Hb1Ac 的效果。

实施例 28

在 db/db 小鼠中的药效学研究

本研究的目的在于在糖尿病情况下证实包含本发明的酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合在肥胖的糖尿病小鼠模型（db/db 小鼠）中对血糖（BG）的调节效应。

将 8-9 周龄雄性 db/db（BKS/Lepr）小鼠于屏障环境内饲养于合适规格

的饲养盒中，自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相对湿度40%-60%，温度为22°C-24°C。1-2周的适应期后，开始用于实验。

于当日实验开始前，检测小鼠随机血糖，并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠分配到溶媒组或治疗组，共5组，每组8只，各组分别接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物，其中德谷胰岛素和门冬胰岛素的注射剂量分别为7U/kg和3U/kg，或皮下注射包含本发明实施例4的标题化合物化合物4和门冬胰岛素的三种药物组合物，其中在注射所述三种药物组合物时，化合物4的注射剂量分别为2.0U/kg、2.4U/kg、3.84U/kg，门冬胰岛素的注射剂量均为3U/kg，其中溶媒包含：60mM苯酚，10mM间甲酚，15mg/ml甘油，15mM Na₂HPO₄，pH值为7.6。

将所述酰化胰岛素溶解在溶媒中至0.6U/ml的给药浓度，给药体积为5ml/kg(即50μl/10g体重)。采用皮下给药(S.C.)方式，颈背部皮下注射给药四次。在大约上午09:30(时间0)给予酰化胰岛素，给药期间动物禁食不禁水，评估给药后0.5、1、2、3、4、6、8、10、12小时小鼠血糖。

用酒精棉球清洁鼠尾部，使用一次性采血针从尾巴采集血滴，用血糖仪及配套试纸(罗氏)进行测定。对于每个单剂量的酰化胰岛素绘制血糖对时间的剂量响应曲线。

为了说明本发明的酰化胰岛素对血糖的影响，对于每个单独的剂量响应曲线，计算从0至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。其中，AUC值越小，表明降糖效果越好，药效越好。

图20a和图20b显示，包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的组合物，在给药后，相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物，在肥胖的糖尿病小鼠模型(db/db小鼠)中有预料不到的增加的降糖药效，在化合物4与门冬胰岛素的用量比远小于德谷胰岛素与门冬胰岛素的用量比时，仍能达到更好的降糖效果。

实施例29

本实验的目的在于测量本发明的酰化胰岛素制剂的化学稳定性。

酰化胰岛素制剂

将实施例4的标题化合物化合物4溶解于0.03%NaOH溶液中，至2.4mM的浓度，然后用4%NaOH溶液调节pH值至7.4，根据在下表中各个

组分的量，将苯酚、间甲酚、甘油和氯化钠混合好后加入化合物 4 溶液中，调节 pH 值至 7.4，然后根据下表中醋酸锌的量平均分三次加入到化合物 4 溶液中，调节 pH 值至最终值。产生最终胰岛素浓度为 1.2mM（200U/ml 或 8.46mg/ml）的酰化胰岛素制剂，其中 Zn 的含量以 Zn/6 摩尔的酰化的胰岛素（简称为“Zn/6ins”）来表示。

本实施例中制剂的化学稳定性能够用在 25℃和 37℃存储 14 天和 21 天后，高分子量蛋白（HMWP）相对于第 0 天时的变化来显示，同时也能够用在 37℃存储 21 天后有关物质的量的变化来表示。

高分子量蛋白（HMWP）的测定

通过高效液相色谱法（HPLC）测定高分子量蛋白（HMWP）的含量，在型号和规格为：Shodex™ PROTEIN KW-802.5（8.0 mm ID×300 mmL）柱上，在柱温为 30℃、样品池温度为 5℃时，用流动相以 0.5ml/min 的流速进行测试，其中，所述流动相包含 3L 的 0.1%精氨酸溶液、750ml 冰醋酸和 1250ml 乙腈。检测波长为 276nm，进样量为 10μl。表 8 示出了，在 25℃和 37℃时，第 14 天和第 21 天相对于第 0 天时 HMWP 的增加量。

表 8

1.2mM 化合物 4 10mM 间甲酚 17mg/ml 甘油 45mM 苯酚 6.5 Zn/6ins 20mMNaCl	25℃ 第 14 天 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)	25℃ 第 21 天 相对于第 0 天 HMWP 的增 加量 (%)	37℃ 第 14 天 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)	37℃ 第 21 天 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)
pH 7.0	0.03	0.07	0.27	0.45
pH 7.2	0.02	0.06	0.25	0.34
pH 7.4	0.03	0.06	0.26	0.34
pH 7.6	0.01	0.06	0.25	0.35
pH 8.0	0.06	0.12	0.44	0.79

