

(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2007-520441

(P2007-520441A)

(43) 公表日 平成19年7月26日(2007.7.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/62 (2006.01)	C07K 14/62 ZNA	4C084
C07K 14/765 (2006.01)	C07K 14/765	4H045
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	
A61K 38/28 (2006.01)	A61K 37/26	
A61P 3/10 (2006.01)	A61P 3/10	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-521357 (P2006-521357)	(71) 出願人	506028661 コンジュシエム, インコーポレイティド カナダ国, ケベック エイチ2エックス 3ワイ8, モントリオール, プレジデント ケネディ アベニュー 225, スイート 3950
(86) (22) 出願日	平成16年7月26日 (2004.7.26)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月3日 (2006.2.3)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/CA2004/001409	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02005/012346	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成17年2月10日 (2005.2.10)		
(31) 優先権主張番号	60/490, 110		
(32) 優先日	平成15年7月25日 (2003.7.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/556, 585		
(32) 優先日	平成16年3月25日 (2004.3.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 持続性インスリン誘導体及びその方法

(57) 【要約】

本発明は、インスリン分子及び血液成分に共有結合する反応基を含むインスリン誘導体であって、好ましくは当該インスリン分子は、ヒト天然インスリン分子であり、そして当該反応基は、G l y A 1、P h e B 1、及びL y s B 2 9の位置から選ばれる位置でインスリン分子のアミノ酸と結合される誘導体に関する。

【特許請求の範囲】

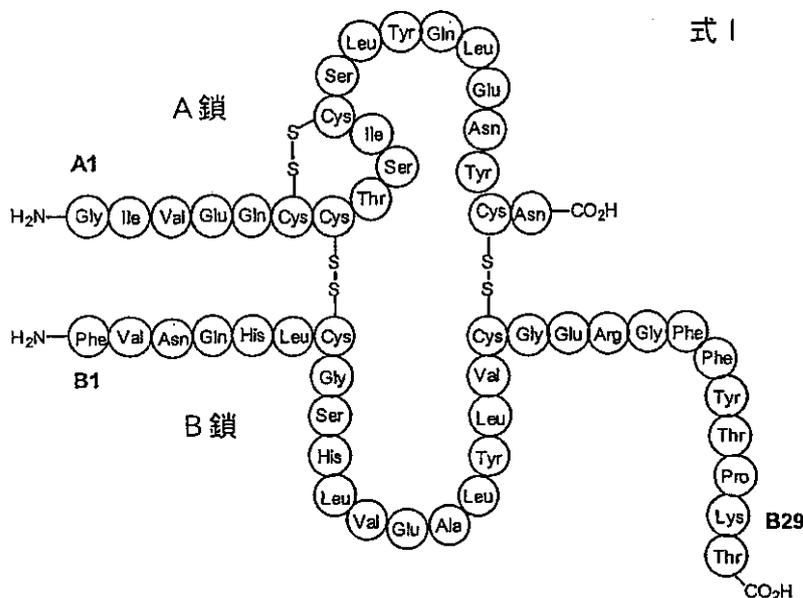
【請求項 1】

インスリン分子及び血液成分に共有結合するための反応基を含むインスリン誘導体。

【請求項 2】

前記インスリン分子が以下の式 I :

【化 1】



10

20

の分子であり、そして前記反応基が、Gly A1、Phe B1、及びLys B29の位置から選ばれる位置で、インスリン分子のアミノ酸に結合する、請求項 1 に記載のインスリン誘導体。

30

【請求項 3】

前記反応基が、マイケル・アクセプター、スクシンイミジル含有基、及びマレイミド含有基からなる群から選ばれる、請求項 1 又は 2 に記載のインスリン誘導体。

【請求項 4】

前記マイケル・アクセプターが、 $\text{CH}_2=\text{CH}-$ 、 $\text{CH}=\text{CH}-$ 、不飽和カルボニル部分である、請求項 3 に記載のインスリン誘導体。

【請求項 5】

前記反応基が、マレイミド含有基である、請求項 1 又は 2 に記載のインスリン誘導体。

【請求項 6】

前記反応基が、3-マレイミドプロピオン酸(MPA)である、請求項 1 又は 2 に記載のインスリン誘導体。

40

【請求項 7】

前記反応基が、リンカーを介して、前記インスリン分子のアミノ酸に結合される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のインスリン誘導体。

【請求項 8】

前記リンカーが、(2-アミノ)エトキシ酢酸(AEA)、エチレンジアミン(EDA)、アミノ・エトキシ・エトキシ・スクシニミン酸(AEES)、AEES-AEES、2-[2-(2-アミノ)]エトキシ酢酸(AEEA)、AEEA-AEEA、 $-\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 、[式中、n が、1 ~ 20 の整数である]、及びアルキル鎖(C1-C10)モチーフ、並びにそれらの組合せからなる群から選ばれる、請求項 7 に記載のインスリン誘導体。

【請求項 9】

50

前記アルキル鎖 (C1-C10)モチーフが、酸素、窒素、又は硫黄原子が取り込まれる飽和又は不飽和の1以上のアルキル鎖 (C1-C10)である、請求項8に記載のインスリン誘導体。

【請求項10】

前記アルキル鎖が、グリシン、3-アミノプロピオン酸 (APA)、8-アミノオクタン酸 (AOA)、及び4-アミノ安息香酸 (APhA)からなる群から選ばれる、請求項9に記載のインスリン誘導体。

【請求項11】

前記組合せが、AEEA-EDA、AEEA-AEEA、及びAEA-AEEAからなる群から選ばれる、請求項8に記載のインスリン誘導体。

10

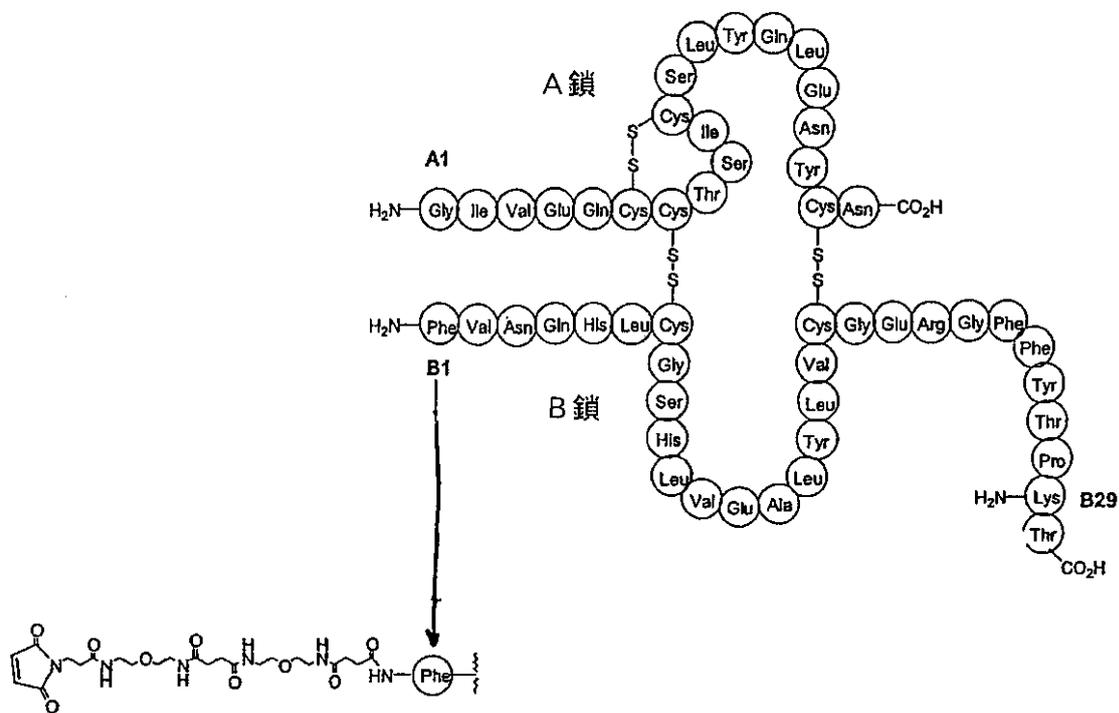
【請求項12】

前記リンカーが、-NH₂-(CH₂)₇-COOHである、請求項6に記載のインスリン誘導体。

【請求項13】

以下の式：

【化2】



20

30

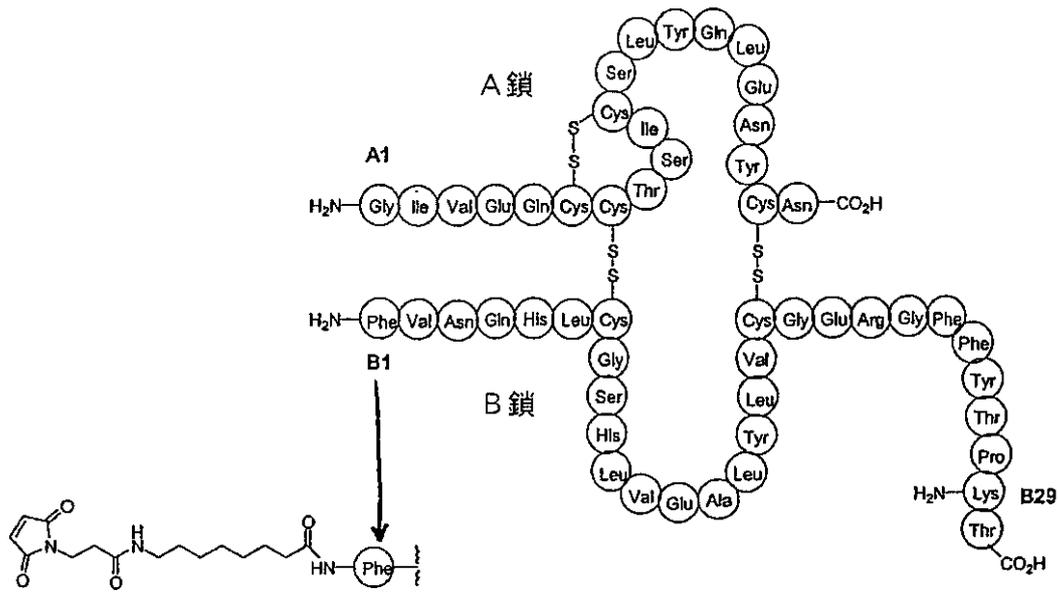
を有する、請求項1に記載のインスリン誘導体。

【請求項14】

以下の式：

40

【化3】



10

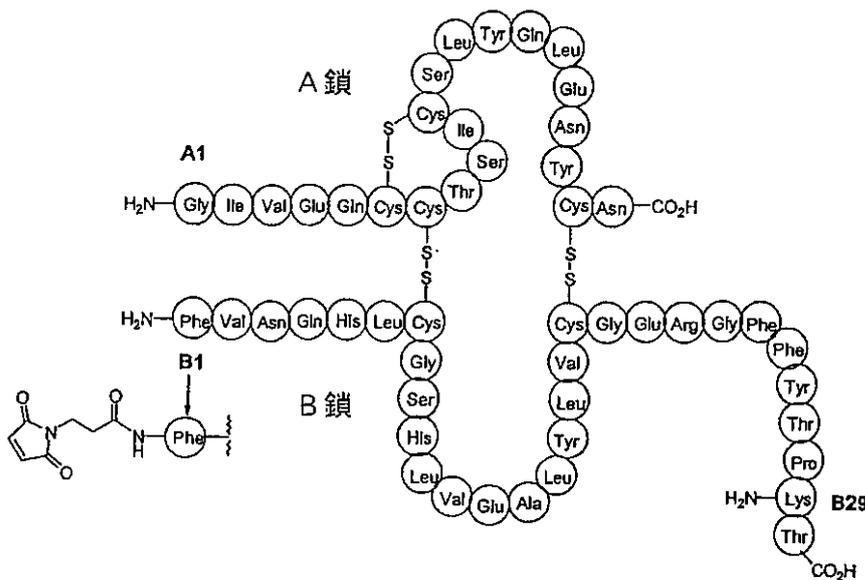
20

を有する請求項1に記載のインスリン誘導体。

【請求項15】

以下の式：

【化4】



30

40

を有する、請求項1に記載のインスリン誘導体。

【請求項16】

前記血液成分が、血液タンパク質である、請求項1に記載のインスリン誘導体。

【請求項17】

前記血液タンパク質が、血清アルブミンである、請求項16に記載のインスリン誘導体

50

。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載されるインスリン誘導体及び血液成分を含むインスリン複合体であって、当該反応基及び当該血液成分が、当該反応基と当該血液成分との間で形成される共有結合を介して結合される、前記複合体。

【請求項 19】

前記血液成分が、血液タンパク質である、請求項 18 に記載のインスリン複合体。

【請求項 20】

前記血液タンパク質が、血清アルブミンである、請求項 19 に記載のインスリン複合体

。

【請求項 21】

前記複合体が、*ex vivo* で形成される、請求項 18 に記載のインスリン複合体。

【請求項 22】

医薬として許容される担体と共に、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のインスリン誘導体を含む医薬組成物。

【請求項 23】

医薬として許容される担体と共に、請求項 18 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のインスリン複合体を含む医薬組成物。

