

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-509088

(P2011-509088A)

(43) 公表日 平成23年3月24日(2011.3.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/62 (2006.01)	C 0 7 K 14/62 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 E	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-541743 (P2010-541743)
 (86) (22) 出願日 平成21年1月6日 (2009.1.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年8月26日 (2010.8.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/000017
 (87) 国際公開番号 W02009/087081
 (87) 国際公開日 平成21年7月16日 (2009.7.16)
 (31) 優先権主張番号 102008003568.8
 (32) 優先日 平成20年1月9日 (2008.1.9)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
 (31) 優先権主張番号 61/044, 659
 (32) 優先日 平成20年4月14日 (2008.4.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 102008025008.2
 (32) 優先日 平成20年5月24日 (2008.5.24)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 397056695
 サノフィーアベンティス・ドイチュラント
 ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク
 テル・ハフツング
 ドイツ連邦共和国デー65929フラン
 クフルト・アム・マイン、ブリュニングシ
 ユトラーセ50
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 極度に遅延した時間作用プロファイルを有する新規なインスリン誘導体

(57) 【要約】

本発明は、基礎時間作用プロファイルを有する新規なインスリンアナログであって、以下の特徴を特徴とするインスリンアナログに関する： a) B鎖末端が、アミド化塩基性アミノ酸残基、例えばリジン又はアルギニンアミドからなること； b) インスリンA鎖のN末端アミノ酸残基が、リジン又はアルギニン基であること； c) アミノ酸位置A8が、ヒスチジン基によって占められていること； d) アミノ酸位置A21が、グリシン基によって占められていること；並びに e) 位置A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3及びB4において、負に荷電したアミノ酸残基の1つ又はそれ以上の置換及び/又は付加が行われること。

【請求項 9】

B2がValに対応する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 10】

B3がAspに対応する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 11】

B4がGluに対応する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 12】

B29がLysに対応する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 13】

B30がThrに対応する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ。

10

【請求項 14】

B31がArg又はLysに対応する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 15】

B32がArg - NH₂又はLys - NH₂に対応する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 16】

以下を含む群より選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ：

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

20

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu(A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

30

Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

40

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His(A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂

50

- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ 10
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ 20
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg(B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ 30
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31) - NH₂
- ヒトインスリン、
Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31) - NH₂ 40
- ヒトインスリン。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの調製方法。

【請求項 18】

インスリンアナログの前駆体を組換えによって調製し、前駆体を二本鎖インスリンに酵素的に処理し、そしてアルギニンアミドとのカップリングを、トリプシン活性を有する酵素の存在下で行ない、インスリンアナログを単離する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

糖尿病を処置する医薬を製造するための請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの使用。

- 【請求項 20】
I 型若しくはII型糖尿病を処置する、又はベータ細胞再生を治療的に補助する医薬を調製するための方法における、請求項 19 に記載の使用。
- 【請求項 21】
請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログ及び / 又はその生理学的に許容される塩を含む医薬。
- 【請求項 22】
製剤が、溶解したインスリンアナログを含む水性形態である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの製剤。 10
- 【請求項 23】
製剤が散剤の形態である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの製剤。
- 【請求項 24】
請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログが、結晶形及び / 又はアモルファス形で存在する、請求項 23 に記載の製剤。
- 【請求項 25】
製剤が懸濁剤の形態である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの製剤。
- 【請求項 26】
製剤が化学シャペロンをさらに含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの製剤。 20
- 【請求項 27】
請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの前駆体をコードする DNA。
- 【請求項 28】
請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの A 鎖をコードする DNA。
- 【請求項 29】
請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のインスリンアナログの B 鎖をコードする DNA。 30
- 【請求項 30】
請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の DNA を含むベクター。
- 【請求項 31】
請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の DNA 又は請求項 30 に記載のベクターを含む宿主生物。
- 【請求項 32】
C ペプチドが、その N 末端でアミノ酸残基アルギニンを、そしてその C 末端に 2 つのアルギニン残基、又は 1 つのアルギニン残基及び 1 つのリジン残基を担持し、そして後者の場合、リジン残基が実際の C 末端を形成する、プレプロインスリンアナログ。
- 【請求項 33】
グルカゴン様ペプチド - 1 (GLP1)、若しくはそのアナログ若しくは誘導体、又はエキセセンジン - 3若しくは - 4、若しくはそのアナログ若しくは誘導体をさらに含む、請求項 22 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の製剤。 40
- 【請求項 34】
エキセセンジン - 4をさらに含む、請求項 33 に記載の製剤。
- 【請求項 35】
エキセセンジン - 4のアナログが、
H - desPro³⁶ - エキセセンジン - 4 - Lys₆ - NH₂、
H - des(Pro^{36,37}) - エキセセンジン - 4 - Lys₄ - NH₂ 及び
H - des(Pro^{36,37}) - エキセセンジン - 4 - Lys₅ - NH₂、 50

又はその薬理的に許容される塩を含む群より選択される、請求項 3 3 に記載の製剤。

【請求項 3 6】

エキセンジン - 4 のアナログが、

desPro³⁶ [Asp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39)、

desPro³⁶ [IsoAsp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39)、

desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39)、

desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39)、

desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 2 (1 - 39)、

desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]エキセンジン - 2 (1 - 39)、

desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39) 及び

desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39)、

10

又はその薬理的に許容される塩を含む群より選択される、請求項 3 3 に記載の製剤。

【請求項 3 7】

ペプチド - Lys₆ - NH₂ が、エキセンジン - 4 のアナログの C 末端に結合されている、請求項 3 6 に記載の製剤。

【請求項 3 8】

エキセンジン - 4 のアナログが、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆ - NH₂、

des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

20

H - Asn - (Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂

、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆

- NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆ - NH₂、

H - des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - N

30

H₂、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂

、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆ - NH₂、

des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

40

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - N H₂、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Ly

s₆ - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆

50

- NH₂、
 des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂
 、
 H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4
 (1 - 39) - NH₂、
 H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] エキセンジン - 4(1 - 3
 9) - NH₂、
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (L
 ys)₆ - NH₂、
 H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4 10
 (1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、
 H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] エキセン
 ジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

又はその薬理学的に許容される塩を含む群より選択される、請求項 3 3 に記載の製剤。

【請求項 3 9】

Arg³⁴, Lys²⁶ (N (- グルタミル(N - ヘキサデカノイル))) GLP - 1 (7 - 37) [リラ
 グルチド] 又はその薬理学的に許容される塩をさらに含む、請求項 3 3 に記載の製剤。

【請求項 4 0】

亜鉛を含まないか又は15 µg/ml未満の亜鉛を含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に
 記載のインスリンアナログの水性製剤。 20

【請求項 4 1】

亜鉛を含まないか又は15 µg/ml未満 ~ 2 mg/mlの亜鉛を含む、請求項 1 ~ 1 6 のいず
 れか 1 項に記載のインスリンアナログの水性製剤。

【請求項 4 2】

亜鉛含量が200 µg/mlである、請求項 4 1 に記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、基礎時間 / 作用プロファイルを有する新規なインスリンアナログ、それらの
 調製及び使用に関する。 30

【背景技術】

【0 0 0 2】

糖尿病の発生率は、近年、ほぼ流行性の程度へ増加した。前記障害は、平均寿命の大幅
 な短縮を生じさせ得る。糖尿病を有する人は、外部からインスリンを身体に頻りに供給し
 なければならない。インスリンでの治療を最適化することが、賢明である。特定の薬理学
 的性質を有する異なるインスリンが、現在、利用可能である。実際には、異なるインスリ
 ンは、それらの作用持続時間に従って、短時間作用型インスリン、速効型インスリン、長
 時間作用型インスリン及び混合型インスリンに区別される。長時間作用型インスリンにつ
 いて同義的に使用される名称は、スローインスリン、デポーインスリン、又は基礎インス
 リンである。これらのインスリン製品の多くの中の有効成分は、1つ又はそれ以上のアミ
 ノ酸の置換、欠失及び / 又は付加によってヒトインスリンから誘導された、いわゆるイン
 スリンアナログである。用語「インスリンアナログ」及び「インスリン類」は、本明細書
 において同義的に使用される。 40

【0 0 0 3】

強化されたインスリン療法の方針は、基礎インスリンの早期投与により血糖値の安定的
 な制御を目指すことによって、健康リスクを減らそうと試みる。現在の基礎インスリンの
 一例は、医薬Lantus (登録商標) (有効成分：インスリングルルギン = Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)ヒトインスリン)である。新規の改善された基礎インスリンを開発する
 一般的な目標は、低血糖事象の数を最小限にすることである。これに関連して理想的な基
 礎インスリンは、各患者において少なくとも24時間確実に作用するものである。インスリ 50

