(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2022-513776
(P2022-513776A)
(43)公表日　令和4年2月9日(2022.2.9)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/17 (2006.01)		C12N	15/17	4B065
C07K 14/62 (2006.01)		C07K	14/62	ZNA 4C084
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	4H045
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全45頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-533149(P2021-533149)
(86)(22)出願日　令和1年12月10日(2019.12.10)
(85)翻訳文提出日　令和3年7月28日(2021.7.28)
(86)国際出願番号　PCT/EP2019/084427
(87)国際公開番号　WO2020/120477
(87)国際公開日　令和2年6月18日(2020.6.18)
(31)優先権主張番号　18306657.0
(32)優先日　平成30年12月11日(2018.12.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　18306658.8
(32)優先日　平成30年12月11日(2018.12.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　18306659.6
最終頁に続く

(71)出願人　504456798
サノフイ
ＳＡＮＯＦＩ
フランス国、エフ－７５００８・パリ、
リユ・ラ・ボエテイ・５４
５４ ｒｕｅ Ｌａ Ｂｏ▲ｅ▼ｔｉｅ，
Ｆ－７５００８ Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ
(74)代理人　100127926
弁理士　結田 純次
(74)代理人　100140132
弁理士　竹林 則幸
(72)発明者　トーマス・ベーメ
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　インスリン受容体結合親和性が低下したインスリンアナログ

(57)【要約】
親インスリンと比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンアナログが、本明細書において提供され、インスリンアナログは、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
親インスリンと比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンアナログであって、分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む、前記インスリンアナログ。
【請求項２】
親インスリンは、ヒトインスリン、ブタインスリン、またはウシインスリンである、請求項１に記載のインスリンアナログ。
【請求項３】
分岐鎖アミノ酸は、バリン（Ｖａｌ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）およびロイシン（Ｌｅｕ）からなる群から選択される、請求項１または２に記載のインスリンアナログ。
【請求項４】
グルタミン酸（Ｇｌｕ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）およびヒスチジン（Ｈｉｓ）からなる群から選択されるアミノ酸で置換されたＡ１４位の変異をさらに含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のインスリンアナログ。
【請求項５】
Ｂ３０位の変異をさらに含む、請求項１～４のいずれか１項に記載のインスリンアナログ。
【請求項６】
Ｂ３０位の変異は、親インスリンのＢ３０位のアミノ酸の欠失である（Ｄｅｓ（Ｂ３０）－変異）、請求項５に記載のインスリンアナログ。
【請求項７】
グルタミン酸（Ｇｌｕ）で置換されたＢ３位の変異をさらに含む、請求項１～６のいずれか１項に記載のインスリンアナログ。
【請求項８】
グリシン（Ｇｌｙ）で置換されたＡ２１位の変異をさらに含む、請求項１～７のいずれか１項に記載のインスリンアナログ。
【請求項９】
インスリンアナログのＢ鎖は、以下：
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫ　（配列番号２２）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号４４）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号４８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号５０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号５８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号６０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号６４）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号６６）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号７０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号７６）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号７８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号８０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫＴ　（配列番号８５）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８６）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号８７）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８９）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９０）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９１）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９２）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９３）

ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９４）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９５）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９６）、
および
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９７）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、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】
（ａ）配列番号４３に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号４４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を有するＢ鎖、
（ｂ）配列番号４７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号４８に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖、または
（ｃ）配列番号７７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号７８に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖
を含む、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】
Ｌｅｕ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン

、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、および
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン
からなる群から選択されるインスリンアナログ。

【請求項１２】

親インスリンのＢ鎖と比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンＢ鎖であって、分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含み、場合により、Ｂ３０位の変異をさらに含み、Ｂ３０位の該変異は、親インスリンのＢ３０位のトレオニンの欠失である（Ｄｅｓ（Ｂ３０）－変異）、前記インスリンＢ鎖。

【請求項１３】

インスリンＡ鎖およびインスリンＢ鎖を含むプロインスリンであって、該インスリンＢ鎖は、親インスリンのＢ鎖と比べて少なくとも１つの変異を含み、該Ｂ鎖は、分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含み、場合により、該プロインスリンの該インスリンＡ鎖は、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）およびヒスチジン（Ｈｉｓ）から選択されるアミノ酸で置換されたＡ１４位の変異を含む、前記プロインスリン。

【請求項１４】

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１２に記載のインスリンＢ鎖、および／または請求項１３に記載のプロインスリンをコードするポリヌクレオチド。

【請求項１５】

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１２に記載のインスリンＢ鎖、請求項１３に記載のプロインスリン、および／または請求項１４に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

親インスリンと比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンアナログが、本明細書において提供され、インスリンアナログは、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異およ

び／または疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む。
【背景技術】
【０００２】
世界中で４億超の人々が１型または２型の真性糖尿病を患っている。１型糖尿病は、インスリン代替で処置される。１型糖尿病とは対照的に、２型糖尿病では、基本的にインスリンの欠乏はないが、多くの症例では、特に進行期では、２型糖尿病患者はインスリンで処置される。
【０００３】
健常なヒトでは、膵臓によるインスリンの放出は、血液グルコースの濃度に厳密に結びついている。例えば食後に生じる血液グルコースレベルの上昇は、インスリン分泌の対応する増大によって迅速に補償される。絶食状態では、血漿インスリンレベルは、インスリン感受性臓器および組織のグルコースによる連続供給を保証し、かつ夜間の肝グルコース生産を低く維持するのに十分である基礎値まで低くなる。多くの場合、外因性による、大部分はインスリンの皮下投与による、内因性インスリン分泌の補充を用いても、上記の血液グルコースに関する生理学的調節の特質が得られることはない。上下への血液グルコースの逸脱が起こる場合があり、このようなことは最も重度の形態では生命を脅かすおそれがある。このことから、糖尿病の改善された療法とは、血液グルコースを生理学的範囲内にできる限り近づけて維持することを第一に目指すことである、ということが導かれることになる。
【０００４】
ヒトインスリンは、５１個のアミノ酸のポリペプチドであり、これらアミノ酸は２つのアミノ酸鎖：２１個のアミノ酸を有するＡ鎖および３０個のアミノ酸を有するＢ鎖に分かれている。これらの鎖は、２つのジスルフィド架橋によって互いに連結されている。第３のジスルフィド架橋が、Ａ鎖の６位と１１位のシステイン間に存在する。真性糖尿病の処置のために現在使用されている一部の製品は、インスリンアナログ、すなわち、その配列が、Ａ鎖におけるおよび／またはＢ鎖における１つまたはそれ以上のアミノ酸置換によってヒトインスリンの配列とは異なる、インスリンバリアントである。
【０００５】
他の多くのペプチドホルモンと同様に、ヒトインスリンはｉｎ　ｖｉｖｏで短半減期を有する。したがって、これは頻繁に投与され、患者にとっては不快感に関連する。したがって、ｉｎ　ｖｉｖｏで向上した半減期、したがって、延長された作用持続時間を有する、インスリンアナログが所望されている。
【０００６】
現在、インスリンの半減期を引き延ばすための様々なアプローチがある。
【０００７】
アプローチの一つは、低ｐＨでは製剤が可溶性であること、しかし生理学的ｐＨでは天然のインスリンと比べて溶解度が低下していることに関する開発に基づいている。インスリンアナログの等電点は、Ｂ鎖のＣ末端に２個のアルギニンを付加することによって上昇する。Ａ２１でのグリシン置換と組み合わせて２個のアルギニンを付加すると（インスリングラルギン）、長期の作用の持続時間を有するインスリンが提供される。インスリンアナログは、皮下部位での注射の際に亜鉛の存在下で沈殿し、ゆっくりと溶解し、その結果、インスリングラルギンの持続的な存在がもたらされる。
【０００８】
別のアプローチでは、長鎖脂肪酸基がインスリンのＬｙｓＢ２９のイプシロンアミノ基にコンジュゲートしている。この基の存在により、非共有結合の可逆結合によってインスリンが血清アルブミンに付着することが可能になる。結果として、このインスリンアナログは、ヒトインスリンと比較して著明に延長された時間作用プロファイルを有する（例えば、非特許文献１；または特許文献１を参照されたい）
【０００９】
特許文献２では、ヒトインスリンと比較して、インスリン受容体媒介クリアランス速度が

低下したインスリンアナログが開示されている。
【００１０】
特許文献３では、ヒトインスリンと比較して、インスリン受容体媒介クリアランス速度が低下したインスリンアナログが開示されている。
【００１１】
特許文献４では、プロテアーゼ安定化インスリンアナログが開示されている。
【００１２】
薬の作用の持続時間を増大するためには、半減期が重要な役割を演じる。半減期（ｔ１／２）は、クリアランスで割った分布容積に比例する。ヒトインスリンの場合、クリアランスは、インスリン受容体への結合、内部移行およびその後の分解によって主に決定される。
【００１３】
したがって、インスリン受容体結合活性の低下、および、したがって受容体媒介クリアランス速度の低下を有するがｉｎ　ｖｉｖｏで血液グルコースレベルを十分に低減させることを可能にするシグナル伝達活性、を有するインスリンアナログが求められている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１４】
【特許文献１】ＷＯ２００９／１１５４６９
【特許文献２】ＷＯ２０１６／００６９６３
【特許文献３】ＷＯ２０１８／０５６７６４
【特許文献４】ＷＯ２００８／０３４８８１
【非特許文献】
【００１５】
【非特許文献１】Ｍａｙｅｒら、Ｉｎｃ．Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ（Ｐｅｐｔ　Ｓｃｉ）８８：６８７～７１３頁、２００７
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１６】
高いシグナル伝達をなおも維持しつつ、結合親和性が極めて低い（したがって、クリアランス速度がより低い）、長時間作用型インスリンアナログが、本明細書において提供される。
【００１７】
驚くべきことに、本発明の根底にある研究の文脈において、疎水性アミノ酸（例えばロイシン、イソロイシン、バリン、アラニンおよびトリプトファン）でのヒトインスリンのＢ１６位および／またはＢ２５位の置換によってインスリン受容体結合活性の減少がもたらさせること（親インスリンのインスリン受容体結合活性と比較して、実施例を参照されたい）が示された。インスリン受容体結合活性に及ぼす最も強力な効果が、分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシンおよびバリン）による置換に対して観察された。興味深いことに、これらの位置で（例えばＢ２５位で）かかる置換を有するインスリンアナログは、インスリン受容体アイソフォームＢ（ＩＲ－Ｂ）結合親和性に基づく予想よりも、シグナル伝達において、６倍までの高まりを示した（実施例を参照されたい）。さらに、試験された一部のインスリンアナログは、α－キモトリプシン、カテプシンＤおよびインスリン分解酵素に対してタンパク質分解安定性の向上を示した（実施例を参照されたい）。
【００１８】
したがって、親インスリンと比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンアナログが、本明細書において提供され、インスリンアナログは、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む。一部の実施形態では、親インスリンと比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンアナログが提供され、インスリンアナログは、分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／また