由上表可知，本发明的酰化胰岛素制剂在上述 pH 值范围内 HMWP 的量随着时间的变化增加非常缓慢，表明本发明的酰化胰岛素制剂在上述 pH 值范围内均具有优异的化学稳定性。

有关物质的量的测定

通过高效液相色谱法 (HPLC) 测定胰岛素有关物质的含量, 在 Waters Kromasil 100A-3.5 μ m-C8 (4.6*250mm) 柱上, 在柱温为 40°C、样品池温度为 10°C 时, 用洗脱相以 1.0ml/min 的流速进行测试。洗脱相由以下组成的流动相进行:

A 相包含 0.1M 无水硫酸钠、0.1M 二水合磷酸二氢钠、10% 乙腈 (v/v), 用浓磷酸调节 pH 值至为 3.0;

B 相为 60% 乙腈 (v/v)。

梯度: 0-40 min 为 41.3%/58.7% A/B 的等度梯度, 40-50min 至 0%/100% A/B 的线性变化, 50-51min 至 41.3%/58.7% A/B 的线性变化, 51-65 min 的 41.3%/58.7% A/B 的等度梯度。表 9 示出了, 在 37°C 时, 第 21 天相对于第 0 天时有关物质的增加量。

表 9

1.2mM 化合物 4 10mM 间甲酚 17mg/ml 甘油 45mM 苯酚 6.5 Zn/6ins 20mMNaCl	37°C 第 21 天 相对于第 0 天时有关 物质的增加量 (%)
pH 7.0	2.43
pH 7.2	2.44
pH 7.4	2.22
pH 7.6	2.29
pH 8.0	3.34

由上表可知, 本发明的酰化胰岛素制剂在上述 pH 值范围内有关物质的量随着时间的变化也非常缓慢, 本发明的上述酰化胰岛素制剂均具有优异的化学稳定性。

实施例 30

本实验的目的是测量本发明的酰化胰岛素制剂的化学稳定性。根据下述表 10 和 11 中各组分的量, 按照与实施例 29 类似地步骤, 配制表 10 和

11 中的酰化胰岛素制剂。并按照与实施例 29 类似的步骤测定 HMWP 和有关物质的变化。下表 10 和 11 示出了不同配方的酰化胰岛素制剂的 HMWP 和有关物质的变化。

表 10

10mM 间甲酚 17mg/ml 甘油 45mM 苯酚 6.5 Zn/6ins 20mMNaCl pH 7.4	25℃ 第 22 天 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)	25℃ 第 42 天 相对于第 0 天 HMWP 的 增加量 (%)	37℃ 第 22 天 相对于第 0 天时 HMWP 的增加 量 (%)	37℃ 第 42 天 相对于第 0 天 时 HMWP 的 增加量 (%)
100U 化合物 4	0.06	0.13	0.25	0.75
200U 化合物 4	0.03	0.07	0.18	0.55

表 11

10mM 间甲酚 17mg/ml 甘油 45mM 苯酚 6.5 Zn/6ins 20mMNaCl pH 7.4	25℃ 第 42 天 相对于第 0 天有关物质 的增加量 (%)	37℃ 第 21 天 相对于第 0 天时有 关物质的增加量 (%)	37℃ 第 42 天 相对于第 0 天时有 关物质的增加量 (%)
100U 化合物 4	0.48	3.23	5.69
200U 化合物 4	0.71	3.06	5.03

由上表可知，本发明的上述酰化胰岛素制剂中 HMWP 的量、及有关物质的量随着时间的变化均增加较缓慢，表明本发明所获得的酰化胰岛素制剂均具有良好的化学稳定性。

实施例 31

本实验的目的是测量本发明的酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合制剂的化学稳定性。

对于该酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合制剂，按表 12 中所列个组分的量制备组合 1-5。化合物 4 其中 Zn 的含量以 Zn/6 摩尔的酰化的胰岛素（简称为“Zn/6ins”）来表示。