ン効果は、理想的には、遅延開始及びできる限り浅い時間ノ作用プロファイルを有し、その結果、短時間の低血糖のリスクが明確に最小限にされ、食料品の事前摂取なしに、投与さえ可能となる。インスリン効果ができる限り長く同一のレベルで持続する場合、即ち、身体に一定量のインスリンが提供される場合、基礎インスリンの十分な供給が存在する。従って、低血糖事象のリスクは低く、患者及び日に特異的な変動性が最小限にされる。従って、理想的な基礎インスリンの薬物動態プロファイルは、遅延した作用開始、及び、延ばされた、即ち、長時間持続しかつ均一である作用を特徴とするべきである。

【0004】

しかし、既に達成された治療的利益にもかかわらず、現在まで記載されたスローインスリンのいずれも、理想的な基礎インスリンの薬物動態特性を示していない。望ましいインスリンは、浅く、長時間持続する時間ノ作用プロファイルを有し、その結果、患者における日依存性の変動及び低血糖事象のリスクがさらに最小限にされ、作用持続時間がさらに延ばされ、その結果、インスリンを毎日投与することが、ある状況においては、もはや必要ではなくなる。これは、糖尿病患者の、特に、自分自身でインスリンを注射することがもはやできない高齢の糖尿病患者及び介護の必要がある糖尿病患者の簡易化された治療を可能にし、従って、非常に経済的に有利でもある。このような基礎インスリンは、さらに、2型糖尿病の初期において有利である。臨床医は、多くの人々に存在する注射恐怖症が、よい時期にインスリン療法を開始することを人々に思いとどまらせると報告している。結果として、血糖の制御が不十分となり、糖尿病の後遺症へ至る。注射によって与えられるインスリン用量の数を減らす基礎インスリンは、インスリン療法を患者により許容されるようにする効果を有し得る。

【0005】

非特許文献1は、B鎖末端又はA及びB鎖のN末端でのリジン又はアルギニンの付加によって、ヒトインスリンの等電点($pI = 5.6$)と比較してアルカリ性の範囲の方向にそれらの等電点(pI)がシフトしたインスリンアナログを調製することによって、インスリンの薬力学を最適化することが可能であり、その結果、生理学的条件下での溶解性が低下し、遅延した時間ノ作用プロファイルが生じるということを記載している。非特許文献1の化合物18(Arg(A0), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)ヒトインスリン(実験による測定値 $pI = 7.3$; 計算値 $pI = 7.58$))は、これに関連して、その考えの文脈において最善の化合物と記載されている。従って、非特許文献1は、新規のインスリンアナログを設計することにおける主要な目的を、 $pI = 5.6$ から中性の範囲へと等電点を増加させるための、ヒトインスリンのアミノ酸配列への正に荷電したアミノ酸の付加であると考えている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Kohn et al. (Peptides 28 (2007) 935 - 948)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

新規のインスリンアナログの設計におけるこのねらいは、酸性アミノ酸でのヒトインスリン中の中性アミノ酸の置換及び/又は酸性アミノ酸の付加とは反対のものであり、何故ならば、このような置換及び/又は付加は、正に荷電したアミノ酸を導入する効果を少なくとも部分的に無効にするためである。しかし、今回、驚くべきことに、記載される望ましい基礎の時間ノ作用プロファイルが、以下の特徴を特徴とするインスリンアナログで得られることがわかった:

- ・ B鎖末端が、アミド化塩基性アミノ酸残基、例えば、リジン又はアルギニンアミドからなること、並びに
- ・ インスリンA鎖のN末端アミノ酸残基が、リジン又はアルギニン残基であること、並びに
- ・ アミノ酸位置A8が、ヒスチジン残基によって占められていること、並びに

B3は、Asp、Glu又はAsnに対応し；

B4は、Asp、Glu又はGlnに対応し；

B29は、Lys又は化学結合に対応し；

B30は、Thr又は化学結合に対応し；

B31は、Arg、Lys又は化学結合に対応し；

B32は、Arg - アミド、Lys - アミド又はアミノ基に対応し、

ここで、A5、A15、A18、B - 1、B0、B1、B2、B3及びB4を含む群の2つのアミノ酸残基が、同時に、互いに独立して、Asp又はGluに対応する。

【 0 0 1 0 】

本発明は、特に、互いに独立して、A0がArgに対応するか、又はA5がGluに対応するか、又はA15がGluに対応するか、又はA18がAspに対応するか、又はB - 1がアミノ基に対応するか、又はB0がGluに対応するか、又はB1がAspに対応するか、又はB2がValに対応するか、又はB3がAspに対応するか、又はB4がGluに対応するか、又はB29がLysに対応するか、又はB30がThrに対応するか、又はB31がArg又はLysに対応する、上述のインスリンアナログに関する。

10

【 0 0 1 1 】

本発明は、特に好ましくは、以下を含む群より選択されるインスリンアナログに関する

：

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

20

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu(A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

30

Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒ
トインスリン、

Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ ヒ
トインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

40

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His(A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ ヒ
トインスリン、

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

50

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

10

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

20

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

30

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31) - NH₂
ヒトインスリン、

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31) - NH₂
ヒトインスリン。

40

【 0 0 1 2 】

記載されるインスリンアナログの名称における用語「ヒトインスリン」の明記は、ヒトインスリンのA鎖及びB鎖のアミノ酸配列に言及し、それらからの全ての逸脱（付加、置換、欠失）は、インスリンアナログの与えられる名称において示される。

【 0 0 1 3 】

本発明は、さらに、上述のインスリンアナログの調製方法に関し、特にここで、インスリンアナログの前駆体を組換えによって調製し、前駆体を二本鎖インスリンに酵素的に処理し、そしてアルギニンアミドとのカップリングを、トリプシン活性を有する酵素の存在下で行ない、インスリンアナログを単離する。

【 0 0 1 4 】

50

本発明は、さらに、糖尿病、特に、I型若しくはII型糖尿病を処置する医薬を製造するための上述のインスリンアナログの使用に関する。本発明は、同様に、ベータ細胞再生を補助する医薬を調製するための上述のインスリンアナログの使用に関する。

【0015】

本発明は、さらに、上述のインスリンアナログ及び/又はその生理学的に許容される塩を含む医薬に関する。

【0016】

本発明は、さらに、製剤が、溶解したインスリンアナログを含む水性形態である、上述のインスリンアナログの製剤に関する。

【0017】

本発明は、さらに、製剤が散剤の形態である、上述のインスリンアナログの製剤に関する。

【0018】

本発明は、さらに、上述のインスリンアナログが結晶形及び/又はアモルファス形で存在する、上述の製剤に関する。

【0019】

本発明は、さらに、製剤が懸濁剤の形態である、上述のインスリンアナログの製剤に関する。

【0020】

本発明は、さらに、製剤が化学シャペロンをさらに含む、上述のインスリンアナログの製剤に関する。

【0021】

本発明は、さらに、上述のインスリンアナログの前駆体、又は上述のインスリンアナログのA鎖若しくはB鎖をコードするDNAに関する。

【0022】

本発明は、さらに、上述のDNAを含むベクターに関する。

【0023】

本発明は、さらに、上述のDNA又は上述のベクターを含む宿主生物に関する。

【0024】

本発明は、さらに、Cペプチドが、そのN末端でアミノ酸残基アルギニンを、そしてそのC末端に2つのアルギニン残基、又は1つのアルギニン残基及び1つのリジン残基を担持し、そして後者の場合、リジン残基が実際のC末端を形成する、プレプロインスリンアナログに関する。

【0025】

本発明は、さらに、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP1)、若しくはそのアナログ若しくは誘導体、又はエキセンジン-3若しくは-4、若しくはそのアナログ若しくは誘導体、好ましくは、エキセンジン-4をさらに含む、上述の製剤に関する。

【0026】

本発明は、さらに、エキセンジン-4のアナログが、
 H-desPro³⁶-エキセンジン-4-Lys₆-NH₂、
 H-des(Pro^{36,37})-エキセンジン-4-Lys₄-NH₂及び
 H-des(Pro^{36,37})-エキセンジン-4-Lys₅-NH₂、
 又はその薬理的に許容される塩を含む群より選択される、上述の製剤に関する。

【0027】

本発明は、さらに、エキセンジン-4のアナログが、
 desPro³⁶ [Asp²⁸]エキセンジン-4 (1-39)、
 desPro³⁶ [IsoAsp²⁸]エキセンジン-4 (1-39)、
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン-4 (1-39)、
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]エキセンジン-4 (1-39)、
 desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン-2 (1-39)、

10

20

30

40

50

desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]エキセンジン - 2 (1 - 39)、
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39) 及び
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39)、