【請求項 24】

血糖関連疾患又は障害を患う対象において血糖関連疾患又は障害を治療する方法であって、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のインスリン誘導体を、当該対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 25】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病、II 型糖尿病、妊娠性糖尿病、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、及び膵炎からなる群から選ばれる、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病及び II 型糖尿病からなる群から選ばれる、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

請求項 18 ~ 21 のいずれか 1 項のインスリン複合体の投与を含む、血糖関連疾患又は障害の治療方法。

【請求項 28】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病、II 型糖尿病、妊娠性糖尿病、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、及び膵炎からなる群から選ばれる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病及び II 型糖尿病からなる群から選ばれる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 22 及び 23 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の投与を含む、血糖関連疾患又は障害の治療方法。

【請求項 31】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病、II 型糖尿病、妊娠性糖尿病、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、及び膵炎からなる群から選ばれる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病及び II 型糖尿病からなる群から選ばれる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

血糖関連疾患又は障害の治療用医薬の製造のための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の誘導体の使用。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

前記血糖関連疾患が、I型糖尿病、II型糖尿病、妊娠性糖尿病、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、及び膵炎からなる群から選ばれる、請求項33に記載の使用。

【請求項35】

前記血糖関連疾患が、I型糖尿病及びII型糖尿病からなる群から選ばれる、請求項33に記載の使用。

【請求項36】

血糖関連疾患又は障害の治療用医薬の製造のための、請求項18～19のいずれか1項に記載の複合体の使用。

【請求項37】

前記血糖関連疾患が、I型糖尿病、II型糖尿病、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、及び膵炎からなる群から選ばれる、請求項36に記載の使用。 10

【請求項38】

前記血糖関連疾患が、I型糖尿病及びII型糖尿病からなる群から選ばれる、請求項37に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の背景

(a) 本発明の分野

[0001] 本発明は、持続性インスリン誘導体に関する。より特異的に、当該インスリン誘導体は、インスリン分子及びそれに結合される反応基を含み、当該反応基は、血液成分と共有結合するためのものであり、それゆえ持続性インスリン誘導体を作成する。 20

【背景技術】

【0002】

(b) 従来技術の記載

[0002] インスリンは、細胞表面受容体に結合して、血液からのグルコース吸収を高める出来事のカスケードを開始させる。正常に機能しないインスリンのレベルは、I型糖尿病及びII型糖尿病などの重篤な障害を導く。I型糖尿病は、生命を脅かす疾患であり、患者は、生存するために複数回のインスリンの自己投与を毎日行わなければならない。II型糖尿病はまた重篤な内科疾患であり、II型糖尿病では、インスリンの内部レベルに対して患者により発達された抵抗性のため、インスリンの内部レベルは、血糖の正しいレベルをもちや維持できなくなる。長期間の使用の開始を低減するために、インスリンでの治療は、ライフスタイルの変化の失敗又は従来血糖制御薬剤が無効になったときに必要となる。 30

【0003】

[0003] 血糖疾患のコントロールの成功は、治療に対する患者の服薬遵守と密接に関わっており、そして必要とされる注射の頻度を減らすことが望まれている。そうするため、新たな持続性インスリン誘導体を提供すること高く望まれている。

【発明の開示】

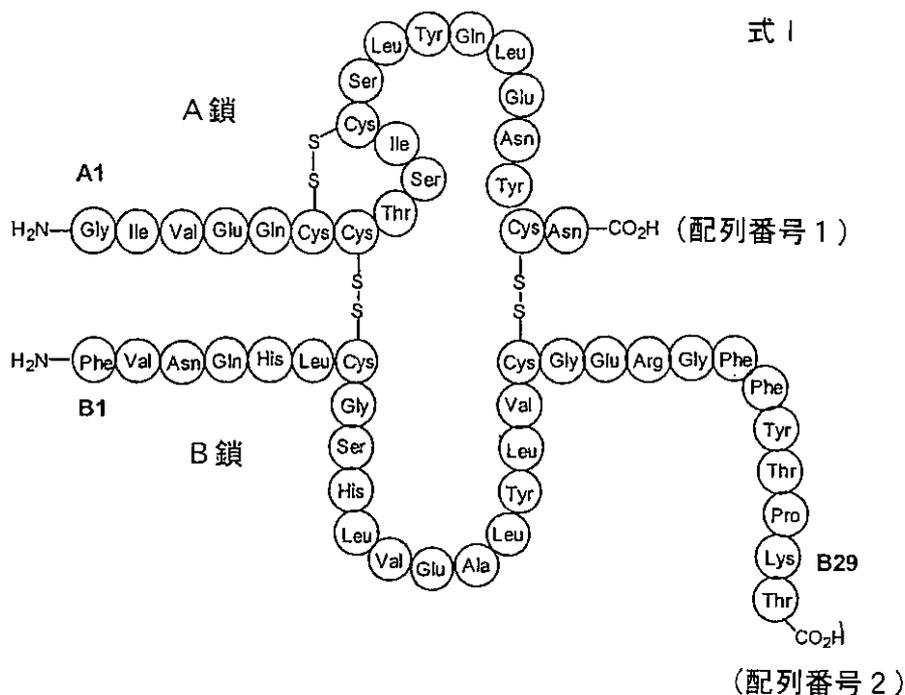
【0004】

[0004] 本発明に従って、インスリン分子と血液成分に共有結合するための反応基を含むインスリン誘導体が提供される。 40

【0005】

[0005] 本発明の好ましい実施態様では、当該インスリン分子は以下の式I：

【化 1】



10

20

30

40

50

で表される分子であり、そして反応基は、Gly A1、Phe B1、及びLys B29の位置から選ばれる位置でインスリンのアミノ酸に結合される。

【0006】

[0007] 本発明の好ましい実施態様では、選択された反応基は、マイケル・アクセプター(, 不飽和カルボニル部分)、スクシンイミジル含有基、及びマレイミド含有基、より好ましくはMPA(3-マレイミドプロピオン酸)からなる群由来である。

【0007】

[0008] 本発明の好ましい実施態様では、反応基は、インスリン分子のアミノ酸に、リンカー、例えば非限定的に、(2アミノ)エトキシ酢酸(AEA)、エチレンジアミン(EDA)、アミノ・エトキシ・エトキシ・スクシニミン酸(amino ethoxy ethoxy succinimic acid)(AEES)、AEES-AEES、2-[2-(2-アミノ)エトキシ]エトキシ酢酸(AEEA)、AEEA-AEEA、-NH₂-(CH₂)_n-COOH、[式中、nは1~20の整数である]、及び酸素、窒素、又は硫黄原子が取り込まれうる飽和又は不飽和アルキル鎖(C1-C10)モチーフ、例えば非限定的にグリシン、3-アミノプロピオン酸(APA)、8-アミノオクタン酸(OA)、及び4-アミノ安息香酸(PhA)、並びにそれらの組合せを介してインスリン分子のアミノ酸に結合される。

【0008】

[0009] 本発明の好ましい実施態様では、血液成分は血液タンパク質であり、より好ましくは血清アルブミンである。

【0009】

[0010] 本発明に従って、本発明のインスリン誘導體と血液成分を含むインスリン複合体が提供され、ここで当該反応基及び当該血液成分は、当該反応基と当該血液成分との間で形成された共有結合を介して複合体化される。当該複合体は、インビボ又はイクスビボで形成される。

【0010】

[0011] 本発明に従って、本発明のインスリン誘導體を、医薬として許容される担体と共に含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 1 1 】

[0012] 本発明に従って、本発明のインスリン複合体を、医薬として許容される担体と供に含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 1 2 】

[0013] 本発明に従って、血糖関連疾患又は障害を患う対象において、血糖関連疾患又は障害を治療する方法であって、本発明のインスリン誘導体、本発明の複合体、及び本発明の医薬組成物の少なくとも1を、当該対象に投与することを含む、前記方法が提供される。

【 0 0 1 3 】

[0014] 本明細書中の全ての参考文献は、援用される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 4 】

[0036] 本発明に従って、持続性インスリン誘導体が提供される。より特異的に、当該インスリン誘導体は、インスリン分子及びそれに結合する反応基を含み、当該反応基は、血液成分に共有結合するためのものである。本出願では、インスリン反応基 - 血液成分の複合体の形成をもたらす共有結合は、本発明のインスリン誘導体を投与した際に、インピボで形成されうるということが意図される。当該共有結合が、本発明のインスリン誘導体を、組み換えアルブミンであるアルブミンソース又は対象の血漿から抽出されたアルブミンソースと接触することにより、又は他の適切なソースのいずれかから提供することによりイクスピボで生じうるということも意図される。ここで当該ソースは、当業者により知られている。

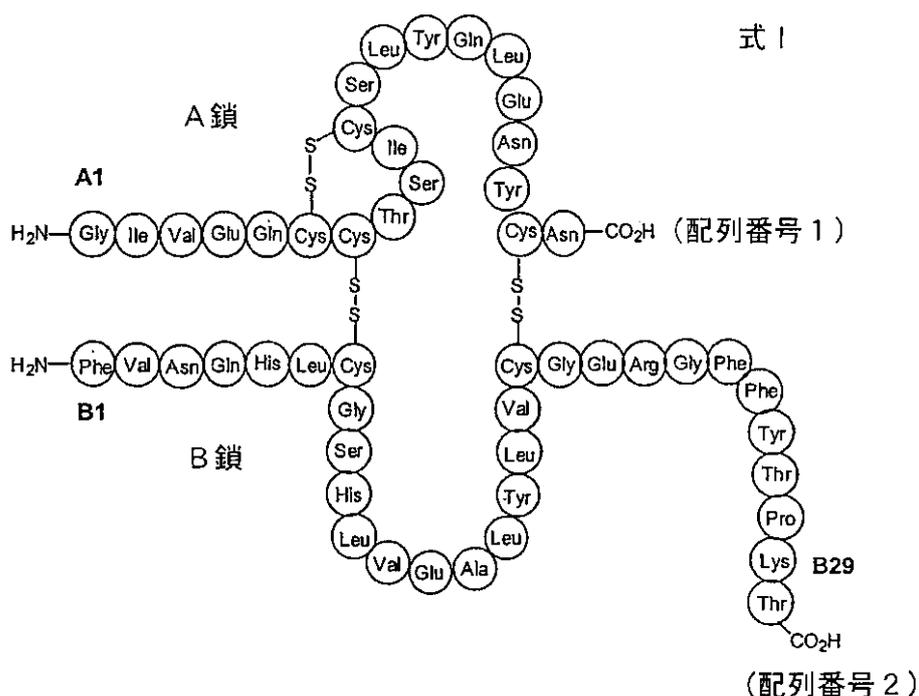
20

【 0 0 1 5 】

[0037] インスリン分子は、未変性のヒトインスリン（例えば、下記式 I における未変性ヒトインスリンの配列を参照のこと）であるか、又はそのアナログ、例えばアミノ酸置換（1又は複数）、アミノ酸欠失（1又は複数）、又はアミノ酸添加（1又は複数）を有するインスリン分子などでありうる。以下は、本発明に従って使用されうるインスリン・アナログの例として記載されており、本アナログを制限する意図はない：Aventis Pharmaceuticals Inc. のランタス（商標）と呼ばれるインスリン・グラルギン（当該薬剤は A 2 1 の位置で置換されたグリセリンを有し、そして B 鎖の C - 末端において加えられた 2 のアルギニン残基を有する）、Novo Nordisk A/S のレベミール（商標）と呼ばれるインスリン・デテミール（当該薬剤は、B 3 0 の位置でスレオニンが欠失され、そしてリジン B 2 9 の側鎖上加えた未変性ヒト・ヒトインスリンである）；Eli Lilly のヒューマログ（商標）と呼ばれるインスリン・リスプロ（当該薬剤は、L y s B 2 8、P r o B 2 9 ヒトインスリンである）；Novo Nordisk A/S、ノボログ（商標）と呼ばれるインスリン・アスパート（当該薬剤は A s p B 2 8 ヒト・インスリンである）；並びにAventisのアピドラ（A p i d r a）（商標）と呼ばれるインスリン・グルリシン（Glulisine）（当該薬剤は、L y s B 3、G l u B 2 9 ヒト・インスリンである）である。

30

【化 2】



10

20

【0016】

[0038] 反応基は、インスリン分子又はそのアナログ上の異なる官能基に結合されうる。好ましくは、当該反応基は、インスリン分子の利用できるアミノ基、例えばA鎖及びB鎖のN-末端アミノ酸のアミノ基、又はLys B29のアミノ基に結合される。本発明に従って、置換された及び/又は加えられたアミノ酸(1又は複数)を含むインスリン・アナログは、反応基を結合するためのさらなるアミノ基を含んでもよい；或いは反応基が結合するために適した他の官能基を含みうる。インピボ又はイクスピボで、血液成分を共有結合することができる好ましい反応基は、マイケル・アクセプター(、不飽和カルボニル部分)スクシンイミジル含有基及びマレイミド含有基である。より好ましい反応基は、マレイミド含有基であり、そしてより得意的にMPA(3-マレイミド・プロピオン酸)である。