表 12

	组合 1	组合 2	组合 3	组合 4	组合 5
化合物 4	0.18mM (或 30U/ml)				
门冬胰岛素	0.18mM (或 30U/ml)				
醋酸锌 (μg/ml)	22.46	22.46	26.38	22.46	24.42
n 个 Zn/6ins	11.5	11.5	13.51	11.5	12.51
苯酚 (mM)	40	40	40	70	55
NaCl (mM)	45	75	45	45	60
其他辅料	10mM 间甲酚 8.5mg/ml 甘油 pH 7.4				

本实施例中制剂的化学稳定性能够在 37℃ 存储 14 天和 28 天后，高分子量蛋白 (HMWP) 相对于第 0 天时的变化来显示。

高分子量蛋白 (HMWP) 的测定

通过高效液相色谱法 (HPLC) 测定高分子量蛋白 (HMWP) 的含量，在型号和规格为：Tskgel, G2000 SWXL, 5μm(7.8×300 mm) 柱上，在柱温为 30℃、样品池温度为 10℃ 时，用流动相以 0.5ml/min 的流速进行测试，其中，所述流动相包含 400ml 异丙醇、300ml 冰醋酸和 300ml 水。检测波长为 276nm，进样量为 10μl。表 13 示出了，在 37℃ 时，第 14 天和第 28 天相对于第 0 天时 HMWP 的增加量。

表 13

组合制剂	37℃ 第 14 天 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量(%)	37℃ 第 28 天 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量(%)
组合 1	0.34	1.03
组合 2	0.32	0.73
组合 3	0.35	0.76
组合 4	0.47	1.32
组合 5	0.37	1.02

由上表可知，本发明的上述酰化胰岛素和门冬胰岛素组合制剂中

HMWP 的量随着时间的变化增加非常缓慢,表明上述组合物制剂均具有优异的化学稳定性。

实施例 32

本实验的目的是测量本发明的酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合制剂的化学稳定性。

根据下述表 14 中各组分的量配制组合 6-10。并按照与实施例 31 类似的步骤测定 HMWP 的变化。下表 15 示出了不同配方的酰化胰岛素制剂的 HMWP 的变化。

表 14

	组合 6	组合 7	组合 8	组合 9	组合 10
化合物 4	0.165mM(或 27.5U/ml)				
门冬胰岛素	0.18mM(或 30U/ml)				
醋酸锌 (μg/ml)	16.78	16.78	20.54	16.78	18.75
Zn/6ins	9.38	9.38	11.49	9.38	10.48
苯酚 (mM)	20	20	20	35	27.5
间甲酚 (mM)	16	10	10	10	16
其他辅料	20mM NaCl 17mg/ml 甘油 pH 7.4				

表 15

组合制剂	37℃ 第 14 天 相对于第 0 天时 HMWP 的增加 量 (%)	37℃ 第 28 天 相对于第 0 天时 HMWP 的 增加量 (%)
组合 6	0.33	1.03
组合 7	0.28	0.79
组合 8	0.35	1.64
组合 9	0.40	1.50
组合 10	0.34	1.17

由上表可知,本发明的上述酰化胰岛素和门冬胰岛素组合制剂中 HMWP 的量随着时间的变化增加非常缓慢,表明上述组合物制剂均具有优

异的化学稳定性。

实施例 33

本实验的目的是测量本发明的酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合制剂的化学稳定性。

根据下述表 16 中各组分的量配制组合 11 和 12。并按照与实施例 31 类似的步骤测定 HMWP 的变化。下表 17 示出了不同配方的酰化胰岛素制剂的 HMWP 的变化。

表 16

	组合 11	组合 12
化合物 4	0.18mM(或 30U/ml)	0.165mM(或 27.5U/ml)
门冬胰岛素	0.18mM 或 30U/ml	0.18mM 或 30U/ml
醋酸锌 (μg/ml)	18.75	18.75
Zn/6ins	9.61	10.48
苯酚 (mM)	20	20
间甲酚 (mM)	16	10
其他辅料	28mM 苯酚 10mM 间甲酚 17mg/ml 甘油 20mM NaCl pH 7.4	

表 17

组合制剂	37℃ 第 21 天 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量 (%)	37℃ 第 28 天 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量 (%)
组合 11	0.63	0.87
组合 12	0.77	1.18

