【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成28年7月14日(2016.7.14)

【公開番号】特開2016-65072(P2016-65072A)
【公開日】平成28年4月28日(2016.4.28)
【年通号数】公開・登録公報2016-026
【出願番号】特願2015-215913(P2015-215913)
【国際特許分類】
Ａ６１Ｋ　47/48　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　 3/08　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　 3/10　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/28　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/26　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/16　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　38/16　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　33/30　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/10　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　47/02　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/62　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/65　(2006.01)
【ＦＩ】
Ａ６１Ｋ　47/48　ＺＮＡ
Ａ６１Ｐ　 3/08
Ａ６１Ｋ　45/00
Ａ６１Ｐ　 3/10
Ａ６１Ｋ　37/26
Ａ６１Ｋ　47/26
Ａ６１Ｋ　47/16
Ａ６１Ｋ　37/08
Ａ６１Ｋ　33/30
Ａ６１Ｋ　47/10
Ａ６１Ｋ　47/02
Ｃ０７Ｋ　14/62
Ｃ０７Ｋ　14/65

【手続補正書】
【提出日】平成28年5月25日(2016.5.25)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０５】
ヒトインスリンの野生型配列（Ａ鎖およびＢ鎖）を、以下および図６２に示す。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３２０
【補正方法】変更

【補正の内容】
【０３２０】
実施例で記載され使用される例示的な複合体Ｉ－１～Ｉ－１７およびＩＩ－Ｉ～ＩＩ－７の構造を、図４４に示す。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４２３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４２３】
実施例３５－複合体の化学的および物理的安定性
この実施例では、３７℃および１５０ストローク／分の機械的攪拌速度で、Ｈｉｎｄｓら（Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．１１：１９５－２０１，２０００）に記載された方法に従う促進条件下での、例示的な複合体と、複合体化されていないインスリンとの安定性を比較する。医薬品等級組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）を、促進安定性試験に関するコントロールとして選択した。Ｈｏｌｃｏｍｂｅら（Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ２７：１２４１－１２４２，２００４）は、非促進条件下、ＲＨＩ安定性は、少なくとも３０日の間室温（ＲＴ）で保持され、冷凍した場合より非常に長い。図２は、ＲＨＩおよび２つの例示的な複合体に関する、５０Ｕ／ｍｌでのｐＨ７．４リン酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中の凝集安定性アッセイの結果を示す。全ての場合、溶液に残る％は、溶液をある時点で遠心（４５００×ｇ、５分）し、Ａ２８０の上澄みを測定し、Ａ２８０の上澄みを最初の出発溶液の上澄みで割ることによって求めた。複合体Ｉ－１（図４４参照）は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、およびNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。複合体Ｉ－１６（図４４参照）は、ＴＳＰＥを骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、およびNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３４】
（ｃ）例示的な複合体およびＲＨＩ生物活性
この実施例では、皮下投与された例示的な複合体および組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）のインビボ薬力学的プロフィールを評価および比較する。図４４の例示的な複合体Ｉ－１は、ＴＳＡＴ－Ｃ６をスカフォールドとして、ＡＥＭを指示薬類縁体として、およびNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。この場合、３．５Ｕ／ｋｇの複合体を、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。図７に示すように、インビボで酵素的に温浸される例示的な複合体の不能性にもかかわらず、ＲＨＩおよび例示的な複合体のグルコース低下プロフィールは、ほぼ同じである。複合体の素早い作用および排出プロフィールは、おそらく、複合体は、薬力学的特性の観点からごくわずかなＭＷの増加の効果をもたらすＲＨＩより、１４％しか大きくないという事実によるものである。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３５

【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３５】
実施例３８－ＲＨＩとのＰＫ比較
この実施例では、皮下投与された例示的な複合体および組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）に関し得た血清インスリンプロフィールを記載し、比較する。図４４の例示的な複合体、Ｉ－１は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、およびＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として合成した。この場合、３．５Ｕ／ｋｇの複合体を、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。図８からわかるように、複合体の薬物動態プロフィールは、ＲＨＩのプロフィールから、統計的に識別不能であり、この複合体は、皮下注射の後、血清に素早く吸収され、そこから排出されることを実証している。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３６】
実施例３９－ＡＥＭ－２－ＴＳＡＴ－Ｃ６－インスリン複合体のＢ２９－置換変種のＰＫおよび生物活性
この実施例では、代表的な複合体を皮下投与して得た、血清インスリンおよび血中グルコースの低下プロフィールを記載する。図４４の例示的な複合体、Ｉ－７は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、および組換えヒトインスリンを薬物として（実施例３７および３８におけるようにＢ１－置換複合体の代わりに、Ｂ２９－置換複合体を生成するために）を使用して合成した。この場合、５Ｕ／ｋｇの複合体を、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝３）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。図９からわかるように、Ｂ２９－置換複合体の薬物動態プロフィールは、ＲＨＩおよび実施例３８のＢ１－置換複合体から統計的に識別不能であり、この複合体も、皮下注射後、血清に素早く吸収され、そこから排出されることを実証している。
【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３８】
図４４の例示的な複合体、Ｉ－１は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、およびＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。この場合、３．５Ｕ／ｋｇの複合体またはインスリンリスプロを、絶食さ

せた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。図１２からわかるように、複合体の薬物動態プロフィールは、インスリンリスプロのプロフィールから統計的に識別不能である。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４３９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４３９】
実施例４１－生物活性におけるリガンドの効果

この実施例では、一連の皮下投与された例示的な複合体で得られた血液グルコースプロフィールを比較する。例示的な複合体は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、およびNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。リガンド組成は、様々な親和力をカバーする複合体ＡＥＭ－２、ＡＥＢＭ－２、ＡＥＴＭ－１、ＡＥＢＭ－１およびＡＥＴＭ－２（最も低い親和性から最も高い親和力）によって変化させた。インスリン複合体は、図４４に、Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３およびＩ－４として示す。各実験で、複合体を、５Ｕ／ｋｇ（３．５Ｕ／ｋｇのＡＥＭ－２）で、絶食させた正常非糖尿病ラット（雄スプラーグードーレイ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４５２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４５２】

Ｎ末端シークエンス解析によれば、糖含有骨格のそれぞれ約９０％が、Ｌｙｓ－Ｂ２９を介してインスリンに複合体化された。ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－４５（Ｂ２９）およびＴＳＡＴ－Ｃ６－ＧＡ－２（Ｂ２９）を、それぞれ、複合体Ｉ－７およびＩ－５として図４４に示す。

【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４５６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４５６】

Ｎ末端シークエンス解析によれば、糖含有骨格のそれぞれ約９０％が、Ｌｙｓ－Ｂ２９を介してインスリンに複合体化された。複合体を、Ｉ－８、Ｉ－９、Ｉ－１０およびＩ－１１として図４４に示す。

【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４６３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４６３】
図３０は、ＲＨＩまたは図４４にＩ－６として示すＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体の血清濃度を、静脈注射後の時間の関数として示す。明らかに、Ｉ－６は、ＲＨＩより非常に素早く血清から排出されている。データは、以下の一般式：Ｃ（ｔ）＝Ａ$_{o}$ＥＸＰ（－ａｔ）＋Ｂ$_{o}$ＥＸＰ（－ｂｔ）（式中、ｔは時間であり、Ｃ（ｔ）は、時間を関数とする血清中の濃度であり、Ａ$_{o}$は、第一分画濃度定数であり、ａは、第一分画指数時間定数であり、Ｂ$_{o}$は、第二分画濃度定数であり、およびｂは、第二分画指数時間定数である）を持つ２分画２項分布モデルを使用した場合、最良適合を示す。各分画と関連する排出半減期（単位：分）は、ｔ１／２（ａ）＝０．６９３／ａおよびｔ１／２（ｂ）＝０．６９３／ｂである。図３０において、ＲＨＩに関し、ｔ１／２（ａ）＝０．７６およびｔ１／２（ｂ）＝１１．４６、およびＩ－６に関し、ｔ１／２（ａ）＝０．４７およびｔ１／２（ｂ）＝２．８７である。換言すれば、Ｉ－６のｔ１／２（ｂ）は、ＲＨＩのｔ１／２（ｂ）より約４倍短い。
【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４６４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４６４】
以下の表に、先に記載した手法と正確に同一の手法を使用して試験した数多くの複合体のｔｌ／２パラメータをまとめる。（構造は図４４に示されている）
【表１１】

製剤	t1/2(a)	t1/2(b)	RHIに対する比t1/2(a)	RHIに対する比t1/2(b)
RHI	0.76	11.46	1.00	1.00
I-5:TSAT-C6-GA-2	0.81	12.02	1.07	1.05
I-8:DSS-AEM-1	0.90	9.61	1.18	0.84
I-7:TSAT-C6-AEM-2	0.45	2.77	0.60	0.24
I-9:TSPE-AEM-3	0.66	2.62	0.87	0.23
I-10: DSS-AETM-1	0.82	4.48	1.08	0.39
I-6: TSAT-C6-AETM-2	0.47	2.87	0.62	0.25
I-11:TSPE-AETM-3	0.22	1.33	0.29	0.12

【手続補正１３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５００
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０５００】
複合体の生物活性を誘引するために、グルコースの外部腹腔内注射は使用しなかった。

代わりに、本発明者らは、複合体製剤のＰＫおよびＰＤプロフィールをコントロールするために、ラットの体内のグルコースの内在性レベルを当てにした。血液サンプルを、尾血管出血によって、最初の複合体注射後、種々の時点で集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。図４１に示すように、正常または糖尿病ラットに、早いまたは遅い時点で、低血糖症状は観察されなかった。糖尿病ラットで観察されたグルコースプロフィールは劇的であり、複合体は、より高いグルコース濃度によって活性化され、長い時間にわたり（最高用量で８時間にわたる）用量比例的にグルコース降下作用を発揮したことを示す。

【手続補正１４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５０１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０５０１】
実験を、異なる用量（７、１４および２８Ｕ／ｋｇ）を用い、より長い時間（２４時間）で繰返した。該実験で得られた結果を図４２に示す。

【手続補正１５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５４２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０５４２】
４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した製剤のそれぞれを投与することにより行った。図４３で示すように、該複合体が、４時間グルコース注射後、測定血清インスリン濃度の著しい増加を伴った、遅延性の吸収プロフィールを示した。

【手続補正１６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５５５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０５５５】
ある実施形態では、インスリン分子は、ヒトインスリン、ブタインスリンおよびウシインスリンからなる群から選択される。ある実施形態では、インスリン分子は、インスリングラルギンまたはインスリンデテミルである。ある実施形態では、インスリン分子は、３個のジスルフィド架橋を含む。

実施例７４－例示的な製剤

ある実施形態で、本開示は、複合体を含む徐放性製剤であって、プロタミンおよび亜鉛を含む製剤を提供する。本開示は、本明細書で記載する複合体（たとえば、図４４、４８、５４、５９、６０または６１の複合体のいずれか１つが挙げられるが、これらに限定されない）のいずれか１つを有する徐放性製剤を包含することは、理解される。

【手続補正１７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５９６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０５９６】
実験全体を通して、血糖値は、市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して測定し

た。各時点の血液を４℃で遠心分離し血清を集め、続いて、血清インスリンおよび血清複合体濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。インスリンまたは複合体血清濃度対時間データは、２分画モデルに従う２つの独立した減衰指数の合計（Ｃ（ｔ）＝ａ　ｅｘｐ（－k_aｔ）＋ｂ　ｅｘｐ（－k_bｔ））（式中、ｔ１／２（ａ）＝（Ｉｎ２）／k_aおよびｔ１／２（ｂ）＝（Ｉｎ２）／k_b）に、最良適合を示した。結果は図４５に示される。左の図は、ａ－ＭＭまたはグルコース不存在下でのＩ－６複合体対ＲＨＩに関する有意に高い（＞５×）排出速度を示す。右の図は、グルコースの存在下（Ｇ４００注入）で、排出速度がいくらか（約５０％）減少し、ａ－ＭＭ存在下（ａ－ＭＭ注入）でかなり実質的に（約４００％）減少することを示す。

【手続補正１８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６０１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６０１】
図４６の最初の２つの図は、４ｇ／ｋｇのグルコース腹腔内注射前後の血糖値および血清インスリン複合体濃度プロフィールを、３．５ｍＵ／分注入のＲＨＩと１５ｍＵ／分注入のＩ－６とで比較している。ＲＨＩ注入は、Ｉ－６注入と比べ、グルコース注射前に有意な低血糖症状を起こす。グルコース腹腔内注射の直後に、Ｉ－６の測定血清インスリン濃度は、血糖濃度増加として、３００％を超える増加を示し、次いでグルコース濃度が減少するにつれ、素早くベースライン濃度に戻る。一方、同じ実験条件下でも、グルコース腹腔内注射後、ＲＨＩは、測定血清インスリン濃度において有意な変化はない。図４６の次の３つの図は、測定インスリン濃度がグルコース腹腔内注射中に増える度合いは、投与されたグルコース用量および結果として得られる血糖値に直接関連することを示す。たとえば、血清インスリン濃度において、１ｇ／ｋｇグルコース注射については、ベースラインに対して５０％ピークの変化しか観察されないのに対し、４ｇ／ｋｇ用量では、ベースラインに対して３００％ピークの変化が観察される。

【手続補正１９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６０５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６０５】
実験全体を通して、血糖値は、市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して測定した。各時点の血液を４℃で遠心分離し血清を集め、続いて、血清インスリンおよび血清複合体濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。インスリンまたは複合体血清濃度対時間データは、２分画モデルに従う２つの独立した減衰指数の合計（Ｃ（ｔ）＝ａ　ｅｘｐ（－k_aｔ）＋ｂ　ｅｘｐ（－k_bｔ））（式中、ｔ１／２（ａ）＝（Ｉｎ２）／k_aおよびｔ１／２（ｂ）＝（Ｉｎ２）／k_b）に、最良適合を示した。図４７の最初の図は、無修飾インスリンの排出は、糖（グルコースＧ４００またはａ－ＭＭ）の存在下で影響されないことを示す。糖質注入を伴う複合体Ｉ－６を示す図４７の最後の図は、比較のために、実施例７９の結果を再プロットしたものである。糖質注入を伴う複合体Ｉ－９を示す図４７の真ん中の図は、グルコース（Ｇ４００の注入）対Ｉ－６複合体との存在で、排出速度がさらにいっそうはっきりと減少（約３５０％対約５０％）することを示す。また、複合体Ｉ－９は、ａ－ＭＭ（ａ－ＭＭ注入）対Ｉ－６複合体の存在で、排出速度がより大きく減少（約７００％対約４００％）することも示す。

【手続補正２０】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６０６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６０６】
実施例８２－ミニブタにおける機序検証およびグルコース応答性特性
先に記載したグルコース応答性インスリン複合体結果が、ラットを超えて他の種に及ぶことができるかを判断するため、本発明者らは、ヒトの代わりになる、本明細書では「小型ブタ」とも言う非糖尿病雄ミニブタ（Ｙｕｃａｔａｎ　ｓｔｒａｉｎ）における糖依存性インビボ排出速度を探ることに目を向けた。図４８にまとめられたインスリン複合体のサブセットに関し、糖依存性排出速度における糖親和力および多価の状態の効果を最初に測定する試験を行った。複合体は、図４４でＩ－７、Ｉ－６、Ｉ－１１およびＩＩ－２として示す。この試験で使用した全ての複合体は、実施例２０で記載した一般的方法に従って合成した。Ａ１，Ｂ２９－二置換ＡＥＴＭ－２インスリン－複合体ＩＩ－２を製造するため、Ｂ２９－一置換ＡＥＴＭ－２インスリン－複合体（Ｉ－６）合成と比べて、１インスリン分子当たり多価活性エステル骨格およびＡＥＴＭリガンドの約１０倍量を使用した。
【手続補正２１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６０８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６０８】
４００ｍｇ／ｄｌで、内因性グルコース誘発ブタインスリンの高濃度が、本発明者らのインスリン複合体免疫アッセイと交差反応した。そのため、グルコース注入実験のＰＫ結果は、ブタインスリンだけのアッセイから得た値を差し引く必要があったが、それでもかなりの「ノイズ」のあるデータとなった。ａ－ＭＭは、内因性ブタインスリン分泌を誘発しないので、ａ－ＭＭ注入実験のデータを、インスリン複合体半減期における糖応答性変化の第一指示薬として使用した。興味深いことに、ブタにおいて、ＡＥＴＭ－２インスリン複合体（Ｉ－６）は、ａ－ＭＭの存在下での$t_{1/2}$において、ラットの４．０倍増加に比べて、ゆるやかな１．７倍増加しか示さなかった（図５５）。しかし、ブタにおいて、Ａ１，Ｂ２９－二置換ＡＥＴＭ－２インスリン－複合体（ＩＩ－２）は、ａ－ＭＭの存在下での$t_{1/2}$における増加がほぼ１０倍を示した（図４９および５０）。他の複合体の結果を図５６で表に示す。
【手続補正２２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６０９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６０９】
ａ－ＭＭ存在下での二置換ＡＥＴＭ－２インスリン－複合体（ＩＩ－２）の静注用量のグルコース低下曲線を超える面積は、糖が存在しない場合より約２．６倍高かった（図５１）。図５８では、ＲＨＩ、Ｉ－６、およびＩＩ－２（二置換ＡＥＴＭ－２インスリン複合体）およびＩＩ－３の間での生物活性における違いを比べる。３種のインスリン複合体は全て、高い親和力ＡＥＴＭ糖リガンドを含有する。この選択されたインスリン複合体の組では、糖依存性半減期と生物活性との間に相関関係はない。
【手続補正２３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６１０
【補正方法】変更

【補正の内容】
【０６１０】
非糖尿病動物においては低血糖を起こすことなく、糖尿病動物で、グルコースを減少させる能力を判定するために、複合体ＩＩ－２を、溶解性溶液として、０．２５、０．５０および１．００Ｕ／ｋｇの用量で、非糖尿病正常血糖小型ブタと、アロキサン糖尿病、高血糖小型ブタの両方にｓｕｂ－Ｑ注射した。インスリン複合体は、糖尿病動物で血糖値における有意な用量依存性減少を示し、一方、非糖尿病動物では全く低血糖またはグルコース低下の兆候がなかった（図５２）。それにひきかえ、０．０６３および０．１２５Ｕ／ｋｇでＲＨＩを注射した場合、糖尿病動物で有意なグルコース低下を起こし、非糖尿病動物では、顕著な低血糖、ならびに有意なグルコース低下および低血糖を起こした（図５３）。これらの予備的な結果に基づいて、約０．５Ｕ／ｋｇの溶解性インスリン複合体ＩＩ－２の単一注射は、糖尿病小型ブタにおいて、６～８時間、低血糖のないグルコースコントロールを提供した。ＩＩ－２のｓｕｂ－Ｑ注射の血清排出速度は、糖尿病小型ブタおよび正常小型ブタにおいて測定した（図５７）。全ての用量に関して、類似のＰＫプロフィールが、糖尿病のブタ患者と正常なブタとの間に観察された。
【手続補正２４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６１２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６１２】
実施例８３－ミニブタにおける最適化実験
図４８におけるＩＩ－２対他の複合体の性能における明白な違いに基づいて、糖親和力および多価であることの効果から、インスリン複合部位（Ａ１対Ｂ２９）の効果を切り離し、定量するのが望ましい。したがって、図４８でのインスリン複合体の製造で使用した方法に類似する複合方法を使用して、図５４に列挙したインスリン複合体（図４４にＩ－１２、Ｉ－１３、Ｉ－１４、Ｉ－１５、ＩＩ－１、ＩＩ－３およびＩＩ－４として示す）、ならびに図５９に示すコントロール化合物を合成した。この試験で使用した二置換複合体は全て、実施例２０で記載した一般的方法に従って合成した。Ａ１，Ｂ２９－二置換インスリン複合体を製造するために、Ｂ２９一置換インスリン－複合体合成と比べて、１インスリン分子当たり、１０倍量の多価活性エステル骨格および糖親和力リガンドを使用した。Ａ１だけが置換された物質も、実施例２０に記載された一般的方法に従って調製した。しかし、この場合、ジ－ｔｅｒｔ－ブチルジカルボネートの半分の当量を使用して、実施例８に記載のＢＯＣ保護合成から単離した、Ｂ２９一ＢＯＣ保護インスリンを使用した。精製したら、実施例１２に記載のＴＦＡ／アニソール方法を使用して、ＢＯＣ基を複合体から除去した。
【手続補正２５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６１４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６１４】
図６０は、種々のインスリン複合体を小型ブタに静注した場合のグルコース濃度の比較を示す。複合体Ｉ－１２（ＡＥＴＭ－２でのＡ１置換）は、グルコースの低下において、複合体Ｉ－６（ＡＥＴＭ－２でのＢ２９置換）よりわずかに効果的であった。複合体Ｃ３を得るための、Ａ１位でのポリエチレンオキシドを用いる複合体１－６の置換では、生物活性全体が減少したが、ａ－ＭＭ誘発生物活性は増加しなかった。複合体ＩＩ－２を得るための、Ａ１位での他のＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２スカフォールドを用いる複合体Ｉ－６の置換では、生物活性全体は減少したが、ａ－ＭＭ誘発生物活性は増加した。
【手続補正２６】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０６１５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０６１５】
図６１は、種々のＡ１，Ｂ２９二置換インスリン－複合体を小型ブタに静脈注射した場合のグルコース濃度の比較を示す。アセチル（複合体Ｃ７）またはＰＥＯ（複合体Ｃ４）基を用いるインスリンのＡ１，Ｂ２９二置換では、生物活性全体は、実質的に減少しなかった。さらに、Ｃ７およびＣ４複合体は、識別可能なａ－ＭＭ誘発生物活性効果を示さなかった。複合体ＩＩ－３は、複合体Ｃ７およびＣ４に対して、生物活性を実質的に減少させたが、ａ－ＭＭの存在下で、その生物活性は、事実上保存された。