又はその薬理的に許容される塩を含む群より選択される、上述の製剤に関する。

【 0 0 2 8 】

本発明は、さらに、ペプチド - Lys₆ - NH₂が、エキセンジン - 4のアナログのC末端に結合されている、前記段落に記載の製剤に関する。

【 0 0 2 9 】

本発明は、さらに、エキセンジン - 4のアナログが、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆ - NH₂、

10

des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂

、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆ - NH₂、

H - des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

20

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂

、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

30

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆ - NH₂、

des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆ - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

40

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - Lys₆ - NH₂、

des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂

、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] エキセンジン - 4(1 - 39) - NH₂、

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

50

ys)₆ - NH₂、

H - (Lys)₆ - des Pro³⁶ · Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]エキセンジン - 4 (1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

H - Asn - (Glu)₅ - des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] エキセンジン - 4(1 - 39) - (Lys)₆ - NH₂、

又はその薬理的に許容される塩を含む群より選択される、上述の製剤に関する。

【0030】

本発明は、さらに、Arg³⁴, Lys²⁶ (N (- グルタミル(N - ヘキサデカノイル))) GLP - 1 (7 - 37) [リラグルチド] 又はその薬理的に許容される塩をさらに含む、上述の製剤に関する。

10

【0031】

本発明のインスリンは、投与後に有利な効果を有する薬学的製剤のアイテムであり得ることは、これに関連する当業者に明らかである。水溶液は、これに関連する出発点である。さらなる成分は、従って、混和性でなければならない。ウイルス動物汚染のリスクは、製剤が動物源由来のいかなる成分も含むべきではない点で、最小限にされる。防腐剤を添加することによって微生物汚染を予防することは、さらに有利である。等張剤を添加することによって、投与部位での組織細胞の生理機能に対する製剤の可能性のある負の効果を補うことが可能である。プロタミンの添加は、安定化効果を有し得、その結果、実質的に塩を含まないインスリン製剤が、製剤へプロタミンを添加することによって得ることができる。フェノール成分の添加は、使用されるインスリンアナログの構造の安定化をもたらし得、従って、特に、作用開始に対する遅延効果をさらにもたらし得る。本発明のスローインスリンの空間的構造を安定化し、よりよい熱的安定性をもたらす物質を、製剤へ添加することも可能である。このような化学シャペロンは、例えば、短い合成ペプチドであり得、これはまた、アミノ酸アナログを含み得、又は、例えば、インスリンのCペプチド由来のペプチド配列を含み得る。

20

【0032】

本発明のインスリンは、デポー形態を開発するために、ナノ粒子中へ組み入れられ得る。本発明のスローインスリンがポリマー担体へ可逆的に結合された状態で存在する、いわゆる徐放製剤も考えられる。

【0033】

本発明のインスリンは、速効型インスリン、例えば、Apidra (登録商標)、NovoRapid (登録商標)、Humalog (登録商標) 又は開発中のインスリン誘導體、又は、好適な時間 / 作用プロファイルを有する製剤、又は、開発中である吸入可能なインスリン又は経鼻若しくは経口投与されるインスリンと並行して投与され得る。速効型及び本発明のスローインスリンの適切に製剤化された混合物もまた、この目的のために使用され得ることが、これに関連する当業者に明らかである。本発明のインスリンアナログは、GLP - 1 (グルカゴン様ペプチド - 1) 又はエキセンジン - 4若しくはエキセンジン - 3と同等の活性によって記載されるペプチドを含む医薬製剤中においてさらに使用され得る。GLP - 1 (7 - 37)、エクセナチド (Byetta (登録商標))、又は調製が特許出願WO 2006/058620、WO 2001/04156、WO 2004/005342及びWO 98/08871に記載されているペプチドは、このようなペプチドの例を示す。これに関連して特に有利な製剤は、これらのペプチドのデポー製剤を含むものである。特にII型糖尿病の初期段階において有利な治療のタイプは、本発明の医薬の投与と並行して与え、インスリンの効果を高めるもの、例えば、メトホルミンである。インクレチンのレベルを増加させるジペプチジルペプチダーゼ - 4阻害剤を用いての併用療法が、膵臓中におけるインスリン分泌を増加させるスルホニル尿素との併用のように、同様に可能である。好適な幹細胞からの膵β細胞の再生が分化因子の投与によって開始される場合、本発明のスローインスリンが、特に有利に使用され得る。これらの適用の全ては、糖尿病の療法についての例として記載され、本発明は、同様にそれに関する。従って、本発明は、さらに、糖尿病、特に、I型糖尿病又はII型糖尿病の治療についての他の有効成分と併用しての本発明のインスリンの使用に関する。

30

40

50

【0034】

本発明は、さらに、特に水性製剤又は散剤を示す、本発明のインスリンアナログを含む医薬に関する。

【0035】

医薬は、好ましくは、注射用の液剤又は懸濁剤である医薬製剤であり；それは、溶解、アモルファス、及び/又は結晶形態、好ましくは溶解形態の、本発明のインスリンアナログの少なくとも1つ、及び/又は、それらの生理学的に許容される塩の少なくとも1つの、内容物を特徴とする。

【0036】

製剤は、好ましくは、約2.5~8.5、特に、4.0~8.5のpHを有し、好ましくは、好適な等張化剤（tonicity agent）、好適な防腐剤、及び、必要に応じて、好適な緩衝剤、及び好ましくはさらに特定の亜鉛イオン濃度を、無菌水溶液中に含む。有効成分を除いた製剤成分の総計は、製剤担体を形成する。好適な等張化剤は、例えば、グリセロール、グルコース、マンニトール、NaCl、カルシウム又はマグネシウム化合物、例えば、CaCl₂などである。弱酸性pH値での本発明のインスリン又はそれらの生理学的に許容される塩の溶解性は、等張化剤及び/又は防腐剤の選択によって影響される。

10

【0037】

好適な防腐剤の例は、フェノール、m-クレゾール、ベンジルアルコール及び/又はp-ヒドロキシ安息香酸エステルである。

【0038】

pHを約4.0~8.5に調節するために特に使用され得る、緩衝物質は、例えば、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムなどである。そうでなければ、生理学的に許容される希酸（典型的に、HCl）又はアルカリ（典型的に、NaOH）もまた、pHを調節するために好適である。

20

【0039】

製剤が亜鉛含量を有する場合、好ましいのは、1~2mg/ml、特に、1µg/ml~200µg/mlのものである。本発明のインスリンアナログの作用プロファイルは、驚くべきことに、亜鉛の添加によって十分に影響され得る。これは、作用の全持続時間、作用開始の速度、及び効果曲線のプロファイルに関して異なり、従って患者の個々の安定化を可能にする、製剤を可能にする。別の可能性は、「ツーチャンバインスリンデバイス」の使用によって生じ、これは、迅速な作用開始及び/又は遅い徐々の作用開始を伴う製剤が、生命状況に応じて投与されることを可能にする。

30

【0040】

本発明の製剤の有効成分プロファイルを変化させるために、未修飾インスリン、好ましくは、ウシ、ブタ又はヒトインスリン、特に、ヒトインスリン、又はそれらのインスリンアナログ及び誘導体を混合することも可能である。GLP-1に直接対応するか若しくはGLP-1（グルカゴン様ペプチド-1）と同等の活性を特徴とするペプチド又はエキセンジン-4誘導体を1つ又はそれ以上混合することが、同様に可能である。本発明は、同様に、このような医薬（製剤）に関する。

【0041】

好ましい有効成分濃度は、約1~1500、より好ましくは、約5~1000、特に、約40~400国際単位/mlに対応するものである。

40

【0042】

本発明のインスリンアナログは、アミドをまだ含まない前駆体として、バイオテクノロジーによって最初は調製される。当業者は、インスリンを調製するための多数の可能性に精通している。これに関連して使用される宿主細胞系は、発酵による培養についての細菌、酵母及び高等植物又は植物細胞である。費用検討が許すならば、宿主系として動物細胞を使用する発現系も考えられる。しかし、そのための前提条件は、動物ウイルスを確実に含まないことである。従って、例として記載された発現系は、タンパク質の組換え調製のために開発された宿主/ベクター系のほんの一部を示すことが、明らかである。例えば、

50

酵母、又は植物系、例えば、コケ、藻類、又は高等植物、例えば、タバコ、エンドウ、ペニバナ、大麦、トウモロコシ若しくはアブラナに基づくバイオテクノロジー方法は、本願に記載されていない。それにもかかわらず、本発明は、標的ペプチドが好適なバイオテクノロジー発現系において調製されることを可能にする、宿主/ベクター系及びコーディングDNA配列を同様に含む。従って、宿主生物は、特に、以下からの植物界より選択され得る：分裂菌綱 (Schizomycetes)、細菌類又はラン藻類を含む第1門分裂植物門 (Schizophyta) の生物、第2門藻類門 (Phycophyta) 第V綱緑藻綱 (Chlorophyceae) の生物、第2門藻類門第VII綱紅藻綱 (Rhodophyceae) の生物、第3門菌類門 (Mycophyta) の生物、第5門コケ植物門 (Bryophyta) の生物、及び第7門種子植物門 (Spermatophyta) の生物。