由上表可知，本发明的上述酰化胰岛素和门冬胰岛素组合制剂中 HMWP 的量随着时间的变化增加非常缓慢，表明上述组合物制剂均具有优异的化学稳定性。

实施例 34

在 db/db 小鼠中的药效学研究

本研究的目的在于在糖尿病情况下证实包含本发明的酰化胰岛素与门冬胰岛素的组合物在肥胖的糖尿病小鼠模型(db/db 小鼠)中对血糖(BG)的调节效应。

参照实施例 28 类似的实验步骤获得实验用 db/db 小鼠。于当日实验开始前,检测小鼠随机血糖,并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠分配到溶媒组或治疗组,共 4 组,每组 5 只,各组分别接受如下处理:皮下注射溶媒,或皮下注射包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物,其中德谷胰岛素和门冬胰岛素的注射剂量分别为 9.3U/kg 和 4U/kg,或皮下注射包含本发明实施例 4 的标题化合物化合物 4 和门冬胰岛素的药物组合物,其中在注射所述药物组合物时,化合物 4 的注射剂量为 3.7U/kg,门冬胰岛素的注射剂量为 4U/kg;其中溶媒包含:55mM 苯酚,10mM 间甲酚,8.5mg/ml 甘油,60mM NaCl, pH 值为 7.6。

将所述酰化胰岛素和门冬胰岛素的注射液溶解在溶媒中至相应的的给药浓度,给药体积为 5ml/kg(即 50 μ l/10g 体重)。采用皮下给药(S.C.)方式,每天给药 1 次。给药期间动物自由饮食饮水,评估连续给药第 21 天药后 0.5、1、2、3、4、6、8 小时小鼠随机血糖和连续给药第 18 天药后 0.5、1、2、3、4、6、8、10 小时小鼠药后禁食血糖。

用酒精棉球清洁鼠尾部,使用一次性采血针从尾巴采集血滴,用血糖仪及配套试纸(罗氏)进行测定。对于每个单剂量的酰化胰岛素和门冬胰岛素注射液绘制血糖对时间的剂量响应曲线。

为了说明本发明的包含酰化胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物对血糖的影响,对于每个单独的剂量响应曲线,计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积(AUC)。其中,AUC 值越小,表明降糖效果越好,药效越好。

图 21a 至图 21d 显示,包含本发明的酰化胰岛素和门冬胰岛素的组合物,在给药后,相对于包含德谷胰岛素和门冬胰岛素的药物组合物,在肥胖的糖尿病小鼠模型(db/db 小鼠)中有预料不到的增加的降糖药效,在化合物 4 与门冬胰岛素的用量比远小于德谷胰岛素与门冬胰岛素的用量比时,仍能达到更好的降糖效果,且降糖持续时间更长。

实施例 35

药代动力学

本实施例的目的在于说明本发明化合物的体内药代动力学性质。

SD 大鼠的药代动力学

SD 大鼠 24 只，每组 6 只（雌雄各半），分为实施例 4 标题化合物化合物 4 低剂量组、化合物 4 中剂量组、和化合物 4 高剂量组，分别皮下注射给药 2、6、18U/kg，以及德谷胰岛素组，德谷给药 14U/kg。化合物 4 低中高剂量组、德谷胰岛素组分别于给药前（0min）、给药后 0.5、1.5、4、6、8、24、48、72h 采血测定血药浓度。使用 WinNonLin v8.0 软件的非房室模型计算药代参数 $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 、 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、 V_d 、 Cl 、 MRT ，试验结果总结在表 18 中。

表 18：向 SD 大鼠皮下注射化合物 4 和德谷后药代动力学参数

剂量(U/kg)	$T_{1/2}$ (hr)	$T_{\max}$ (hr)	$C_{\max}$ (ng/ml)	AUC_{0-t} (hr*ng/ ml)	AUC_{INF} (hr*ng/ ml)	V_d IU/(ng/ mL)/kg	Cl IU/(h*ng/ mL)/kg	MRT (hr)
化合物 4 2U/kg	6.09	2.75	52.75	507.94	563.67	1336.24	152.02	6.36
化合物 4 6U/kg	9.37	4.25	121.65	1879.09	2275.89	1589.15	115.39	8.54
化合物 4 18U/kg	8.49	5.67	346.07	6054.42	6770.48	1375.99	113.09	10.88
德谷 14U/kg	2.76	2	1443.24	8896.67	8920.49	0.0063	0.0016	4.65

$C_{\max}$ =峰浓度， $T_{\max}$ =达峰时间， $T_{1/2}$ =末端消除半衰期， AUC_{0-t} =0-t 时间-血糖浓度时间曲线下面积， AUC_{INF} =血浆浓度时间曲线下从施用时间至无穷大的面积， V_d =表观分布容积， Cl =清除率， MRT =平均驻留时间