30

【0017】

[0039] 場合により、反応基は、リンカーを介してインスリン分子に結合される。当該リンカーは、好ましくは、ヒドロキシエチル・モチーフ、例えば(2-アミノ)エトキシ酢酸(AEA)、エチレンジアミン(EDA)、アミノ・エトキシ・エトキシ・スクシニミン酸(AEES)、2-[2-(2-アミノ)エトキシ]エトキシ・酢酸(AEEA)、AEA-AEEA、-NH₂-(CH₂)_n-COOH[式中、nは1~20の整数である]、飽和又は不飽和の1以上のアルキル鎖(C1-C10)であって、酸素、窒素、又は硫黄原子を含みうるアルキル鎖モチーフ、例えばグリシン、3-アミノプロピオン酸(APA)、8-アミノオクタン酸(OA)、4-アミノ安息香酸(AphA)からなる群から選ばれる。リンカーの組合せの例は、非限定的にAEEA-EDA、AEEA-AEEA、AEA-AEEA、AEES-AEESなどを含む。好ましいリンカーは、8-アミノオクタン酸(OOA)であるが、又は反応基(MPA)でリンカーを使用しないものである。当業者は、どのタイプのリンカーが、本発明の目的のために適しているかを容易に知るであろう。

40

【0018】

[0040] 本発明はまた、インスリン複合体に関する。当該複合体は、その反応基が、共

50

有結合を形成するために、インビボ又はイクスビボで血液成分と反応されたインスリン誘導体を含む。それゆえ、当該複合体は、インビボにおいて、インスリン誘導体の投与により形成されるか、又はイクスビボにおいて、インスリン誘導体を血液溶液又は精製血液成分と、共有結合の形成を許容するイクスビボの条件下で接触することにより形成されうる。精製血液成分は、血液成分からの抽出及び精製により提供されうるか、又は組み替え技術により産生されうる。好ましい血液成分は、血液タンパク質であり、より好ましくは血清アルブミンである。

【0019】

[0041] 本発明はさらに、血糖関連疾患又は障害の治療方法であって、インスリン誘導体又はインスリン複合体の投与を含む方法に関する。血糖関連疾患又は障害は、I型糖尿病及びII型糖尿病、並びに妊娠性糖尿病を含む。また、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、膵炎及び他の膵臓関連疾患もまた、本発明のインスリン誘導体又はインスリン複合体を投与することにより治療されうる。インスリンはまた、成長因子として知られており、そしてそれゆえ、本発明のインスリン誘導体又はインスリン複合体は、傷の治癒及び他の関連する適応のための局所投与に有用でありうる。

10

【0020】

[0042] 以下の実施例は、本発明の範囲を制限する目的ではなく、上記される発明をさらに例示する目的である。

【実施例】**【0021】**

[0043] 図1は、インスリン分子並びに以下の実施例にそって言及されるGly A1、Phe B1、及びLys B29部位を示す。

20

【0022】

実施例I

(Gly A1) - MPA - インスリンの合成

[0044] インスリン(100mg)を、DMF(ジメチルホルムアミド)(20ml)及びTFA(100 μ l)中に溶解した。当該溶液に、NMM(4-メチルモルホリン、200 μ l)及びMPA-OSu(N-スクシンイミジル・3マレイミドプロパノエート、9.2mg 2.5当量)を加え、そして当該反応液を2時間攪拌した。水を加えることにより反応を止め、そしてAcOH(酢酸)でpH4に調節した。アセトニトリルを加えて、沈殿を溶解し、そして水/アセトニトリル(3:1)の全体の体積は20mlであった。当該溶液を半調製HPLC中に注入した。Phenomenex Luna10mフェニル-ヘキシル21mm \times 250mmカラムを、水性TFA溶液(水中に0.1%TFA、溶媒A)及びアセトニトリルTFA溶液(アセトニトリル中に0.1%TFA、溶媒B)で平衡化した。27%から31%までのBの勾配を120分かけて流すことにより、9.5ml/分で溶出を達成した。ペプチドを含む分画を、214及び254nmでUV吸収により検出した。分画を9.5mlの一定分量で回収した。所望の産物プロファイルを含む分画を、直接LC/MSに注入後に質量検出により同定した。Rt=36~46分で純粋な分画を回収し、混合し、そして凍結乾燥して、23mgの回収されたインスリンと供に白色粉末(40mg)を与えた。

30

40

【0023】

[0045] 計算された質量は、5958.5g/molであり、そしてLC-MSにより計測された質量は、5958.0g/molである。

【0024】

[0046] 表1は、アミノ酸配列分析(フェニルイソチオシアネートを使用するエドマン分解)を示し、当該分析は、A鎖のN末端がブロックされ、そしてN-末端(フェニルアラニン)が、いまだに遊離していたということを確認するために行われた。

【0025】

【表 1】

表 1

化合物	鎖	エドマン分解の結果 (位置)			
		1	2	3	4
ヒト・ インスリン	A	Gly	Ile	Val	Glu
	B	Phe	Val	Asn	Gln
実施例 I	A	—	—	—	—
	B	Phe	Val	Asn	Gln
実施例 II	A	Gly	Ile	Val	Glu
	B	—	—	—	—
実施例 III	A	Gly	Ile	Val	Glu
	B	—	—	—	—
実施例 IV	A	Gly	Ile	Val	Glu
	B	Phe	Val	Asn	Gln

表 1 は実施例 I ~ IV のエドマン分解を介した構造の解明を表す。

【 0 0 2 6 】

実施例 I I

(P h e B 1) - M P A - インスリンの合成

【0047】 インスリン (1 0 0 m g) を D M S O (ジメチルスルホキシド) (4 m l) 及び E t ₃ N (トリエチルアミン) (1 0 0 μ l) 中に、超音波処理して溶解した。当該溶液に、B o c ₂ O (ジ - t e r t - ブチル ・ ジカルボネート) (9 . 3 m g , 2 . 5 当量) を加え、そして当該反応液を室温で 3 0 分間攪拌した。反応溶液を、A c O H で p H 4 に調節した。当該溶液を、半調製 H P L C 中に注入した。Phenomenex Luna 1 0 m フェニル - ヘキシル 2 1 m m × 2 5 0 m m カラムを、水性 T F A 溶液 (水中に 0 . 1 % T F A 、溶媒 A) 及びアセトニトリル T F A 溶液 (アセトニトリル中に 0 . 1 % T F A 、溶媒 B) で平衡化した。2 7 % から 4 0 % までの B の勾配を 1 2 0 分かけて流すことにより、9 . 5 m l / 分で溶出を達成した。ペプチドを含む分画を、2 1 4 及び 2 5 4 n m で U V 吸収により検出した。分画を 9 . 5 m l の一定分量に回収した。所望の産物プロファイルを含む分画を、直接 L C / M S に注入後に質量検出により同定した。3 の産物 (B o c - インスリン、G l y A 1 L y s B 2 9 - B i s B o c - インスリン、及び T r i s B o c - インスリン) を単離し、そして所望の (G l y A 1 L y s B 2 9) - B i s B o c - インスリンを混合し、そして凍結乾燥して白色粉末を与えた (7 2 m g) 。

【 0 0 2 7 】

【0048】 D M F (3 m l) 中の (G l y A 1 L y s B 2 9) - B i s B o c - インスリン (5 1 m g) を、M P A - O S u (3 6 m g) と、E t ₃ N (3 0 μ l) の存在下で反応させた。当該反応液を 2 時間室温で攪拌した。D M F を減圧下で蒸発させた。当該残基を、T F A (2 m l) で 1 0 分間処理し、そして次に T F A を蒸発させた。粗製生成物を水 / アセトニトリル (3 ; 1) 中で溶解し、そして当該溶液を、半調製 H P L C 中に注入した。Phenomenex Luna 1 0 m フェニル - ヘキシル 2 1 m m × 2 5 0 m m カラムを、水性 T F A 溶液 (水中に 0 . 1 % T F A 、溶媒 A) 及びアセトニトリル T F A 溶液 (C H ₃ C N 中に 0 . 1 % T F A 、溶媒 B) で平衡化した。2 7 % から 3 2 % までの B の勾配を 1 2 0 分かけて流すことにより、9 . 5 m l / 分で溶出を達成した。ペプチドを含む分画を、2 1 4 及び

254 nmでUV吸収により検出した。分画を9.5 mlの一定分量に回収した。所望の産物プロファイルを含む分画を、直接LC/MSに注入後に質量検出により同定した。純粋な分画を混合し、そして凍結乾燥して、白色粉末を与えた(29 mg)。

【0028】

[0049] 計算された質量は、5958.5 g/molであり、そしてLC-MSにより計測された質量は、5958.4 g/molであった。

【0029】

[0050] アミノ酸配列分析(フェニルイソチオシアネートを使用するエドマン分解)を使用して、B鎖のN末端がブロックされ、そしてA鎖のN末端(グリシン)がいまだに遊離していたことを確認した(表1参照のこと)。

10

【0030】

実施例III

(B1)-MPA-OA-インスリンの合成

[0051] (Gly A1 Lys B29)-BisBoc-インスリン(39 mg)を含むDMF(3 mL)及びEt₃N(30 μL)を、MPA-OA-OSu([N-スクシンイミジル8-N-(3-マレイミドプロパニルカルボニル)アミノオクタノエート]25 mg)と4時間反応させた。DMFを蒸発させ、そして残渣をTFAで10分間処置した。TFAを蒸発させた後、残渣を水/アセトニトリル(1:3)中に溶解した。当該溶液を半調製HPLCに注入した。Phenomenex Luna10mフェニル-ヘキシル21mm×250mmカラムを、水性TFA溶液(水中に0.1%TFA、溶媒A)及びアセトニトリルTFA溶液(アセトニトリル中に0.1%TFA、溶媒B)で平衡化した。27%から36%までのBの勾配を120分かけて流すことにより、9.5 ml/分で溶出を達成した。ペプチドを含む分画を、214及び254 nmでUV吸収により検出した。分画を9.5 mlの一定分量に回収した。所望の産物プロファイルを含む分画を、直接LC/MSに注入後に質量検出により同定した。純粋な分画を混合し、そして凍結乾燥して、白色粉末(21 mg)を与えた。

20

【0031】

[0052] 計算されたMassは6099.5 g/molであり、そしてLC-MSにより計測された質量は、6099.6 g/molである。

【0032】

実施例IV

(Lys B29)-MPA-インスリンの合成

[0053] インスリン74 mgをDMSO(2 mL)及びAcOH(46 μL)中に溶解した。当該溶液にBoc₂O6.9 mg、2.5当量)を加え、そして反応液を5時間室温で攪拌した。水(15 mL)及びアセトニトリル(5 mL)を加え、そして反応液を半調製HPLCカラム(C18フェニル-ヘキシル)に、流速9.5 ml/分、そして勾配を27%~40%で120分間で注入した。43分での分画を混合し、そして凍結乾燥して(Gly A1 Phe B1)-Boc₂-インスリン(30 mg)を与えた。

30

【0033】

[0054] (Gly A1 Phe B1)-Boc₂-インスリン(30 mg)を含むDMF(2 mL)及びNMM(4-メチルモルフォリン、100 μL)をMPA-OSu(10 mg)と60分間反応させた。DMFを蒸発させ、そして残渣をTFAで10分間処理した。該残渣を水/アセトニトリル(3:1)中で溶解し、そして溶液を半調製HPLCに注入した。Phenomenex Luna10mフェニル-ヘキシル21mm×250mmカラムを、水性TFA溶液(水中に0.1%TFA、溶媒A)及びアセトニトリルTFA溶液(アセトニトリル中に0.1%TFA、溶媒B)で平衡化した。27%から32%までのBの勾配を120分かけて流すことにより、9.5 ml/分で溶出を達成した。ペプチドを含む分画を、214及び254 nmでUV吸収により検出した。分画を9.5 mlの一定分量に回収した。所望の産物プロファイルを含む分画を、直接LC/MSに注入後に質量検出により同定した。純粋な分各を混合し、そして凍結乾燥して、白色粉末を与えた(22.2 m

40

50

g)。

【0034】

[0055] 計算された質量は、5958.5 g/molであり、そしてLC-MSにより計測された質量は、5958.0 g/molである。

【0035】

[0056] アミノ酸配列分析(フェニルイソチオシアネートを使用するエドマン分解)を使用して、B鎖N末端(フェニルアラニン)及びA鎖N末端(グリシン)の両方が、遊離であることを確認した(表1を参照のこと)。

【0036】

実施例V

MPA(AEES)₂-COOHリンカーの合成

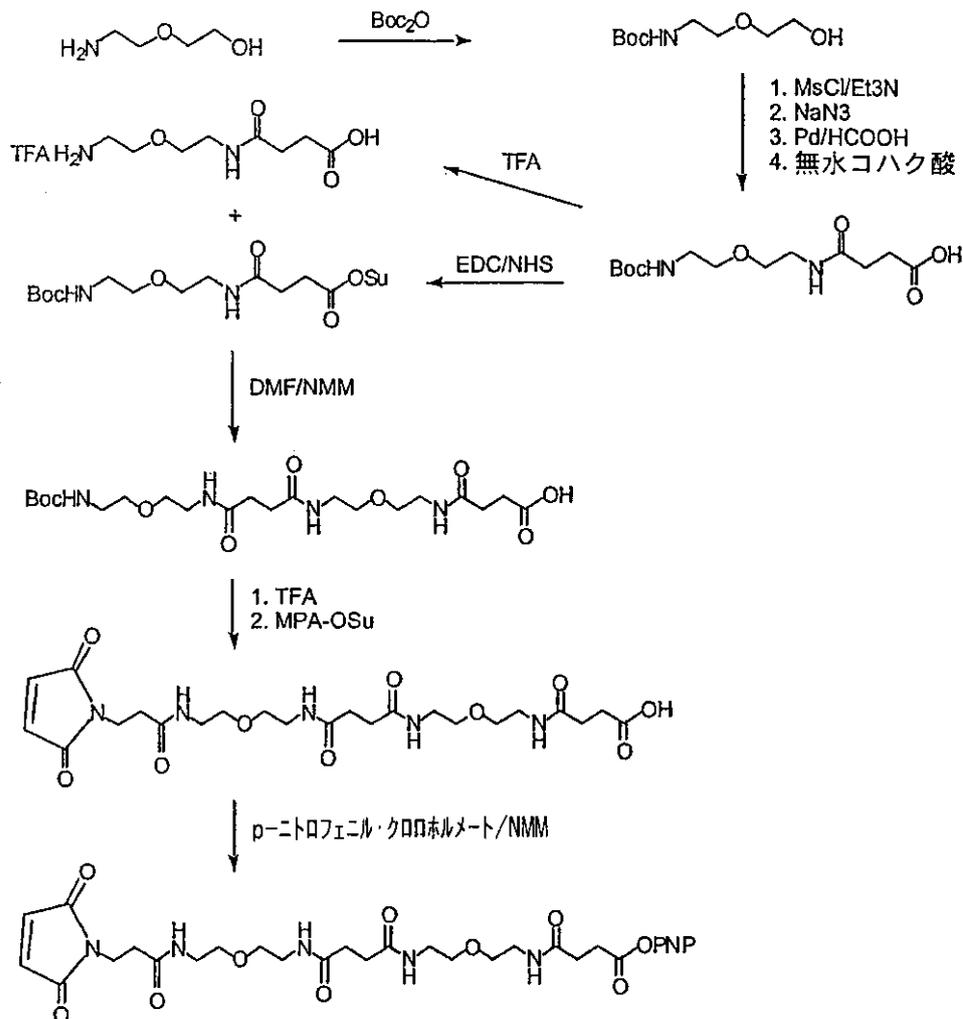
[0057] フラッシュカラム・クロマトグラフィーをBiotage(商標)"40iフラッシュ・クロマトグラフィー"モジュラー・システムを使用して行った。半調製HPLC精製を、Phenomex luna(RP-18、10μフェニル-ヘキシル250×21.2mm)カラムを使用してWaters"Breaze"システム1500シリーズにおいて、9.5ml/分の移動層流速で行った。Phenomex luna(RP-18、10μフェニル-ヘキシル250×50.0mm)カラムを、50ml/分移動層流速で使用して、Glison690システムを調製スケールの精製に使用した。水(0.1%TFA)中のアセトニトリル(CH₃CN)(0.1%TFA)の勾配を、各化合物の合成方法において指示された詳細に基づいて使用した。LC-MSを、ES1エレクトロスプレー・ソースを備えるAgilent1100シリーズLC-MSDシングル4極子質量分析計を使用して行った。

【0037】

10

20

【化3】

MPA-(AEES)₂-COOH リンカー合成

10

20

30

【0038】

実施例VI

(Phe B1)-MPA-(AEES)₂-インスリン

【0039】

[0058] メタノール (150 ml) 中の 2-(2-アミノエトキシ)エタノール (50.0 g) を、 Boc_2O (93.4 g) と 30 分間反応させた。メタノールを吸引下で蒸発させ、そして残渣を酢酸エチル中に溶解し、水、塩類溶液で洗浄し、そして硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を蒸発後、粗製生成物を、次のステップに使用した。MS m/z 205

40

【0040】

[0059] 保護アルコールを、 Et_3N (66 ml) の存在下で、 N,N -ジメチルホルムアミド (500 ml) 中に溶解した。MsCl (メシレート・クロリド) を 0 で 30 分かけて滴下して加え、そして室温で 1 時間攪拌した。 NaN_3 (127.6 g) を次に反応混合液に加え、次に NMM (N -メチルモルフォリン、215 ml) を加え、そして反応液を 40 ~ 50 で 16 時間攪拌した。反応混合液を酢酸エチル (2 l) に注ぎ、そして水で洗浄した。水層を酢酸エチル (2 l) で戻し抽出し、そして混合酢酸エチル層を水、塩類溶

50

液で洗浄し、そして乾燥した。当該溶媒の蒸発後、粗製生成物を次のステップに使用した (101.4 g、いくらかのDMFを含む)。MS m/z 231。

【0041】

[0060] 当該粗製生成物 (62.4 g) をメタノール (300 ml) 中に溶解し、次に Pd(OAc)₂ (3.0 g) 及びギ酸 (96%、62 g) を加えた。反応終了後、Pd種を、セライトを通したる過により取り除いた。メタノールを吸引下で取り除き、そしてさらに減圧下で乾燥させた。粗製生成物を次のステップに使用した。

【0042】

[0061] 粗製生成物をジクロロメタン中に溶解し、そしてEt₃Nで塩基性になるまで中和した。無水コハク酸 (32.3 g) を一回で加えた。当該反応液を室温で1時間攪拌した。溶媒を吸引下で取り除き、そして残渣を、HCl (1 N) により、pH 3に酸性化した。当該生成物を酢酸エチルで抽出した。当該酢酸エチル層を、シリカゲル・プラグ (1 kg) を通した。次に該シリカゲルを、2~4%メタノールを含む酢酸エチルで洗浄した。純粋な分画 (薄層クロマトグラフィーにより判断される) を混合し、そして溶媒を吸引下で取り除いて、Boc-AEESを油状残渣として与えた (36 g、44%)。MS m/z 305。

10

【0043】

[0062] Boc-AEES (5.5 g) を、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS 4.57 g) 及びエチル-(ジメチルアミノプロピル)カルボジミド・ヒドロクロリド (EDC, 7.62 g) を含むジクロロメタン (30 ml) で2時間処理した。NHSエステルを酢酸エチル (500 ml) 中に注ぎ、0.1 N・HClで洗浄し、そして硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を吸引下で取り除き、そして当該残渣をそのまま次のステップで使用した。

20

【0044】

[0063] Boc-AEES (6.05 g) をトリフルオロ酢酸 (TFA、10 ml) で10分間処理した。TFAを吸引下で取り除き、そしてさらに減圧下で乾燥した。(AEES)アミノ酸をN,N-ジメチルホルムアミド (20 ml) 中に溶解し、そして過剰量のNMMで塩基性化した。次に実施例Vの粗製生成物を加え、そして反応液を室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、そして残渣を、5~40%の勾配を60分かけて使用する調製HPLCに注入した。当該溶媒を取り除き、そして残渣を減圧下で乾燥して、Boc-(AEES)₂-COOHを油として与えた (5.64 g、84%)。MS m/z 478。

30

【0045】

[0064] Boc-(AEES)₂-COOH (3.60 g) をトリフルオロ酢酸 (TFA、10 ml) で10分間処理した。TFAを吸引下で取り除き、そしてさらに減圧下で乾燥させた。(AEES)₂アミノ酸を、N,N-ジメチルホルムアミド中に溶解し、そしてNMMで塩基性にした。MPA-OSu (2.94) を加え、そして混合液を、30分間攪拌した。N,N-ジメチルホルムアミドを減圧下で取り除いた。残渣を水中に溶解し、そして4~50%の勾配を60分かけて使用する調製HPLC中に注入した。純粋な分画を混合し、そして溶媒を取り除いて、MPA-(AEES)₂-COOHを、灰白色固体 (3.8 g、95%) として与えた。MS m/z 542.2。

【0046】

[0065] MPA-(AEES)₂-COOH (3.04 g) を、NMM (1.13 ml) を含むN,N-ジメチルホルムアミド (20 ml) 中に溶解し、そしてp-ニトロフェニル・クロロホルメートで処理した (1.13 g)。反応混合液を室温で2時間攪拌した。N,N-ジメチルホルムアミドを減圧下で取り除いた。残渣を、Biota (商標) システムを使用するフラッシュ・カラム・クロマトグラフィーにより精製した。カラムを酢酸エチル (500 ml) で洗浄し、続いて10%メタノールを含む酢酸エチル (1 l) で洗浄した。純粋な分画を、混合し、そして溶媒を取り除いて、MPA-(AEES)₂-CO₂PNPを固体として与えた (1.39 g、37%)。MS m/z 663。

40

【0047】

[0066] NMM (200 µL) の存在下で室温にて、Gly A1、Lys B29

50

- Bis Boc - インスリン (200 mg) を含む N, N - ジメチルホルムアミド (10 mL) を、実施例 V I I I からの MPA - (A E E S)₂ - CO₂ PNP (200 mg) と 16 時間結合させた。N, N - ジメチルホルムアミドを減圧下で取り除き、そして残渣を TFA で 10 分間処理した。TFA を吸引下で取り除き、該残渣を水中に溶解し、そして 120 分かけて 27 ~ 32 % 勾配を使用する HPLC 中に注入した。純粋な分画を混合し、そして溶媒を凍結乾燥して、(Phe B1) - MPA (A E E S)₂ - インスリンを、白色粉末として与えた (95.0 mg、43.7%)。MS m/z 6330.4.

【0048】

実施例 V I I

NMM (200 μL) の存在下で室温にて、Gly A1、Phe B1 - Bis Boc - インスリン (200 mg) を含む N, N - ジメチルホルムアミド (10 mL) を、実施例 V I からの MPA - (A E E S)₂ - CO₂ PNP (200 mg) と 16 時間結合させた。N, N - ジメチルホルムアミドを減圧下で取り除き、そして残渣を TFA で 10 分間処理した。TFA を吸引下で取り除いた後、該残渣を水中に溶解し、そして 120 分かけて 27 ~ 32 % 勾配を使用する HPLC 中に注入した。純粋な分画を混合し、そして溶媒を凍結乾燥して、(Lys B29) - MPA (A E E S)₂ - インスリンを、白色粉末として与えた (56.3.0 mg、25.9%)。MS m/z 6328.8.

10

【0049】

実施例 V I I I

(B29) - MPA (OA) - インスリンの合成

20

[0068] Gly A1 Phe B1 - Bis Boc - インスリン (205 mg) を含む N, N - ジメチルホルムアミド (10 mL) を、MPA - OA - CO₂ SU (139 mg) と、室温で 16 時間、NMM (20 μL) の存在下で結合した。溶媒を減圧下で取り除き、そして残渣を水中で溶解し、そして 120 分かけて 27 ~ 36 % 勾配を使用する HPLC 中に注入した。純粋な分画を混合し、そして溶媒を凍結乾燥して、(Lys B29 - MPA (OH) - インスリンを、白色粉末 (64.2 mg、31%) として与えた。MS m/z 6098.8.

【0050】

実施例 I X

インビトロ結合アッセイ

30

[0069] Wistar ラットの肝臓膜を、[125I] インスリン、及びさらなる濃度 インスリン、図 1 において記載される DAC : インスリン、並びにその対応する複合体と、4 で 16 時間インキュベーションした。膜をろ過し、そして 3 回洗浄し、そしてフィルターをカウントして、特異的に結合された [125I] インスリンを測定した。IC50 を、GraphPad Prism ソフトウェアを使用して計算した。

【0051】

[0070] IC50 の結果を、表 2 に記載した。

【表 2】

表 2

	IC50 (nM)
インスリン	12.0
実施例 I	57.1
実施例 II	18.8
実施例 III	17.2
実施例 IV	46.0
実施例 VI	24.9
実施例 VII	58.1
実施例 VIII	64.1
実施例 I の複合体	2059.0
実施例 II の複合体	100.5
実施例 III の複合体	87.7
実施例 IV の複合体	1190.0
実施例 VI の複合体	38.5
実施例 VII の複合体	508.2
実施例 VIII の複合体	1013.4

10

20

【0052】

図 2 及び図 3 は、本発明のインスリン誘導体の濃度関数における阻害割合 (%) の点で、ラット肝臓膜に結合するインスリンを記載する。

【0053】

実施例 X

インビトロ 生物活性

30

[0072] インビトロ活性を評価するために、脂肪細胞におけるグルコースの取り込みを使用した。生物アッセイにおいて使用するために、3T3-L1細胞、マウス線維芽細胞系列を脂肪細胞に分化させた。3T3-L1細胞をDMEM及び10%FBS中に撒き、そしてコンフルエントになるまで成長させ、続いて2日間インキュベーションした。デキサメタゾン及びインスリンを加えることにより分化を誘導した(D0)。7日目に、90%より多い細胞が、脂肪細胞の表現型、つまり脂肪滴の増加を示した。図4A-4Cは、3日後の前脂肪細胞を示し、そして7日目の脂肪細胞を示す。図5A及び5Bは、4日目での脂肪細胞及び7日目の脂肪細胞のオイルレッドO染色を示す。図6A及び6Bは、4日目及び7日目でのオイルレッドO染色及びメチレン・ブルー染色を示す。

40

【0054】

[0073] 3T3-L1脂肪細胞を、5mMグルコース及び0.5%FBSを含むDMEM中で一晚飢餓状態にした。細胞を、1%BSAを含むクレープ-リンゲル-Hepes緩衝液中で洗浄し、そして増加濃度のインスリン、DAC:インスリン誘導体、及びその対応する複合体で、20分間、37°Cでインキュベーションし、そして $[^{14}\text{C}]-2\text{-デオキシ-D-グルコース}$ (1 μCi /ウェル)でさらに20分間インキュベーションした。細胞を可溶化し、そして放射活性を計測した。グルコース取り込みを、インスリン・コントロールに対して計算し、そしてEC50を、GraphPad Prism (商標)ソフトウェアを使用して計算した。

【0055】

[0074] 表3は、試験された化合物に対するEC50の結果を示し、そして図7は、当

50

該化合物の濃度 (M) の関数におけるコントロールのグルコース取り込みの割合 (%) を示す。

【 0 0 5 6 】

【 表 3 】

表 3

化合物	EC50 (nM)
ヒト・インスリン	1.2
実施例III	34
実施例IIIの複合体	48
実施例IV	45
実施例IVの複合体	110

10

【 0 0 5 7 】

実施例 X I

[0075] さらに、インビトロ活性を評価するために、脂肪細胞の他のソースにおいてグルコース取り込みを使用した。体重 175 ± 25 g の W i s t e r 由来雄ラットから得た副睾丸脂肪を使用する。組織 (0.03 g / m l) を、コラゲナーゼを含む改変 H E P E S 溶液 p H 7.4 により、37 で分解した。試験化合物及び/又は溶媒を、 500μ L の一定量の改変 H E P E S 緩衝液 p H 7.4 でインキュベーションし、そして D - [3 - 3 - H] グルコース (2.5μ C i / m l) を次に加えて、2時間インキュベーションした。試験化合物誘導性のグルコース取り込みであって、コントロール 2 n M インスリンの応答に対して 50 % 以上多いグルコースの取り込みの増加は、有力なインスリン受容体アゴニスト活性を指し示す。 50 % を超えて、インスリン誘導性グルコースの取り込み応答を阻害する試験化合物は、インスリン受容体アンタゴニスト活性を指し示す。化合物は、 10 、 1 、 0.1 、 0.01 、及び 0.001μ M でスクリーニングされる。

20

【 0 0 5 8 】

[0076] 表 4 は、試験される化合物についての E C 5 0 の結果を示し、そして図 8 は、化合物の濃度 (M) 関数におけるコントロールのグルコース取り込み割合 (%) を示す。

30

【 0 0 5 9 】

【 表 4 】

表 4

化合物	EC50 (nM)
ヒト・インスリン	1.4
実施例III	17.5
実施例IIIの複合体	17.8
実施例VI	15.4
実施例VIの複合体	13.3

40

【 0 0 6 0 】

実施例 X I I

インビボ実験

[0077] 組換えヒトインスリンと本発明のインスリン誘導體との間の血中グルコース低

50

下効力の評価は、糖尿病の雌 db/db マウスに皮下投与される際に、比較される。

【0061】

[0078] 試験化合物を、一回の皮下ポータル注射により、5～6週齢のメス db/db マウス、体重 24.3～33.3 g に投与した。注射された投与溶液の平均体積は、0.35 ml/マウス (12.5 ml/kg) であった。

【0062】

[0079] 組換え (イー・コリ (E. coli)) ヒト・インスリン (以下で rH インスリンと呼ぶ) は、ICNTM により、28 IU/mg の濃度で提供される。

【0063】

インスリン誘導体のストック溶液を、合成インスリン誘導体を酸性水 (~ pH 2) で再構成することにより、14.29 mg/ml (~ 400 IU/ml) で調製した。ストック溶液を次に 0.9% NaCl で希釈し、そして 0.22 μm フィルター (Millex GV) を通して、表 5 に表される投与溶液を得た。群 I は、コントロール溶液として、0.9% NaCl・USP を受けた。

10

【0064】

【表 5】

表 5

群	試験化合物	実際の溶液濃度 (mg/mL)
2	rHインスリン	0.29
3	実施例 I	0.29
4	実施例 I	1.43
5	実施例 II	0.29
6	実施例 II	1.43
7	実施例 III	0.29
8	実施例 III	1.43

20

30

【0065】

[0081] 群と処理は、表 6 において要約される。

【表 6】

表 6

群	試験/ コントロール 物品	投与量 レベル (mg/kg)	投与量 当量 * (~IU/kg)	動物数 (雌)
1	0.9% NaCl	0	0	5
2	rHインスリン	3.6	100	5
3	実施例 I	3.6	100	5
4	実施例 I	17.9	500	5
5	実施例 II	3.6	100	5
6	実施例 II	17.9	500	5
7	実施例 III	3.6	100	5
8	実施例 III	17.9	500	5

* 販売元により28IU/mgで見積られたrHインシュリンの効力に基づく

10

20

【0066】

【0082】 血液採取（一滴）を、尻尾の先で行い、そしてグルコースレベルを、手持ちグルコメーター（モデル：ワンタッチUltraTM、Lifescan Canada）を使用して測定した。血液グルコースレベルを、投与前に一度全ての動物で測定し、そして投与後1、2、3、4、6、24、30、48、及び72時間で測定した。

【0067】

インビボ結果：

【0083】 全ての動物は、試験化合物の投与前に通常であるようにみえた。投与後およそ1時間で、100IU/kgの組換えヒト・インスリン（rHインスリン）で皮下投与された群2の動物は、活動が少し低下し、そして非強制的な歩行を示した。他の処置を受けた動物は、実験を通して通常であるように見えた。食餌消費のわずかな減少が、実施例IIの17.9mg/kgの化合物で処置された動物において観測された。

30

【0068】

【0084】 表7は、rHインスリン及びインスリン誘導体の一回投与の後の食餌消費（全重量/ケージ（g））を示す。

【表 7】

表 7
食餌消費：全体重/ゲージ(g)

群	処置	投与24h前	0-6h	0-24h	24-48h	48-72h
1	0.9% NaCl	30.4	6.2	30.7	28.9	31.6
2	rHインスリン 3.6mg/kg	30.2	6.6	29.2	30.7	31.7
3	実施例 I 3.6mg/kg	28.7	5.8	30.5	28.8	28.7
4	実施例 I 17.9mg/kg	29.8	5.1	28.3	31.3	31.5
5	実施例 II 3.6mg/kg	31.8	6.4	30.3	29.8	31.0
6	実施例 II 17.9mg/kg	30.5	6.4	31.2	26.5	29.7
7	実施例 III 3.6mg/kg	29.9	6.0	31.4	31.9	31.8
8	実施例 III 17.9mg/kg	28.7	4.5	27.0	22.8	24.5

10

20

【0069】

[0085] 表 8 は、rHインスリン及びインスリン誘導体の一回投与後のコントロールに対する食餌消費（全重量/ゲージ）を示す。

【表 8】

表 8
コントロール群に対する食餌消費割合 (%)

群	処置	投与24h前	0-6h	0-24h	24-48h	48-72h
1	0.9% NaCl	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	rHインスリン 3.6mg/kg	99.3	106.5	95.1	106.2	100.3
3	実施例 I 3.6mg/kg	94.4	93.5	99.3	99.7	90.8
4	実施例 I 17.9mg/kg	98.0	82.3	92.2	108.3	99.7
5	実施例 II 3.6mg/kg	104.6	103.2	98.7	103.1	98.1
6	実施例 II 17.9mg/kg	100.3	103.2	101.6	91.7	94.0
7	実施例 III 3.6mg/kg	98.4	96.8	102.3	110.4	100.6
8	実施例 III 17.9mg/kg	94.4	72.6	87.9	78.9	77.5

10

20

【0070】

血糖の差分は、図 9、10、11、12、13、及び 14 において報告された各々のマウスについて、投与後の血中グルコース・レベル対投与前のグルコース・レベルから計算される。一般的に、インスリン誘導体（実施例 I、実施例 II、及び実施例 III）は、用量依存的様式で血中グルコース濃度を低下でき、そして一回の投与量（100 IU/kg）のみで試験された組換えインスリンは、2 時間活性であった。3.6 mg/kg において、実施例 2 は、最初の 2 時間インスリンと同程度の活性であり、一方実施例 I 及び実施例 III では不十分な効果しか得られない。rHインスリンの低下効果は、17.9 mg/kg でより強調された。なぜなら、当該効果が 24 時間まで観察されたからである。全体図は、インスリン誘導体が、24 時間まで（コントロール群に比べて）活性であることを示したが、グルコース・レベルが投与後 1～2 時間減少し、次に 3～4 時間で増加し、そして再び 6 時間で減少しているということに留意することは重要である。この「上昇と下降」応答は、マウスの食性および代謝が、薬剤の効力に影響を与えうる重要なパラメーターであるということを示唆しうる。db/db マウスが、年齢につれてインスリン抵抗性を発達させ、このことが、グルコース低下効果を得るために注射されなければならないかなり高用量のインスリンを説明しうるということについて言及することは重要である。

30

40

【0071】

実施例 X III

通常ラットにおける薬物動態プロファイル

[0087] Rhインスリン、実施例 III のインスリン誘導体、及び実施例 III のインスリン誘導体の複合体を、7～8 週齢の雄 CDラットに、36 nmol/kg sc 又は 12 nmol/kg 静脈内 (iv) のいずれかで投与した。血液サンプルを、72 時間まで (rhインスリン-処置した動物については 3 時間まで) 回収した。薬剤レベルを、ヒト・インスリン ELISA キット (Linco) を使用して測定した。薬物動態パラメーターを、WinNonlin ソフトウェアを使用して、化合物/投与経路あたり N = 4 で非区画

50

分析により計算した。図15は、通常のSDラットにおけるインスリンの薬物動態プロファイルである。ここでインスリンは、scで36nmol/kgで投与され、そしてivで12nmol/kgで投与された。図16は、通常のSDラットにおける実施例IIIの複合体の薬物動態プロファイルであり、ここで複合体は、scで36nmol/kg、及びivで12nmol/kgで投与された。図17は、通常のSDラットにおける実施例IIIのインスリン誘導体の薬物動態プロファイルであり、ここでインスリン誘導体は、scで36nmol/kgで投与され、そしてivで12nmol/kgで投与された。図18は、インスリン、実施例IIIのインスリン誘導体、及び実施例IIIのインスリン誘導体の複合体の皮下投与のPKプロファイルである。図19は、インスリン、実施例IIIのインスリン誘導体、及び実施例IIIのインスリン誘導体の複合体の静脈内投与のPKプロファイルである。 10

【0072】

実施例XIV

糖尿病ラットにおける一回用量の薬力学

【0088】 雄CDラットにおいて、ストレプトゾトシン(60mg/kg)の一回iv注射で、糖尿病を誘導した。2日後、DAC(商標):インスリン誘導体を120nmol/kg、前もって成形された複合体300nmol/kg、rhインスリン20U/kg(120nmol/kg)、又は溶媒を、ラットに1回sc注射した。血中グルコースレベルを手持ちグルコメーターで、注射直前、及び投与後1、2、3、4、6、8、10、11、24、30、及び48時間後、5匹のラット/群で測定した。但し溶媒群については3匹のラット/群で試験した。通常のラットにおける血糖の範囲は、5.2~7.6mmol/lであった。 20

【0073】

【0089】 図20は、120nmol/kgの実施例I~IVを投与した後のラットにおける血中グルコースレベルを示す。図21は、本発明の実施例I~IVの対応する複合体を300nmol/kgで投与した後の、ラットにおける血糖レベルを示す。

【0074】

実施例XV

繰返し皮下注射後の、DAC:インスリン誘導体の効力及び前もって成形された対応の複合体の効力の評価 30

【0090】 本アッセイは、成獣雄CD(商標)ラットに繰返し皮下注射した後の、実施例IIIのインスリン誘導体及びその複合体の効力対遊離ヒト組換えインスリンの効力を評価するために行われた。

【0075】

【0091】 1型糖尿病を、ストレプトゾトシン(60mg/kg、pH4.5)の1回静脈(iv)注射により、実験1日目に雄CD(商標)ラットに誘導した。高血糖は、血液を試験する血中グルコースモニターを使用して確認された。試験化合物を、実験3日目から14日目まで1日1回、皮下(sc)注射により1ml/kg体重で投与した。血中グルコースレベルを、それぞれの日の投与の直前、及び投与後2、8、19時間で試験した。食餌と水の消費量を、毎日モニターした。体重を、実験1、3、6、9、12、15、及び17日目に集めた。 40

【0076】

【0092】 図22は、実施例IIIのインスリン誘導体についての1日目、6日目、及び12日目における1日の血中グルコース・プロファイルを示し、そして図23は、実施例IIIのインスリン誘導体の複合体について、1日目、6日目、及び12日目での1日の血中グルコース・プロファイルを示す。

【0077】

【0093】 本発明は、その特異的な実施態様に関して記載される一方で、さらなる改良が可能であり、そして当該出願が、本発明の原理に一般的に従う発明、並びに本発明が関連する技術において既知又は慣習的な慣行の範囲内であり、本明細書に記載された基本的特 50

徴に適用され、そして添付の特許請求の範囲内に従う開示からの逸脱を含む発明の全てのバリエーション、使用、又は適応をカバーすることが意図されることが、理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】[0015] 図1は、天然ヒトインスリンから派生された実施例I～実施例VII I Iを示す。

【図2】[0016] 図2は、wistarラットの肝臓膜上のインスリン、インスリン誘導体、及びインスリン誘導体の複合体の競合的結合を示す。

【図3】[0017] 図3は、wistarラットの肝臓膜上のインスリン、インスリン誘導体、及びインスリン誘導体の複合体の競合的結合を示す。 10

【図4】[0018] 図4A、4B、4C、5A、5B、6A、6Bは、3T3L1脂肪細胞分化段階を示す。

【図5】[0018] 図4A、4B、4C、5A、5B、6A、6Bは、3T3L1脂肪細胞分化段階を示す。

【図6】[0018] 図4A、4B、4C、5A、5B、6A、6Bは、3T3L1脂肪細胞分化段階を示す。

【図7】[0019] 図7は、インスリン、実施例III、及びIV、並びにそれらの対応する複合体についての、3T3-L1脂肪細胞におけるグルコース輸送を示す。

【図8】[0020] 図8は、インスリン、実施例III、及びVI、並びにそれらの対応する複合体についてのwisterラット脂肪細胞由来の副睾丸脂肪細胞におけるグルコース輸送を示す。 20

【図9】[0021] 図9は、インスリン3.6mg/kgで処置された動物における時間関数で、血糖の差分を示す。

【図10】[0022] 図10は、実施例I、II、IIIのインスリン誘導体3.6mg/kgで処置された動物における時間関数で、血糖の差分を示す。

【図11】[0023] 図11は、実施例I、II、IIIのインスリン誘導体17.9mg/kgで処置された動物における時間関数で、血糖の差分を示す。

【図12】[0024] 図12は、インスリン及び実施例Iのインスリン誘導体3.6mg/kgで、並びに実施例Iのインスリン誘導体17.9mg/kgで処置された動物における時間関数で、血糖の差分を示す。 30

【図13】[0025] 図13は、インスリン及び実施例IIのインスリン誘導体3.6mg/kgで、並びに実施例IIのインスリン誘導体17.9mg/kgで処置された動物における時間関数で、血糖の差分を示す。

【図14】[0026] 図14は、インスリン及び実施例IIIのインスリン誘導体3.6mg/kgで、並びに実施例IIIのインスリン誘導体17.9mg/kgで処置された動物における時間関数で、血糖の差分を示す。

【図15】[0027] 図15は、皮下注射及び静脈注射された未変性のインスリンの薬物動態プロファイルを示す。

【図16】[0028] 図16は、皮下注射及び静脈注射された実施例IIIの複合体のインスリンの薬物動態プロファイルを示す。 40

【図17】[0029] 図17は、皮下注射及び静脈注射された実施例IIIの薬物動態プロファイルを示す。

【図18】[0030] 図18は、皮下注射されたインスリン、実施例III、及び実施例IIIの複合体の薬物動態プロファイルの比較を示す。

【図19】[0031] 図19は、静脈注射されたインスリン、実施例III、及び実施例IIIの複合体の薬物動態プロファイルの比較を示す。

【図20】[0032] 図20は、ストレプトゾシン誘発糖尿病ラットにおいて、インスリン、実施例I～IV、及び溶媒の皮下注射後の薬力学プロファイルの比較を示す。

【図21】[0033] 図21は、ストレプトゾシン誘発糖尿病ラットにおいて、インスリン 50

、実施例 I ~ I V の複合体、及び溶媒の皮下注射後の比較の薬力学プロファイルを示す。

【図 2 2】 [0034] 図 2 2 は、実施例 I I I の繰り返しの皮下注射の比較の薬力学プロファイル (1日目対 6日目対 12日目対コントロール)を示す。そして

【図 2 3】 [0035] 図 2 3 は、実施例 I I I の複合体の繰り返された皮下注射の比較の薬理学プロファイル (1日目対 6日目対 12日目対コントロール)を示す。

【 図 1 】

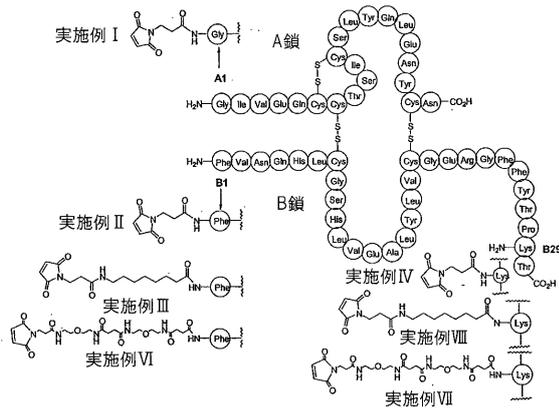


Fig. 1

【 図 2 】

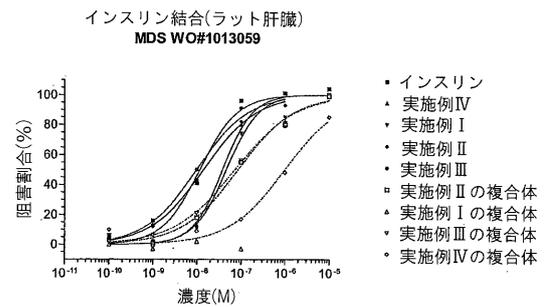


Fig. 2

【 図 3 】

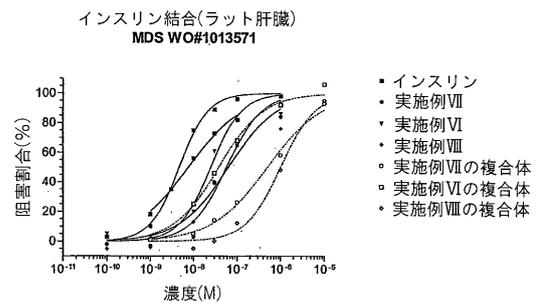
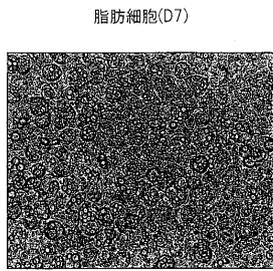
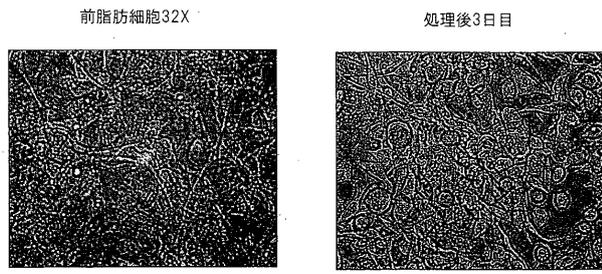
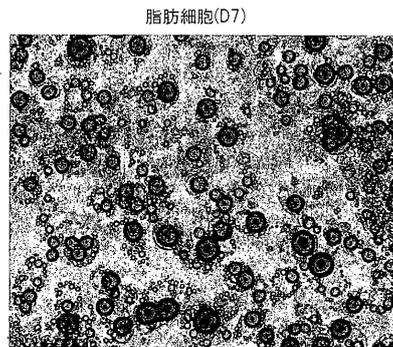
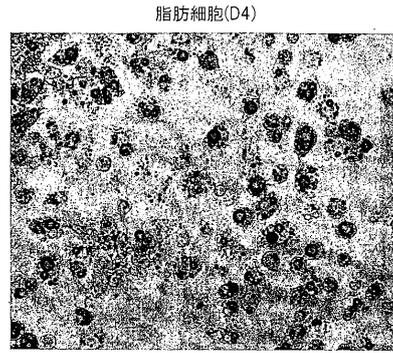


Fig. 3

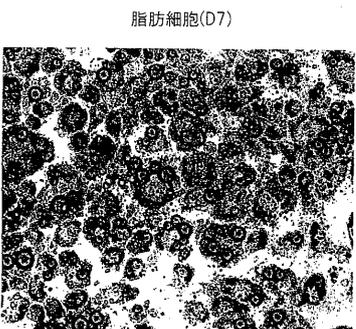
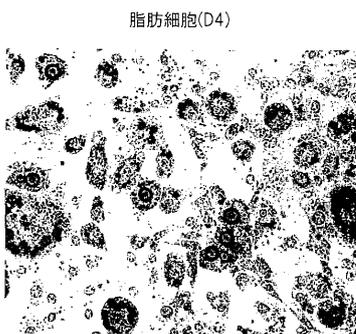
【 図 4 】



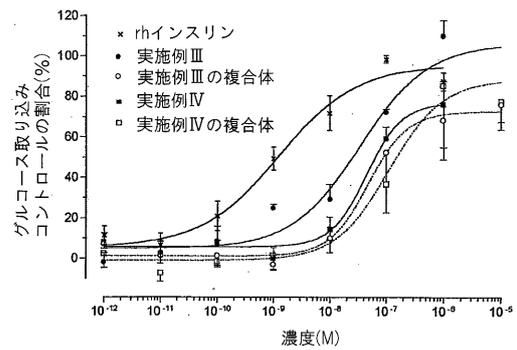
【 図 5 】



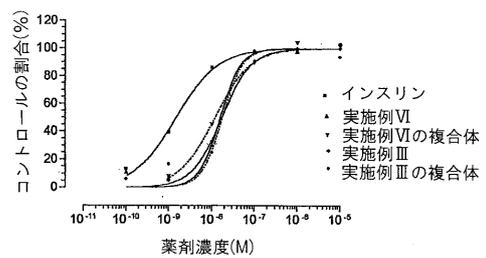
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

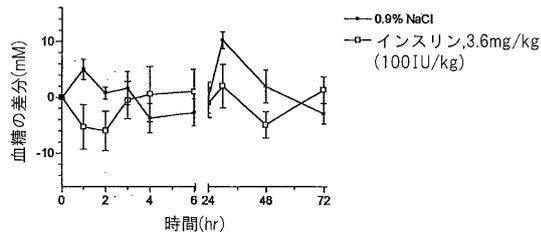


Fig. 9

【 図 1 1 】

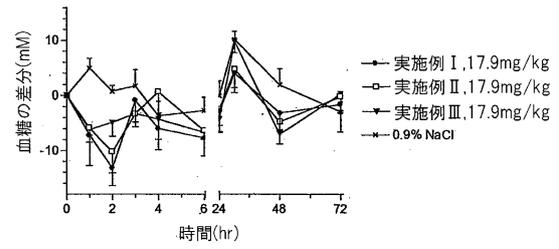


Fig. 11

【 図 1 0 】

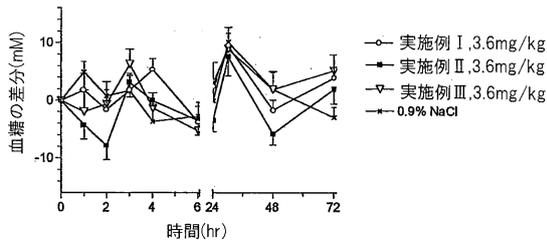


Fig. 10

【 図 1 2 】

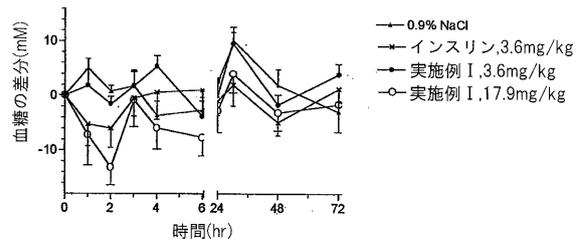


Fig. 12

【 図 1 3 】

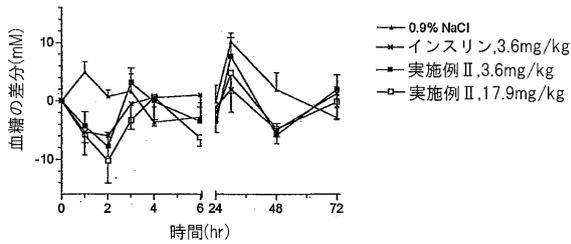


Fig. 13

【 図 1 5 】

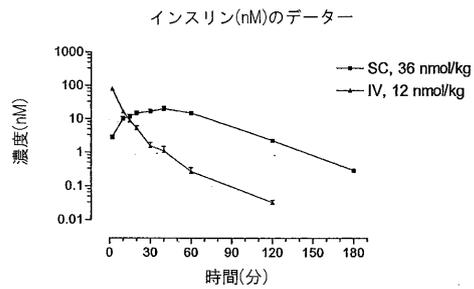


Fig. 15

【 図 1 4 】

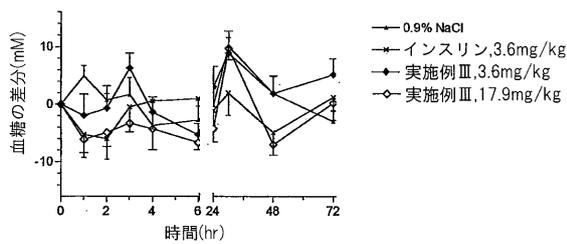


Fig. 14

【 図 1 6 】

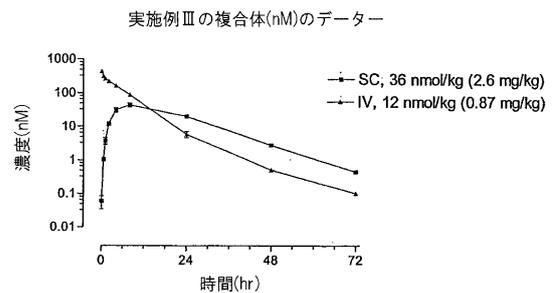


Fig. 16

【 図 17 】

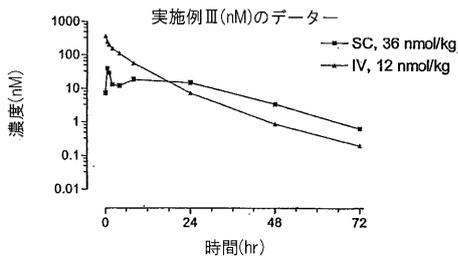


Fig. 17

【 図 19 】

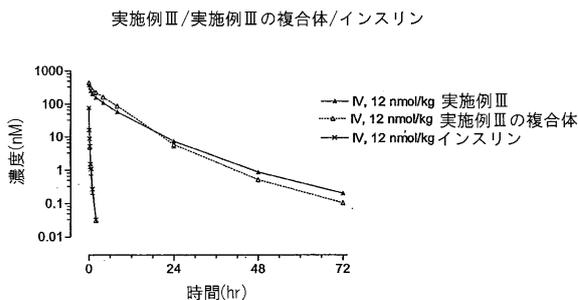


Fig. 19

【 図 18 】

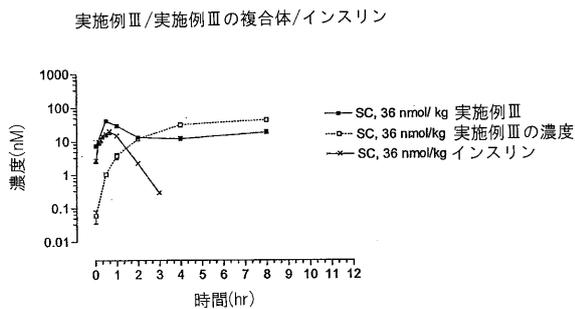


Fig. 18

【 図 20 】

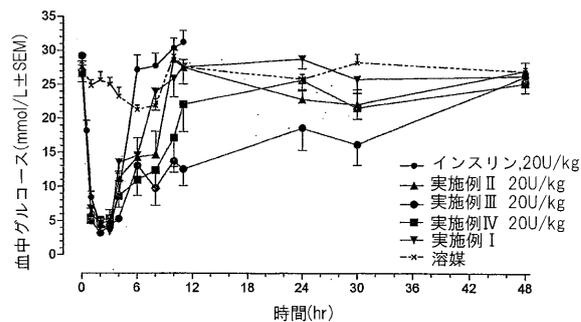


Fig. 20

【 図 21 】

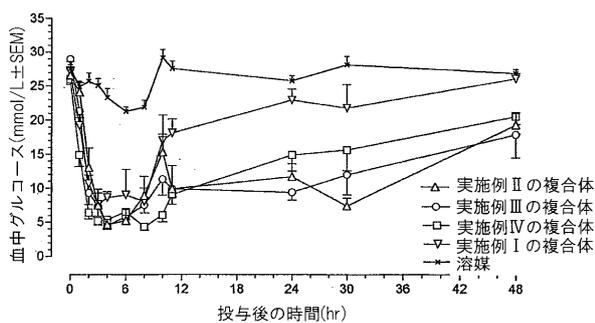


Fig. 21

【 図 23 】

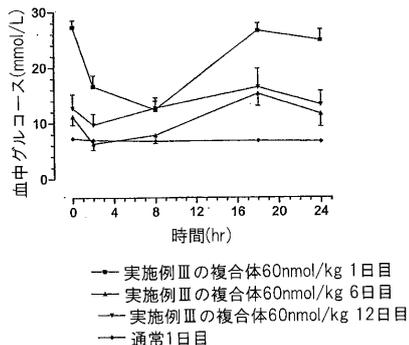


Fig. 23

【 図 22 】

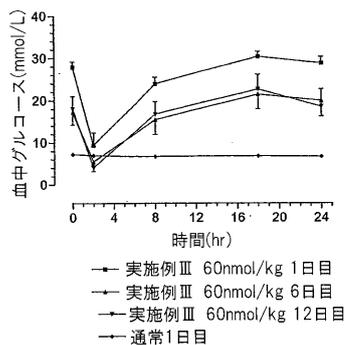


Fig. 22

【手続補正書】

【提出日】平成19年3月29日(2007.3.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

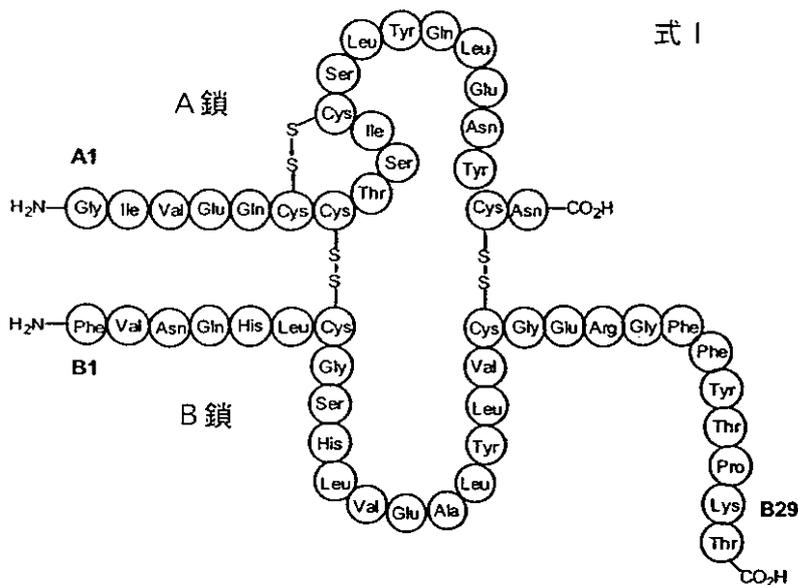
【請求項1】

インスリン分子及び血液成分に共有結合するための反応基を含むインスリン誘導体であって、当該反応基が、 α 、 β -不飽和カルボニル部分、スクシニミジル含有基、及びマレイミド含有基からなる群から選ばれる、前記インスリン誘導体。

【請求項2】

前記インスリン分子が以下の式I：

【化1】



の分子であり、そして前記反応基が、Gly A1、Phe B1、及びLys B29の位置から選ばれる位置で、インスリン分子のアミノ酸に結合する、請求項1に記載のインスリン誘導体。

【請求項3】

前記反応基が、マレイミド含有基である、請求項1又は2に記載のインスリン誘導体。

【請求項4】

前記反応基が、3-マレイミドプロピオン酸(MPA)である、請求項1又は2に記載のインスリン誘導体。

【請求項5】

前記反応基が、リンカーを介して、前記インスリン分子のアミノ酸に結合される、請求項1～4のいずれか1項に記載のインスリン誘導体。

【請求項6】

前記リンカーが、(2-アミノ)エトキシ酢酸(AEA)、エチレンジアミン(EDA)、アミノ・エトキシ・エトキシ・スクシニミン酸(AEES)、AEES-AEES、2-[2-(2-アミノ)エトキシ]エトキシ酢酸(AEEA)、AEEA-AEEA、-NH₂-(CH₂

)_n-COOH、[式中、nが、1～20の整数である]、及びアルキル鎖(C₁-C₁₀)モチーフ、並びにそれらの組合せからなる群から選ばれる、請求項5に記載のインスリン誘導体。

【請求項7】

前記アルキル鎖(C₁-C₁₀)モチーフが、酸素、窒素、又は硫黄原子が取り込まれる飽和又は不飽和の1以上のアルキル鎖(C₁-C₁₀)である、請求項6に記載のインスリン誘導体。

【請求項8】

前記アルキル鎖が、グリシン、3-アミノプロピオン酸(APA)、8-アミノオクタン酸(AOA)、及び4-アミノ安息香酸(APhA)からなる群から選ばれる、請求項7に記載のインスリン誘導体。

【請求項9】

前記組合せが、AEEA-EDA、AEEA-AEEA、及びAEA-AEEAからなる群から選ばれる、請求項6に記載のインスリン誘導体。

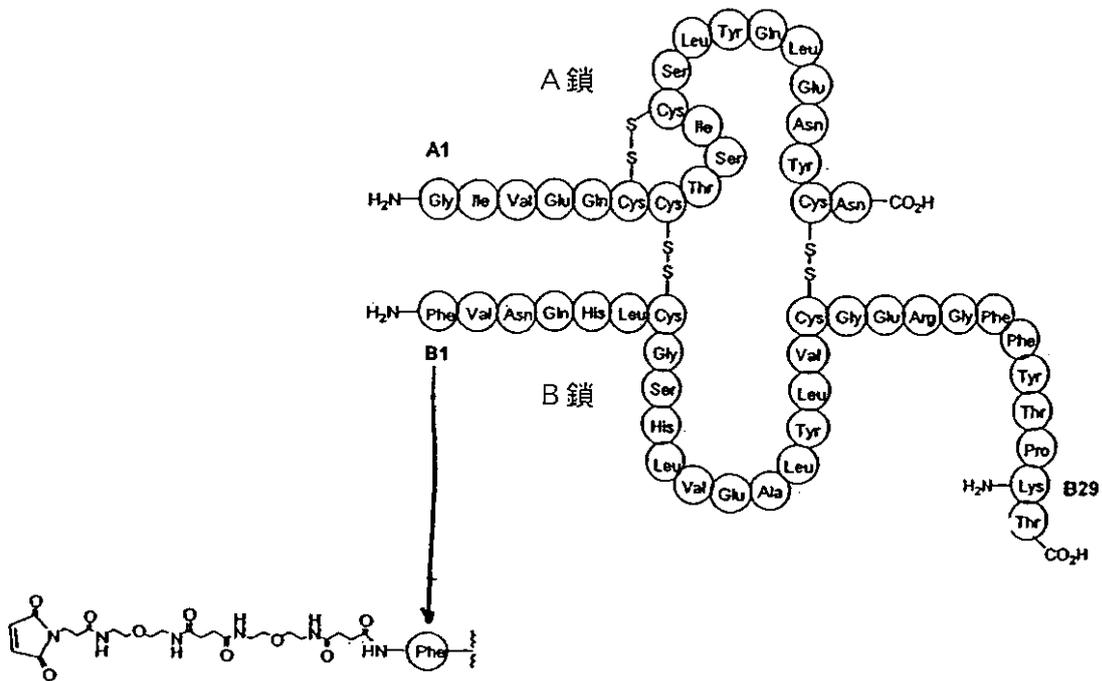
【請求項10】

前記リンカーが、-NH₂-(CH₂)₇-COOHである、請求項6に記載のインスリン誘導体。

【請求項11】

以下の式：

【化2】

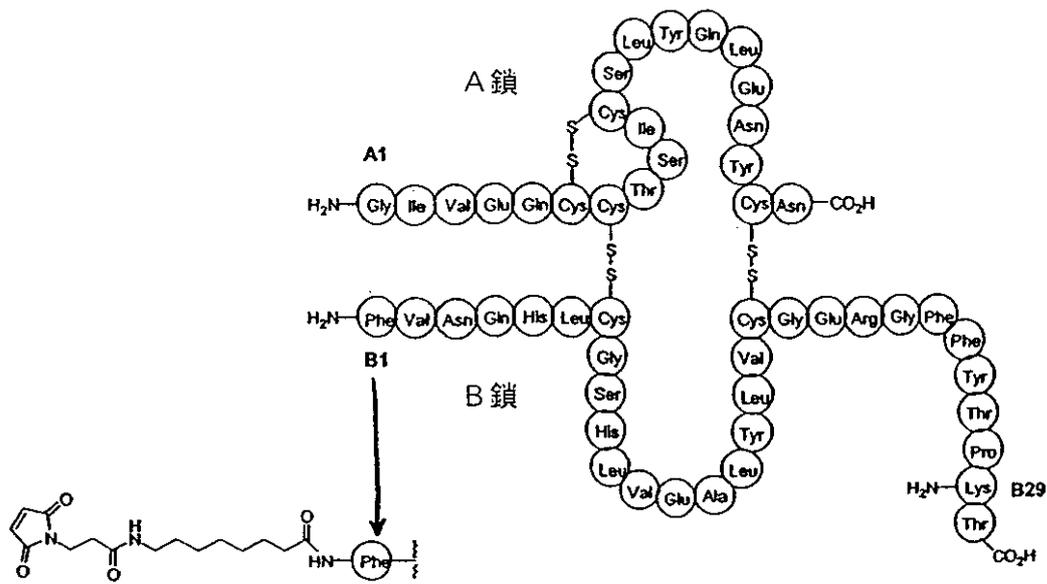


を有する、請求項1に記載のインスリン誘導体。

【請求項12】

以下の式：

【化 3】

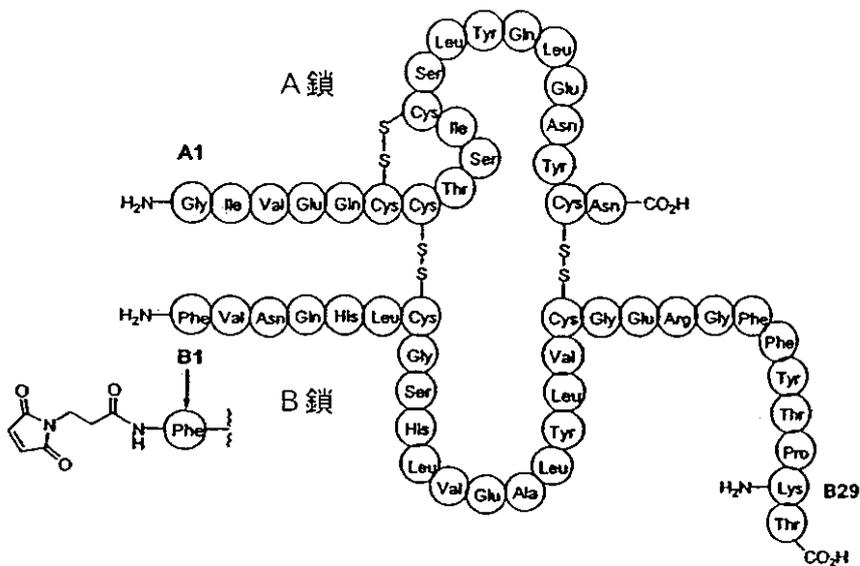


を有する請求項 1 に記載のインスリン誘導体。

【請求項 1 3】

以下の式：

【化 4】



を有する、請求項 1 に記載のインスリン誘導体。

【請求項 1 4】

前記血液成分が、血液タンパク質である、請求項 1 に記載のインスリン誘導体。

【請求項 1 5】

前記血液タンパク質が、血清アルブミンである、請求項 1 4 に記載のインスリン誘導体。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載されるインスリン誘導体及び血液成分を含むインスリン複合体であって、当該反応基及び当該血液成分が、当該反応基と当該血液成分との間で形成される共有結合を介して結合される、前記複合体。

【請求項 17】

前記血液成分が、血液タンパク質である、請求項 16 に記載のインスリン複合体。

【請求項 18】

前記血液タンパク質が、血清アルブミンである、請求項 17 に記載のインスリン複合体。

【請求項 19】

前記複合体が、*ex vivo* で形成される、請求項 16 に記載のインスリン複合体。

【請求項 20】

前記血液成分が組換えアルブミンである、請求項 19 に記載のインスリン複合体。

【請求項 21】

医薬として許容される担体と共に、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のインスリン誘導体を含む医薬組成物。

【請求項 22】

医薬として許容される担体と共に、請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のインスリン複合体を含む医薬組成物。

【請求項 23】

血糖関連疾患又は障害を治療のための医薬組成物であって、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のインスリン誘導体を含む、前記医薬組成物。

【請求項 24】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病、II 型糖尿病、妊娠性糖尿病、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、及び膵炎からなる群から選ばれる、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病及び II 型糖尿病からなる群から選ばれる、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のインスリン複合体を含む、血糖関連疾患又は障害の治療のための医薬組成物。

【請求項 27】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病、II 型糖尿病、妊娠性糖尿病、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、及び膵炎からなる群から選ばれる、請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病及び II 型糖尿病からなる群から選ばれる、請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

請求項 21 及び 22 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を含む、血糖関連疾患又は障害の治療のための医薬組成物。

【請求項 30】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病、II 型糖尿病、妊娠性糖尿病、嚢胞性線維症、多嚢胞性卵巣症候群、及び膵炎からなる群から選ばれる、請求項 29 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

前記血糖関連疾患が、I 型糖尿病及び II 型糖尿病からなる群から選ばれる、請求項 29 に記載の医薬組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2004/001409
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC ⁷ C07K-14/62, C07K-14/765, A61P-3/10, C07K-1/113, A61K-38/28, A61P-5/50		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC ⁷ C07K-14/62		
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 practicable, search terms used) Canadian Patent Database; EPOQUE; DELPHION; ESP@CENET; CA PLUS Key words: "insulin derivative"; "insulin analog"; "insulin analogue"; "insulin conjugate"; "long lasting"; "protracted"		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 05187 A1 (UNITED MEDICAL & DENTAL SCHOOLS OF GUYS AND ST. THOMAS' HOSPITALS) 23 February 1995 whole document	1, 2, 7, 16-23, 33-38
Y		3-6, 8-15
X	CA 2334859 A1 (KINGS COLLEGE LONDON; DEUTSCHES WOLFFORSCHUNGS INSTITUT) 23 December 1999 whole document	1-3, 7, 16, 18, 19, 21-23, 33-38
Y		4-6, 8-15, 17, 20
X	JONASSEN ET AL. "Fatty acid acylated insulins display protracted action due to binding to serum albumin." In: PEPTIDE SCIENCE: PRESENT AND FUTURE, PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL PEPTIDE SYMPOSIUM, 1 ST KYOTO, NOV. 30, 1997, (1999), MEETING DATE 1997, pages 674-677. EDITOR: SHIMONISHI, YASUTSUGA. PUBLISHER: KLUWER DORDRECHT, NETH. whole document	1-3, 7, 16-23, 33-38
Y		4-6, 8-15
Further documents are listed in the continuation of Box C.		Patent family members are listed in 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 application or patent 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" "X" "Y" "Z"	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 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 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-type search 10 November 2004 (10-11-2004)	Date of mailing of the international-type search report 10 November 2004 (10-11-2004) 21 December 2004	
Name and mailing address of the ISA/ Commissioner of Patents Canadian Patent Office - PCT Ottawa/Gatineau KIA 0C9 Facsimile No. 1-819-953-9358	Authorized officer Colleen MacFarlane (819)997-4614	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2004/001409

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAUDYS ET AL. "Extending insulin action <i>in vivo</i> by conjugation to carboxymethyl dextran." BIOCONJUGATE CHEMISTRY. 1998, vol. 9, pages 176-183 whole document	1-3, 7, 16, 18, 19, 21-23, 33-38
Y		4-6, 8-15, 17, 20
Y	CA2363712 A1 (CONJUCHEM INC.) 23 November 2000 whole document	1-23, 33-38
Y	UCHIO ET AL. "Site specific insulin conjugates with enhanced stability and extended action profile." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 35 (1999), vol. 35(2,3), pages 289-306 whole document	1-23, 33-38
Y	US 6323311 B1 (LIU ET AL.) 27 November 2001	1-23, 33-38
Y	US 3868357 A (SMYTH ET AL.) 25 February 1975	1-23, 33-38
Y	US 3868356 A (SMYTH ET AL.) 25 February 1975	1-23, 33-38
P,X	THIBAudeau ET AL. "Development of novel DAC TM insulin analogues with extended pharmacodynamic profiles." AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 64 TH SCIENTIFIC SESSIONS. ABSTRACT 488-P, June 4-8, 2004, ORLANDO, FLORIDA	1-23, 33-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2004/001409
--

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	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos. : 24-32 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority; namely: Claims 24-32 are directed to methods of treatment of the human/animal body. (Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv) PCT)
2	<input type="checkbox"/> 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	<input type="checkbox"/> Claims Nos. : because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule
Box III	Observation 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 :	
1	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3	<input type="checkbox"/> 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	<input type="checkbox"/> 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	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2004/001409

Patent document cited	Publication Date	Family Members	Publication Date
WO9505187	23-02-1995	AT147043T T	15-01-1997
		AT148311T T	15-02-1997
		AU688288 B2	12-03-1998
		AU4483489 A	14-05-1990
		AU5569594 A	22-06-1994
		BR9307514 A	31-08-1999
		CA2040851 A1	20-10-1992
		CA2149118 A1	09-06-1994
		DE68927613D D1	13-02-1997
		DE68927613T T2	24-04-1997
		DE69307922D D1	13-03-1997
		DE69307922T T2	05-06-1997
		DK670685T T3	24-02-1997
		EP0439504 A1	07-08-1991
		EP0670685 A1	13-09-1995
		EP0725648 A1	14-08-1996
		EP1234586 A2	28-08-2002
		ES2100034T T3	01-06-1997
		GB2224008 A	25-04-1990
		GB2276820 A	12-10-1994
CA2334859	23-12-1999	AU8029798 A	05-01-2000
		CA2334859 A1	23-12-1999
		EP1086130 A1	28-03-2001
		JP2002518408T T	25-06-2002
		WO9965941 A1	23-12-1999
CA2363712	23-11-2000	AT226593T T	15-11-2002
		AT252601T T	15-11-2003
		AU754770 B2	21-11-2002
		AU761591 B2	05-06-2003
		AU764103 B2	07-08-2003
		AU765753 B2	25-09-2003
		AU4774800 A	05-12-2000
		AU4855500 A	05-12-2000
		AU5027100 A	05-12-2000
		AU5139300 A	05-12-2000
		BR0010750 A	26-02-2002
		BR0010757 A	19-02-2002
		CA2363712 A1	23-11-2000
		CA2372338 A1	23-11-2000
		CA2373252 A1	23-11-2000
		CA2373680 A1	23-11-2000
		CN1350548T T	22-05-2002
		CN1351611T T	29-05-2002
		DE60000665D D1	28-11-2002
		DE60000665T T2	26-06-2003
		DE60006100D D1	27-11-2003
		DE60006100T T2	01-07-2004
		DK1180121T T3	01-03-2004
		EA3922 B1	30-10-2003
		EP1105409 A2	13-06-2001
		EP1171582 A2	16-01-2002
		EP1179012 A1	13-02-2002
		EP1180121 A1	20-02-2002
		EP1264840 A1	11-12-2002
		ES2185595T T3	01-05-2003
		ES2209885T T3	01-07-2004
		JP2002544287T T	24-12-2002
		JP2003500341T T	07-01-2003
		JP2003508350T T	04-03-2003
		JP2003527312T T	16-09-2003
		NO20015584 A	03-01-2002
		PT1180121T T	31-03-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2004/001409

Continuation of Form PCT/ISA/210 (patent family annex):

		SI1180121T T1	30-04-2004
		US6329336 B1	11-12-2001
		US6514500 B1	04-02-2003
		US6593295 B2	15-07-2003
		US2003108567 A1	12-06-2003
		US2003108568 A1	12-06-2003
		US2004127398 A1	01-07-2004
		US2004138100 A1	15-07-2004
		WO0069900 A2	23-11-2000
		WO0069902 A1	23-11-2000
		WO0069911 A1	23-11-2000
		WO0070665 A2	23-11-2000
		ZA200106676 A	19-07-2002
		ZA200109110 A	13-06-2002
US6323311	27-11-2001	AU7830400 A	24-04-2001
		US6323311 B1	27-11-2001
		WO0121197 A1	29-03-2001
US3868357	25-02-1975	AT68372 A	15-02-1977
		AT339512B B	25-10-1977
		AU472582 B2	27-05-1976
		AU3821372 A	26-07-1973
		BE778538 A1	26-07-1972
		CA980765 A1	30-12-1975
		CH547777 A	11-04-1974
		DE2204053 A1	17-08-1972
		FR2123524 A5	08-09-1972
		GB1381273 A	22-01-1975
		GB1381274 A	22-01-1975
		IE36225 B1	15-09-1976
		NL7201179 A	01-08-1972
		SE382452 B	02-02-1976
		US3868356 A	25-02-1975
		US3868357 A	25-02-1975
		ZA7200277 A	27-09-1972
US3868356	25-02-1975	AT68372 A	15-02-1977
		AT339512B B	25-10-1977
		AU472582 B2	27-05-1976
		AU3821372 A	26-07-1973
		BE778538 A1	26-07-1972
		CA980765 A1	30-12-1975
		CH547777 A	11-04-1974
		DE2204053 A1	17-08-1972
		FR2123524 A5	08-09-1972
		GB1381273 A	22-01-1975
		GB1381274 A	22-01-1975
		IE36225 B1	15-09-1976
		NL7201179 A	01-08-1972
		SE382452 B	02-02-1976
		US3868356 A	25-02-1975
		US3868357 A	25-02-1975
		ZA7200277 A	27-09-1972

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テームコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P	15/08	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 ブリドン, ドミニク ピー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 1 1 4, サンフランシスコ, マウンテン スプリング アベニュー 1 3 5

(72) 発明者 カステニユ, ジャン - ポール

カナダ国, ケベック エイチ 3 ピー 1 ワイ 6, タウン オブ マウント ロイヤル, ロックハート アベニュー 4 5 5

(72) 発明者 ファン, シカイ

カナダ国, ケベック エイチ 9 ジェイ 3 エックス 2, カークランド, デノールト 1 5 3

(72) 発明者 レガー, ロジャー

カナダ国, ケベック ジェイ 4 アール 2 ブイ 8, セント - ランバート, アッパー エディソン 2 0 2

(72) 発明者 ロビテイル, マルティン

カナダ国, ケベック ジェイ 2 ジー 6 エー 2, グランビー, フレシエット 4 9 1

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA06 BA01 BA44 CA32 DB34 NA14 ZA662 ZA812 ZC032
ZC352

4H045 AA10 AA30 BA20 BA32 BA41 CA40 DA37 DA70 EA20 EA27

FA51 FA58 FA72 FA74 GA21 GA25