10

【0043】

欧州特許出願公開EP - A 1 222 207は、修飾Cペプチドを含むプレプロインスリンをコードするプラスミドpINT358dを記載している。本発明のインスリンの前駆体として役立つプレプロインスリンを発現することが可能となるように、プロインスリンコード配列を特異的に修飾することが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の助けを借りて、現在、可能である。対応の融合タンパク質は、細胞内に調製される必要は必ずしもない。このようなタンパク質はまた、細菌発現、ペリプラズム中への及び/又は培養上清中への続いての分泌によっても調製され得ることが、当業者に明らかである。欧州特許出願公開EP - A 1 364 029は、例としてこれを記載している。本発明は、同様に、本発明のアナログをもたらすプロインスリン前駆体に関する。

20

【0044】

この方法で調製されたプロインスリンは、位置A0にリジン又はアルギニンを含みかつB鎖のC末端にリジン又はアルギニンを有するインスリンアナログ前駆体へ原則として変換され得る。

【0045】

本発明のプロインスリンが細菌中での細胞内発現の後に封入体の形態又は可溶性形態である場合、これらの前駆体は、プロセッシング及び生化学的修飾が着手され得る前に、正しい構造へインビトロ折り畳みによって折り畳まれなければならない。これに関連して、記載の融合タンパク質は、尿素又はグアニジニウム塩酸塩による変性後に直接折り畳みを可能にし、本発明は、同様に、折り畳み中間体に関する。

30

【0046】

個々の中間体を濃縮するために、生化学的方法、特に、それらの基本原理が公表され、実際にテキストブックの主題である分離プロセスが使用される。このような原理は、結果的に合わされ得、従って、それらの順序では以前は公表されていないプロセスとなり得ることが、当業者に明らかである。従って、本発明は、同様に、本発明のアナログの精製をもたらすプロセスに関する。

【0047】

本発明は、さらに、本発明のインスリンアナログを製造するための方法に関し、ここで、インスリンアナログの前駆体が、組換えによって調製され、二本鎖インスリン前駆体へ酵素的に変換され、これは、A鎖のアミノ酸1に関してN末端にアルギニン又はリジンを有し、B鎖のC末端にリジン又はアルギニン残基を有し、これが、トリプシン活性を有する酵素の存在下で、アルギニンアミド又はリジンアミドを用いて、アミドへ、従って、本発明のスローインスリンへ変換され、生化学的精製プロセスによって高純度で調製される。

40

【0048】

他のアミノ酸残基による少なくとも1つの天然のアミノ酸残基の置換及び/又は少なくとも1つのアミノ酸残基の付加及び/又は欠失によって、対応の、その他の点では同一の天然のタンパク質とは相違するタンパク質は、タンパク質の「アナログ」と呼ばれる。これに関連して、付加された及び/又は置換されたアミノ酸残基が、天然には生じないものであることも、可能である。

50

【 0 0 4 9 】

最初のタンパク質の特定のアミノ酸残基の化学修飾によって得られるタンパク質は、タンパク質の「誘導体」と呼ばれる。化学修飾は、例えば1つ又はそれ以上のアミノ酸への1つ又はそれ以上の特定の化学基の付加からなり得る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 0 】

【 図 1 】 ラットにおける新規なインスリンアナログの血糖降下作用を示すグラフである。

【 図 2 】 イヌにおける新規なインスリンアナログの血糖降下作用を示すグラフである。

【 図 3 】 イヌにおけるYKL205の血糖降下作用を示すグラフである。

【 図 4 】 イヌにおけるYKL205の血糖降下作用の垂鉛依存性を示すグラフである。

10

【 0 0 5 1 】

以下の実施例は、これに関連して限定的な影響を与えることなしに本発明の概念を例証することを目的とする。

【 実施例 】

【 0 0 5 2 】

実施例 1 : C / A 鎖境界でArg Argを担持する修飾 C ペプチド及びGly (A21) - インスリンをコードするベクター誘導体pINT3580の調製

欧州特許出願公開EP - A 1 222 207には、プラスミド類、pINT358d、pINT91d、及びプライマー配列Tirが記載されている。これらの産物のDNAを、プラスミドpINT3580を構築するために使用した。プラスミドpINT358dは、特定の性質を有する修飾 C ペプチドをコードする遺伝子配列をさらに特徴とする。3つのプライマー配列を合成した：

20

【 0 0 5 3 】

【 化 2 】

pint3580_glya21rev

5'-CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTTCTCCAGCTGG-3' (配列番号 3)

【 0 0 5 4 】

30

このプライマーは、後処理後、pINT358dによってコードされるプロインスリン配列のA鎖の位置21にアスパラギンの代わりにグリシン（下線が引かれた、太字）を導入するのに用いた。

【 0 0 5 5 】

【 化 3 】

arg_cjuncf

5'-GTCCCTGCAGCGTCGCGGCATCGTGGAGCAG-3' (配列番号 4)

40

【 0 0 5 6 】

このプライマーは、プライマーarg_cjunc_revと同様、インスリン A / B 鎖境界でリジンの代わりにアルギニンを導入するために役立った。

【 0 0 5 7 】

【化4】

arg_cjunc_rev

5'-CCACGATGCC GCGACGCTGC AGGGACCCCT CCAGCG-3' (配列番号 5)

【0058】

導入すべきアルギニンについてのコドンは、両方のプライマーにおいて太字になっている。プライマー対Tir / arg_cjunc_rev及びarg_cjuncf / pint3580_glya21revの各々並びにテンプレートとしてのプラスミドプラスミドpINT358dのDNAを用いて、欧州特許出願公開E P - A 1 222 207に従って、PCRを行った。2つの反応の産物のアリコートを含ませ、第3PCRにおいてプライマー対Tir / pint3580_glya21revと共に使用した。この反応の産物を、ゲル電気泳動による反応混合物の分画後精製し、そして一つの同じ反応で製造業者の説明書に従って制限酵素Sal1 / Nco1で消化し、反応混合物をゲル電気泳動によって分画し、そしてプロインスリン配列をコードするDNAフラグメントを単離した。次いで、フラグメントを、DNAリガーゼ反応によって、Nco1 / Sal1 - オープンドpINT91dベクターDNA中に挿入した。

【0059】

連結反応混合物を、コンピテント大腸菌細菌細胞を形質転換するために使用した。形質転換混合物を、25mg / l アンピシリンを含有する選択プレート上に取り出した。プラスミドDNAをコロニーから単離し、DNA配列分析によってキャラクタライズした。コレクトプラスミドをpINT3580と命名した。

【0060】

実施例2 : His (A8), Gly (A21) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3581の構築

実施例1に記載したように3つのポリメラーゼ連鎖反応によって、構築を行った。第3反応の産物を、Nco1 / Sal1切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンドpINT91dベクターDNA中に挿入した。プライマーTir及びpint3580_glya21revを使用した。2つのさらなるプライマーを合成した：

【化5】

pint3580_Ha8f

5'-AGCAGTGCTGCCACAGCATCTGCTCCCTCTAC-3' (配列番号 6)

pint3580_Ha8rev

5'-GAG CAGATGCT **GTG** GCAGCACTG CTCCACGATG-3' (配列番号 7)

【0061】

A鎖の位置8でヒスチジンをコードするコドンを、各ケースにおいて太字表示することによって強調している。実施例1に記載したと同様に、構築を行った。PCR1及び2についてのテンプレートは、プラスミドpINT3580のDNAであった。PCR1をプライマー対Tir / pint3580_Ha8revを用いて行い、PCR2をプライマー対pint3580_Ha8f / pint3580_glya21revを用いて行った。プライマー対Tir / pint3580_glya21revを、PCR3において使用した。この場合におけるテンプレートは、PCR1及びPCR2の反応産物の混合物であった。コレクトプラスミドをpINT3581と命名した。

【0062】

10

20

30

40

50

実施例 3 : His (A8), Glu (A5), Gly (A21) - プレプロインスリンをコードするプラスミド pINT3582 の構築

実施例 1 及び 2 に記載したと同様に、3 つのポリメラーゼ連鎖反応によって、構築を行った。第 3 反応の産物を、Nco1 / Sal1 切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンド pINT91d ベクター-DNA 中に挿入した。プライマー Tir 及び pint3580_glya21rev を使用した。2 つのさらなるプライマーを合成した。