比格犬的药代动力学

犬 36 只，每组 6 只，雌雄各半，分为化合物 4 低、中、高剂量组，分别皮下注射给药 0.3、0.6、1.2U/kg，化合物 4 静脉组，静脉注射给药 0.6U/kg，德谷胰岛素组，皮下注射给药 0.6U/kg，静脉注射给药 0.6U/kg。化合物 4 静脉组和德谷胰岛素静脉组于给药前、给药后 2 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、30 h、36 h、48 h 采血测定血药浓度，化合物 4 低剂量、高剂量和德谷胰岛素皮下注射组于给药前、药后 0.5 h、1h、2h、4h、6h、8h、12 h、24 h、30 h、36 h、48 h 采血测定血药浓度，化合

物 4 中剂量组连续给药 7 天, 于首次给药和末次给药采集给药前、药后 0.5 h、1h、2h、4h、6h、8h、12 h、24 h、30 h、36 h、48 h、72 h (末次) 采血测定血药浓度。使用 WinNonLin v8.0 软件的非房室模型计算药代参数 C_{max}、T_{max}、T_{1/2}、AUC_{0-t}、MRT, 试验结果总结在表 19 中。

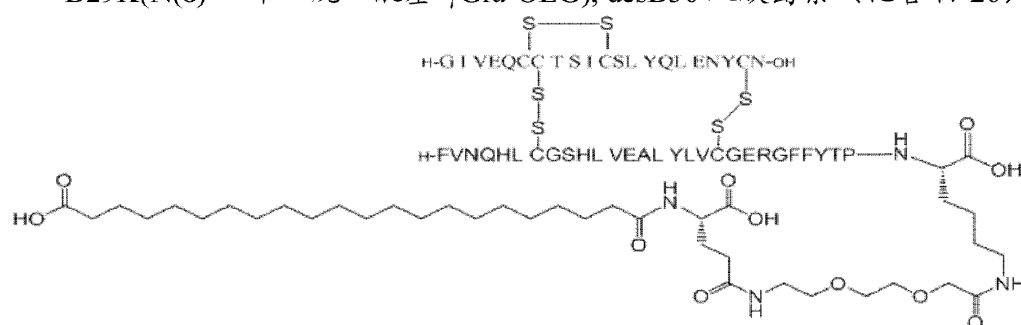
表 19: 向比格犬皮下注射化合物 4 和德谷后药代动力学参数

剂量 (U/kg)	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{0-t} (hr*ng/ml)	AUC _{INF} (hr*ng/ml)
化合物 4 0.3U/kg	6.79	5.34	11.5	170	182
化合物 4 0.6U/kg	6.2	5.33	35.9	598	617
化合物 4 1.2U/kg	6	3.67	82.7	1117	1139
化合物 4 静脉 0.6U/kg	2.46	-	482	852	860
德谷 0.6U/kg	3.205	3.665	84.145	645.07	649.575
德谷 静脉 0.6U/kg	3.02	-	357.99	779.17	801.92

由上述实验结果可知, 本发明的酰化胰岛素衍生物化合物 4 在大鼠和比格犬体内均表现出较长的半衰期、更平稳的降糖效果。

实施例 36

B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-OEG), desB30 人胰岛素 (化合物 20)



以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备化合物 B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-OEG), desB30 人胰岛素。

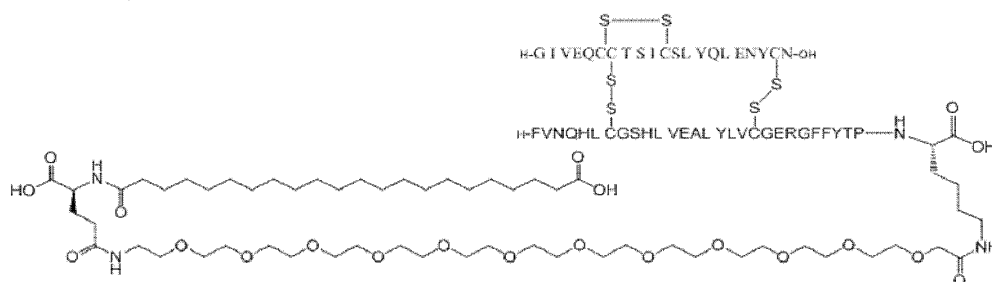
LC-MS(电喷雾): $m/z=1266.8122[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰- γ Glu-(OEG-OSu)-OtBu 与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z=854.57(M+1)^+$