は分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む。
【００１９】
本明細書で使用される「インスリンアナログ」という表現は、天然に存在するインスリン中に存在する少なくとも１個のアミノ酸残基を欠失させるおよび／または置換することにより、および／または少なくとも１個のアミノ酸残基を付加することにより、天然に存在するインスリン（本明細書では「親インスリン」、例えばヒトインスリンとも呼ばれる）の構造から形式上誘導可能な分子構造を有するペプチドを指す。付加および／または交換されたアミノ酸残基は、コード可能アミノ酸残基であっても他の天然に存在する残基であっても純粋に合成的なアミノ酸残基であっても、いずれでもよい。本明細書で言及されるアナログは、ｉｎ　ｖｉｖｏで、例えばヒト対象において、血液グルコースレベルを低減させることができる。
【００２０】
一部の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、２つのペプチド鎖、Ａ鎖およびＢ鎖を含む。典型的には、２つの鎖は、システイン残基間のジスルフィド架橋によって連結されている。例えば、一部の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、３つのジスルフィド架橋を含む：Ａ６位とＡ１１位のシステイン間の１ジスルフィド架橋、Ａ鎖のＡ７位のシステインとＢ鎖のＢ７位のシステインの間の１ジスルフィド架橋、およびＡ鎖のＡ２０位のシステインとＢ鎖のＢ１９位のシステインの間の１ジスルフィド架橋。したがって、本明細書で提供されるインスリンアナログは、Ａ６、Ａ７、Ａ１１、Ａ２０、Ｂ７およびＢ１９の各位にシステイン残基を含む。
【００２１】
本明細書で提供される一部の実施形態では、インスリンアナログは単鎖インスリンである。単鎖インスリンとは、インスリンＢ鎖が、非切断連結ペプチドを介してインスリンＡ鎖と隣接して連結している単一のポリペプチド鎖である。
【００２２】
インスリンの変異、すなわち親インスリンの変異は、鎖、すなわちアナログのＡ鎖またはＢ鎖のいずれか、Ａ－鎖またはＢ－鎖における変異アミノ酸残基の位置（例えば、Ａ１４、Ｂ１６およびＢ２５）、および親インスリンの天然アミノ酸を置換するアミノ酸の３文字コード、を参照しつつ、本明細書では示される。「ｄｅｓＢ３０」という用語は、親インスリンからのＢ３０アミノ酸を欠失するアナログを指す（すなわち、Ｂ３０位のアミノ酸が存在しない）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）ｌｌｅ（Ｂ１６）ｄｅｓＢ３０ヒトインスリンは、ヒトインスリンのＡ鎖の１４位（Ａ１４）のアミノ酸残基がグルタミン酸で置換され、Ｂ鎖の１６位（Ｂ１６）のアミノ酸残基がイソロイシンで置換され、Ｂ鎖の３０位のアミノ酸を欠失する（すなわち存在しない）、ヒトインスリンのアナログである。
【００２３】
本明細書で提供されるインスリンアナログは、親インスリンと比べて少なくとも１つの変異（アミノ酸の置換、欠失、または付加）を含む。本明細書で使用される用語「少なくとも１つ」とは、「少なくとも２つ」、「少なくとも３つ」、「少なくとも４つ」、「少なくとも５つ」等などの、１つ、または２つ以上を意味する。一部の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、Ｂ鎖に少なくとも１つの変異およびＡ鎖に少なくとも１つの変異を含む。さらなる実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、Ｂ鎖に少なくとも２つの変異およびＡ鎖に少なくとも１つの変異を含む。例えば、インスリンアナログは、Ｂ１６位に置換、Ｂ３０位に欠失およびＡ１４位に置換を含むことができる。あるいは、インスリンアナログは、Ｂ２５位に置換、Ｂ３０位に欠失およびＡ１４位に置換を含むことができる。さらに、インスリンアナログは、Ｂ１６位に置換、Ｂ２５位に置換、Ｂ３０位に欠失およびＡ１４位に置換を含むことができる。
【００２４】
本明細書で提供されるインスリンアナログは、上の変異に加えて変異を含むことができる。一部の実施形態では、変異の数は、ある特定の数を超えない。一部の実施形態では、インスリンアナログは、親インスリンと比べて、１２未満の変異（すなわち、欠失、置換、

付加）を含む。別の実施形態では、アナログは、親インスリンと比べて１０未満の変異を含む。別の実施形態では、アナログは、親インスリンと比べて、８未満の変異を含む。別の実施形態では、アナログは、親インスリンと比べて、７未満の変異を含む。別の実施形態では、アナログは、親インスリンと比べて、６未満の変異を含む。別の実施形態では、アナログは、親インスリンと比べて５未満の変異を含む。別の実施形態では、アナログは、親インスリンと比べて、４未満の変異を含む。別の実施形態では、アナログは、親インスリンと比べて３未満の変異を含む。

【００２５】

本明細書で使用される「親インスリン」という表現は、天然に存在するインスリン、すなわち、非変異の、野生型インスリンを指す。一部の実施形態では、親インスリンは、哺乳動物のインスリンなどの動物のインスリンである。例えば、親インスリンは、ヒトインスリンであっても、ブタインスリンであっても、またはウシインスリンであってもよい。

【００２６】

一部の実施形態では、親インスリンはヒトインスリンである。ヒトインスリンの配列は当技術分野で良く知られており、実施例のセクションの表１に示されている。ヒトインスリンは、配列番号１に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号２に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＦＹＴＰＫＴ）を有するＢ鎖を含む。

【００２７】

別の実施形態では、親インスリンはウシインスリンである。ウシインスリンの配列は当技術分野で良く知られている。ウシインスリンは、配列番号８１に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＡＳＶＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号８２に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣ－ＧＥＲＧＦＦＹＴＰＫＡ）を有するＢ鎖を含む。

【００２８】

別の実施形態では、親インスリンはブタインスリンである。ブタインスリンの配列は当技術分野で良く知られている。ブタインスリンは、配列番号８３に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号８４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣ　ＧＥＲＧＦＦＹＴＰＫＡ）を有するＢ鎖を含む。

【００２９】

ヒト、ウシおよびブタのインスリンは、３つのジスルフィド架橋を含む：Ａ６位とＡ１１位のシステイン間の１ジスルフィド架橋、Ａ鎖のＡ７位のシステインとＢ鎖のＢ７位のシステインの間の１ジスルフィド架橋、およびＡ鎖のＡ２０位のシステインとＢ鎖のＢ１９位のシステインの間の１ジスルフィド架橋。

【００３０】

本明細書で提供されるインスリンアナログは、対応する親インスリンの、例えばヒトインスリンのインスリン受容体結合親和性と比較して、減少しているインスリン受容体結合親和性を有する。

【００３１】

インスリン受容体は、ウシ、ブタまたはヒトのインスリン受容体などの任意の哺乳動物のインスリン受容体である。一部の実施形態では、インスリン受容体は、ヒトインスリン受容体、例えば、ヒトインスリン受容体アイソフォームＡまたはヒトインスリン受容体アイソフォームＢ（実施例のセクションで使用されたもの）である。

【００３２】

有利には、本明細書で提供されるヒトインスリンアナログは、ヒトインスリン受容体へのヒトインスリンの結合親和性と比較して、ヒトインスリン受容体に対して著明に低下した結合親和性を有する（実施例を参照されたい）。したがって、インスリンアナログは、極めて低いクリアランス速度、すなわち、極めて低いインスリン受容体媒介クリアランス速度を有する。

【００３３】
一部の実施形態では、インスリンアナログは、その親インスリンと比較して、対応するインスリン受容体への結合親和性２０％未満を有する、すなわち呈する。別の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、その親インスリンと比較して、対応するインスリン受容体への結合親和性１０％未満を有する。別の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、その親インスリンと比較して対応するインスリン受容体への結合親和性５％未満、例えば、その親インスリンと比較して結合親和性３％未満、を有する。例えば、本明細書で提供されるインスリンアナログは、その親インスリンと比較して、対応するインスリン受容体への結合親和性０．１％から１０％の間、例えば、結合親和性０．３％から５％の間を有することができる。また、本明細書で提供されるインスリンアナログは、その親インスリンと比較して、対応するインスリン受容体への結合親和性０．５％から３％の間、例えば、結合親和性０．５％から２％の間を有することができる。
【００３４】
インスリン受容体へのインスリンアナログの結合親和性を決定する方法は、当技術分野で良く知られている。例えば、インスリン受容体結合親和性は、インスリン受容体への、［１２５Ｉ］－標識ヒトインスリンなどの［１２５Ｉ］標識親インスリンと（非標識）インスリンアナログとの間の競合的結合の評価に基づいたシンチレーション近接アッセイによって決定することができる。インスリン受容体は、組換えインスリン受容体を過剰発現する細胞の、例えばＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）細胞の膜に存在する。一実施形態では、インスリン受容体結合親和性は、実施例のセクションに記載のように決定される。
【００３５】
天然に存在するインスリンまたはインスリンアナログがインスリン受容体へ結合すると、インスリンシグナル伝達経路を活性化する。インスリン受容体はチロシンキナーゼ活性を有する。インスリンが受容体へ結合すると、チロシン残基上で、受容体の自己リン酸化を刺激するコンフォメーション変化が誘発される。インスリン受容体の自己リン酸化によって、受容体のチロシンキナーゼ活性が、シグナルの伝達に関与する細胞内基質に向けて刺激される。したがって、インスリンアナログによるインスリン受容体の自己リン酸化は、前記アナログによって引き起こされるシグナル伝達の尺度と考えられる。
【００３６】
実施例のセクションの表１にあるインスリンアナログを、自己リン酸化アッセイに供した。興味深いことに、Ｂ１６位およびＢ２５位に脂肪族置換を有するインスリンアナログは、これらのインスリン受容体結合親和性に対して、予想よりも高いインスリン受容体自己リン酸化を引き起こした。したがって、本明細書で提供されるインスリンアナログは、低い結合活性を有し、その結果、受容体媒介クリアランス速度がより低いが、それでもなお比較的高いシグナル伝達を引き起こすことができる。したがって、本明細書で提供されるインスリンアナログは、長時間作用型インスリンとして使用される可能性がある。一部の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、親インスリン（例えばヒトインスリン）と比べて、インスリン受容体自己リン酸化を１～１０％、例えば２～８％誘導することができる。さらに、一部の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、親インスリン（例えばヒトインスリン）と比べて、インスリン受容体自己リン酸化を３～７％、例えば５～７％誘導することができる。親インスリンと比べたインスリン受容体の自己リン酸化は、実施例のセクションに記載のように決定することができる。
【００３７】
本明細書で提供されるインスリンアナログを、プロテアーゼ安定性アッセイに供した。表３に示すように、本明細書で提供されるインスリンアナログは、ヒトインスリンと比較して、試験したプロテアーゼの少なくとも一部に向けてより高い安定性を有した。タンパク質分解安定性の向上は、α－キモトリプシン、カテプシンＤおよびインスリン分解酵素（ＩＤＥ）に対して観察された。したがって、本明細書で提供されるインスリンアナログは

、典型的には、タンパク質分解安定型インスリンアナログである。したがって、これらは、親インスリンと比べて、プロテアーゼによる分解がより遅い。一部の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、親インスリンと比較して、α－キモトリプシン、カテプシンＤおよびインスリン分解酵素（ＩＤＥ）による分解に対して安定化されている。

【００３８】

上記のように、インスリンアナログは、親インスリンと比較して、少なくとも１つの変異を含む。

【００３９】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異を含む。したがって、Ｂ１６位のアミノ酸（ヒト、ウシおよびブタのインスリンのチロシン）は、疎水性アミノ酸で置き換えられている。

【００４０】

別の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む。したがって、Ｂ２５位のアミノ酸（ヒト、ウシおよびブタのインスリンのフェニルアラニン）は、疎水性アミノ酸で置き換えられている。

【００４１】

別の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む。

【００４２】

疎水性アミノ酸は、任意の疎水性アミノ酸である。例えば、疎水性アミノ酸は、分岐鎖アミノ酸などの脂肪族アミノ酸である。

【００４３】

本明細書で提供されるインスリンアナログの一部の実施形態では、Ｂ１６位および／またはＢ２５位の置換に使用される疎水性アミノ酸は、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、トリプトファン、メチオニン、プロリン、グリシン、フェニルアラニンまたはチロシン（または前述のアミノ酸の誘導体）である。

【００４４】

ヒト、ウシおよびブタのインスリンなどのいくつかの親インスリンは、Ｂ１６位にチロシンを、Ｂ２５位にフェニルアラニンを含む。したがって、親インスリンのＢ１６位のアミノ酸は、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、トリプトファン、メチオニン、プロリン、グリシン、またはフェニルアラニン（または前述のアミノ酸の誘導体）で置換することができる。さらに、親インスリンのＢ２５位のアミノ酸は、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、トリプトファン、メチオニン、プロリン、グリシン、またはチロシン（または前述のアミノ酸の誘導体）で置換することができる。

【００４５】

前述のアミノ酸の誘導体は当技術分野で知られている。

【００４６】

ロイシンの誘導体には、それらに限定されないが、ホモロイシンおよびｔｅｒｔ－ロイシンが含まれる。したがって、Ｂ１６位および／またはＢ２５位のアミノ酸は、ホモロイシンまたはｔｅｒｔ－ロイシンで置換することができる。

【００４７】

バリンの誘導体は、例えば、３－エチルノルバリンである。したがって、Ｂ１６位および／またはＢ２５位のアミノ酸は、３－エチルノルバリンで置換することができる。

【００４８】

グリシンの誘導体には、それらに限定されないが、シクロヘキシルグリシン、シクロプロピルグリシンおよびトリフルオロエチルグリシンが含まれる。

【００４９】

アラニンの誘導体には、それらに限定されないが、ベーター－ｔ－ブチルアラニン、シクロブチル－アラニン、シクロプロピル－アラニンおよびホモ－シクロヘキシルアラニンが含

まれる。
【００５０】
一部の実施形態では、Ｂ１６位および／またはＢ２５位の置換に使用される疎水性アミノ酸は、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、またはトリプトファンである。
【００５１】
一部の実施形態では、脂肪族アミノ酸はアラニンではない。したがって、Ｂ１６位および／またはＢ２５位の置換に使用される疎水性アミノ酸は、イソロイシン、バリン、ロイシン、またはトリプトファンである。
【００５２】
一部の実施形態では、Ｂ１６位および／またはＢ２５位の置換に使用される疎水性アミノ酸は、イソロイシン、バリン、またはロイシンである。
【００５３】
一部の実施形態では、本明細書で言及されるアミノ酸は、Ｌ－アミノ酸（例えば、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－バリン、またはＬ－ロイシン）である。したがって、例えばＢ１６位、Ｂ２５位および／またはＡ１４位の置換に使用されるアミノ酸（またはそれらの誘導体）は、典型的にはＬ－アミノ酸である。
【００５４】
一部の実施形態では、疎水性アミノ酸は脂肪族アミノ酸である。したがって、本明細書で提供されるインスリンアナログは、脂肪族アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異、ならびに脂肪族アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異（ならびに場合により、それらに限定されないが、Ｄｅｓ（Ｂ３０）およびＧｌｕ（Ａ１４）を含むさらなる変異）を含む。
【００５５】
脂肪族アミノ酸は、脂肪族側鎖官能基を含む非極性で疎水性のアミノ酸である。炭化水素鎖上の炭素原子数が増加すると疎水性が高くなる。脂肪族の疎水性の尺度は、Ｋｙｔｅ ａｎｄ Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅスケールによる疎水性指標であり、このスケールは、例えば、Ｋｙｔｅ Ｊ．ら Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ．１９８２ １５７（１）：１０５～３２頁によって開示されるように決定することができる。一部の実施形態では、脂肪族アミノ酸とは、疎水性指標（Ｋｙｔｅ ａｎｄ Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅスケールに準拠）が２．０超、例えば３．０超または３．５超を有する脂肪族アミノ酸である。
【００５６】
脂肪族アミノ酸には、それらに限定されないが、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニンおよびグリシンが含まれる。例えば、脂肪族アミノ酸は、イソロイシン、バリン、ロイシンおよびグリシンから選択されるアミノ酸、例えば、イソロイシン、バリンおよびロイシンから選択されるアミノ酸である。
【００５７】
イソロイシン、バリンおよびロイシンは分岐鎖アミノ酸（略してＢＣＡＡ）である。したがって、脂肪族アミノ酸は分岐鎖アミノ酸である。一部の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、分岐鎖アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異ならびに分岐鎖アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異（ならびに場合により、それらに限定されないが、Ｄｅｓ（Ｂ３０）およびＧｌｕ（Ａ１４）を含むさらなる変異）を含む。
【００５８】
イソロイシン、バリンおよびロイシンなどのアミノ酸であるＢＣＡＡは、非直鎖である脂肪族側鎖を有するアミノ酸である、すなわち、分岐鎖アミノ酸は、分岐（３個以上の炭素原子に結合した中央炭素原子）を伴う脂肪族側鎖を有するアミノ酸である。
【００５９】
分枝鎖アミノ酸は、翻訳中に生合成的にタンパクに組み込まれるアミノ酸、すなわちタンパク質原生のＢＣＡＡであっても、自然にコードされていないかいかなる生物体の遺伝コードにも見いだされないアミノ酸、すなわち非タンパク質原生のＢＣＡＡであっても、よい。例えば、タンパク質原生のＢＣＡＡとは、ロイシン、イソロイシンおよびバリンであ

る。したがって、疎水性／脂肪族アミノ酸である分岐鎖アミノ酸は、ロイシン、イソロイシンまたはバリン（またはロイシン、イソロイシンまたはバリンの誘導体、例えば、上記のロイシンまたはバリンの誘導体）である。

【００６０】

一部の実施形態では、分岐鎖アミノ酸はイソロイシンである。一部の実施形態では、分岐鎖アミノ酸はバリンである。一部の実施形態では、分岐鎖アミノ酸はロイシンである。

【００６１】

上記のＢ１６位の変異および／またはＢ２５位の変異に加えて、本明細書で提供されるインスリンアナログは、親インスリンと比べてさらなる変異を含むことができる。

【００６２】

例えば、インスリンアナログは、Ａ１４位の変異をさらに含むことができる。かかる変異は、プロテアーゼ安定性を高めることが知られている（例えば、ＷＯ２００８／０３４８８１を参照されたい）。一部の実施形態では、Ａ１４位のアミノ酸は、グルタミン酸（Ｇｌｕ）で置換されている。一部の実施形態では、Ａ１４位のアミノ酸は、アスパラギン酸（Ａｓｐ）で置換されている。一部の実施形態では、Ａ１４位のアミノ酸は、ヒスチジン（Ｈｉｓ）で置換されている。

【００６３】

さらに、本明細書で提供されるインスリンアナログは、Ｂ３０位の変異を含むことができる。一部の実施形態では、Ｂ３０位の変異は、親インスリンのＢ３０位のトレオニンの欠失である（Ｄｅｓ（Ｂ３０）－変異とも呼ばれる）。

【００６４】

さらに、本発明のインスリンアナログは、グルタミン酸（Ｇｌｕ）で置換されたＢ３位の変異、および／またはグリシン（Ｇｌｙ）で置換されたＡ２１位の変異をさらに含むことができる。

【００６５】

一実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号２２に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００６６】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号２４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００６７】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号４４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００６８】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号４８に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００６９】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号５０に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００７０】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号５８に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００７１】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号６０に示すアミノ酸

配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００７２】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号６４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００７３】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号６６に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００７４】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号７０に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００７５】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号７８に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００７６】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、配列番号８０に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を含む、またはそれからなる。

【００７７】

上にまとめたＢ鎖は、Ｄｅｓ（Ｂ３０）変異を含む。したがって、親インスリンのＢ３０位に存在するアミノ酸（ヒトインスリンのトレオニン、およびブタおよびウシのインスリンのアラニン）を欠失する、すなわち存在しない。しかし、本発明のアナログのＢ鎖はこの変異を含まない、すなわち、３０位にトレオニンを含むことも、想定される。したがって、本発明のインスリンアナログのＢ鎖は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなることができる：

・ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫＴ　（配列番号８５）
・ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８６）
・ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号８７）
・ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８８）
・ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８９）
・ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９０）
・ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９１）
・ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９２）
・ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９３）
・ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９４）
・ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９５）
・ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９６）
・ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９７）

【００７８】

一実施形態では、本発明のインスリンアナログのＡ鎖は、配列番号１に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ）を含む、またはそれからなる。

【００７９】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＡ鎖は、配列番号４３に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を含む、またはそれからなる。

【００８０】

別の実施形態では、本発明のインスリンアナログのＡ鎖は、配列番号４５に示すアミノ酸

配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＧ）を含む、またはそれからなる。
【００８１】
典型的には、本発明のインスリンアナログは、上記のＡ－鎖およびＢ－鎖を含む。
【００８２】
例えば、本発明のインスリンアナログは、以下からなる群から選択される：
Ｌｅｕ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン、すなわちＬｅｕ（Ｂ１６）－ヒトインスリン）、
Ｖａｌ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン、すなわちＶａｌ（Ｂ１６）－ヒトインスリン）、
Ｉｌｅ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｌｅｕ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例

えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、および
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）。
【００８３】
別の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、以下からなる群から選択される：
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン、すなわちＡｓｐ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、

Ａｓｐ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、および
Ａｓｐ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）。

【００８４】

別の実施形態では、本明細書で提供されるインスリンアナログは、以下からなる群から選択される：
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、

Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）、および
Ｈｉｓ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－インスリン（例えばヒトインスリン）。

【００８５】

別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ１１を参照されたい）。例えば、Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号２１に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号２２に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。

【００８６】

別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ１２を参照されたい）。例えば、Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号２３

に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号２４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。

【００８７】

別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ２２を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号４３に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号４４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。

【００８８】

別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ２４を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号４７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号４８に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。

【００８９】

別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ２５を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号４９に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＧ）を有するＡ鎖および配列番号５０に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。

【００９０】

別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ２９を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号５７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号５８に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。

【００９１】

別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ３０を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号５６に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号６０に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。

【００９２】
別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ３２を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号６３に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号６４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。
【００９３】
別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ３３を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号６５に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＧ）を有するＡ鎖および配列番号６６に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。
【００９４】
別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ３５を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号６９に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号７０に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。
【００９５】
別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ３８を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号７５に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号７６に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。
【００９６】
別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ３９を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号７７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号７８に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。
【００９７】
別の実施形態では、インスリンアナログは、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（例えば、Ｇｌ

ｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン）である。このアナログの配列は、例えば、実施例のセクションの表１に示されている（アナログ４０を参照されたい）。例えば、Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンは、配列番号７９に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＧ）を有するＡ鎖および配列番号８０に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖を含む。

【００９８】

インスリンアナログは、適当とみなされる任意の方法によって製造することができる。例えば、インスリンアナログは、組換え法によってまたは固相合成によって製造することができる。

【００９９】

上に本明細書で与えた定義および説明は、必要な変更を加えて以下に適用される。

【０１００】

本明細書で提供されるインスリンアナログのＢ鎖に関連して上に本明細書で定義されるインスリンＢ鎖、すなわちインスリンＢ鎖ペプチドが、本明細書において提供される。したがって、親インスリンのインスリンＢ鎖と比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンＢ鎖が、本明細書において提供され、ここで、Ｂ鎖は、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異、および／または、疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む。インスリンＢ鎖は、ｄｅｓ（Ｂ３０）欠失など、上に本明細書に記載のさらなる変異を含むことができる。

【０１０１】

また、本明細書で提供されるインスリンアナログのインスリンＡ鎖および／またはインスリンＢ鎖を含むプロインスリンも、本明細書において提供される。Ｂ鎖は、本明細書で提供されるインスリンアナログについて本明細書で上に定義される任意のＢ鎖である。例えば、インスリンＡ鎖およびインスリンＢ鎖を含むプロインスリンが、本明細書において提供され、ここで、前記Ｂ鎖は、親インスリンのＢ鎖と比べて少なくとも１つの変異を含み、ここで、変異は、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位にありおよび／または疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位にある。インスリンＢ鎖は、Ｂ鎖について上に本明細書で記載のさらなる変異を含むことができる。

【０１０２】

本明細書で提供されるプロインスリンが含むＡ鎖は、本明細書で提供されるインスリンアナログについて本明細書で上に定義される任意のＡ鎖である。一部の実施形態では、前記プロインスリンのＡ鎖は、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）およびヒスチジン（Ｈｉｓ）から選択されるアミノ酸で置換されたＡ１４位の変異を含む。

【０１０３】

インスリンＡ鎖および／またはインスリンＢ鎖に加えて、本明細書で提供されるプロインスリンは、リーダー配列またはＣペプチドなどのさらなるエレメントを含むことができる。一部の実施形態では、プロインスリンは、インスリンＢ鎖とインスリンＡ鎖との間に位置するＣペプチドをさらに含むことができる。Ｃペプチドは、長さ４～９個のアミノ酸などの、長さ４～１０個のアミノ酸を有することができる。配向は以下の通りである（Ｎ末端からＣ末端へ）：Ｂ鎖、Ｃペプチド、Ａ鎖。

【０１０４】

本明細書で提供されるインスリンアナログ、インスリンＢ鎖、およびプロインスリンをコードするポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。前記ポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドの発現を可能にするプロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態では、プロモーターは、前記ポリヌクレオチドに対して異種である。一部の実施形態では、プロモーターは構成的プロモーターである。別の実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。

【０１０５】

さらに、本明細書で提供されるインスリンアナログをコードするポリヌクレオチドを含むベクターが、本明細書において提供される。一部の実施形態では、前記ベクターは発現ベクターである。

【０１０６】

本明細書で提供される、インスリンアナログ、インスリンＢ鎖、およびプロインスリンをコードする核酸、ポリヌクレオチド、および／またはベクターを含む宿主細胞が、本明細書において提供される。一部の実施形態では、宿主細胞は、エスケリキア属に属する細胞、例えば大腸菌細胞などの細菌細胞である。別の実施形態では、宿主細胞は、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）細胞またはクルイベロミセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　ｌａｃｔｉｓ）細胞などの酵母細胞である。

【０１０７】

本明細書で提供されるインスリンアナログの医薬的に有効な量と医薬的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が、本明細書において提供される。

【０１０８】

本明細書で提供される１つまたはそれ以上のインスリンアナログまたはそれらの医薬組成物の医薬的に有効な量を対象に投与する工程を含む、疾患を処置する方法が、本明細書において提供される。

【０１０９】

一部の実施形態では、疾患は、ＩＩ型真性糖尿病などの真性糖尿病である。

【０１１０】

医学において使用するためのインスリンアナログまたはそれらの医薬組成物が、本明細書において提供される。

【０１１１】

ＩＩ型真性糖尿病などの真性糖尿病の処置に使用するためのインスリンアナログまたはそれらの医薬組成物が、本明細書において提供される。

【０１１２】

最終的には、ＩＩ型真性糖尿病などの真性糖尿病の処置のための医薬または薬物の製造のための、本明細書で提供されるインスリンアナログまたはそれらの医薬組成物の使用が、本明細書において提供される。

【発明を実施するための形態】

【０１１３】

インスリンアナログ、インスリンＢ鎖、プロインスリン、および使用について、以下の実施形態およびそれぞれの従属性および後方参照によって示される実施形態の組合せによってさらに例示する。上に本明細書で与えた定義および説明は、必要な変更を加えて、以下の実施形態に適用される。

【０１１４】

１．親インスリンと比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンアナログであって、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む、インスリンアナログ。

【０１１５】

２．親インスリンは、ヒトインスリン、ブタインスリン、またはウシインスリンである、実施形態１のインスリンアナログ。

【０１１６】

３．Ｂ１６位および／またはＢ２５位の疎水性アミノ酸は脂肪族アミノ酸である、実施形態１または２のインスリンアナログ。

【０１１７】

４．Ｂ１６位および／またはＢ２５位の前記脂肪族アミノ酸は、バリン（Ｖａｌ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）およびロイシン（Ｌｅｕ）からなる群から選択される分岐鎖アミノ酸などの、分岐鎖アミノ酸である、実施形態１～３のいずれか１つのインスリンアナログ。

【０１１８】

５．前記インスリンアナログは、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）およびヒスチジン（Ｈｉｓ）からなる群から選択されるアミノ酸で置換されたＡ１４位の変異をさらに含む、実施形態１～３のいずれか１つのインスリンアナログ。

【０１１９】

６．前記インスリンアナログはＢ３０位の変異をさらに含み、例えば、ここで、Ｂ３０位の変異は親インスリンのＢ３０位のアミノ酸の欠失である（Ｄｅｓ（Ｂ３０）－変異）、実施形態１～５のいずれか１つのインスリンアナログ。

【０１２０】

７．前記インスリンアナログは、グルタミン酸（Ｇｌｕ）で置換されたＢ３位の変異をさらに含む、実施形態１～６のいずれか１つのインスリンアナログ。

【０１２１】

８．前記インスリンは、グリシン（Ｇｌｙ）で置換されたＡ２１位の変異をさらに含む、実施形態１～７のいずれか１つのインスリンアナログ。

【０１２２】

９．インスリンアナログのＢ鎖は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、実施形態１～８のいずれか１つのインスリンアナログ：

ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫ　（配列番号２２）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号４４）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号４８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号５０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号５８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号６０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号６４）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号６６）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号７０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号７６）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号７８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号８０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫＴ　（配列番号８５）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８６）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号８７）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８９）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９０）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９１）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９２）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９３）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９４）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９５）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９６）、および
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９７）

【０１２３】

１０．以下

（ａ）配列番号４３に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖
および配列番号４４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を有するＢ鎖、
（ｂ）配列番号４７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖

および配列番号４８に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖、または
（ｃ）配列番号７７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号７８に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖
を含む、実施形態１～９のいずれか１つのインスリンアナログ。
【０１２４】
１１．以下からなる群から選択されるインスリンアナログ：
Ｌｅｕ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、

Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、および
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン。

【０１２５】

１２．親インスリンのＢ鎖と比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンＢ鎖であって、Ｂ鎖は、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異、および／または疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む、インスリンＢ鎖。

【０１２６】

１３．親インスリンは、ヒトインスリン、ブタインスリン、またはウシインスリンである、実施形態１２によるインスリンＢ鎖。

【０１２７】

１４．Ｂ１６位および／またはＢ２５位の疎水性アミノ酸は脂肪族アミノ酸である、実施形態１２または１３によるインスリンＢ鎖。

【０１２８】

１５．前記脂肪族アミノ酸は、バリン（Ｖａｌ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）およびロイシン（Ｌｅｕ）からなる群から選択される分岐鎖アミノ酸などの、分岐鎖アミノ酸である、実施形態１２～１４のいずれか１つによるインスリンＢ鎖。

【０１２９】

１６．前記インスリンＢ鎖は、グルタミン酸（Ｇｌｕ）で置換されたＢ３位の変異をさらに含む、実施形態１２～１５のいずれか１つによるインスリンＢ鎖。

【０１３０】

１７．前記インスリンＢ鎖は、Ｂ３０位の変異をさらに含み、Ｂ３０位の変異は親インスリンのＢ３０位のアミノ酸の欠失である（Ｄｅｓ（Ｂ３０）－変異）、実施形態１２～１６のいずれか１つによるインスリンＢ鎖。

【０１３１】

１８．インスリンＡ鎖およびインスリンＢ鎖を含むプロインスリンであって、インスリンＢ鎖は、親インスリンのＢ鎖と比べて少なくとも１つの変異を含み、Ｂ鎖は、疎水性アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異、および／または疎水性アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む、プロインスリン。

【０１３２】

１９．前記プロインスリンのインスリンＡ鎖は、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）およびヒスチジン（Ｈｉｓ）から選択されるアミノ酸で置換されたＡ１４位の変異を含む、実施形態１８のプロインスリン。

【０１３３】

２０．親インスリンは、ヒトインスリン、ブタインスリン、またはウシインスリンである、実施形態１８または１９によるプロインスリン。

【０１３４】

２１．Ｂ１６位および／またはＢ２５位の疎水性アミノ酸は脂肪族アミノ酸である、実施形態１８～２０のいずれか１つによるプロインスリン。

【０１３５】

２２．前記脂肪族アミノ酸は、バリン（Ｖａｌ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）およびロイシ

ン（Ｌｅｕ）からなる群から選択される分岐鎖アミノ酸などの、分岐鎖アミノ酸である、実施形態１８～２１のいずれか１つによるプロインスリン。
【０１３６】
２３．前記プロインスリンは、グルタミン酸（Ｇｌｕ）で置換されたＢ３位の変異をさらに含む、実施形態１８～２２のいずれか１つによるプロインスリン。
【０１３７】
２４．前記プロインスリンは、Ｂ３０位の変異をさらに含み、Ｂ３０位の変異は親インスリンのＢ３０位のアミノ酸の欠失である（Ｄｅｓ（Ｂ３０）－変異）、実施形態１８～２３のいずれか１つによるプロインスリン。
【０１３８】
２５．実施形態１～１１のいずれか１つのインスリンアナログ、実施形態１２～１７のいずれか１つのインスリンＢ鎖、および／または実施形態１８～２４のいずれか１つのプロインスリンをコードするポリヌクレオチド。
【０１３９】
２６．実施形態２５のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【０１４０】
２７．実施形態１～１１のいずれか１つのインスリンアナログ、実施形態１２～１７のいずれか１つのインスリンＢ鎖、実施形態１８～２４のいずれか１つのプロインスリン、実施形態２５のポリヌクレオチド、および／または実施形態２６の発現ベクター
を含む宿主細胞。
【０１４１】
２８．実施形態１～１１のいずれか１つに定義される１つまたはそれ以上のインスリンアナログを患者に投与する工程を含む、真性糖尿病を有する患者を処置する方法。
【０１４２】
２９．真性糖尿病の処置に使用するための、実施形態１～１１のいずれか１つに定義されるインスリンアナログ。
【０１４３】
本明細書に引用されるすべての参考文献は、その開示内容全体および本明細書で特に述べる開示内容に関して、参照によって本明細書に組み入れる。
【実施例】
【０１４４】
実施例１：ヒトインスリンおよびインスリンアナログの産生
ヒトインスリンならびにインスリンアナログを、組換え的に産生した。プレプロインスリンをコードするポリヌクレオチドを、Ｇｅｎｅａｒｔ（登録商標）から注文した。設計したポリヌクレオチドを、酵母での発現向けに最適化した。それらを、クルイベロミセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　ｌａｃｔｉｓ）Ｋで機能的な発現と分泌を可能にする古典的な制限クローニングによって発現ベクターに挿入した。分泌リーダーとして、遺伝子を、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のアルファ接合因子シグナルをコードするＤＮＡ配列にＣ末端で融合させた。組換え遺伝子発現を、ラクトース誘導性Ｋ．ラクチスのプロモーターによって制御した。
【０１４５】
ヒトインスリンおよびインスリンアナログを、プレプロインスリンとして製造した。遺伝的に融合したＮ末端プレ配列を使用して、発現および分泌の収率を改善し、培養液中でペプチドを安定化させた。幅広い種類の配列がこの目的に使用することができ、これらを効率について試験した。プロインスリン自体は、Ｃペプチドに融合したＢ鎖と、これに続くＣ末端のＡ鎖からなる。Ｃ－ペプチドとして、種々のアミノ酸の組合せが記載されている。１～１０個のアミノ酸の短ペプチドがＣ配列としてうまく機能することが示された。インスリンのその後のプロセシングについては、Ｃ－ペプチドに隣接してその切出しを可能にする、特定のプロテアーゼに対する認識部位が重要である。

【０１４６】
Ｋ．ラクチス細胞を、化学的手段によってコンピテントとした。その後に、細胞を、それぞれのプレプロインスリンをコードする発現プラスミドで形質転換した。プラスミドの挿入後、細胞を、ｇｅｎｅｔｉｃｉｎを含有する選択寒天プレートにプレーティングした。増殖したコロニーを分離し、組換え遺伝子発現について試験した。細胞を、ｇｅｎｅｔｉｃｉｎを補充した酵母ペプトンデキストロース培地中で十分に高い細胞密度まで増殖させた。最初の増殖期の後、ラクトースを補充したｇｅｎｅｔｉｃｉｎを含む塩緩衝酵母エキス培地を培養物に添加して、組換え遺伝子の発現を誘導した。培養物を数日間増殖させ、上清を遠心分離により回収した。
【０１４７】
機能性インスリンまたはインスリンアナログの精製を、濾過手順によって開始した。最初のクロマトグラフィーキャプチャ手順を、イオン交換樹脂を用いて行った。プレプロインスリンからインスリンへの切断を、高度に特異的なプロテアーゼを用いて、実行した。宿主細胞タンパク質、プレ配列、および生成物の関連製品の除去を、さらなる２つのクロマトグラフィーステップのカスケードによって行った。疎水性相互作用クロマトグラフィーの次に、この目的を達成するために別のイオン交換手順を適用した。最終ポリシングを逆相クロマトグラフィーにより行った。濾過、沈殿および凍結乾燥を使用して、インスリン分子の生産プロセスを完了した。
【０１４８】
活性化カルボン酸誘導体とのカップリング反応の後、コンジュゲートしたインスリン分子を含む溶液を濾過した。最終精製は逆相クロマトグラフィーにより行った。濾過、沈殿および凍結乾燥を使用して、標的分子の合成を完了した。
【０１４９】
例えばＢ１６位、Ｂ２５位および／またはＡ１４位の変異を有する種々のインスリンアナログを生成した。表１に、生成したインスリンの概要を提供する。
【０１５０】

【表１】

表 1:ヒトインスリンの生成されたアナログ

アナログ	骨格	A14	B16	B25	アミノ酸配列　A鎖	配列番号 (A鎖)	アミノ酸配列　B鎖	配列番号 (B鎖)
WT	ヒトインスリン(野生型)	Tyr	Tyr	Phe	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	1	FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFFYTPKT	2
2	Glu(A14)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Phe	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCN	3	FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFFYTPK	4
3	Leu(B16)Des(B30)-インスリン	Tyr	Leu	Phe	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	5	FVNQHLCGSHLVEALLLVC GERGFFYTPK	6
4	Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-インスリン	Tyr	Trp	Phe	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCG	7	FVNQHLCGSHLVEALWLVC GERGFFYTPK	8
5	His(B16)Des(B30)-インスリン	Tyr	His	Phe	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	9	FVNQHLCGSHLVEALHLVC GERGFFYTPK	10
6	Val(B16)Des(B30)-インスリン	Tyr	Val	Phe	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	11	FVNQHLCGSHLVEALVLVC GERGFFYTPK	12
7	Ala(B25)-インスリン	Tyr	Tyr	Ala	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	13	FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFAYTPKT	14
8	Ala(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Ala	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	15	FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFAYTPK	16
9	Glu(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Glu	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	17	FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFEYTPK	18
10	His(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	His	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	19	FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFHYTPK	20
11	Leu(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Leu	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	21	FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFLYTPK	22
12	Val(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Val	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	23	FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFVYTPK	24
13	His(B16)His(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	His	His	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCN	25	FVNQHLCGSHLVEALHLVC GERGFHYTPK	26
14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Trp	His	GIVEQCCTSICSLYQLE NYCG	27	FVNQHLCGSHLVEALWLVC GERGFHYTPK	28

【表２】

15	Gly(A21)Trp(B16)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Trp	Trp	GIVEQCCTSICSLYQLENYCG	29	FVNQHLCGSHLVEALWLVCGERGFWYTPK	30
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	His	Phe	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	31	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFFYTPK	32
17	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	Trp	Phe	GIVEQCCTSICSLEQLENYCG	33	FVNQHLCGSHLVEALWLVCGERGFFYTPK	34
18	Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Phe	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	35	FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFFYTPK	36
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Phe	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	37	FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFFYTPK	38
20	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Phe	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	39	FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFFYTPK	40
21	Glu(A14)His(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	His	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	41	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFHYTPK	42
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Ile	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	43	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK	44
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Trp	GIVEQCCTSICSLEQLENYCG	45	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFWYTPK	46
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Val	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	47	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK	48
25	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Val	GIVEQCCTSICSLEQLENYCG	49	FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK	50
26	Glu(A14)Glu(B16)His(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Glu	His	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	51	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPK	52
27	Glu(A14)His(B16)Ala(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	His	Ala	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	53	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFAYTPK	54
28	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	His	His	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	55	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK	56
29	Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Ile	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	57	FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK	58
30	Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Ile	GIVEQCCTSICSLEQLENYCN	59	FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK	60

【表３】

31	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Trp	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCG	61	FVEQHLCGSHLVEALILVC GERGFWYTPK	62
32	Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Val	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCN	63	FVNQHLCGSHLVEALILVC GERGFVYTPK	64
33	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Val	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCG	65	FVEQHLCGSHLVEALILVC GERGFVYTPK	66
34	Glu(A14)Leu(B16)Ala(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Leu	Ala	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCN	67	FVNQHLCGSHLVEALLLVC GERGFAYTPK	68
35	Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Ile	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCN	69	FVNQHLCGSHLVEALVLVC GERGFIYTPK	70
36	Glu(A14)Gly(A21)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Trp	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCG	71	FVNQHLCGSHLVEALVLVC GERGFWYTPK	72
37	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Trp	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCG	73	FVEQHLCGSHLVEALVLVC GERGFWYTPK	74
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Val	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCN	75	FVNQHLCGSHLVEALVLVC GERGFVYTPK	76
39	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Val	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCN	77	FVEQHLCGSHLVEALVLVC GERGFVYTPK	78
40	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Val	GIVEQCCTSICSLEQLE NYCG	79	FVEQHLCGSHLVEALVLVC GERGFVYTPK	80

【０１５１】

実施例２：インスリン受容体結合親和性アッセイ／インスリン受容体自己リン酸化アッセイ

生成した種々のインスリンアナログのインスリン結合およびシグナル伝達を、結合アッセイおよび受容体自己リン酸化アッセイによって決定した。

【０１５２】

Ａ）インスリン受容体結合親和性アッセイ

表１にリストされたアナログに対するインスリン受容体結合親和性を、Ｈａｒｔｍａｎｎら（Ｅｆｆｅｃｔ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｌｏｎｇ－ａｃｔｉｎｇ　ｉｎｓｕｌｉｎ　ａｎａｌ

ｏｇｓ ｇｌａｒｇｉｎｅ ａｎｄ ｄｅｇｌｕｄｅｃ ｏｎ ｃａｒｄｉｏｍｙｏｃｙｔｅ ｃｅｌｌ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ Ｄｉａｂｅｔｏｌ．２０１６；１５：９６頁）に記載のように、決定した：インスリン受容体に埋め込まれた原形質膜（Ｍ－ＩＲ）の分離および競合結合実験を、先に記載のように実行した（Ｓｏｍｍｅｒｆｅｌｄら、ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１０；５（３）：ｅ９５４０）。簡潔にいえば、ＩＲを過剰発現するＣＨＯ細胞を収集し、氷冷２．２５ＳＴＭバッファー（２．２５Ｍスクロース、５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．４、５ｍＭ $MgCl_2$、ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ）に再懸濁し、ダウンスホモジナイザーを使用して破砕し、これに続いて超音波処理した。ホモジネートを０．８ ＳＴＭバッファー（０．８Ｍスクロース、５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．４、５ｍＭ $MgCl_2$、ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ）でオーバーレイし、１００，０００ｇで９０分間超遠心分離した。界面の原形質膜を収集し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で２回洗浄した。最終ペレットを希釈バッファー（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．４、５ｍＭ $MgCl_2$、ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ）に再懸濁し、ダウンスホモジナイザーで再度ホモジナイズした。競合結合実験を、９６ウェルマイクロプレートで結合バッファー（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．１％ＢＳＡ、ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ、ｐＨ７．８に調整）中で実行した。各ウェルで、分離膜２μｇを、小麦胚芽凝集素、ポリビニルトルエンポリエチレンイミン シンチレーション近接アッセイ（ＳＰＡ）のビーズ０．２５ｍｇとともにインキュベートした。一定濃度の［１２５Ｉ］標識ヒトインスリン（１００ｐＭ）および種々の濃度のそれぞれの非標識インスリン（０．００１～１０００ｎＭ）を室温（２３℃）で１２時間添加した。放射能を、マイクロプレート・シンチレーションカウンター（Ｗａｌｌａｃ Ｍｉｃｒｏｂｅｔａ、Ｆｒｅｉｂｕｒｇ、ドイツ）で平衡状態で測定した。

【０１５３】

ヒトインスリンに対する試験アナログのインスリン受容体結合親和性アッセイの結果を表２に示す。

【０１５４】

Ｂ） インスリン受容体自己リン酸化アッセイ（シグナル伝達の尺度として）

インスリン受容体Ｂに結合するインスリンアナログのシグナル伝達を決定するために、自己リン酸化をｉｎ ｖｉｔｒｏで測定した。ヒトインスリン受容体アイソフォームＢ（ＩＲ－Ｂ）を発現するＣＨＯ細胞を、先に記載のようにＩｎ－Ｃｅｌｌ Ｗｅｓｔｅｒｎ技術を使用したＩＲ自己リン酸化アッセイに使用した（Ｓｏｍｍｅｒｆｅｌｄら、ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１０；５（３）：ｅ９５４０）。ＩＧＦ１Ｒ自己リン酸化の分析の場合、ＩＧＦ１Ｒテトラサイクリン調節性発現プラスミドを安定的にトランスフェクトしたマウス胎児線維芽細胞３Ｔ３ Ｔｅｔ ｏｆｆ細胞株（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ、ドイツ）において受容体を過剰発現させた。受容体のチロシンリン酸化レベルを決定するために、細胞を９６ウェルプレートに播種し、４４時間増殖させた。細胞を、無血清培地ハムＦ１２培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｄａｒｍｓｔａｄｔ、ドイツ）で２時間血清飢餓とした。これに続いて、ヒトインスリンまたはインスリンアナログのいずれかの濃度を上昇させて、細胞を３７℃で２０分間処理した。インキュベーション後、培地を捨て、細胞を新たに調製した３．７５％パラホルムアルデヒドで２０分間固定した。細胞を、ＰＢＳの０．１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で２０分間透過処理した。ブロッキングを、Ｏｄｙｓｓｅｙブロッキングバッファー（ＬＩＣＯＲ、Ｂａｄ Ｈｏｍｂｕｒｇ、ドイツ）で室温で１時間実行した。抗ｐＴｙｒ ４Ｇ１０（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｓｃｈｗａｌｂａｃｈ、ドイツ）を室温で２時間インキュベートした。一次抗体のインキュベーション後、細胞をＰＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、米国）で洗浄した。二次抗マウス－ｌｇＧ－８００－ＣＷ抗体（ＬＩＣＯＲ、Ｂａｄ Ｈｏｍｂｕｒｇ、ドイツ）を１時間インキュベートした。結果を、ＴＯ－ＰＲＯ３染料（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｋａｒｌｓｒｕｈｅ、ドイ

ツ）でのＤＮＡの定量化によって標準化した。データを相対単位（ＲＵ）として得た。

【０１５５】

ヒトインスリンと比べた試験アナログのインスリン受容体自己リン酸化アッセイの結果を表２に示す。

【０１５６】

【表４】

表 2:ヒトインスリンの試験アナログの相対インスリン受容体結合親和性および自己リン酸化活性(配列については表 1 を参照されたい)。

アナログ	骨格	A14	B16	B25	インスリン受容体結合親和性*	自己リン酸化活性*
WT	ヒトインスリン(野生型)	Tyr	Tyr	Phe	1	1
2	Glu(A14)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Phe	1.05	0.87
3	Leu(B16)Des(B30)-インスリン	Tyr	Leu	Phe	0.24	0.34
4	Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-インスリン	Tyr	Trp	Phe	0.57	0.4
5	His(B16)Des(B30)-インスリン	Tyr	His	Phe	nd	nd
6	Val(B16)Des(B30)-インスリン	Tyr	Val	Phe	nd	0.32
7	Ala(B25)-インスリン	Tyr	Tyr	Ala	0.05	0.2
8	Ala(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Ala	nd	0.17
9	Glu(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Glu	nd	nd
10	His(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	His	0.37	0.31
11	Leu(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Leu	0.01	0.06
12	Val(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Val	0.01	0.06
13	His(B16)His(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	His	His	0.11	0.1
14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Trp	His	0.4	0.35
15	Gly(A21)Trp(B16)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Trp	Trp	0.43	0.38
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	His	Phe	0.36	0.29
17	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	Trp	Phe	0.63	0.38
18	Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Phe	0.23	0.18
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Phe	nd	0.32
20	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Phe	0.4	0.28
21	Glu(A14)His(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	His	nd	nd
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Ile	0.01	0.04
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Trp	0.56	0.37
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Val	0.01	0.04

【表５】

25	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Val	0.02	0.03
26	Glu(A14)Glu(B16)His(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Glu	His	0.01	0.07
27	Glu(A14)His(B16)Ala(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	His	Ala		0.11
28	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	His	His	0.12	0.11
29	Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Ile		0.01
30	Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Ile	0**	0.01
31	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Trp	0.12	0.13
32	Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Val	0	0.04
33	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Ile	Val	0.01	0.02
34	Glu(A14)Leu(B16)Ala(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Leu	Ala	0.01	0.04
35	Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Ile	0	0.01
36	Glu(A14)Gly(A21)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Trp	0.17	0.23
37	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Trp	0.21	0.19
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Val	0	0.03
39	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Val	0	0.02
40	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Val	0.01	0.01

*ヒトインスリンとの比較、*nd*:未決定

**0 の値は、結合親和性が検出限界未満であったことを意味する

【０１５７】

Ｃ）　結論

表２から導き出せる通り、Ｂ１６位および／またはＢ２５位の種々の疎水性置換について試験した（トリプトファン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）。程度が異なるにもかかわらず、これらの位置に疎水性置換を有する試験インスリンアナログすべてが、インスリン受容体結合活性の減少を示した。Ｔｒｐ置換（例えば、アナログ４、１５および２３を参照されたい）と比較して、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンなどの脂肪族アミノ酸による置換は、インスリン受容体結合活性に対してより強い影響を有した。最も強い効果は、分岐鎖アミノ酸であるバリン、ロイシンおよびイソロイシ

ンで観察された。イソロイシン、バリンおよびロイシンでの置換によって、インスリン受容体結合活性の著明な減少がもたらされた。興味深いことに、Ｂ２５位のかかる置換を有するインスリンアナログは（Ｂ２５位のバリン、ロイシン、またはイソロイシン置換などの、１１、１２、２２、２４、２５、２９、３０、３２、３３、３５、３８、３９、４０の各アナログ）、それらのＩＲ－Ｂ結合親和性に基づく予想よりも、シグナル伝達において、６倍までの高まりを示した。具体的には、Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンおよびＶａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリン（それぞれアナログ１１および１２）によれば、ヒトインスリンと比べて、インスリン受容体Ｂへの結合はわずか１％を示したが、自己リン酸化は６％を示した。同様に、Ｂ１６位の単一ロイシン置換（アナログ３）も、程度がわずかにより低いながら、シグナル伝達において同様の高まりを示した。比較すると、アナログ２６を別として、ヒスチジンＢ２５の置換を保有するアナログ（１０、１３、１４、２１、２８の各アナログ）もまた、受容体結合の低下を示したが、自己リン酸化の随伴性減少を示した。

【０１５８】

一部の例では（３０、３２、３５、３８、３９の各アナログ）、インスリン受容体結合は０％であったが、一方、自己リン酸化アッセイで依然として活性を示した。これらのアナログはすべて、共通して、Ｂ１６位およびＢ２５位のバリン置換および／またはイソロイシン置換の組合せを有するが、このことから、その組合せがインスリン受容体結合のさらなる低下の要因であることが、示唆される。Ｂ２５位の置換がないが、Ｂ１６位の交換があるインスリンは、それらの自己リン酸化値と比較してわずかにより高い結合親和性を呈した（アナログ３、４、１６、１７、１８、１９、２０の各アナログ）。

【０１５９】

Ｂ２５位のアラニンは、バリン、ロイシンまたはイソロイシンの置換（１１、１２、２２の各アナログ）と同様の効果を示したが、より低い程度であった。バリン、ロイシンまたはイソロイシンの置換を有するアナログの受容体結合親和性および自己リン酸化活性は、アラニン置換を有するアナログよりも低かった。

【０１６０】

実施例３：様々な組換えプロテアーゼおよび人工胃液における ｉｎ ｖｉｔｒｏ 安定性の決定

インスリンアナログを、タンパク質分解安定性（α－キモトリプシン、カテプシンＤ、インスリン分解酵素（ＩＤＥ）および擬似胃液）について試験した。

【０１６１】

Ａ） アッセイ条件

【表６】

プロテアーゼ	アッセイ中の最終プロテアーゼ濃度 [μg/ml]	使用したバッファー系
トリプシン	2	0.1M 重炭酸アンモニウム, pH 8.3
α-キモトリプシン	0.5	0.1M 重炭酸アンモニウム, pH 8.3
カルボキシペプチダーゼＡ	0.1	TCNB-バッファー中のトリプシンによる事前活性化(60 分)、アッセイ Tris-バッファー　7.5
カルボキシペプチダーゼＢ	0.1	TCNB-バッファー中のトリプシンによる事前活性化(30 分)、アッセイ Tris-バッファー　7.5
カテプシンＤ	2	酢酸バッファー、pH4.5
IDE	2	Tris-バッファー　pH7.5

【０１６２】

Ｂ）　擬似胃液の調製

塩化ナトリウム２グラムと精製ペプシン３．２ｇ（ブタ胃粘膜由来、タンパク質１ｍｇ当たり８００～２５００単位の活性を有する）を塩酸７．０ｍｌに溶解した。体積を水で１０００ｍｌまで調整した。生成する溶液を混合し、０．２Ｎ水酸化ナトリウムまたは０．２Ｎ塩酸いずれかでｐＨ１．２±０．１に調整した。

【０１６３】

Ｃ）　一般アッセイ手順

安定性の決定は、適当な時点（ＳＩＦおよびＳＧＦについては１５、３０、６０、１２０および２４０分；プロテアーゼについては１５、３０、６０および１２０分）を使用して行った。インキュベーションを３７℃で行い、残存する親化合物の％をＴ０時点を参照して計算した。

親化合物の決定については、エタノール（１ｅｑ．ｖ／ｖ）によるタンパク質沈殿および遠心分離ステップの後に、上清を使用して、適当な生物分析ＬＣ－ＭＳ／ＭＳまたはＬＣ－ＨＲＭＳ法を使用した。

【０１６４】

Ｄ）　サンプルの調製

化合物を最終濃度４０μＭで希塩酸に溶解した。アッセイにおける化合物濃度を２μＭとした。希釈標準溶液の１：２０希釈をプロテアーゼバッファーへと行い、次いでサンプルを３７℃で撹拌しながらインキュベートした。適当な時点においてアリコートを採取し、反応をエタノール（１ｅｑ．ｖ／ｖ）でクエンチし、次いで遠心分離した。上清を分析した。

【０１６５】

Ｅ）　結論

特に、Ｂ鎖の１６位と２５位のバリンおよびイソロイシンなどの親油性アミノ酸置換について調査した。試験したアナログ（２、７、１１、１２、１４、１６、１９、２２、２３、２４、および３８）のうち、ヒトインスリンと比べて、トリプシン、カルボキシペプチダーゼＡおよびカルボキシペプチダーゼＢの各プロテアーゼに対して、安定性に関して軽微な差のみが観察された（データ示さず）。全体として、Ａ１４およびＢ２５の置換を保

有するすべてのアナログ（２２、２４、３８の各アナログ）が、α－キモトリプシン、カテプシンＤおよびインスリン分解酵素（ＩＤＥ）に対してタンパク質分解安定性の向上を示した。例えば、α－キモトリプシンの場合、ヒトインスリンは２時間以内に完全に分解したが、一方、アナログ２２はほぼ完全に耐性であった。同様に、試験したすべてのＢ２５置換アナログは、カテプシンＤに対して安定性の向上を示したが、アナログ３８（Ｂ１６／Ｂ２５バリアント）は他のＢ２５バリアントと比較して優れた安定性を示した。

【０１６６】

注目すべき一例外がＩＤＥの場合に観察され、Ａ１４／Ｂ１６置換を有するアナログ１９は、Ｂ２５バリアントと比較し成績の改善を示した。しかし、データが示唆するところは、グルタミン酸を用いて本実施例で試験した、Ａ１４の置換が安定性の向上に重要である、ことである。他の置換も、安定性の向上に有益であることが示された：例えば、Ｂ１６位のおよびＢ２５位の置換である。例えば、Ｂ２５位にアミノ酸交換を有するアナログ７は、不安定性の上昇という結果をもたらした。

【０１６７】

【表７】

表 3:様々なインスリンアナログを 4 種の異なるプロテアーゼとともに 30 分間または 120 分間インキュベートした後の残存インスリンアナログのパーセント(試験したアナログの配列については、表 1 を参照されたい)。

アナログ	骨格	A14	B16	B25	胃液 (30 分) [%]	α-キモトリプシン (120 分) [%]	カテプシン D (30 分) [%]	インスリン分解酵素、IDE (30 分)[%]
WT	インスリン	Tyr	Tyr	Phe	0	5	0	38
2	Glu(A14)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Phe	0	35	0	81
7	Ala(B25)-インスリン	Tyr	Tyr	Ala	30	58	52	2
11	Leu(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Leu	nd	nd	nd	12
12	Val(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Tyr	Val	44	31	43	11
14	Gly(A21)Trp(B16) His(B25)Des(B30)-インスリン	Tyr	Trp	His	nd	nd	nd	41
16	Glu(A14)His(B16) Des(B30)-インスリン	Glu	His	Phe	nd	nd	nd	88
19	Glu(A14)Val(B16) Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Phe	0	30	0	98
22	Glu(A14)Ile(B25) Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Ile	52	99	20	77
23	Glu(A14)Gly(A21) Trp(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Trp	nd	nd	nd	80
24	Glu(A14)Val(B25) Des(B30)-インスリン	Glu	Tyr	Val	52	40	59	86
38	Glu(A14)Val(B16) Val(B25)Des(B30)-インスリン	Glu	Val	Val	36	34	62	86

nd:未決定

【０１６８】

項

以下の項は、本明細書の一部である：

【０１６９】

１．親インスリンと比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンアナログであって、インスリンアナログは、分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含む、インスリンアナログ。

【０１７０】

２．親インスリンは、ヒトインスリン、ブタインスリン、またはウシインスリンである、

項１のインスリンアナログ。
【０１７１】
３．分岐鎖アミノ酸は、バリン（Ｖａｌ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）およびロイシン（Ｌｅｕ）からなる群から選択される、項１または２のインスリンアナログ。
【０１７２】
４．前記インスリンアナログは、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）およびヒスチジン（Ｈｉｓ）からなる群から選択されるアミノ酸で置換されたＡ１４位の変異をさらに含む、項１～３のいずれか１項のインスリンアナログ。
【０１７３】
５．前記インスリンアナログは、Ｂ３０位の変異をさらに含む、項１～４のいずれか１項のインスリンアナログ。
【０１７４】
６．Ｂ３０位の変異は、親インスリンのＢ３０位のアミノ酸の欠失である（Ｄｅｓ（Ｂ３０）－変異）、項５のインスリンアナログ。
【０１７５】
７．前記インスリンアナログは、グルタミン酸（Ｇｌｕ）で置換されたＢ３位の変異をさらに含む、項１～６のいずれか１項のインスリンアナログ。
【０１７６】
８．前記インスリンは、グリシン（Ｇｌｙ）で置換されたＡ２１位の変異をさらに含む、項１～７のいずれか１項のインスリンアナログ。
【０１７７】
９．インスリンアナログのＢ鎖は、以下：
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫ　（配列番号２２）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号４４）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号４８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号５０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号５８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号６０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号６４）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号６６）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ　（配列番号７０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号７６）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号７８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ　（配列番号８０）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＬＹＴＰＫＴ　（配列番号８５）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８６）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号８７）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８８）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号８９）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９０）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９１）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９２）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＩＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９３）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫＴ　（配列番号９４）
ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９５）
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９６）、および
ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫＴ　（配列番号９７）
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、項１～８のいずれか１項のインスリンアナログ。

【０１７８】
１０．以下
（ａ）配列番号４３に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖
および配列番号４４に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＩＹＴＰＫ）を有するＢ鎖、
（ｂ）配列番号４７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号４８に示すアミノ酸配列（ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖、または
（ｃ）配列番号７７に示すアミノ酸配列（ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＥＱＬＥＮＹＣＮ）を有するＡ鎖および配列番号７８に示すアミノ酸配列（ＦＶＥＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＶＬＶＣＧＥＲＧＦＶＹＴＰＫ）を有するＢ鎖
を含む、項１～９のいずれか１項のインスリンアナログ。
【０１７９】
１１．以下
Ｌｅｕ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｌｅｕ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン

、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン
、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）Ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｉｌｅ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｉｌｅ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン、
および
Ｇｌｕ（Ａ１４）Ｇｌｙ（Ａ２１）Ｇｌｕ（Ｂ３）Ｖａｌ（Ｂ１６）Ｖａｌ（Ｂ２５）－ヒトインスリン
からなる群から選択されるインスリンアナログ。

【０１８０】
１２．親インスリンのＢ鎖と比べて少なくとも１つの変異を含むインスリンＢ鎖であって、分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含み、場合により、Ｂ３０位の変異をさらに含み、Ｂ３０位の変異は、親インスリンのＢ３０位のトレオニンの欠失である（Ｄｅｓ（Ｂ３０）－変異）、インスリンＢ鎖。

【０１８１】
１３．インスリンＡ鎖およびインスリンＢ鎖を含むプロインスリンであって、インスリンＢ鎖は、親インスリンのＢ鎖と比べて少なくとも１つの変異を含み、ここで、Ｂ鎖は、分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ１６位の変異および／または分枝鎖アミノ酸で置換されたＢ２５位の変異を含み、場合により、前記プロインスリンのインスリンＡ鎖は、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）およびヒスチジン（Ｈｉｓ）から選択されるアミノ酸で置換されたＡ１４位の変異を含む、プロインスリン。

【０１８２】
１４．項１～１１のいずれか１項のインスリンアナログ、項１２のインスリンＢ鎖、および／または項１３のプロインスリンをコードするポリヌクレオチド。

【０１８３】
１５．項１～１１のいずれか１項のインスリンアナログ、項１２のインスリンＢ鎖、項１３のプロインスリン、および／または項１４のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【配列表】
2022513776000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/084427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/62
ADD.

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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, 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	GLENDORF TINE ET AL: "Importance of the solvent-exposed residues of the insulin B chain alpha-helix for receptor binding.", 22 April 2008 (2008-04-22), BIOCHEMISTRY 22 APR 2008, VOL. 47, NR. 16, PAGE(S) 4743 - 4751, XP002791114, ISSN: 0006-2960	1-3,9, 11-15
Y	abstract; table 1	4-8,10

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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 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" 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	Date of mailing of the international search report
22 January 2020	30/01/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gurdjian, Didier

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/084427

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XU BIN ET AL: "Diabetes-associated mutations in insulin: Consecutive residues in the B chain contact distinct domains of the insulin receptor", BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 43, no. 26, 6 July 2004 (2004-07-06), pages 8356-8372, XP002313979, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/BI0497796	1-3,9, 11-15
Y	abstract page 8357, left-hand column; figure 1	4-8,10
X	SHOELSON S E ET AL: "Mutations at the dimer, hexamer, and receptor-binding surfaces of insulin independently affect insulin-insulin and insulin-receptor interactions.", 18 February 1992 (1992-02-18), BIOCHEMISTRY 18 FEB 1992, VOL. 31, NR. 6, PAGE(S) 1757 - 1767, XP002791115, ISSN: 0006-2960	1-3,9, 11-15
Y	abstract page 1764, right-hand column, paragraph 4 - page 1765, paragraph 3	4-8,10
Y	WO 2009/112583 A2 (NOVO NORDISK AS [DK]; NIELSEN PETER KRESTEN [DK] ET AL.) 17 September 2009 (2009-09-17) abstract; claims 1-11	4-8,10
Y	EP 2 371 853 A2 (INST BIOTECHNOLOGII I ANTYBIOTYKOW [PL]) 5 October 2011 (2011-10-05) abstract; claims 1-8; sequence 9	4-8,10

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2019/084427

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:

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 an 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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/ EP2019/ 084427

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2019/084427

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009112583 A2	17-09-2009	CN 101970477 A	09-02-2011
		EP 2254905 A2	01-12-2010
		ES 2618073 T3	20-06-2017
		JP 5762001 B2	12-08-2015
		JP 2011512856 A	28-04-2011
		US 2011092419 A1	21-04-2011
		WO 2009112583 A2	17-09-2009
EP 2371853 A2	05-10-2011	CA 2729938 A1	07-01-2010
		CN 102083855 A	01-06-2011
		EA 201170149 A1	30-06-2011
		EP 2321344 A2	18-05-2011
		EP 2371853 A2	05-10-2011
		JP 2011526886 A	20-10-2011
		PL 219335 B1	30-04-2015
		PL 2371853 T3	29-06-2018
		US 2011136736 A1	09-06-2011
		US 2014121353 A1	01-05-2014
		WO 2010002283 A2	07-01-2010

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ａ６１Ｋ	*38/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/28	
Ａ６１Ｐ	*3/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	

(32)優先日　平成30年12月11日(2018.12.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,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,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ

ティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　シュテファン・ゲスレーゲン
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　マルクス・ヘルマン・コーン
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　マルティン・ヴィル
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA57X AA72X AA87X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44
4C084　AA02 DB34 NA14
4H045　AA10 BA10 CA40 DA37 EA28 FA74