【化 6】

pint3581_Ea5f

10

5'GCATCGTGGAGGAGTGCTGCCACAGCATCTG 3' (配列番号 8)

pint3581_Ea5rev

5'-CTGT GGCAGCACTC CTCCACGATG CCGCGACG-3' (配列番号 9)

【0063】

20

A 鎖の位置 5 にグルタミン酸をコードするコドン、各ケースにおいて太字表示することによって強調している。構築を、実施例 1 に記載したと同様に行った。テンプレートは、プラスミド pINT3581 の DNA であった。コレクトプラスミドを pINT3582 と命名した。

【0064】

実施例 4 : His (A8), Asp (A18), Gly (A21) - プレプロインスリンをコードするプラスミド pINT3583 の構築

1 つのみのポリメラーゼ連鎖反応によって行ったことにより、構築は実施例 1 とは相違した。この反応の産物を、Nco1 / Sal1 切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンド pINT91d ベクター-DNA 中に挿入した。プライマー Tir を使用した。1 つのさらなるプライマーを合成した：

【化 7】

30

pint3580_Da18rev

5' CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAAGTAGTCCTCCAGCTGGTAGAGGGAG 3'

(配列番号 10)

【0065】

A 鎖の位置 18 にアスパラギン酸をコードするコドン、太字表示することによって強調している。テンプレートは、プラスミド pINT3581 の DNA であった。コレクトプラスミドを pINT3583 と命名した。

40

【0066】

実施例 5 : His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21) - プレプロインスリンをコードするプラスミド pINT3584 の構築

1 つのみのポリメラーゼ連鎖反応によって行ったことにより、構築は実施例 1 とは相違した。この反応の産物を、Nco1 / Sal1 切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンド pINT91d ベクター-DNA 中に挿入した。プライマー Tir、pint3580_Da18rev (実施例 4) を使用した。テンプレートは、プラスミド pINT3582 の DNA であった。コレクトプラスミドを pINT3584 と命名した。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物 YKL205 - 1 についての前駆体である

50

:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 6 7 】

リジンアミドでの対応するアミド化によって、化合物YKL205 - 1bが導かれた :

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp (A18), Gly(A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 6 8 】

実施例 6 : His (A8), Glu (A15), Gly (A21) - プレプロインスリンをコードするプラスミド pINT3585 の構築

1 つのみのポリメラーゼ連鎖反応によって行うことにより、構築は実施例 1 とは相違した。この反応の産物を、Nco1 / Sal1 切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンド pINT91d ベクター DNA 中に挿入した。プライマー-Tir を使用した。1 つのさらなるプライマーを合成した :

【 化 8 】

pint3580_Ea15rev

5'- CAAAGGTCGA CTATTAGCCG CAGTAGTTCTCCAGCTCGTA GAGGGAGCAG
ATGCTG -3' (配列番号 11)

【 0 0 6 9 】

A 鎖の位置 15 にグルタミン酸をコードするコドン、太字表示することによって強調している。テンプレートは、プラスミド pINT3581 の DNA であった。コレクトプラスミドを pINT3585 と命名した。

【 0 0 7 0 】

実施例 7 : His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21) - プレプロインスリンをコードするプラスミド pINT3586 の構築

1 つのみのポリメラーゼ連鎖反応によって行うことにより、構築は実施例 1 とは相違した。この反応の産物を、Nco1 / Sal1 切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンド pINT91d ベクター DNA 中に挿入した。プライマー-Tir を使用した。1 つのさらなるプライマーを合成した :

【 化 9 】

pint3585_Ea15_Da18rev

5'- CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCTCCAGCTCGTAGAGGGAGCAG
ATGCTG -3' (配列番号 12)

【 0 0 7 1 】

A 鎖の位置 15 のグルタミン酸及び A 鎖の位置 18 のアスパラギン酸についてのコドンを、各ケースにおいて太字表示することによって強調している。テンプレートは、プラスミド pINT3581 の DNA であった。コレクトプラスミドを pINT3586 と命名した。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物 YKL205 についての前駆体である :

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 7 2 】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物 YKL205b についての前駆体である :

10

20

30

40

50

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン

【0073】

実施例 8 : Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3587の構築

1つのみのポリメラーゼ連鎖反応によって行うことにより、構築は実施例 1 とは相違した。この反応の産物を、Nco1 / Sal1切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンドpINT91dベクターDNA中に挿入した。プライマー-Tir及び実施例 6 に記載のpint3580_Ea15revを使用した。テンプレートは、プラスミドpINT3582のDNAであった。コレクトプラスミドをpINT3587と命名した。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 2についての前駆体である：

10

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン

【0074】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 2bについての前駆体である：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン

20

【0075】

実施例 9 : His (A8), Gly (A21), Asp (B3) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3588の構築

実施例 1 及び 2 に記載したと同様に、3つのポリメラーゼ連鎖反応によって、構築を行った。第3反応の産物を、Nco1 / Sal1切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンドpINT91dベクターDNA中に挿入した。プライマー-Tir及びpint3580_glya21revを使用した。2つのさらなるプライマーを合成した：

【化10】

pint3581_Db3f

30

5'- GCACGATTTGTGGACCAGCACCTGTGCGGC -3' (配列番号 13)

pint3581_Db3rev

5'- CACAGG TGCTGGTCCA CAAATCGTGC CGAATTC -3' (配列番号 14)

【0076】

40

インスリン B 鎖の位置 3 にアスパラギン酸をコードするコドン、各ケースにおいて太字表示することによって強調している。実施例 1 に記載したと同様に、構築を行った。テンプレートは、プラスミドpINT3581のDNAであった。コレクトプラスミドをpINT3588と命名した。

【0077】

実施例 10 : Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3589の構築

実施例 9 に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1及びPCR2においてテンプレートとしてプラスミドpINT3582のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3589が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのア

50

ミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 3についての前駆体である：
Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ -
ヒトインスリン

【0078】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 3bについての前駆体である：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ -
ヒトインスリン

【0079】

実施例11：His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3590の構築

10

実施例9に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1及びPCR2においてテンプレートとしてプラスミドpINT3585のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3590が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 4についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ -
ヒトインスリン

【0080】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 4bについての前駆体である：

20

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ -
ヒトインスリン

【0081】

実施例12：His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3591の構築

実施例9に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1及びPCR2においてテンプレートとしてプラスミドpINT3586のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3591が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 5についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ -
ヒトインスリン

30

【0082】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 5bについての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ -
ヒトインスリン

【0083】

実施例13：His (A8), Gly (A21), Asp (B3) - Glu (B4) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3592の構築

実施例1及び2に記載したと同様に、3つのポリメラーゼ連鎖反応によって、構築を行った。第3反応の産物を、Nco1 / Sal1切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンドpINT91dベクター-DNA中に挿入した。プライマー-Tir及びpint3580_glya21revを使用した。2つのさらなるプライマーを合成した：

40

【化 1 1】

pint3581_Db3_Eb4f

5'- GCACGATTTGTGG**ACGAG**CACCTGTGCGGCTC -3' (配列番号 15)

pint3581_Db3_Eb4rev

5'- CGCACAGG TGCTCGTCCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (配列番号 16)

【 0 0 8 4】

インスリン B 鎖の位置 3 においてアスパラギン酸及び位置 4 においてグルタミン酸をコードするコドン、各ケースにおいて太字表示することによって強調している。実施例 1 に記載したと同様に、構築を行った。テンプレートは、プラスミド pINT3581 の DNA であった。コレクトプラスミドを pINT3592 と命名した。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物 YKL205 - 6 についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 8 5】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物 YKL205 - 6b についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 8 6】

実施例 14 : His (A8), Gly (A21), Glu (B4) - プレプロインスリンをコードするプラスミド pINT3593 の構築

実施例 1 及び 2 に記載したと同様に、3 つのポリメラーゼ連鎖反応によって、構築を行った。第 3 反応の産物を、Nco1 / Sal1 切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンド pINT91d ベクター DNA 中に挿入した。プライマー Tir 及び pint3580_glya21rev を使用した。2 つのさらなるプライマーを合成した：

【化 1 2】

pint3581_Eb4f

5'- ACGATTTGTGAAC**GAG**CACCTGTGCGGCTC -3' (配列番号 17)

pint3581_Eb4rev

5'- CGCACAGG TGCTCGTTCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (配列番号 18)

【 0 0 8 7】

インスリン B 鎖の位置 4 にグルタミン酸をコードするコドン、太字表示することによって強調している。実施例 1 に記載したと同様に、構築を行った。テンプレートは、プラスミド pINT3581 の DNA であった。コレクトプラスミドを pINT3593 と命名した。

【 0 0 8 8 】

実施例15 : Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3594の構築

実施例9に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1及びPCR2においてテンプレートとしてプラスミドpINT3582のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3594が得られた。

【 0 0 8 9 】

前記プロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 7についての前駆体である：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

10

【 0 0 9 0 】

前記プロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 7bについての前駆体である：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 9 1 】

実施例16 : His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3595の構築

実施例9に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1及びPCR2においてテンプレートとしてプラスミドpINT3585のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3595が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 8についての前駆体である：

20

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 9 2 】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 8bについての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

30

【 0 0 9 3 】

実施例17 : His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3596の構築

実施例9に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1及びPCR2においてテンプレートとしてプラスミドpINT3586のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3596が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 9についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 9 4 】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 9bについての前駆体である：

40

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 0 9 5 】

実施例18 : His (A8), Gly (A21), Glu (B0) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3597の構築

2つのポリメラーゼ連鎖反応によって、構築を行った。プライマー-pint3580_glya21revを使用した。2つのさらなるプライマーを合成した：

【化 1 3】

pint3581_Eb0f1

5'- CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGTTTGTG AACCAGCACC TGTG-3'

(配列番号 19)

pint3581_Eb01f2

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAG-3'

(配列番号 20)

10

【 0 0 9 6】

この場合において、2つのプライマーの部分的な重複が存在する。Pint3581_Eb0f2は、NcoI認識配列を含有する。これを下線で示す。B鎖の開始での位置0にグルタミン酸をコードするコドン、各ケースにおいて太字表示することによって強調している。PCR1について

20

【 0 0 9 7】

プライマー対pint3581_Eb - 1f2 / pint3580_glya21revを用いて、PCR1を行った。PCR2についてのテンプレートは、PCR1由来の産物であった。プライマー対pint3581_Eb - 1f2 / pint3580_glya21revを用いて、PCR2を行った。PCR2由来の産物は、完全なプレプロインスリン配列をカバーした。第2反応の産物を、Nco1 / Sal1切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンドpINT91dベクターDNA中に挿入した。コレクトプラスミドをpINT3597と命名した。位置B0のグルタミン酸についてのコドンを、アスパラギン酸のコドンによって置き換え、前記実施例に従うと、位置B0にグルタミン酸の代わりにアスパラギン酸を有するプラスミドを生じさせた。

30

【 0 0 9 8】

実施例19 : Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3598の構築

実施例18に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1においてテンプレートとしてプラスミドpINT3582のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3598が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 10についての前駆体である :

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

40

【 0 0 9 9】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 10bについての前駆体である :

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 1 0 0】

実施例20 : His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3599の構築

実施例18に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1においてテンプレートとしてプラスミドpINT3585のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3599が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の

50

後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 11についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン

【 0 1 0 1 】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 11bについての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン

【 0 1 0 2 】

実施例21：His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3600の構築

実施例18に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1においてテンプレートとしてプラスミドpINT3586のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3600が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 12についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂
- ヒトインスリン

【 0 1 0 3 】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 12bについての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂
- ヒトインスリン

【 0 1 0 4 】

実施例22：His (A8), Gly (A21), Asp (B1) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3601の構築

2つのポリメラーゼ連鎖反応によって、構築を行った。プライマー-pint3580_glya21revを使用した。2つのさらなるプライマーを合成した：

【 化 1 4 】

pint3581_Db1f1

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG AGACGTG AACCAGCACC TGTGCG-3'

(配列番号 21)

pint3581_Db1f2

5'-TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAC-3'

(配列番号 22)

【 0 1 0 5 】

この場合において、2つのプライマーの部分的な重複が存在する。Pint3581_Db - 1f2は、NcoI認識配列を含有する。これを下線で示す。B鎖の位置1にアスパラギン酸をコードするコドン、各ケースにおいて太字表示することによって強調している。PCR1についてのテンプレートは、プラスミドpINT3581のDNAであった。プライマー-pint3581_Db1f1 / pint3580_glya21revを用いて、PCR1を行った。PCR2についてのテンプレートは、PCR1由来の産物であった。プライマー-pint3581_Db1f2 / pint3580_glya21revを用いて、PCR2を行った。PCR2由来の産物は、完全なプレプロインスリン配列をカバーした。第2反応の産物を

10

20

30

40

50

、Nco1 / Sal1切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンドpINT91dベクターDNA中に挿入した。コレクトプラスミドをpINT3601と命名した。

【 0 1 0 6 】

実施例23 : Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3602の構築

PCR1においてテンプレートとしてプラスミドpINT3582のDNAを使用することによって、実施例22に記載したと同様に反応を行い、プラスミドpINT3602が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 13についての前駆体である：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

10

【 0 1 0 7 】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 13bについての前駆体である：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 1 0 8 】

実施例24 : His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3603の構築

PCR1においてテンプレートとしてプラスミドpINT3585のDNAを使用することによって、実施例22に記載したと同様に反応を行い、プラスミドpINT3603が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 14についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

20

【 0 1 0 9 】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 14bについての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

30

【 0 1 1 0 】

実施例25 : His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3604の構築

実施例22に記載したと同様に反応を行い、しかしPCR1においてテンプレートとしてプラスミドpINT3586のDNAを使用することによって、プラスミドpINT3604が得られた。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 15についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

40

【 0 1 1 1 】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 15bについての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 1 1 2 】

実施例26 : His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1) - プレプロインスリンをコードするプラスミドpINT3605の構築

2つのポリマーゼ連鎖反応によって、構築を行った。プライマー-pint3580_glya21rev及び実施例18に記載のプライマー-pint3581_Eb01f2を使用した。プライマー-pint3597_Db1fを合成した：

50

【化 1 5】

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGGACGTG AACCAGCACC TGTGC-3'

(配列番号 23)

【 0 1 1 3】

位置 0 にグルタミン酸をコードし、B 鎖の開始に各ケースにおいてアスパラギン酸をコードするコドン、各ケースにおいて太字表示することによって強調している。PCR1 についてのテンプレートは、プラスミド pINT3597 の DNA であった。プライマー対 pint3597_Db1f / pint3580_glya21rev を用いて、PCR1 を行った。PCR2 についてのテンプレートは、PCR1 由来の産物であった。プライマー対 pint3581_Eb1f2 / pint3580_glya21rev を用いて、PCR2 を行った。PCR2 由来の産物は、完全なプレプロインスリン配列をカバーした。第 2 反応の産物を、Nco1 / Sal1 切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンド pINT91d ベクター DNA 中に挿入した。コレクトプラスミドを pINT3605 と命名した。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物 YKL205 - 16 についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 1 1 4】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物 YKL205 - 16a についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ - ヒトインスリン

【 0 1 1 5】

実施例 27 : His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), desThr (B30) - プレプロインスリンをコードするプラスミド pINT3606 の構築

実施例 1 及び 2 に記載したと同様に、3 つのポリメラーゼ連鎖反応によって、構築を行った。プライマー Tir 及び pint3580_glya21rev を使用した。2 つのさらなるプライマーを合成した：

【化 1 6】

desB30f

5'-TTCTACACACCCAAGCGCGATGTTCCCTCAGGTGG-3' (配列番号 24)

desB30rev

5'-AGG AACATCGCGC TTGGGTGTGT AGAAGAAGC-3' (配列番号 25)

【 0 1 1 6】

PCR1 及び PCR2 についてのテンプレートは、プラスミド pINT3586 の DNA であった。PCR1 をプライマー対 desB30f / pint3580_glya21rev を用いて行い、PCR2 をプライマー対 Tir / desB30rev テンプレートを用いて行った。PCR3 について使用したテンプレートは、PCR1 及び PCR2 の産物の等モル混合物であった。プライマー対 Tir / pint3580_glya21rev を用いて反応を行った。PCR3 由来の産物は、完全なプレプロインスリン配列をカバーした。第 3 反応の産物を、Nco1 / Sal1 切断後に、Nco1 / Sal1 - オープンド pINT91d ベクター DNA 中に挿入した。前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、アルギニンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物 YKL205 - 17 についての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Arg (B31) - NH₂
- ヒトインスリン

【0117】

前記プラスミドによってコードされたプレプロインスリンは、リジンアミドでのアミド化の後に得られ、下記の構造を示した、化合物YKL205 - 17bについての前駆体である：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Lys (B31) - NH₂
- ヒトインスリン

【0118】

実施例28：プロインスリン誘導体の発現

欧州特許出願公開EP - A 1 222 207の実施例1に従って、発現を行った。

10

【0119】

実施例29：プロインスリン誘導体の折り畳み

原則としてEP - A 0 668 282に記載の方法によって、折り畳みを行った。

【0120】

実施例30：C末端B鎖末端がリジン又はアルギニンを特徴とする2本鎖Arg (A0) - インスリン前駆体を得るための、折り畳まれたプレプロインスリンの酵素処理

折り畳まれたプレプロインスリン前駆体の酵素処理を、例えばWO91/03550の実施例4に記載される通りに行った。この場合において、WO 2007/031187 A1に記載のトリプシン変異体を使用することが、特に有利であるとわかった。

【0121】

実施例31：Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリンの調製

20

追加の酸性アミノ酸のポジショニングに関係なく、標準反応を下記の通りに行った：Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31) - インスリンアナログ100mgを、アルギニンアミド溶液 (4.46 g / L) 0.95mlに溶解し、M酢酸Na緩衝液 (pH 5.8) 0.13mL、及びDMF 2mlを添加した。反応混合物を12℃に冷却し、トリプシン0.094ml (0.075 mg, Roche Diagnostics) を添加することによって開始した。8時間後にTFAをpH 2.5まで添加することによって反応を停止させ、HPLCによって分析した。>60% Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ - ヒトインスリンが形成された。US 5,656,722と同様に、トリプシン阻害剤溶液を添加し、続いて、アミド化アナログを精製した。

30

【0122】

対応のリジンアミド化合物の調製を同様にして行った。しかし、溶液中に366 g / Lのリジンアミドを含有するリジンアミドストック水溶液が、出発材料を形成した。

【0123】

実施例32：アミド化インスリン誘導体の製剤

本発明のインスリン誘導体をそれらの生物薬理的及び物理化学的特性について試験するために、化合物の溶液を下記の通りに調製した：本発明のインスリン誘導体を、80 µg / mL亜鉛 (塩化亜鉛として) を含む 1 mM塩酸に240 ± 5 µMの標的濃度で溶解した。

【0124】

以下の組成物を溶解媒体として使用した：

40

- a) 1 mM塩酸
- b) 1 mM塩酸、5 µg / ml亜鉛 (塩化亜鉛又は塩酸として添加)
- c) 1 mM塩酸、10 µg / ml亜鉛 (塩化亜鉛又は塩酸として添加)
- d) 1 mM塩酸、15 µg / ml亜鉛 (塩化亜鉛又は塩酸として添加)
- e) 1 mM塩酸、30 µg / ml亜鉛 (塩化亜鉛又は塩酸として添加)
- f) 1 mM塩酸、80 µg / ml亜鉛 (塩化亜鉛又は塩酸として添加)
- g) 1 mM塩酸、120 µg / ml亜鉛 (塩化亜鉛又は塩酸として添加)

【0125】

この目的のために、最初に、分子量及び所望の濃度に基づいて必要とされるよりも約30%高い量の凍結乾燥材料を、量り分けた。次いで、存在する濃度を分析的HPLCによって測

50

定し、続いて、溶液を、80 µg/mL亜鉛を含む5 mM塩酸を用いて、標的濃度を達成するために必要な体積まで補った。必要に応じて、pHを 3.5 ± 0.1 へ再調節した。240 ± 5 µMの標的濃度を確認するためのHPLCによる最終分析後、完成した溶液を、0.2 µmフィルターアタッチメントを備えた注射器によって無菌バイアル中へ移し、これを、隔壁及びクランプキャップで閉じた。本発明のインスリン誘導体の短期単回テストのため、例えば等張剤、防腐剤又は緩衝物質の添加に関して、製剤の最適化は行わなかった。

【0126】

実施例33：ラットにおける新規なインスリンアナログの血中グルコース低下作用の評価

選択した新規なインスリンアナログの血中グルコース低下作用を、健常雄性正常血糖Wistarラットにおいて試験した。雄性ラットに、9 nmol/kgの用量のインスリンアナログを皮下注射で投与した。インスリンアナログの注射の直前、及び注射後8時間までの一定の間隔で、動物から血液サンプルを採取し、その血中グルコース含量を測定した。使用した本発明のインスリンアナログが、明確に遅延した作用開始、及びより長く、一様な作用持続時間をもたらすことが、実験によって明らかに示された(図1参照)。

10

【0127】

実施例34：イヌにおける新規なインスリンアナログの血中グルコース低下作用の評価

選択した新規なインスリンアナログの血中グルコース低下作用を、健常雄性正常血糖ビーグル犬において試験した。雄性動物に、6 nmol/kgの用量のインスリンアナログを皮下注射で投与した。インスリンアナログの注射の直前、及び注射後48時間までの一定の間隔で、動物から血液サンプルを採取し、その血中グルコース含量を測定した。使用した本発明のインスリンアナログが、明確に遅延した作用開始、及びより長く、一様な作用持続時間をもたらすことが、実験によって明らかに示された(図2参照)。

20

【0128】

実施例35：2倍増加した用量でのイヌにおける血中グルコース低下作用の評価

選択した新規なインスリンアナログの血中グルコース低下作用を、健常雄性正常血糖ビーグル犬において試験した。雄性動物に、6 nmol/kg及び12 nmol/kgの用量のインスリンアナログを皮下注射で投与した。インスリンアナログの注射の直前、及び注射後48時間までの一定の間隔で、動物から血液サンプルを採取し、その血中グルコース含量を測定した。使用した本発明のインスリンアナログが用量依存的効果を有すること、しかし、用量が2倍増加されたにもかかわらず、作用プロファイルは、浅いプロファイルを有し、即ち顕著な低点(最下点)が観察されなかったことが、実験によって明らかに示された(図3参照)。このことから、本発明のインスリンは、公知のスローインスリンと比較して明確により少ない低血糖事象しかもたらさないことが推論できる。

30

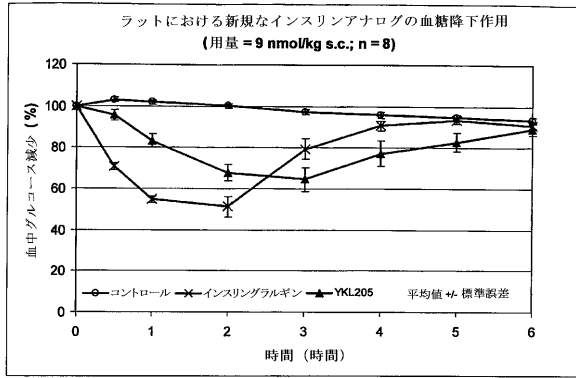
【0129】

実施例36：製剤中の種々の亜鉛濃度でのイヌにおける血中グルコース低下作用の評価

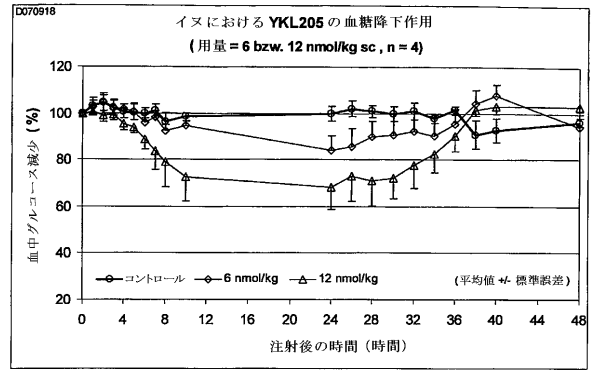
実験を実施例35に記載される通りに行った。図4は結果を示す。これによれば、ゼロ又は低い亜鉛含量で迅速な作用開始が観察され、効果が24時間維持され、一方で、より高い亜鉛含量で徐々の作用開始が観察され、インスリン効果が24時間よりも明確により長く維持されるような様式で、本発明のインスリンアナログの時間-効果曲線は、同一のインスリン濃度を有する製剤中において亜鉛イオン含量によって影響され得る。

40

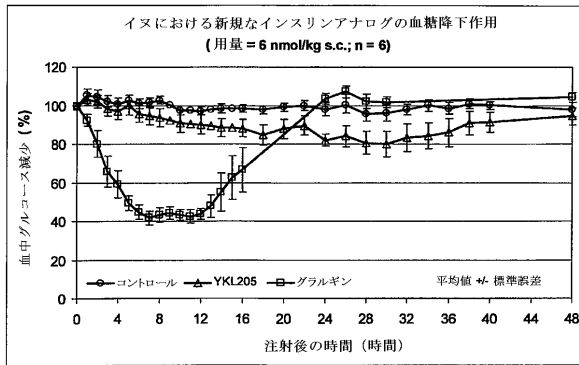
【 図 1 】



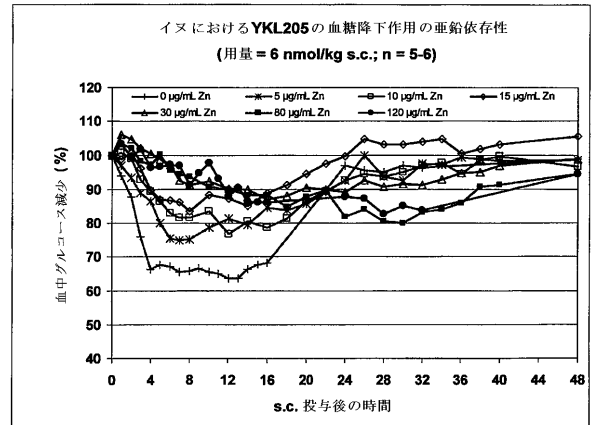
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2011509088000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/000017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/081824 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE [US]; WEISS MICHAEL [US]) 19 July 2007 (2007-07-19) abstract page 1, paragraph 3 page 4, paragraph 4 page 5, last paragraph	1-31, 33-42
X	US 6 100 376 A (DOERSCHUG MICHAEL [DE]) 8 August 2000 (2000-08-08) abstract column 1, line 41 - line 47 column 4, line 38 - line 58	1-31, 33-42
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 Juni 2009		Date of mailing of the international search report 22/06/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Grötzingler, Thilo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/000017

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 89/10937 A (NOVONORDISK AS [DK]) 16 November 1989 (1989-11-16) abstract page 6, line 9 - line 12 page 11; example 1 page 20; table 1	1-31, 33-42
X	WO 03/053339 A (LILLY CO ELI [US]; BEALS JOHN MICHAEL [US]; DEFELIPPIS MICHAEL ROSARIO) 3 July 2003 (2003-07-03) abstract page 10, line 11 - line 17 page 51; example 12	32
X	WO 02/079250 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 10 October 2002 (2002-10-10) abstract page 3, line 1 - line 16	32
X	WO 01/25278 A (AVENTIS PHARMA GMBH [DE]) 12 April 2001 (2001-04-12) abstract page 2, line 28 - page 3, line 4	32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/000017

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/000017

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-31, 33-42

Insulin analogs as characterized in claim 1 and corresponding embodiments.

2. Claim 32

Preproinsulin analog as characterized in claim 32.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/000017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007081824	A	19-07-2007	NONE
US 6100376	A	08-08-2000	NONE
WO 8910937	A	16-11-1989	AU 615760 B2 10-10-1991 AU 3692889 A 29-11-1989 DE 68912777 D1 10-03-1994 DE 68912777 T2 11-05-1994 EP 0419504 A1 03-04-1991 HU 55442 A2 28-05-1991 IE 65504 B1 01-11-1995 JP 3504240 T 19-09-1991 NZ 229108 A 26-05-1992 ZA 8903508 A 31-01-1990
WO 03053339	A	03-07-2003	AU 2002346490 A1 09-07-2003 BR 0215029 A 20-12-2005 CA 2468100 A1 03-07-2003 CZ 20040710 A3 16-02-2005 EP 1545460 A2 29-06-2005 HR 20040551 A2 31-10-2004 JP 2005519041 T 30-06-2005 MX PA04006084 A 31-03-2005 SK 2432004 A3 01-04-2005
WO 02079250	A	10-10-2002	EP 1377608 A1 07-01-2004 JP 2004533821 T 11-11-2004
WO 0125278	A	12-04-2001	AT 380196 T 15-12-2007 AU 778369 B2 02-12-2004 AU 7287700 A 10-05-2001 BR 0014464 A 11-06-2002 CA 2385857 A1 12-04-2001 CN 1377370 A 30-10-2002 DE 19947456 A1 05-04-2001 DK 1222207 T3 17-03-2008 EP 1222207 A1 17-07-2002 ES 2295054 T3 16-04-2008 HK 1049016 A1 14-10-2005 HU 0202755 A2 28-12-2002 JP 2003511018 T 25-03-2003 MX PA02003103 A 30-09-2002 NO 20021335 A 03-06-2002 NZ 518066 A 28-05-2004 PL 354078 A1 15-12-2003 PT 1222207 E 11-02-2008 TW 265168 B 01-11-2006 US 6534288 B1 18-03-2003 ZA 200202520 A 25-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/000017

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C07K14/62		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C07K		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2007/081824 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE [US]; WEISS MICHAEL [US]). 19. Juli 2007 (2007-07-19) Zusammenfassung Seite 1, Absatz 3 Seite 4, Absatz 4 Seite 5, letzter Absatz	1-31, 33-42
X	US 6 100 376 A (DOERSCHUG MICHAEL [DE]) 8. August 2000 (2000-08-08) Zusammenfassung Spalte 1, Zeile 41 - Zeile 47 Spalte 4, Zeile 38 - Zeile 58	1-31, 33-42
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen. <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*B* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
9. Juni 2009		22/06/2009
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Grötzingler, Thilo

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/000017

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 89/10937 A (NOVONORDISK AS [DK]) 16. November 1989 (1989-11-16) Zusammenfassung Seite 6, Zeile 9 - Zeile 12 Seite 11; Beispiel 1 Seite 20; Tabelle 1 -----	1-31, 33-42
X	WO 03/053339 A (LILLY CO ELI [US]; BEALS JOHN MICHAEL [US]; DEFELIPPIS MICHAEL ROSARIO) 3. Juli 2003 (2003-07-03) Zusammenfassung Seite 10, Zeile 11 - Zeile 17 Seite 51; Beispiel 12 -----	32
X	WO 02/079250 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 10. Oktober 2002 (2002-10-10) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 1 - Zeile 16 -----	32
X	WO 01/25278 A (AVENTIS PHARMA GMBH [DE]) 12. April 2001 (2001-04-12) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 28 - Seite 3, Zeile 4 -----	32

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/000017**Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erweisen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2009 /000017

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-31,33-42

Insulinaloga wie in Anspruch 1 charakterisiert und entsprechende Ausführungsformen.

2. Anspruch: 32

Präproinsulinanalogon wie in Anspruch 32 charakterisiert.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/000017

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2007081824	A	19-07-2007	KEINE
US 6100376	A	08-08-2000	KEINE
WO 8910937	A	16-11-1989	AU 615760 B2 10-10-1991 AU 3692889 A 29-11-1989 DE 68912777 D1 10-03-1994 DE 68912777 T2 11-05-1994 EP 0419504 A1 03-04-1991 HU 55442 A2 28-05-1991 IE 65504 B1 01-11-1995 JP 3504240 T 19-09-1991 NZ 229108 A 26-05-1992 ZA 8903508 A 31-01-1990
WO 03053339	A	03-07-2003	AU 2002346490 A1 09-07-2003 BR 0215029 A 20-12-2005 CA 2468100 A1 03-07-2003 CZ 20040710 A3 16-02-2005 EP 1545460 A2 29-06-2005 HR 20040551 A2 31-10-2004 JP 2005519041 T 30-06-2005 MX PA04006084 A 31-03-2005 SK 2432004 A3 01-04-2005
WO 02079250	A	10-10-2002	EP 1377608 A1 07-01-2004 JP 2004533821 T 11-11-2004
WO 0125278	A	12-04-2001	AT 380196 T 15-12-2007 AU 778369 B2 02-12-2004 AU 7287700 A 10-05-2001 BR 0014464 A 11-06-2002 CA 2385857 A1 12-04-2001 CN 1377370 A 30-10-2002 DE 19947456 A1 05-04-2001 DK 1222207 T3 17-03-2008 EP 1222207 A1 17-07-2002 ES 2295054 T3 16-04-2008 HK 1049016 A1 14-10-2005 HU 0202755 A2 28-12-2002 JP 2003511018 T 25-03-2003 MX PA02003103 A 30-09-2002 NO 20021335 A 03-06-2002 NZ 518066 A 28-05-2004 PL 354078 A1 15-12-2003 PT 1222207 E 11-02-2008 TW 265168 B 01-11-2006 US 6534288 B1 18-03-2003 ZA 200202520 A 25-10-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 K 38/28 (2006.01)	A 6 1 K	37/26	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K 33/30 (2006.01)	A 6 1 K	33/30	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ポール・ハーベルマン
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72) 発明者 ゲーアハルト・ザイプケ
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72) 発明者 ローラント・クルレ
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72) 発明者 ギュンター・ミュラー
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72) 発明者 マルク・ゾマーフェルト
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72) 発明者 ノールベルト・テナゲルス
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72) 発明者 ゲーオルク・チャンク
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー
- (72) 発明者 ウルリッヒ・ヴェルナー
ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA02 CA06 CA20 DA06 EA04 GA19 HA06
4B064 AG16 BJ12 CA02 CA19 CA21 CB05 CC15 CC24 DA07
4B065 AA26X AB01 AC14 AC16 BA02 BD14 BD44 CA24 CA44
4C084 AA01 AA02 BA02 BA08 BA19 BA20 BA23 BA26 BA31 BA44
DB34 DC50 MA05 MA17 MA21 MA34 MA43 NA05 NA14 ZC351
4C086 AA01 AA02 HA03 MA02 MA04 NA05 ZC35
4H045 AA10 BA09 CA42 DA37 EA27 FA16 FA74