实施例 37

B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-12xPEG), desB30 人胰岛素
(化合物 21)



与实施例 1 第 2 部分类似的步骤制备化合物 B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-12xPEG), desB30 人胰岛素。

LC-MS(电喷雾): $m/z=1354.8667[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰- γ Glu-(12xPEG-OSu)-OtBu 与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z=1294.83 (M+1)^+$

实施例 38

本发明的胰岛素衍生物的受体结合能力

本试验目的在于证明本发明的胰岛素衍生物对胰岛素受体的结合能力。

采用表面等离子共振 (SPR) 方法对本发明的化合物 2 和对照化合物 2, 分别在没有人血清白蛋白 (HSA) 存在下和 2% HSA 存在下, 进行与带 his 标签的胰岛素受体 A 胞外域 (IRA, Sino Biological) 之间的结合能力试验。

用操作缓冲液 (Running buffer) (Cytiva) 或含 2.0% HSA 的操作缓冲液分别稀释样品, 使得化合物 2、和对照化合物 2 样品的进样浓度均为 400 nM。选用 NTA 传感芯片 (Cytiva), 25°C 条件下在 Biacore T200 (Cytiva) 上进行 SPR 分析。以 10 μ L/min 的流速注入 0.5M NiCl₂ (Cytiva) 60 s, 随后用 HBS-EP buffer (Cytiva) 清洗。以 5 μ L/min 的流速注入 3 μ g/mL IRA 受体 180 s, 使 IRA 受体结合在芯片表面。之后以 30 μ L/min 流速注入测试

的胰岛素衍生物样品 60 s, 并进行 60 s 解离。每次进样后以 10 μ L/min 的流速注入 350mM EDTA (Cytiva) 60 s 进行芯片再生, 最后 HBS-P buffer (Cytiva) 清洗之后则可进行下一个样品的检测。选用样品解离前 4 s 的响应 (Response) 值作为对受体的结合力测试结果, 针对每个样品重复 3 次试验。

图 22 示出了化合物 2 和对照化合物 2 在 2%HSA 存在下 (模拟生理条件), 相对于 0%HSA 时, 受体结合能力的情况。由图 22 可以看出, 在 2%HSA 存在下, 化合物 2 相对于对照化合物 2, 具有明显提高的受体结合能力, 白蛋白对本发明的化合物 2 的受体结合能力的影响, 显著低于对照化合物 2。

这表明, 在白蛋白的存在下, 本发明的胰岛素衍生物例如化合物 2 相对于对照化合物 2, 具有预料不到的显著提高的受体结合能力, 即, 白蛋白对本发明的胰岛素衍生物的受体结合能力的影响, 显著低于对照化合物 2。

本发明已经通过上述实施例进行了说明, 但应当理解的是, 上述实施例只是用于举例和说明的目的, 而非意在将本发明限制于所描述的实施例范围内。此外本领域技术人员可以理解的是, 本发明并不局限于上述实施例, 根据本发明的教导还可以做出更多种的变型和修改, 这些变型和修改均落在本发明所要求保护的范围以内。本发明的保护范围由附属的权利要求书及其等效范围所界定。

序列

SEQ ID NO.1:

DesB30 人胰岛素 A 链:

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

SEQ ID NO.2:

DesB30 人胰岛素 B 链:

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

SEQ ID NO.3:

A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素 A 链:

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

SEQ ID NO.4:

A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素 B 链:

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

SEQ ID NO.5:

A14E, B16E, B25H, desB30 人胰岛素 A 链:

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

SEQ ID NO.6:

A14E, B16E, B25H, desB30 人胰岛素 B 链:

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

SEQ ID NO.7:

人胰岛素 A 链:

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

SEQ ID NO.8:

人胰岛素 B 链:

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

SEQ ID NO.9:

A21G 人胰岛素 A 链:

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

SEQ ID NO.10:

A21G 人胰岛素 B 链:

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

SEQ ID NO.11:

A21G, desB30 人胰岛素 A 链:

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

SEQ ID NO.12:

A21G, desB30 人胰岛素 B 链:

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

SEQ ID NO.13:

B28D 人胰岛素 A 链:

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

SEQ ID NO.14:

B28D 人胰岛素 B 链:

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

SEQ ID NO.15:

GLP-1-(7-37)肽

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

SEQ ID NO.16:

[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

SEQ ID NO.17:

[Arg34]GLP-1-(7-37)肽

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly