

【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 1 部門第 1 区分

【発行日】平成22年8月12日(2010.8.12)

【公表番号】特表2009-542235(P2009-542235A)

【公表日】平成21年12月3日(2009.12.3)

【年通号数】公開・登録公報2009-048

【出願番号】特願2009-518756(P2009-518756)

【国際特許分類】

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 14/62 (2006.01)

A 6 1 K 38/28 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 21/02 E

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 14/62

A 6 1 K 37/26

A 6 1 P 3/10

【手続補正書】

【提出日】平成22年6月28日(2010.6.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 1】

実施例 3：アルギニンアミドとのカップリングによる A r g (B 3 1)、G l y (A 2 1) 前駆体からの A r g (B 3 1)、A r g (B 3 2)、G l y (A 2 1) インスリンの調製

2 1 A - G l y - 3 0 B a l - A r g - インスリン 1 0 0 m g をアルギニンアミド溶液 0 . 9 5 m L (4 4 6 g / L) に溶解し、1 M の酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 8) 0 . 1 3 m L 及び D M F 2 m L を添加した。反応混合物を 1 2 に冷却し、トリプシン 0 . 0 9 4 m L (0 . 0 7 5 m g、Roche Diagnostics) を添加することによって開始した。

8 時間後、T F A を p H 2 . 5 まで添加することによって反応を停止させ、H P L C によって分析した。6 0 % を超える A r g (B 3 1)、A r g (B 3 2)、G l y (A 2 1) ヒトインスリンが生成した。トリプシン阻害剤溶液を添加した後、米国特許第 5 , 6 5 6 , 7 2 2 号と同様に、アミド化された類似体を精製した。次に、アミド化されたインスリン類似体を、酸の存在下で数時間加水分解して、A r g (B 3 1)、A r g (B 3 2)、- G l y (A 2 1) ヒトインスリンを得た。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 2】

実施例 4：リシンアミドとのカップリングによる A r g (B 3 1)、G l y (A 2 1)

ヒトインスリン前駆体からの A r g (B 3 1)、L y s (B 3 2)、G l y (A 2 1) ヒトインスリンの調製

2 1 A - G l y - 3 0 B a L - A r g - インスリン 1 0 0 m g をリシンアミド溶液 0 . 9 3 m L (4 0 0 g / L) に溶解し、1 M の酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 8) 0 . 1 3 m L 及び D M F 2 m L を添加した。反応混合物を 1 2 に冷却し、トリプシン 0 . 0 9 4 m L (0 . 0 7 5 m g、Roche Diagnostics) を添加することによって開始した。

8 時間後、T F A を p H 2 . 5 まで添加することによって反応を停止させ、H P L C によって分析した。A r g (B 3 1)、L y s (B 3 2) - N H ₂、G l y (A 2 1) ヒトインスリンを生成させ、米国特許第 5 , 6 5 6 , 7 2 2 号と同様に、トリプシン阻害剤溶液の添加後に精製した。次に、酸の存在下で、アミド化されたインスリン類似体を数時間加水分解し、A r g (B 3 1)、L y s (B 3 2)、G l y (A 2 1) ヒトインスリンを得た。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 6】

次に、実施例 1 2 と同様に、ヒルジン融合部分が、位置 3 において N 末端で開始する 6 個のヒスチジンによって伸長され、及び配列 D D D D K (配列番号 1 4) によって位置 7 2 から C 末端で伸長された融合タンパク質をコードするベクター p A D H 2 __ L T __ H 6 __ H i r __ e n t e r o __ i n s __ g l y A 2 1 を構築した。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 5】

実施例 1 8 : アルギニンアミドとのカップリングによる B (1 ~ 2 9) - A (1 ~ 2 1) スプリットインスリン前駆体からの A r g (B 3 0) - インスリンの調製

B (1 ~ 2 9) - A (1 ~ 2 1) スプリットインスリン 1 0 0 m g をアルギニンアミド溶液 0 . 9 5 m L (4 4 6 g / L) に溶解し、1 M の酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 8) 0 . 1 3 m L 及び D M F 2 m L を添加した。反応混合物を 1 2 に冷却し、トリプシン 0 . 0 9 4 m L (0 . 0 7 5 m g、Roche Diagnostics) を添加することによって開始した。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 7】

実施例 1 9 : リシンアミドとのカップリングによる B (1 ~ 2 9) - A (1 ~ 2 1) スプリットインスリン前駆体からの L y s (B 3 0) - インスリンの調製

B (1 ~ 2 9) - A (1 ~ 2 1) スプリットインスリン 1 0 0 m g をリシンアミド溶液 0 . 9 3 m L (4 0 0 g / L) 中に溶解し、1 M の酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 8) 0 . 1 3 m L 及び D M F 2 m L を添加した。反応混合物を 1 2 に冷却し、トリプシン 0 . 0 9 4 m L (0 . 0 7 5 m g、Roche Diagnostics) を添加することによって出発した。8 時間後、T F A を p H 2 . 5 まで添加することによって反応を停止させ、H P L C によって分析した。L y s (B 3 0) - インスリンアミドが生成し、米国特許第 5 , 6 5 6 , 7 2 2 号と同様に、トリプシン阻害剤溶液の添加後に精製した。次に、アミド化されたインスリンを酸の存在下で数時間加水分解して L y s (B 3 0) - インスリンを得るか、又は薬剤

として直接使用することが可能であった。