(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2017-537065
(P2017-537065A)
(43)公表日　平成29年12月14日(2017.12.14)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/62	(2006.01)	C07K	14/62		4C084
A61K 38/28	(2006.01)	A61K	38/28		4H045
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	
C12N 15/00	(2006.01)	C12N	15/00	ZNA	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 51 頁）

(21)出願番号　特願2017-521099 (P2017-521099)
(86)(22)出願日　平成27年10月12日 (2015.10.12)
(85)翻訳文提出日　平成29年5月10日 (2017.5.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/055057
(87)国際公開番号　WO2016/064606
(87)国際公開日　平成28年4月28日 (2016.4.28)
(31)優先権主張番号　62/066,187
(32)優先日　平成26年10月20日 (2014.10.20)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500429332
ケース　ウェスタン　リザーブ　ユニバーシティ
ＣＡＳＥ　ＷＥＳＴＥＲＮ　ＲＥＳＥＲＶＥ　ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ
アメリカ合衆国、４４１０６、オハイオ州、クリーブランド、ユークリッド　アベニュー　１０９００
(74)代理人　100104411
弁理士　矢口　太郎
(72)発明者　ワイス、マイケル　エー.
アメリカ合衆国、４４０２２　オハイオ州、モアランド　ヒルズ、７０　ウッドバーン　ドライブ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物学的作用強度の高いハロゲン化インスリン類似体

(57)【要約】
【解決手段】　インスリン分子は、Ｂ１０位にＡｓｐ置換、Ａ８、Ｂ２８、およびＢ２９に相当する１若しくはそれ以上の位置にＧｌｕ、Ｂ２４位にハロゲン化フェニルアラニンを有する。前記類似体は、選択的に（ｉ）Ｂ鎖からの１、２、または３残基のＮ末端欠失、（ｉｉ）少なくとも１つの酸性残基を含むＢ鎖のモノペプチドまたはジペプチドＣ末端の伸長、および（ｉｉｉ）インスリンの安定性を向上させる、当該分野で既知の他の修飾を含んでもよい。インスリン類似体単量体当たりの亜鉛イオン０．００～０．１０の亜鉛イオン非存在下または存在下、少なくとも７．０～８．０の範囲のｐＨ値の可溶性溶液に溶解した、Ｕ－１００～Ｕ－１０００の連続強度の上記類似体製剤。患者の血糖値を低下させる方法は、患者に生理学的有効量のインスリンを投与する工程を有する。
【選択図】　図１

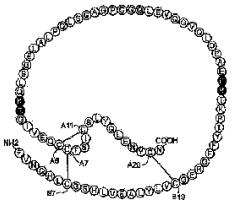


FIG. 1A
(PRIOR ART)
PROINSULIN

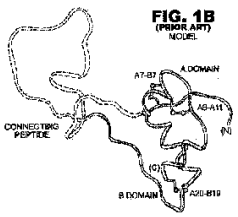


FIG. 1B
(PRIOR ART)
MODEL

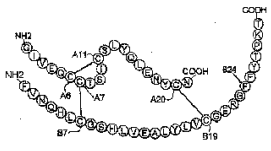


FIG. 1C
(PRIOR ART)

【特許請求の範囲】
【請求項１】
生物学的作用強度が高いインスリン分子であって、前記インスリンはＡ鎖ペプチドおよびＢ鎖ペプチドを有し、前記インスリンは、
ヒトインスリンのＢ１０に相当する位置のアスパラギン酸と、
ヒトインスリンのＡ８、Ｂ２８、およびＢ２９に相当する１若しくはそれ以上の位置のグルタミン酸と、
ヒトインスリンのＢ２４に相当する位置のハロゲン化フェニルアラニンと
を有する、インスリン分子。
【請求項２】
請求項１記載のインスリン分子において、前記インスリン分子は、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、Ｇｌｕ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｇｌｕ、Ｇｌｕ－Ａｓｐ、およびＳｅｒ－Ａｓｐから選択されるＢ鎖ポリペプチドのジペプチドＣ末端伸長を有する、インスリン分子。
【請求項３】
請求項１または２記載のインスリン分子であって、Ｂ１、Ｂ１－Ｂ２、またはＢ１－Ｂ３の切断を有する、インスリン分子。
【請求項４】
請求項１記載のインスリン分子において、ヒトインスリンＢ３０位に相当するアミノ酸がない、インスリン分子。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか１つに記載のインスリン分子において、ヒトインスリンのＢ２９に相当する位置がＰｒｏであり、ヒトインスリンのＢ２８に相当する位置が酸性アミノ酸である、インスリン分子。
【請求項６】
請求項１～５のいずれか１つに記載のインスリン分子において、前記インスリンは、さらに、
ヒトインスリンのＡ１３に相当する位置がトリプトファンであり、
ヒトインスリンのＡ１４に相当する位置がグルタミン酸であり、
ヒトインスリンのＡ２１に相当する位置がグリシンである、
置換から選択される１若しくはそれ以上の置換を有する、インスリン分子。
【請求項７】
請求項１記載のインスリン分子であって、
Ｂ１０位のアスパラギン酸と、
Ｂ２４位のオルト－フルオロ－フェニルアラニンと、
Ｂ２９位のグルタミン酸と
を有する、インスリン分子。
【請求項８】
請求項７記載のインスリン分子であって、さらに、残基Ｂ１－Ｂ３の切断を有する、インスリン分子。
【請求項９】
請求項７または請求項８記載のインスリン分子であって、さらに、Ａ２１位のグリシンを有する、インスリン分子。
【請求項１０】
請求項７～９のいずれか１つに記載のインスリン分子であって、さらに、Ａ８位のグルタミン酸を有する、インスリン分子。
【請求項１１】
請求項７～１０のいずれか１つに記載のインスリン分子であって、さらに、Ｂ鎖のジペプチド伸長としてＧｌｕＢ３１－ＧｌｕＢ３２を有する、インスリン分子。
【請求項１２】
請求項１記載のインスリン分子であって、

Ｂ１０位のアスパラギン酸と、
Ｂ２４位のオルト－フルオロ－フェニルアラニンと、
Ａ８位のグルタミン酸と
を有する、インスリン分子。
【請求項１３】
請求項１２記載のインスリン分子であって、さらに、Ｂ２８位のリジンおよびＢ２９位のプロリンを有する、インスリン分子。
【請求項１４】
請求項１２または請求項１３記載のインスリン分子であって、さらに、Ａ２１位のグリシンを有する、インスリン分子。
【請求項１５】
Ｕ－１００～Ｕ－１０００で製剤化される、請求項１～１４のいずれか１つに記載のインスリン分子を有する医薬組成物。
【請求項１６】
請求項１５記載の医薬組成物であって、Ｕ－１００～Ｕ－５００で製剤化される、医薬組成物。
【請求項１７】
請求項１５記載の医薬組成物であって、Ｕ－５００～Ｕ－１０００で製剤化される、医薬組成物。
【請求項１８】
請求項１５～１７のいずれか１つに記載の医薬組成物であって、無亜鉛製剤であり、またはインスリン１モル当たり０．０１～０．１０の比で亜鉛を含む、医薬組成物。
【請求項１９】
請求項１５～１８のいずれか１つに記載の医薬組成物であって、ｐＨ７～８で製剤化され、選択的にｐＨ緩衝液を有する、医薬組成物。
【請求項２０】
請求項１５～１９のいずれか１つに記載の医薬組成物であって、バイアルまたは注射用ペンに封入される、医薬組成物。
【請求項２１】
糖尿病患者を治療する方法であって、前記患者に請求項１５～２０のいずれか１つに記載の医薬組成物を投与する工程を有する、方法。
【請求項２２】
請求項２１記載の方法において、前記組成物はプランディアルインスリンとして投与される、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
連邦政府の支援を受けた研究又は開発に関する記述
本発明は、助成金番号ＤＫ０４０９４９およびＤＫ０７４１７６として米国国立衛生研究所との共同契約のもと、政府支援を受けて行われた。米国政府は本発明に対して一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００２】
本発明は、熱力学的安定性の増加および／または作用強度の増加など、薬剤学的性質の向上を示すポリペプチドホルモン類似体に関する。より具体的には、本発明は、（野生型インスリンと比較し）製剤強度が高くなったときに即効性を示す、および／または（野生型インスリンと比較し）患者に投与したホルモン類似体１ナノモル当たりの生物学的作用強度が高いスンスリン類似体に関する。したがって、本発明の類似体は、前記類似体が（ｉ）二価金属イオンがなく、熱力学的安定性の向上を示す、（ｉｉ）タンパク質濃度０．６ｍＭ以上で自己会合の低下を示す、および（ｉｉｉ）ｉｎ　ｖｉｖｏにおいてナノモル

単位で生物学的作用強度の上昇を示すように、すなわち、野生型ヒトインスリンと比較し、糖尿病の哺乳類に皮下または静脈内注射した場合、同程度の血糖濃度低下を誘発するために必要なインスリン類似体分子が少なくなるように、Ａ鎖および／またはＢ鎖に酸性アミノ酸置換の新規組み合わせを含むポリペプチド鎖２本から成る。好ましくない分裂促進性の上昇を避けるため、本発明の類似体は、（芳香環のオルト、メタ、またはパラ位など）Ｂ２４位のフェニルアラニンの芳香環にハロゲン原子（フッ素（Ｆ）、塩素（Ｃｌ）、臭素（Ｂｒ）、またはヨウ素（Ｉ））を含み、即効性を与えるため、当該分野で既知のＢ２８およびＢ２９位などＡまたはＢドメインの他の部位に標準的または非標準的アミノ酸置換を選択的に含んでもよい。

【０００３】

治療薬およびワクチンを含む非標準的タンパク質の設計は、広く医学的および社会的利益を有する可能性がある。一般に、ヒト、その他の哺乳類、脊椎生物、無脊椎生物、または真核細胞でコードされる天然タンパク質は、細胞内で選択的に機能するように進化した可能性があるが、それにもかかわらず、治療用途では最適には及ばない。そのようなタンパク質の類似体は、生物物理学的、生化学的、または生化学的特性が向上する可能性がある。タンパク質類似体の利益は、（糖尿病の哺乳類または糖尿病患者の血糖濃度を低下させる代謝調節など）「ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ」活性を向上させ、癌細胞の増殖促進など、意図しないおよび／または好ましくない副作用は抑制することであろう。そのようなタンパク質を設計する別の利益は、より高い強度の製剤を達成するタンパク質濃度で、速い作用発現を維持できることであろう。さらに別の社会的利益の例は、室温以上での分解抵抗性を増大させ、輸送、販売、および使用しやすくするものであろう。治療用タンパク質の例はインスリンにより示される。ＲＮＡスプライシングの別の形式、または翻訳後糖鎖付加の別のパターンにより生成した受容体イソ型とは関係なく、他の哺乳類遺伝子でコードされ、インスリン受容体に結合する野生型ヒトインスリンおよびインスリン分子は、複数の臓器および多様な細胞に存在する。また、野生型インスリンは、相同的１型インスリン様成長因子受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）に対し、低いが有意な親和性で結合する。

【０００４】

医学的利益のさらなる例は、可溶性インスリン類似体製剤の薬物速度論的特性を最適化したものであり、強度Ｕ－２００～Ｕ－１０００の範囲、すなわち、従来のＵ－１００インスリン製剤よりも２倍から１０倍高い強度の製剤で（当該分野ではＵ－１００の強度で知られるプランディアル・インスリン（ｐｒａｎｄｉａｌ　ｉｎｓｕｌｉｎ）類似体に特徴的であるような）作用発現の速さが保持されている（この命名法では、「Ｕ－Ｘ」が溶液または懸濁液１ｍｌあたり体内にＸ単位が投与されることを示す）。強度を上げたインスリン製剤は、著しいインスリン抵抗性を示す患者に特に有益であることが保証され、体内または体外インスリンポンプにも有用と考えられ、リザーバの寿命が延長し、新世代のポンプ技術ではリザーバの小型化が可能である。既存のインスリン製剤は、インスリンまたはインスリン類似体濃度を増加させ、製剤強度をＵ－２００（２００国際単位／ｍｌ）超とすると、典型的には薬物動態学的および薬動力学的特性の延長を示す。このように延長すると、上記製剤を皮下注射した場合にプランディアル血糖コントロールへの有効性が損なわれ、ポンプによる連続皮下注入の有効性および安全性が損なわれる。これらの不都合な点を考慮すると、即効型インスリン類似体製剤の治療上および社会的利益は、Ｕ－２００～Ｕ－１０００の強度で即効性を保持するインスリン類似体を設計することで向上するだろう。新規可溶性インスリン類似体の１型ＩＧＦ受容体に対する親和性が野生型ヒトインスリンと比較して弱い場合、新たに利益が生じ、これはｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ効果（二次的な標的への効果）の例として示される。ヒト癌細胞株のインスリン刺激による増殖をモニターするために開発された試験で、濃縮インスリン類似体製剤で分裂促進性を低下させる必要がある場合にも、追加の治療上および社会的利益が生じる。

【０００５】

インスリンの投与は糖尿病の治療として長く確立されてきた。糖尿病患者における従来のインスリン補充療法の主な目標は、血糖濃度を厳密にコントロールし、健康なヒト被験

者に特徴的な正常範囲を上下に逸脱しないようにすることである。正常範囲以下に逸脱すると、直ちにアドレナリン作動性または神経低糖症状が伴い、重度の場合は痙攣、昏睡、および死に至る。正常範囲以上に逸脱すると、網膜症、失明、および腎不全などの微小血管疾患の長期的リスクが上昇する。

【０００６】

インスリンは小さな球状タンパク質であり、脊椎動物の代謝において中心的役割を果たす。インスリンには２１残基から成るＡ鎖と３０残基から成るＢ鎖が含まれる。前記ホルモンはZn^{2+}により安定化した六量体として膵臓のβ細胞に保存されるが、血中ではZn^{2+}が遊離した単量体として機能する。インスリンは、結合領域（３５残基）でＢ鎖Ｃ末端残基（残基Ｂ３０）とＡ鎖Ｎ末端残基が結合した、単鎖前駆体であるプロインスリンの生成物である。様々な根拠から、プロインスリンはインスリン様のコアから成り、結合ペプチドが不規則であることが示されている。３つの特異的ジスルフィド架橋（Ａ６－Ａ１１、Ａ７－Ｂ７、およびＡ２０－Ｂ１９）が形成すると同時に、粗面小胞体（ＥＲ）では単鎖生合成前駆体である表記のプロインスリンが酸化的に折り畳まれる。プロインスリンの配列および構造は図１Ａおよび１Ｂの略図に示す。プロインスリンは途中のトランス・ゴルジ網でインスリンに変換され、膵臓β細胞内のグルコース調節分泌顆粒で亜鉛－インスリン六量体として保存される。ヒトインスリンＡ鎖およびＢ鎖のアミノ酸配列を図１Ｃの略図に示す。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明は、中性ｐＨ、Ｕ－２００～Ｕ－１０００の強度で即効型インスリン類似体を可溶性製剤に設計する医学的および社会的需要が動機となった。プランディアル・インスリン類似体濃度を上昇させると、進行性の自己会合に有利であることは当該分野で既知であり、当初の分子デザインの論理は自己会合の低下を予測していた（Ｂｒａｎｇｅ Ｊ１，Ｒｉｂｅｌ Ｕ，Ｈａｎｓｅｎ ＪＦ，Ｄｏｄｓｏｎ Ｇ，Ｈａｎｓｅｎ ＭＴ，Ｈａｖｅｌｕｎｄ Ｓ，Ｍｅｌｂｅｒｇ ＳＧ，Ｎｏｒｒｉｓ Ｆ，Ｎｏｒｒｉｓ Ｋ，Ｓｎｅｌ Ｌ，ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ ｉｎｓｕｌｉｎｓ ｏｂｔａｉｎｅｄ ｂｙ ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｍｅｄｉｃａｌ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｎａｔｕｒｅ ３３３：６７９－８２）。この論理については図２の略図に示す。当該分野で既知の従来のインスリン製剤は、典型的には、単量体単位で０．６ｍＭ（希釈時はこれよりも低い）の公称タンパク質濃度では亜鉛インスリン六量体が優位となることを利用しており、この安定な会合がこのホルモンを物理的および化学的分解から保護している。このタンパク質濃度を超えて野生型インスリン六量体を濃縮すると、六量体－六量体相互作用が進行し、この自己会合レベルがさらに高くなることで皮下デポー製剤からの注入インスリンの吸収が遅くなり、これにより薬物動態および薬効が延長する。現在のプランディアル・インスリン類似体製剤（ＨＵＭＡＬＯＧ（登録商標）、ＮＯＶＯＬＯＧ（登録商標）、およびＡＰＩＤＲＡ（登録商標））と類似の伸長は、（単量体単位で）約２ｍＭ以上の濃度で起こる。

【０００８】

したがって、Ｕ－２００～Ｕ－１０００で強度を上げたプランディアル製剤の障害は、野生型インスリンの複合体自己会合特性により引き起こされており、中性ｐＨでは、濃度依存的に単量体、二量体、三量体、四量体、六量体、十二量体、およびより高次の種が分布する可能性がある。この障害を克服するため、高強度の即効型インスリン類似体製剤を設計する新規経路２種類を予想した。最初のアプローチは、タンパク質３～８ｍＭの高濃度でも高次の自己会合が起こりにくい超安定なインスリン単量体および二量体を設計することであった。このアプローチでは、化学的分解、重合、およびフィブリル化に関する米国食品医薬品局のガイドラインにより、個々のインスリン類似体分子の内因的安定性が増加することで、安定な製剤には不必要な亜鉛介在性または亜鉛依存性の六量体会合が得られる。第２のアプローチはインスリン類似体を探すものであり、内因性の生物学的活性が

、分子あたりでは野生型インスリンよりも大きくなる。内因活性が上昇すると、（ＨＵＭＡＬＯＧ（登録商標）、ＮＯＶＯＬＯＧ（登録商標）、およびＡＰＩＤＲＡ（登録商標）のように）従来の０．６ｍＭの濃度でも、タンパク質溶液がＵ－１００以上の強度を示すことができる。また、インスリン分解の主要なメカニズムは希釈したタンパク質溶液よりも濃縮したタンパク質溶液で速くなるため、内因的作用強度が高いと、強度は同等であるが、タンパク質濃度が高い、対応するインスリン類似体製剤と比較し、製剤の安定性が高くなる。同じ分子学的設計では、これら２つの相補的アプローチは互いに補い合い、製剤の強度、作用速度、および安定性を同時に最適化させることができる。

【０００９】

哺乳類に皮下または静脈内注射した場合に生物学的作用強度が高くなる即効型インスリン類似体を設計し、Ｕ－１００～Ｕ－１０００の様々な強度の製剤が同等の薬物動態学的および薬力学的特性を示すようにするためには、相補的課題が３つあり、それぞれ先行する解決策はない。本発明では、これらの各課題を同時に克服することができる分子学的設計１種類を提供する。順に各課題を取り上げる。

【００１０】

最初の課題はｉｎ　ｖｉｖｏでの作用強度をどのように高くするかである。この問題は、インスリン類似体のインスリン受容体に対する生化学的親和性の上昇による問題とは異なり、単に、最終的には標的細胞内の貯蔵庫から形質膜にＧｌｕｔ４グルコーストランスポーターが移行し、その結果、血糖濃度が低下する、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける複雑な分子および細胞イベントの道筋の最初の段階を示しているにすぎない。（インスリン受容体に対する親和性が亢進または低下する）ｉｎ　ｖｉｔｒｏ作用強度が著しく異なるヒトインスリンと類似体は、哺乳類における血糖降下作用の点では等しい効果を有する可能性があることは周知がある（Ｖφｌｕｎｄ，　Ａ．，　Ｂｒａｎｇｅ，　Ｊ．，　Ｄｒｅｊｅｒ，　Ｋ．，　Ｊｅｎｓｅｎ，　Ｉ．，　Ｍａｒｋｕｓｓｅｎ，　Ｊ．，　Ｒｉｂｅｌ，　Ｕ．，　Ｓφｒｅｎｓｅｎ，　Ａ．Ｒ．，　ａｎｄ　Ｓｃｈｌｉｃｈｔｋｒｕｌｌ，　Ｊ．（１９９１）Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ａｎｄ　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｐｏｔｅｎｃｙ　ｏｆ　ｉｎｓｕｌｉｎ　ａｎａｌｏｇｕｅｓ　ｄｅｓｉｇｎｅｄ　ｆｏｒ　ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｕｓｅ．Ｄｉａｂｅｔ．Ｍｅｄ．８：８３９－４７）。ｉｎ　ｖｉｖｏでの作用強度が高くなったインスリン類似体設計の課題は、その作用強度とｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞活性試験（例えば、マウス脂肪細胞またはＨＥＰ－Ｇ２肝細胞の組織培養；Ｖφｌｕｎｄ，　Ａ．，　ｅｔ　ａｌ．同書）との間に関連性がないことでさらに増大する。このように関連性がないため、また特にインスリン受容体に対する親和性が高いインスリン類似体で作用強度は高くなっていないため、原則としてでも、ｉｎ　ｖｉｖｏで作用強度の高い即効性類似体が存在するか否かが、当該分野で分かっていない。したがって、本発明の最初の驚くべき観点は、ｉｎ　ｖｉｖｏの作用強度を実際に高くできることであり、インスリン類似体のインスリン受容体（ＩＲ）に対する親和性を低下させる同時的な分子修飾の正味の作用にもかかわらず、このような作用強度の上昇が生じるということである。我々のデザインでは、Ｂ２４位のフェニルアラニンのハロゲン化誘導体と関連した１若しくはそれ以上の酸性置換を利用しており、１型インスリン様成長因子（ＩＧＦ）受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）に対する親和性も低下する。

【００１１】

第２の発明の驚くべき観点は、実用的なインスリン製剤として安全及び有効な製剤とすることができるように、そのようなインスリン類似体が同時に自己会合の低下を示し、それにより皮下会合で即効的な作用を示すが、化学的および物理的分解に対する安定性をまだ十分維持するように設計することができる点である。インスリン類似体の上記２つの特性により、分裂促進性が上昇しないことはさらに驚きである。これら３つの好ましい特徴を集合させるには、同時に３つの修飾が必要であり、いずれか１つのみでは上記の利益は得られず、実際はインスリン類似体の安全性または有効性に有害になると予想される。３つの修飾とは、（ｉｉ）Ｂ１０位のヒスチジンをアスパラギン酸に置換する、（ｉｉ）Ａ８、Ｂ２９、および／またはＢ２９位に１若しくはそれ以上の酸性修飾基を導入する、ま

たはＢ鎖のジペプチドＣ末端を伸長する、および（ｉｉｉ）Ｂ２４位のフェニルアラニンの芳香環にハロゲン原子を導入することである。理論により制約されることは望まないが、我々は、本発明のインスリン類似体のｉｎ　ｖｉｖｏでの作用強度上昇が、受容体連結に対する標的組織の細胞シグナル伝達を反映すると予測している。

【００１２】

本発明の製剤は、肥満、２型糖尿病、および著しいインスリン抵抗性を示す西洋社会の患者に偏って利益を与えると予想している。そのような臨床的特徴は、アフリカ系アメリカ人、スペイン系アメリカ人、および土着のアメリカ人部族など、主張が不十分な少数民族への負担を増す。タンパク質１ナノモルあたりの生物活性が高くなっているため、本発明の製剤はインスリンポンプのリザーバの寿命を延長し、このようなポンプの小型化を可能にする上でも有用である。

【００１３】

したがって、本発明の観点は、皮下注射において即効性の薬物動態学的および薬力学的特性を示すインスリン類似体を提供することである。本発明の類似体は、Ｂ１０位にアスパラギン酸、およびさらにＡ８、Ｂ２８、および／またはＢ２９位の１若しくはそれ以上の位置にグルタミン酸を含む。本発明のインスリン類似体は、Ｂ２４位のフェニルアラニンの芳香環に（水素原子の代わりに）１若しくはそれ以上のハロゲン原子も含む。インスリン類似体のインスリン受容体（ＩＲ－ＡおよびＩＲ－Ｂイソ型）に対する絶対的ｉｎ　ｖｉｔｒｏ親和性は、野生型ヒトインスリンの５～１００％の範囲であることは、本発明のさらなる観点であるため、ホルモン－受容体複合体が滞留時間の延長を示す可能性は低く、理論により制約されることは望まないが、このような滞留時間の延長は、哺乳類の発癌リスクの上昇または培養時の癌細胞株のより急速な増殖と関連すると考えられる。また、インスリン類似体の１型インスリン様成長因子受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）に対する絶対的ｉｎ　ｖｉｔｒｏ親和性が野生型ヒトインスリンの１０～１００％の範囲であることは、本発明のさらなる観点であるため、ホルモン／ＩＧＦ－１Ｒ複合体が滞留時間の延長を示す、または野生型ヒトインスリンを介する有糸分裂誘発よりも過剰のＩＧＦ－１Ｒ関連有糸分裂誘発を媒介する可能性は低い。

【００１４】

上記の特徴の組み合わせは、Ｂ２４位のフェニルアラニン芳香環のハロゲン化修飾と合わせて、酸性アミノ酸置換の新規の組み合わせにより与えられる。インスリン単量体表面と比較した本芳香環の構造的環境を図３に示す。理論により制約されることは望まないが、我々は、Ｂ２４のハロゲン化修飾がインスリン受容体およびＩＧＦ－１Ｒ受容体の保存されたＢ２４関連結合ポケットを混乱させ、ＡｓｐＢ１０の滞留時間を延長させ、３種類のホルモン受容体複合体（ＩＲ－Ａ、ＩＲ－Ｂ、およびＩＧＦ－１Ｒ）の親和性を高める作用を軽減すると推測している。これも理論により制約されることは望まないが、さらに我々は、（ＡｓｐＢ１０によって与えられる）Ｂ１０位の負電荷と（これらの部位の１若しくはそれ以上の酸性アミノ酸置換によって与えられる）Ａ８、Ｂ２８、および／またはＢ２９の１若しくはそれ以上の負電荷を合わせた非相加的作用は、細胞レベルでのホルモン－受容体連結に対するインスリンシグナルの強度を増大させると推測している。このモデルでは、１分子当たりで評価した場合、（糖尿病を有する哺乳類の血糖濃度制御と関連し、）インスリン類似体のｉｎ　ｖｉｖｏ作用強度を増加させるのは、後者の強度増大である。

【００１５】

一般に、本発明はＢ１０位にアスパラギン酸、Ｂ２４位にハロゲン置換フェニルアラニン誘導体、およびＡ８、Ｂ２８、および／またはＢ２９位の１若しくはそれ以上の酸性アミノ酸置換を有するインスリン類似体を提供する。したがって、本発明は、構成要素の修飾のいずれか1つによって与えられた念願の臨床的利益を一緒に提供する修飾の組み合わせを含むインスリン類似体の新規クラスに関する。本発明の類似体は、ジペプチドＣ末端の伸長（Ｂ３１およびＢ３２位の残基）を含む変異体Ｂ鎖を含み、少なくとも１残基が、これに制限されるものではないが、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、Ｇｌｕ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｇｌｕ、

Ｇｌｕ－Ａｓｐ、Ｓｅｒ－Ａｓｐなどの酸性残基である。代わりに、本発明の類似体は、選択的に、（ｉ）残基Ｂ１、Ｂ１－Ｂ２、またはＢ１－Ｂ３がない、および／または（ｉｉ）残基Ｂ３０がないなど、Ｂ鎖の切断を含む。本発明の別の類似体は、Ｂ２８位の酸性アミノ酸置換と関連してＢ２９位にプロリンを含む。本発明のさらに別の類似体は、Ａ１３位にトリプトファン、Ａ１４位にグルタミン酸、および／またはＡ２１位にグリシンを含む。

【図面の簡単な説明】

【００１６】

【図１】図１Ａは、Ａ鎖およびＢ鎖および側方の二塩基開裂部位（黒丸）で示した接続領域およびＣペプチド（白丸）を含むヒトプロインスリン配列（配列ＩＤ番号：１）の略図である。

【００１７】

図１Ｂは、インスリン様構造および不規則な接続ペプチド（点線）から成るプロインスリンの構造モデルである。

【００１８】

図１Ｃは、Ｂ鎖のＢ２７およびＢ３０位を示す、ヒトインスリン配列（配列ＩＤ番号：２および３）の略図である。

【００１９】

【図２】図２は、当該分野で既知のプランディアル（即効型）インスリン類似体設計の根底にある薬物動態学的原則の略図である。皮下デポー製剤では、インスリン六量体（左上）は大きすぎて毛細血管（下部）を効率的に通過することができないが、インスリン二量体（中央上）およびインスリン単量体（左上）ではより速い取り込みが媒介される。プランディアル・インスリン製剤ＨＵＭＡＬＯＧ（登録商標）およびＮＯＶＯＬＯＧ（登録商標）は、その分解速度が加速されるように、亜鉛インスリン六量体の二量体化表面付近にアミノ酸置換を有するインスリン類似体（それぞれインスリン・リスプロおよびアスパルト）を含み、プランディアル・インスリン製剤ＡＰＩＤＲＡ（登録商標）（インスリン・グルリジン）は、（結合平衡として）同様にデポー製剤で速い分解速度を示す無亜鉛オリゴマーとして製剤化されている。本発明のインスリン類似体は、単離インスリン単量体、および安定性が増加することで亜鉛を介した会合または亜鉛なしの高次の会合がない製剤化を可能とする弱い結合の二量体を提供する。左上の六量体は、$T_3R^f{}_3$亜鉛六量体を示しており、Ａ鎖を緑色、Ｂ鎖を青色で示し、３つの結合フェノールリガンドが赤色でＣＰＫモデルとして示している。中央の二量体は無亜鉛Ｔ２二量体を示し、Ａ鎖は赤色、Ｂ鎖は緑色（残基Ｂ１－Ｂ２３およびＢ２９－Ｂ３０）または灰色（Ｂ２４－Ｂ２８、逆平行βシート）で示しており、二量体と関連した鎖間水素結合を点線で示す。結晶学的プロトマーの集まり（Ｔ、Ｒ、およびR^f）を右上に示し、Ａ鎖を赤色、Ｂ鎖を青色（Ｂ１－Ｂ９）および緑色（Ｂ１０－Ｂ３０）で示す。

【００２０】

【図３】図３は、Ｔ状態のインスリン単量体の静電電位表面図であり、（棒モデルとしてアジュールブルーで示す）ＰｈｅＢ２４の側鎖の役割を、疎水性コアに隣接する隙間と比較して示している。Ｂ２４芳香環の縁部周辺にある空間は、オルト、メタ、またはパラ位のプロトンをフルオロ芳香族、クロロ芳香族、またはブロモ芳香族による修飾で置換できる十分な広さである。前記タンパク質表面については、負の静電電位の領域を網掛けの赤色、正の静電電位の領域を青で示している。

【００２１】

【図４】図４は、インスリン類似体（Ｔ－０３３７とする）の作用強度の静脈内試験をＫＰインスリンと比較して提供している。糖尿病Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（時間０の血糖値３５０～４００ｍｇ／ｄｌ）の尾静脈に、表示の全長インスリン類似体１０μｇ／３００ｇ体重またはｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３インスリン類似体９．４μｇ／３００ｇ体重を注入した。（Ａ）時間（横軸）を関数とした血糖濃度（縦軸）のプロット。記号：（□：枠ありの網掛け四角）希釈液対照（緩衝液のみ）、（□：枠なし網掛け四角）インス

リン・リスプロ、（○）ｄｅｓ－Ｂ１，Ｂ３－ＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリン（Ｔ－０３３７とする）。（Ｂ）初期血糖濃度のパーセント変化（縦軸）と比較した同データの別プロット。記号はグラフＡと同じ。各群のラット数は９匹（希釈液対照）または５匹（インスリン類似体）。誤差バー、標準誤差。

【００２２】

【図５】図５は、インスリン類似体の皮下注射に対する糖尿病Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの薬力学的反応試験を示す。糖尿病Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（時間０の血糖値は３５０～４００ｍｇ／ｄｌ）の尾静脈に、表示の全長インスリン類似体１０μｇ／３００ｇ体重またはｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３インスリン類似体９．４μｇ／３００ｇ体重を注入した。（Ａ）時間（横軸）を関数とした血糖濃度（縦軸）のプロット。記号：（□：枠ありの網掛け四角）希釈液対照（すなわち、緩衝液のみ）、（■）インスリン・リスプロ、（○）ＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリンのＧｌｙＡ２１誘導体（Ｔ－０３４７とする）。（Ｂ）初期血糖濃度のパーセント変化（縦軸）と比較した同データの別プロット。記号はグラフＡと同じ。各群のラット数は１２匹（希釈液対照）、１１匹（インスリン・リスプロ）、または４匹（本発明のインスリン類似体）。誤差バー、標準誤差。

【００２３】

【図６】図６は、インスリン類似体の作用強度の静脈内試験をインスリン・リスプロと比較して提供している。糖尿病Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（時間０の血糖値３５０～４００ｍｇ／ｄｌ）の尾静脈に、表示の全長インスリン類似体／３００ｇ体重を注入した。各グラフで希釈液対照（緩衝液のみ）は、枠ありの灰色で塗りつぶした四角（□）で示している。（Ａ、Ｃ、およびＥ）時間（横軸）を関数とした血糖濃度（縦軸）のプロット。（Ｂ、Ｄ、およびＦ）初期血糖濃度のパーセント変化（縦軸）と比較した同データの各プロット。

【００２４】

（ＡおよびＢ）記号：（△）５μｇの用量のＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリン、（▲）１０μｇの用量のＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリン、および（■、枠なし）１０μｇの用量のインスリン・リスプロ。希釈液群およびインスリン・リスプロ群のラット数は各９匹、類似体Ｔ－０３３５の各用量でラット数４匹、誤差バー、標準誤差。類似体オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリンもＴ－０３３５とする。

【００２５】

（ＣおよびＤ）記号：（＊）１０μｇの用量のＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリン、および（■、枠なし）１０μｇの用量のインスリン・リスプロ。希釈液群およびインスリン・リスプロ群のラット数は各９匹、類似体Ｔ－０３３９の各用量でラット数４匹、誤差バー、標準誤差。類似体オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリンもＴ－０３３９とする。

【００２６】

（ＥおよびＦ）記号：（＊）１０μｇの用量のＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリンＧｌｕＡ２１、ＧｌｕＡ８誘導体、および（■、枠なし）１０μｇの用量のインスリン・リスプロ。希釈液群およびインスリン・リスプロ群のラット数は各９匹、類似体Ｔ－０３４８の各用量でラット数４匹、誤差バー、標準誤差。類似体オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリンもＴ－０３４８とする。本類似体の誤差バー（濃い垂直線の部分）は場合によっては記号よりも小さいため、図では見えていない。

【００２７】

【図７】図７は、インスリン類似体の皮下注射に対する糖尿病Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの薬力学的反応試験を示す。糖尿病ラット（時間０の血糖値は４００±２０ｍｇ／ｄｌ）に、表示のインスリン類似体１単位／３００ｇ体重をｓ．ｑ．注入した。糖尿病Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（時間０の血糖値は３５０～４００ｍｇ／ｄｌ）

の尾静脈に、表示の全長インスリン類似体／３００ｇ体重を注入した。各グラフで希釈液対照（緩衝液のみ）は、枠ありの灰色で塗りつぶした四角（■）で示している。（Ａ、Ｃ、およびＥ）時間（横軸）を関数とした血糖濃度（縦軸）のプロット。（Ｂ、Ｄ、およびＦ）初期血糖濃度のパーセント変化（縦軸）と比較した同データの別プロット。

【００２８】

（ＡおよびＢ）記号：（▲）２０μｇの用量のＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリン、および（■）２０μｇの用量のインスリン・リスプロ。希釈液群のラット数は１２匹、インスリン・リスプロ群のラット数は１１匹、本類似体群のラット数は４匹とした。誤差バー、標準誤差。類似体オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリンもＴ－０３３５とする。

【００２９】

（ＣおよびＤ）記号：（◆）２０μｇの用量のＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９、ＧｌｕＢ３１、ＧｌｕＢ３２－インスリン、および（■）２０μｇの用量のインスリン・リスプロ。希釈液群のラット数は１２匹、インスリン・リスプロ群のラット数は１１匹、本類似体群のラット数は４匹とした。誤差バー、標準誤差。類似体オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９、ＧｌｕＢ３１、ＧｌｕＢ３２－インスリンもＴ－０３３６とする。

【００３０】

（ＥおよびＦ）記号：（＊、灰色の×）１０μｇの用量のＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリンのＧｌｕＡ８誘導体、（×、黒色の×）２０μｇの用量のＡｓｐＢ１０、オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－インスリンのＧｌｕＡ８誘導体、（□、枠なし）１０μｇの用量のインスリン・リスプロ、および（■）２０μｇの用量のインスリン・リスプロ。希釈液群のラット数は１２匹、２０μｇの用量のインスリン・リスプロ群のラット数は１１匹、１０μｇの用量のインスリン・リスプロ群のラット数は７匹、本類似体群のラット数は各用量１１匹とした。誤差バー、標準誤差。類似体オルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４のＧｌｕＡ８類似体、ＧｌｕＢ２９－インスリンもＴ－０３３９とする。

【００３１】

【図８】図８は、（Ｂ）酸性置換基ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ２９を含むヒトインスリン類似体（Ｔ－０３３９とする）の各用量反応関係を、（Ａ）対照類似体ＫＰ－インスリンとオルト－フルオロ－フェニルアラニンの位置を合わせて描写している。データは、いずれのケースも横軸に示された用量でインスリン類似体を皮下注射後、糖尿病Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットから得たものである。縦軸は、注射後最初の１時間の血糖濃度の初期低下率を示している。それぞれのＩＣ５０値は５．４μｇ（ＫＰ－インスリン）および２．９μｇ（Ｔ－０３３９）と推定され、本発明の類似体本来の作用強度の２倍と一致している。

【００３２】

【図９】図９は、２５℃での化学変性により調査した熱力学的安定性試験を示している。これらの試験では、ヘリックスに感受性の波長でＣＤにより検出される楕円率を、縦軸に塩酸グアニジン濃度の関数として示している。変性剤濃度（ΔＧｕ）ゼロでの遊離エネルギーは、２つの状態を適用することで推測した。（Ａ）ＡｓｐＢ１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－ヒトインスリン（白丸、Ｔ－０３３５とする）とＫＰ－インスリン（白丸、白四角）。（Ｂ）ＡｓｐＢ１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９、ＧｌｕＢ３１、ＧｌｕＢ３２－ヒトインスリン（白丸、Ｔ－０３３６とする）とＫＰ－インスリン（白四角）。（Ｃ）ＡｓｐＢ１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－ヒトインスリンのｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３の誘導体（白丸、Ｔ－０３３７とする）とＫＰ－インスリン（白四角）。（Ｄ）ＡｓｐＢ１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＬｙｓＢ２８、ＰｒｏＢ２９－ヒトインスリンのＧｌｕＡ８誘導体（白丸、Ｔ－０３３８とする）とＫＰ－インスリン（白四角）。（Ｅ）ＡｓｐＢ１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－ヒトインスリンのＧｌｕＡ８誘導体（白丸、Ｔ－０３３９とする）とＫＰ－インスリン（白四角）。（Ｆ）ＡｓｐＢ

１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９、ＧｌｕＢ３１、ＧｌｕＢ３２－ヒトインスリンのＧｌｕＡ８誘導体（白丸、Ｔ－０３４０とする）とＫＰ－インスリン（白四角）。２Ｆ－ＰｈｅＢ２４は、Ｂ２４位のオルト－フルオロ－フェニルアラニンを示す。

【００３３】

【図１０】図１０は、２５℃での化学変性により検討した熱力学的安定性試験を示している。（Ａ）ＡｓｐＢ１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＬｙｓＢ２８、ＰｒｏＢ２９－ヒトインスリンのＧｌｙＡ２１誘導体（白丸、Ｔ－０３４６とする）とＫＰ－インスリン（白四角）。（Ｂ）ＡｓｐＢ１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－ヒトインスリンのＧｌｙＡ２１誘導体（白丸、Ｔ－０３４７とする）とＫＰ－インスリン（白四角）。（Ｃ）ＡｓｐＢ１０、２Ｆ－ＰｈｅＢ２４、ＧｌｕＢ２９－ヒトインスリンのＧｌｕＡ８、ＧｌｙＡ２１誘導体（白丸、Ｔ－０３４８とする）とＫＰ－インスリン（白四角）。これらの試験では、ヘリックスに感受性の波長（２２２ｎｍ）でＣＤにより検出される楕円率を、縦軸に塩酸グアニジン濃度の関数として示している。変性剤濃度（ΔＧｕ）ゼロでの遊離エネルギーは、２つの状態を適用することで推測した。２Ｆ－ＰｈｅＢ２４は、Ｂ２４位のオルト－フルオロ－フェニルアラニンを示す。

【００３４】

【図１１】図１１は、ＭＣＦ－７ヒト乳癌細胞株の分裂促進性試験を示し、本発明の類似体と野生型ヒトインスリン、ＡｓｐＢ１０－ヒトインスリン、インスリン様成長因子Ｉ（ＩＧＦ－Ｉ、図示せず）を比較できるようにしている。

【発明を実施するための形態】

【００３５】

本発明は、分子レベルでのｉｎ　ｖｉｖｏ生物学的作用強度が増加し、広範なタンパク質濃度および製剤強度（典型的にはＵ－１００～Ｕ－５００、選択的にＵ－１０００の高さも可能）での作用が速く、ＩＲ－Ａ／ＩＲ－Ｂ受容体結合親和性が野生型ヒトの親和性に対して５～１００％の範囲の絶対的親和性であり（下限はプロインスリンに対応するように選択した）、ＩＧＦ－１Ｒの親和性が野生型ヒトインスリン以下であり、亜鉛イオンなしの野生型ヒトインスリンのベースラインの安定性に対して亜鉛イオンなしの熱力学的安定性が高いインスリン類似体に関するものである。

【００３６】

皮下デポー製剤からの速い吸収動態が、単量体または二量体であるが、これよりも高次の自己会合状態ではないインスリン類似体により、タンパク質濃度０．６～６．０ｍＭ（正式な単量体濃度により計算）、中性ｐＨの無亜鉛溶液中で発生することは、本発明の特徴である。当該分野で既知のとおり、従来のプランディアル製剤は、六量体－六量体相互作用により伸長し、亜鉛で安定化した、または亜鉛イオンとは無関係の六量体など、自己会合の状態間に考えられる連続した結合平衡を示す。この戦略の分子学的実装は、（ｉ）野生型ヒトインスリンと比較して無亜鉛単量体または二量体として超安定であり、（ｉｉ）分子レベルまたはナノモルレベルで（ホルモン制御による血糖濃度の低下により評価した）生物学的作用強度の上昇を示す、新規クラスのインスリン類似体を提供することである。理論により制約されることは望まないが、バイアル、ペン、又はポンプリザーバにおいて無亜鉛インスリン類似体単量体および二量体は本質的に安定であるため、安定な製剤とすることができるが、血流中での前記類似体の本質的作用強度は、Ｕ－２００～Ｕ－５００および選択的にＵ－１０００の高さの製剤強度でプランディアル血糖コントロールを示し、増大した本質的安定性のため、現在のインスリン類似体プランディアル製剤と比較し、低いタンパク質濃度で特定の強度を達成することができる。血糖コントロールに対する作用強度の上昇は、分裂促進性、すなわち、癌リスクおよび癌増殖の観点からは望ましくない明確なシグナル伝達経路の亢進とは関連していないことが本発明の特徴である。

【００３７】

制限されない例として、アスパラギン酸がＢ１０位に保持され、フェニルアラニンのハロゲン化誘導体がＢ２４位に保持され、Ａ８、Ｂ２８、および／またはＢ２９により提供される１若しくはそれ以上の部位に１若しくはそれ以上の酸性アミノ酸置換が存在する限

り、インスリン類似体がブタ、ウシ、ウマ、およびイヌインスリンなどの動物インスリン由来のＡ鎖およびＢ鎖配列で作られることも予測される。そのようなヒトインスリンまたは動物インスリン由来の変異型Ｂ鎖は任意にＣ末端ジペプチドの伸長を含むが（それぞれの残基の位置はＢ３１およびＢ３２とする）、これらのＣ末端で伸長した塩基の少なくとも１つは酸性アミノ酸である。加えてまたは代わりに、本発明のインスリン類似体はＢ１～Ｂ３残基の欠失を含む、またはＢ２８位にプロリンのない変異型Ｂ鎖と結合してもよい（例えば、ＡｓｐＢ２８またはＧｌｕＢ２８とＢ２９位のリジンまたはプロリンとの組み合わせ）。Ａ１３位のロイシンを選択的にトリプトファン置換し、Ａ１４位のチロシンを選択的にグルタミン酸と置換してもよい。

【００３８】

さらに、本発明のインスリン類似体は、ピキア酵母（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）、サッカロミケス酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｃｉａｅ）、または他の酵母発現種または菌株の酵母生合成における、前駆体ポリペプチドのＬｙｓに対するタンパク質分解に由来することも想定される。そのような菌株は、改変ｔＲＮＡ合成酵素および直交ナンセンス抑圧によりＢ２４位にハロゲン修飾フェニルアラニンを挿入するように改変することもできる。本発明のインスリン類似体のＢドメインは、（熱力学的安定性、受容体結合親和性、およびフィブリル化抵抗性を増大させる目的で）選択的にＢ２０および／またはＢ２３位のＤアミノ酸など、非標準的置換を含んでもよい。Ｂ２４位のハロゲン化修飾は、Phe^{B24}の２つの環位（すなわち、オルト－Ｆ－Phe^{B24}、オルト－Ｃｌ－Phe^{B24}、またはオルト－Ｂｒ－Phe^{B24}）とすることができる。選択的に、前記類似体は、熱力学的安定性および受容体結合活性を増大することを目的とし、Tyr^{B16}および／またはTyr^{B26}（３－モノ－ヨード－Ｔｙｒまたは［３，５］－ジ－ヨード－Ｔｙｒ）の芳香環にヨウ素置換を含んでもよい。Ｃ末端のThr^{B27}、Thr^{B30}、または１若しくはそれ以上のセリン残基を単独または組み合わせて単糖類付加体で修飾することも想定され、例はＯ－結合Ｎ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＧａｌＮＡｃ－O^{β}－ＳｅｒまたはＧａｌＮＡｃ－O^{β}－Ｔｈｒ）、Ｏ－結合α－Ｄ－マノピラノシド（マンノース－O^{β}－Ｓｅｒまたはマンノース－O^{β}－Ｔｈｒ）、および／またはα－Ｄ－グルコピラノシド（グルコース－O^{β}－Ｓｅｒまたはグルコース－O^{β}－Ｔｈｒ）により示される。

【００３９】

様々な実施形態では、別のまたは追加の変異を本明細書のインスリン類似体に導入し、薬効（例えば、作用発現またはその持続時間）、受容体の選択性、グルコースの反応性、および／または安定性（例えば、熱安定性）に影響を及ぼすことができ、一部の実施形態では、前記変異が濃縮された形態で有効となる、および／またはポンプ系での送達に適切となる。

【００４０】

本明細書で説明した修飾は、リスプロ・インスリン（Ｌｙｓ　Ｂ２８、Ｐｒｏ　Ｂ２９）、インスリン・アスパルト（Ａｓｐ　Ｂ２８）、およびＤＫＰ－インスリンなど、多数の既存の即効型インスリン類似体に作られる。ＤＫＰインスリンは、置換Ａｓｐ　Ｂ１０（Ｄ）、Ｌｙｓ　Ｂ２８（Ｋ）およびＰｒｏ　Ｂ２９（Ｐ）を含む。さらに、または代わりに、前記インスリン類似体は１若しくはそれ以上の以下の修飾を含んでもよい。

【００４１】

即効型インスリン類似体に関する一部の実施形態では、前記インスリン類似体がＡ８位にアミノ酸置換を有する（例えば、Ｇｌｕ以外）。Ａ８側鎖は、インスリン単量体のＡ鎖表面から溶媒に、およびその集合体ではインスリン六量体に向かって突出すると考えられるため、立体的な衝突がなく、多様な側鎖をつくることができる。インスリンの天然構造では、この位置はＡ１－Ａ８　α－ヘリックスのＣ末端残基である。Ａ８の置換は（野生型Ｔｈｒと比較して）そのＣ－Ｃａｐ傾向を高めるため、Ａ１－Ａ８　α－ヘリックスセグメントの安定性が増大する。Ａ８の多様な置換を、当該分野で既知のＢ鎖置換を含む即効型インスリン類似体に導入する場合、野生型ヒトインスリンと比較し、熱力学的安定性

が上昇し、フィブリル化への抵抗性が増加するが、インスリン受容体の親和性は実質的に維持される。典型的なＡ８の置換は、トリプトファン、メチオニン、リジン、またはヒスチジンなどである。これらの実施形態に沿った他の典型的な修飾については、米国特許第８，９９３，５１６号明細書に説明され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００４２】

一部の実施形態では、前記インスリン類似体がより速い六量体の分解を示すため、皮下注射後の吸収が加速される。一部の実施形態では、ハロゲン化Ｐｈｅの代わりに、前記インスリン類似体がＢ２４位にシクロヘキサニルアラニン（Ｃｈａ）などの非標準アミノ酸を導入し、ヒトにおけるインスリン吸収の律速段階である六量体の分解速度を著しく高める。これは、芳香族アミノ酸側鎖を、平面ではないが、フェニルアラニンとほぼ同サイズおよび同形状の非芳香族類似体で置換することにより達成され、前記類似体は、少なくとも、前記天然型芳香族側鎖を含む対応するインスリンまたはインスリン類似体の生物学的活性の一部を維持する。この参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ　２０１４／０３０３０７６を参照のこと。さらに、例えば、Ｂ２９位の非標準アミノ酸に追加置換することでさらに利益が得られる可能性がある。典型的な非標準的アミノ酸は、ノルロイシン、アミノブチル酸、アミノプロピオン酸、オルニチン、ジアミノブチル酸、およびジアミノプロピオン酸を含む。この参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ　２０１４／０３０３０７６を参照のこと。

【００４３】

さらに他の実施形態では、製造工程でジスルフィド対合およびタンパク質の折り畳みを達成後、前記インスリン類似体が残基Ｂ１～Ｂ３の非必須性を利用している。残基Ｂ１～Ｂ３の除去は、野生型の残基Ａｓｎ　Ｂ３の位置にＢ３位のＬｙｓまたはＡｒｇを含む前駆体でトリプシンの作用により達成することができる。そのような前駆体の例は、製剤ＡＰＩＤＲＡ（登録商標）の有効成分である類似体インスリン・グルリジンである（Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）。類似体には残基ＰｈｅＢ１－ＶａｌＢ２－ＡｓｎＢ３がないため、短縮Ｂ鎖（２７残基）を含む。前記短縮Ｂ鎖は、室温以上でもフィブリル化に抵抗性を与え、インスリン受容体に天然型同様結合できるようになる。これらの実施形態の典型的な修飾については、ＷＯ　１１６７５３に説明され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００４４】

一部の実施形態では、前記インスリン類似体が、一連のタンパク質濃度、および皮下注射後に急速に吸収する形状の製剤とすることができる、十分な化学的安定性および物理的安定性の亜鉛安定化インスリン六量体を形成する。例えば、前記インスリン類似体は３つのグルタミン酸残基Ｇｌｕ　Ａ８、Ｇｌｕ　Ｂ３１、およびＧｌｕ　Ｂ３２を有してもよく、当該分野で既知のＢ鎖の置換と組み合わせて使用され、インスリン六量体の分解を加速する、または同製剤の野生型インスリンと比較し、皮下注射後のインスリン類似体の吸収がさらに速くなることと関連する。例えば、前記インスリン類似体は（ａ）Ａ８位のグルタミン酸（Ｇｌｕ）、（ｂ）Ｂ鎖の２残基Ｇｌｕ　Ｂ３１－Ｇｌｕ　Ｂ３２の伸長、および（ｃ）選択的にＢ２４位の非飽和アミノ酸（例えば、シクロヘキサニルアラニンまたはフェニルアラニンの芳香環のハロゲン化誘導体）を組み込むことで修飾可能である。この参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ　２０１３／１１００６９を参照のこと。

【００４５】

以下にさらに詳細に説明される通り、一部の実施形態では、前記インスリン類似体が即効型インスリン類似体のこれまでの制限、つまり、これらが野生型インスリンよりもフィブリル化に対する感受性が高いことを取り上げている。前記インスリン類似体は、Ｂ２７および／またはＢ３０にＯ－結合単糖類ピラノシド付加体を有してもよい（例えば、マンノピラノシド、Ｎ－アセチル－ガラクトピラノシド、またはグルコピラノシド）。これらの類似体は、Ｂ２７およびＢ３０位のトレオニン残基の天然での発生および予備成形されたコアのインスリン（ｄｅｓ，－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］－インスリン［ＤＯ

Ｉ］とする）にこれらの部位で炭水化物付加体を修飾した合成ペプチドを結合する、トリプシンを介した半合成の可能性を生かしている。これらの実施形態の典型的なインスリン類似体については、ＷＯ　０１５０７８に説明され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００４６】

さらに他の実施形態では、前記インスリン類似体の血流への急速な吸収が、少なくとも一部はＢ鎖のＳｉｔｅ－１関連表面およびそれに隣接した部位の置換または修飾のためである。さらに、標的細胞シグナル伝達の持続期間短縮は、Ａ鎖および／またはＢ鎖Ｓｉｔｅ－２関連表面の変異または修飾によって得られる。Ｓｉｔｅ－２関連の置換は、Ｂ１３、Ｂ１７、Ａ１２、Ａ１３、およびＡ１７の１若しくはそれ以上の位置の修飾である。この参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ　２０１４／１４５５９３を参照のこと。

【００４７】

一部の実施形態では、前記インスリン類似体がＢ２６のモノ－またはジ－ヨード-Ｔｙｒを有する即効型インスリン類似体（例えば、３－Ｉ－Ｔｙｒ　Ｂ２６）であり、これが、例えばバイアルまたは送達器具中でＲ６六量体を安定化する。この参照により本明細書に組み込まれる、米国仮出願第６２／０１９，３５５号明細書を参照のこと。

【００４８】

一部の実施形態では、前記インスリン類似体が前記インスリン受容体に結合したグルコース反応性結合を示す。これらの実施形態の典型的なインスリン類似体については、米国仮出願第６２／１３２，７０４号明細書および第６２／１３３，２５１号明細書に開示され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、そのような類似体が２つの重要要素を含む。第１は、Ａ１位のグリシン（Ｇｌｙ　Ａ１）のαアミノ基、または選択的に、Ａ１位で耐性に優れたアミノ酸置換としてのＤリジン（Ｄ－Ｌｙｓ　Ａ１）のεアミノ基、またはＡ４位の置換としてのＬリジンのεアミノ基（Ｌ－Ｌｙｓ　Ａ４）にある（ペーサー要素を含む）フェニルボロン酸誘導体である。フェニルボロン酸基は、単糖類内のジオールと結合する。前記スペーサー要素は３～１６炭素原子の直鎖型アシル鎖を含んでもよく、その末端または末端付近に選択的に１若しくはそれ以上の窒素原子を含んでもよい。第２の要素はＢ２７、Ｂ２８、Ｂ２９、Ｂ３０位の１若しくはそれ以上にある、または１残基Ｂ３１（Ｂ３１）または２残基（Ｂ３１－Ｂ３２）を含むＢ鎖のペプチド伸長に結合したＮ結合またはＯ結合単糖、二糖、またはオリゴ糖である。Ｏ結合単糖類の例は、セレンまたはトレオニン誘導体であり、Ｎ結合単糖類の例はアスパラギンまたはグルタミン誘導体である。

【００４９】

単糖類の例はグルコース、マンノース、およびＮ－アセチル－ガラクトースである。前記類似体は、皮下デポー製剤の表面レクチンに前記インスリン類似体のグルコース感受性結合を提供することを目的としたメカニズムとして、（スペーサー要素とともに）残基Ｂ１に結合した追加フェニルボロン酸基（またはそのハロゲン誘導体）を選択的に含んでもよい。

【００５０】

一部の実施形態では、前記インスリン類似体は、好ましくはインスリン受容体Ｂ（ＩＲ－Ｂ）に対してインスリン受容体Ａ（ＩＲ－Ａ）に結合する。典型的な類似体およびその有益な特性については、ＷＯ　０１９５８９６に説明され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、前記類似体は単鎖インスリンであり、前記インスリンＡ鎖およびインスリンＢ鎖は、プロインスリンリンカーと比較し、切断リンカーと結合する。例えば、前記リンカーは１５アミノ酸長未満とすることができ（例えば、４～１３アミノ酸長）、一部の実施形態では、配列Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ－Ａｒｇを有する。

【００５１】

一部の実施形態では、前記インスリン類似体を修飾し、Ｉ型インスリン様成長因子（ＩＧＦＲ）に対するその相対的親和性を低下させるように修飾するが、実質的には前記インスリン受容体（ＩＲ）に対する親和性が保持または改善する。この点についての典型的な

修飾はＷＯ　０１８４４８８に説明され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、前記インスリン類似体がＡ０位（つまり、Ａ鎖のアミノ末端の付加）にアミノ酸付加体を含む、またはＡ４、Ａ８、またはＡ２１位にアミノ酸置換を含む、またはその組み合わせである。インスリンの天然構造では、残基Ａ１－Ａ８がα－ヘリックスを有する。このセグメントはインスリンおよびインスリン類似体のＩＲおよびＩＧＦＲへの結合に関与すると考えられる。１つの例では、Ａ０伸長がＡｒｇ、Ａ８置換がＡｒｇ、およびＡ２１置換がＧｌｙである。別の例では、Ａ０伸長がＡｒｇ、Ａ８置換がＨｉｓ、およびＡ２１置換がＧｌｙである。別の例では、Ａ４置換がＨｉｓまたはＡｌａ、Ａ８置換がＨｉｓである。さらに別の例では、Ａｌ置換がＤアミノ酸、Ａ８置換がジ－アミノ－酪酸である。代わりに、（この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）米国仮出願第６２／１０５，７１３号明細書に説明されるとおり、前記類似体がＢ１０位のＡｓｐとＢ２４位のペンタ－フルオロ－Ｐｈｅとを含み、これがさらにＬｙｓ　Ｂ３およびＧｌｕ　Ｂ２９と結合する。

【００５２】

フィブリル化を加速または阻害する因子が広範に検討された。無亜鉛インスリンは広範な条件でフィブリル化を受けやすく、天然の二量化および高次の自己会合を妨げる因子により促進される。活性型インスリンの構造は、Ｈｉｓ　Ｂ１０の側鎖が配位した軸亜鉛イオンにより安定化されると考えられる。商標ＮＯＶＯＬＯＧ（登録商標）およびＨＵＭＡＬＯＧ（登録商標）として販売されるインスリン類似体は、フィブリル化がより速く、物理的安定性が低い。フィブリル化はインスリンの製造、保存、および使用における重大な懸念であり、糖尿病治療用のインスリン類似体は、例えば高温、低ｐＨにより増強する。

【００５３】

一部の実施形態では、前記インスリン類似体がＨｉｓ　Ａ４およびＨｉｓ　Ａ８をともに有し、残基Ｂ１にヒスチジン置換を有する。前記Ｈｉｓ　Ｂ１置換が存在する場合、Ｂ１　Ｈｉｓ残基の側鎖とＢ５ヒスチジン側鎖の組み合わせは、潜在的Ｂ１－Ｂ５　ｂｉ－ヒスチジンＺｎ結合部位を有し、Ｚｎ依存性にフィブリル化を保護すると考えられる。同様に、Ｈｉｓ　Ａ４、Ｈｉｓ　Ａ８置換も潜在的ｂｉ－ヒスチジンＺｎ結合部位を提供し、フィブリル化から保護する。これらの実施形態の類似体については、ＵＳ　８，３４３，９１４に説明され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００５４】

これらまたは他の実施形態では、少なくとも一部はＢ２４、Ｂ２５、および／またはＢ２６位のハロゲン化フェニルアラニンによりフィブリル化に対する抵抗性が達成され、塩素化フェニルアラニンまたはフッ素化フェニルアラニンとすることができる。様々な実施形態では、前記ハロゲン化フェニルアラニンがオルト－モノフルオロ－フェニルアラニン、オルト－モノブロモ－フェニルアラニン、オルト－モノクロロ－フェニルアラニン、またはパラ－モノクロロ－フェニルアラニンである。これらの実施形態に沿った典型的な類似体については、ＵＳ　８，９２１，３１３に開示され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００５５】

さらに他の実施形態では、安定性の改善を示した前記インスリン類似体が、Ｂ２４位のメチル化フェニルアラニン置換およびＢ鎖ポリペプチドのカネボキシ末端への２つのアミノ酸付加から選択される少なくとも１つの変更を含むＢ鎖プリペプチドを有する。Ｂ３１位の最初のアミノ酸はグルタミンおよびアスパラギン酸から選択され、Ｂ３２位の第２のアミノ酸はグルタミン、アラニン、およびアスパラギン酸から選択される。前記メチル化フェニルアラニンはオルト－モノフルオロ－フェニルアラニン、メタ－モノブロモ－フェニルアラニン、またはパラ－モノクロロ－フェニルアラニンとしてもよい。これらの実施形態はＵＳ　８，３９９，４０７に説明され、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、ＵＳ　２０１４／０１２８３１９に説明される通り、前記ハロゲン化フェニルアラニンがペンタ－フルオロ－フェニルアラニンであり、この参照により本明細書に組み込まれる。

【００５６】
一部の実施形態では、フィブリル化抵抗性が、少なくとも一部はＵＳ　８，１９２，９５７に説明される構造を有する単鎖インスリンにより達成することができ、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。これらの実施形態はインスリンのＡ鎖およびＢ鎖のアミノ酸置換とリンカーペプチド配列を組み合わせ、単量体タンパク質の等電点が野生型ヒトインスリンと同等またはこれ未満となるようにすることで、中性のｐＨ条件でタンパク質の溶解性が保存されるようにしている。一部の実施形態では、前記Ｃペプチドが ＧＧＰＲＲおよびＧＧＰＲＲから選択されるアミノ酸配列を有する。
【００５７】
さらに、ヒトと動物のインスリンが同様であり、過去にヒト糖尿病患者で動物インスリンが使用されていたことを考慮すると、インスリン配列に他の軽度の修飾、特に「保存的」と考えられるこれらの置換を導入可能であることも想定される。例えば、本発明から離れずに、同じ側鎖のアミノ酸基内にさらにアミノ酸の置換を加えることもできる。これには、アラニン（ＡｌａまたはＡ）、バリン（ＶａｌまたはＶ）、ロイシン（ＬｅｕまたはＬ）、イソロイシン（ＩｌｅまたはＩ）、プロリン（ＰｒｏまたはＰ）、トリプトファン（ＴｒｐまたはＷ）、フェニルアラニン（ＰｈｅまたはＦ）、およびメチオニン（ＭｅｔまたはＭ）といった中性疎水性アミノ酸を含む。同様に、天然型極性アミノ酸は、グリシン（ＧｌｙまたはＧ）、セリン（ＳｅｒまたはＳ）、トレオニン（ＴｈｒまたはＴ）、チロシン（ＴｙｒまたはＹ）、システイン（ＣｙｓまたはＣ）、グルタミン（ＧｌｕまたはＱ）、およびアスパラギン（ＡｓｎまたはＮ）の群内で互いに置換することができる。酸性アミノ酸はアスパラギン酸（ＡｓｐまたはＤ）およびグルタミン酸（ＧｌｕまたはＥ）である。（リジン（ＬｙｓまたはＫ）、アルギニン（ＡｒｇまたはＲ）およびヒスチジン（ＨｉｓまたはＨ）を含む）塩基性アミノ酸置換の導入は、このクラスの類似体で上昇した正味の負電荷を維持するためには好ましくない。ほかに記載がない限り、または内容から明らかな場合は、本明細書に示したアミノ酸はＬアミノ酸と考える。標準的なアミノ酸は、同じ化学的クラスに属する非標準的アミノ酸によって置換することもできる。
【００５８】
比較のため、ヒトプロインスリンのアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：１として示す。
配列ＩＤ番号：１（ヒトプロインスリン）
Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ
【００５９】
ヒトインスリンＡ鎖のアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：２として示す。
配列ＩＤ番号：２（ヒトＡ鎖、残基位置Ａ１－Ａ２１）
Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ
【００６０】
ヒトインスリンＢ鎖のアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：３として示す。
配列ＩＤ番号：３（ヒトＢ鎖、残基位置Ｂ１－Ｂ３０）
Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ

【００６１】
本発明の修飾インスリンのアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４として一般形態で示され、６つのシステイン残基が対になり、野生型ヒトインスリン同様、３つのジスルフィド架橋を提供する。
配列ＩＤ番号：４（インスリン類似体）
Ａ鎖
Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{1}$－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｘａａ$_{2}$－Ｘａａ$_{3}$－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{4}$
Ｂ鎖
Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$－Ｘａａ$_{7}$－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{8}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{9}$－Ｘａａ$_{10}$－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{11}$－Ｘａａ$_{12}$
式中、Ｘａａ$_{1}$（Ａ８位）はＴｈｒまたはＧｌｕであり、Ｘａａ$_{2}$はＬｅｕ、Ｔｙｒ、またはＴｒｐであり、Ｘａａ$_{3}$はＴｙｒまたはＧｌｕであり、Ｘａａ$_{4}$はＡｓｎ、Ａｓｐ、Ａｌａ、またはＧｌｙであり、Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$－Ｘａａ$_{7}$は野生型ヒトインスリンではＰｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ、またはＮ末端欠失変異体Ｖａｌ－Ａｓｎ（ｄｅｓ－Ｂ１）、Ａｓｎ（ｄｅｓ－Ｂ１，Ｂ２）、またはなし（ｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３）であり、Ｘａａ$_{8}$は芳香環の１若しくはそれ以上の水素原子がフッ素（Ｆ）、塩素（Ｃ）、または臭素（Ｂｒ）の群のハロゲン原子で置換されたフェニルアラニン誘導体であり、Ｘａａ$_{9}$またはＸａａ$_{10}$の少なくとも１つが酸性アミノ酸であり、選択的に、Ｘａａ$_{11}$－Ｘａａ$_{12}$がＢ鎖のＣ末端ジペプチド伸長を提供し、少なくとも１つの残基が酸性側鎖である。
【００６２】
本発明のインスリン類似体のアミノ酸配列は、一部、配列ＩＤ番号：５～１１（完全Ｂ鎖を含む）および配列ＩＤ番号：１２～１８（Ｎ末端短縮Ｂ鎖を含む）で示され、略して野生型ヒトインスリンと比較した特定の修飾のみが提供される（すなわち、具体的な配列の例はＸａａ$_{1}$、Ｘａａ$_{2}$、Ｘａａ$_{3}$、Ｘａａ$_{4}$、Ｘａａ$_{5}$、Ｘａａ$_{6}$、Ｘａａ$_{7}$、Ｘａａ$_{8}$、Ｘａａ$_{9}$、Ｘａａ$_{10}$、Ｘａａ$_{11}$、およびＸａａ$_{12}$を特徴とする。配列ＩＤ番号：５～１１で示される分子は、Ｂ鎖のＢ１、Ｂ２、およびＢ３位のそれぞれに野生型残基Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎを含み、配列ＩＤ番号：６～１８で示される分子は残基Ｂ１－Ｂ３がない短縮Ｂ鎖を含む。各ケースで、残基Ｂ２４はオルト－フルオロ－フェニルアラニンを含む。配列ＩＤ番号：５で示される配列は、配列ＩＤ番号：４のインスリン類似体の具体例を提供するが、これらの例は配列ＩＤ番号：４で定義される類似体を組み合わせた空間を制限する意図はない。提供された配列コードは、分子命名の内部コードに関する。

ID/コード	B10	B24 ハロゲン	他の酸性/非酸性置換
配列 ID 番号:5 T-0335	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluB29
配列 ID 番号:6 T-0336	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluB29 GluB31 GluB32
配列 ID 番号:7 T-0338	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 LysB28 ProB29
配列 ID 番号:8 T-0339	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 GluB29
配列 ID 番号:9 T-0346	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GlyA21 LysB28 ProB29
配列 ID 番号:10 T-0347	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GlyA21 GluB29
配列 ID 番号:11 T-0348	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 GlyA21 GluB29

【００６３】

本発明の類似体は、これに制限されるものではないが、配列ＩＤ番号：１２～１８で例示されるＢ鎖のＮ末端欠失（ｄｅｓ－Ｂ１、ｄｅｓ－Ｂ１，Ｂ２、またはｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３）を選択的に含んでもよい。これらのＮ末端残基は受容体結合に必要ないが、生合成単鎖前駆体に存在すると、小胞体の天然型ジスルフィド対の有効性を高めるため、生産収率が上昇すると考えられる。

ID/コード	B10	B24 ハロゲン	他の酸性/非酸性置換	B 鎖欠失または伸長（ext.）
配列 ID 番号:12 T-0337	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluB29	*des*-B1-B3 C 末端の伸長なし
配列 ID 番号:13 T-0351	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluB29 GluB31 GluB32	*des*-B1-B3 GluB31 GluB32
配列 ID 番号:14 T-0338	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 LysB28 ProB29	*des*-B1-B3 C 末端の伸長なし
配列 ID 番号:15 T-0339	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 GluB29	*des*-B1-B3 C 末端の伸長なし
配列 ID 番号:16 T-0355	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GlyA21 LysB28 ProB29	*des*-B1-B3 C 末端の伸長なし
配列 ID 番号:17 T-0349	AspB10	オルトフルオロ-PheB24	GlyA21 GluB29	*des*-B1-B3 C 末端の伸長なし
配列 ID 番号:18 T-0350	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 GlyA21 GluB29	*des*-B1-B3 C 末端の伸長なし

【００６４】

以下のＤＮＡ配列は単鎖インスリン類似体をコードし、ピキア酵母（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）の使用パターンを最適化したコードを有する。これらの単鎖インスリン類似体は、上記二本鎖インスリン類似体の産生の生合成中間体を提供する。各ケースで最終コドン（ＡＡＴ）はストップコドンを表す。

【００６５】

５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：１９として示す。

配列ＩＤ番号：１９

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴ

ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００６６】

５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：２０として示す。

配列ＩＤ番号：２０

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴ
ＡＡ

【００６７】

５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８、およびＧｌｕＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：２１として示す。

配列ＩＤ番号：２１

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴ
ＡＡ

【００６８】

非標準的アミノ酸がコドンＢ２４位（ＴＡＧ）のナンセンス抑制により挿入されるように、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：２２として示す。

配列ＩＤ番号：２２

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴ
ＡＡ

【００６９】

非標準的アミノ酸がコドンＢ２４位（ＴＡＧ）のナンセンス抑制により挿入されるように、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：２３として示す。

配列ＩＤ番号：２３

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴ
ＡＡ

【００７０】

配列ＩＤ番号：２４～２８で提供される合成遺伝子群は、上記に示されたアミノ酸配列に従い、選択的にＡ１３およびＡ１４位に特定のアミノ酸置換をコードした一連のＤＮＡ配列を提供する。酵母の核遺伝子では、ロイシンがＤＮＡコドンＴＴＡ、ＴＴＧ、ＣＴＴ、ＣＴＣ、およびＣＴＧでコードされ、チロシンがＤＮＡコドンＴＡＴおよびＴＡＣによりコードされ、トリプトファンがＤＮＡコドンＴＧＧによりコードされ、グルタミン酸が

ＤＮＡコドンＧＡＡおよびＧＡＧによってコードされることは、当該分野で既知である。

【００７１】

配列ＩＤ番号：２４は、Ａ１３位のコドン（XXX_1）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（XXX_2）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：２４

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－XXX_1－XXX_2－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ

【００７２】

配列ＩＤ番号：２５は、Ａ１３位のコドン（XXX_1）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（XXX_2）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：２５

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－XXX_1－XXX_2－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ

【００７３】

配列ＩＤ番号：２６は、Ａ１３位のコドン（XXX_1）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（XXX_2）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：２６

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－XXX_1－XXX_2－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ

【００７４】

配列ＩＤ番号：２７は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（XXX_1）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（XXX_2）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：２７

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－XXX_1－XXX_2－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ

【００７５】
配列ＩＤ番号：２８は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２８
ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ
【００７６】
配列ＩＤ番号：２９～４３で提供される合成遺伝子群は、配列ＩＤ番号：２４～２８で定義される配列の特徴に加え、選択的にＢ１（配列ＩＤ番号：２９～３３）、Ｂ２（配列ＩＤ番号：３４～３８）またはＢ３（配列ＩＤ番号：３９～４３）の３つのコドン位置の１つでリジン残基をコードする一連のＤＮＡ配列を提供し、生合成単鎖インスリン前駆体のそのようなリジン置換により、Ｂ鎖が上記のアミノ酸配列に従い、Ｎ末端欠失ｄｅｓ－Ｂ１、ｄｅｓ－Ｂ１、Ｂ２、またはｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３を含む本発明のインスリン類似体を産生することができる。これらのＮ末端切断は、それぞれ生合成単鎖インスリン前駆体Ｂ１、Ｂ２、またはＢ３位の置換により方向づけられる。酵母の核遺伝子では、リジンがＤＮＡコドンＡＡＡおよびＡＡＧによりコードされることは、当該分野で既知である。上述のとおり、酵母の核遺伝子では、ロイシンがＤＮＡコドンＴＴＡ、ＴＴＧ、ＣＴＴ、ＣＴＣ、およびＣＴＧでコードされ、チロシンがＤＮＡコドンＴＡＴおよびＴＡＣによりコードされ、トリプトファンがＤＮＡコドンＴＧＧによりコードされ、グルタミン酸がＤＮＡコドンＧＡＡおよびＧＡＧによってコードされることは、当該分野で既知である。
【００７７】
配列ＩＤ番号：２９は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２９
ＸＸＸ３ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【００７８】
配列ＩＤ番号：３０は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＡｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：３０
ＸＸＸ３ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ

ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００７９】

配列ＩＤ番号：３１は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ａｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３１

ＸＸＸ３ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８０】

配列ＩＤ番号：３２は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ｔｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３２

ＸＸＸ３ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８１】

配列ＩＤ番号：３３は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ｔｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３３

ＸＸＸ３ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８２】

配列ＩＤ番号：３４は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ｔｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３４

ＴＴＣＸＸＸ３ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ

ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８３】

配列ＩＤ番号：３５は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＡｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３５

ＴＴＣＸＸＸ３ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８４】

配列ＩＤ番号：３６は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＡｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３６

ＴＴＣＸＸＸ３ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８５】

配列ＩＤ番号：３７は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３７

ＴＴＣＸＸＸ３ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８６】

配列ＩＤ番号：３８は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３８

ＴＴＣＸＸＸ３ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ

ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８７】

配列ＩＤ番号：３９は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３９

ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ３ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８８】

配列ＩＤ番号：４０は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ３がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＡｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：４０

ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ３ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００８９】

配列ＩＤ番号：４１は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＡｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：４１

ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ３ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００９０】

配列ＩＤ番号：４２は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：４２

ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ３ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ

【００９１】
配列ＩＤ番号：４３は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（$ＸＸＸ_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（$ＸＸＸ_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、$ＸＸＸ_3$がリジンをコードするように、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：４３
ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ３ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－$ＸＸＸ_1$－$ＸＸＸ_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴＡＡ
【００９２】
本発明の２つの単鎖インスリン類似体は、ピキア酵母（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）の前駆体ポリペプチドの生合成により作成し、この系は開裂Ｎ末端伸長ペプチドとの天然型ジスルフィド架橋を含む折り畳みタンパク質を分泌する。この前駆体タンパク質のトリプシン開裂では、残基ＰｈｅＢ１に始まりＡｒｇＢ２２で終わる切断Ｂ鎖および完全Ａ鎖を含む２本鎖インスリンフラグメントが生じる。前記前駆体ポリペプチドはその配列が配列ＩＤ番号：１９～２８で与えられる合成遺伝子によってコードされ、各ケースで前記ＡｓｐＢ１０の置換を含み、選択的に追加置換ＧｌｕＡ８、ＴｒｐＡ１３、ＴｙｒＡ１３、および／またはＧｌｕＡ１４を含んでもよい。また、単鎖インスリン前駆体は、Ｂ２４位のナンセンスコドンを含むと想定され、非標準的アミノ酸置換が組み換え型直交ｔＲＮＡ合成酵素により挿入されるようになっており、そのような前駆体はトリプシン処理されないが、代わりにリジン特異的エンドペプチダーゼにより開裂される。
【００９３】
本発明を例示するインスリン類似体の受容体結合親和性は、野生型ヒトインスリンとの関連で決定される（表１）。前記試験では、前記インスリン受容体のＡイソ型を利用した。ヒトインスリンおよびインスリン・リスプロと比較し、本インスリン類似体は１０～６０％の相対的親和性を保持していた。分裂促進性１型ＩＧＦ－Ｉ受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）に対するこれらの類似体の親和性は、野生型ヒトインスリンと同等かそれよりも弱く（表２）、ＡｓｐＢ１０およびオルト－フルオロ－ＰｈｅＢ２４を含むが、Ｂ鎖に第２の酸性置換がない１つの類似体（Ｔ－０３３８）は、ＩＧＦ－１Ｒに対して親和性を示し、野生型インスリンよりもわずかに強かった。受容体結合活性試験のプロトコールは以下の通りであった。マイイクロタイター・ストリップ・プレート（Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｂ）を、ＡＵ５　ＩｇＧ（リン酸干渉食塩水中４０ｍｇ／ｍｌ、１００μｌ／ｗｅｌｌ）を用い、４℃で一晩インキュベートした。結合データを２つの部位の連続モデルにより分析した。データは非特異的結合（１μＭヒトインスリン存在下での関連する膜に残った放射能の量）について修正した。すべての試験において、競合リガンド存在下で結合したトレーサーの割合は、リガンド欠乏人工物を回避するため、１５％未満とした。解離定数（$Ｋ_d$）は、ＷｈｉｔｔａｋｅｒおよびＷｈｉｔｔａｋｅｒが報告した数理モデルを当てはめて決定し（２００５．Ｊ．　Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８０：　２０９３２－２０９３６）、前記モデルでは非相同的競合であると想定し、非線形回帰を利用した（Ｗａｎｇ，　１９９５，　ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．３６０：　１１１－１１４）。
【００９４】

【表１】

表1. *インスリン受容体に対するインスリン類似体の親和性（イソ型B）*

類似体	K_d	標準誤差	相対的親和性
インスリン	0.16	0.003	100
T-0335（配列ID番号:5）	0.39	0.006	41
T-0336（配列ID番号:6）	0.91	0.015	17
T-0338（配列ID番号:7）	0.31	0.005	52
T-0339（配列ID番号:8）	0.37	0.005	43
T-0346（配列ID番号:9）	0.27	0.004	59
T-0347（配列ID番号:10）	0.38	0.006	42
T-0348（配列ID番号:11）	0.36	0.005	44

【００９５】

【表２】

表2. *1型IGF受容体（IGF-1R）に対するインスリン類似体の親和性*

類似体	解離定数（nM）	
	K_d	標準誤差
T-0335（配列ID番号:5）	31	6
T-0336（配列ID番号:6）	78	21
T-0338（配列ID番号:7）	7	1
T-0339（配列ID番号:8）	20	4
T-0346（配列ID番号:9）	10	2
T-0347（配列ID番号:10）	27	5
T-0348（配列ID番号:11）	24	5
インスリン	11	2

【００９６】

生物活性および薬効は、ストレプトゾトシンにより糖尿病とした雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（約３００ｇ）で検討した。内因性の作用強度は、時間ｔ＝０分でラット尾静脈にインスリン類似体の特定用量を静脈内ボーラス注射することで評価し、それぞれのデータは図４および６に示す。時間ｔ＝０分でのラットの皮下注射に対する薬力学的反応は、作用強度および生物学的利用能を統合した指標を提供し、インスリン作用の時間経過は、一部、皮下デポー製剤からの前記インスリン類似体の吸収速度を反映している。

それぞれのデータは図５および７に提供される。皮下注射後１時間の血糖濃度の初期低下率を表３Ａおよび３Ｂに示す。

【００９７】

【表３Ａ】

表3A. *血糖濃度の初期低下率*

類似体	用量10 ?g[a]	対照[b]
T-0338	-239.8(±32.0) mg/dl/hr	-191.2(±20.8) mg/dl/hr
T-0346	-194.3(±34.0) mg/dl/hr	-241.2(±21.4) mg/dl/hr
T-0348	-175.3(±23.7) mg/dl/hr	-241.2(±21.4) mg/dl/hr

[a]個々のラットの実体重により用量を調節し、体重300グラム当たりインスリン類似体10?gとした。

[b]対照の注射では同量のKP－インスリン（インスリン・リスプロ）を利用した。

【００９８】

【表３Ｂ】

表3B. *血糖濃度の初期低下率*

類似体	用量20 ?g[a]	対照[b]
T-0335	-230.5(±11.2) mg/dl/hr	-212.5(±22.1) mg/dl/hr
T-0336	-212.1(±23.4) mg/dl/hr	-212.5(±22.1) mg/dl/hr
T-0337	-315.2(±18.2) mg/dl/hr	-290.1(±17.6) mg/dl/hr
T-0339	-272.4(±33.7) mg/dl/hr	-290.1(±17.6) mg/dl/hr
T-0340	-292.9(±29.4) mg/dl/hr	-290.1(±17.6) mg/dl/hr
T-0347	-254.7(±8.0) mg/dl/hr	-221.2(±24.4) mg/dl/hr

[a]個々のラットの実体重により用量を調節し、体重300グラム当たりインスリン類似体20?gとした。

[b]対照の注射では同量のKP－インスリン（インスリン・リスプロ）を利用した。

【００９９】

本発明の類似体は、糖尿病Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットに静脈内または皮下経路で注射した場合、ナノモルベースで（インスリン・リスプロと比較し）より大きな作用強度を示す。そのような向上は、図８に示すデータで例示される通り、前記類似体が低用量の場合（つまり、ＩＣ５０値以下の場合）に最も明らかである。体重３００グラムあたり１０μｇの用量、またはそれ以上の用量では、本発明の類似体は、表３Ａおよび３Ｂで明らかな通り、ラットの生物学的変動の範囲内（ラットごとおよび週ごと）のインスリン・リスプロ（ＫＰ－インスリン）の用量として血糖濃度の同等の低下をもたらす。

【０１００】

前記インスリン類似体の熱力学的安定性は、報告があるとおり、ＣＤによりモニターし

たグアニジン変性により精査された（Ｈｕａ，　Ｑ．Ｘ．，　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．　Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８３，　１４７０３－１６　（２００８））。この結果は、これらの類似体が野生型インスリンまたはＫＰ－インスリンよりも化学的変性にそれぞれより安定であることを示している（２５℃でのアンフォールディングの自由エネルギー（ΔＧｕ）はそれぞれ３．３±０．１および４．３±０．１ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ）。以下の２５℃でのΔＧ$_u$の推定値は、変性剤濃度ゼロに外挿した類似体の２つの状態モデルを適用することで得られた：（類似体Ｔ－０３３５）５．１±０．１ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ、（類似体Ｔ－０３３６）５．３±０．１ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ、（類似体Ｔ－０３３８）５．６±０．１ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ、（類似体Ｔ－０３３９）６．０±０．１ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ、（類似体Ｔ－０３４６）４．８±０．１ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ、（類似体Ｔ－０３４７）４．６±０．１ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ、および（類似体Ｔ－０３４８）５．９±０．１ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ。ΔＧ$_u$がこのように高いことは、同条件の野生型インスリンまたはＫＰ－インスリンの研究で観察されるであろう無亜鉛条件での化学的分解に対して、本発明のインスリン類似体の抵抗性が高くなることを予測する。それぞれのデータは図９および１０に提供される。それぞれのケースにおいて、本発明のインスリン類似体を５０％アンフォールディングするためには、インスリン・リスプロ（ＫＰ－インスリン）を５０％アンフォールディングするよりも高い濃度の塩酸グアニジンが必要である。

【０１０１】

軟寒天におけるＭＣＦ－７コロニー形成試験。軟寒天におけるＭＣＦ－７コロニー形成試験。予熱した（４２℃）０．６％寒天懸濁液０．２５ｍｌを用いてＭＣＦ－７細胞懸濁液０．２５ｍｌ（２．２５×１０^{5}細胞）を２倍の増殖培地／５％透析ウシ胎児血清（ＦＢＳ）±インスリン類似体５０ｎＭに入れて混合し、単細胞懸濁液を得た。この０．３％懸濁液を２４ウェルプレートの０．６％寒天０．５ｍｌの層に注いだ。前記寒天に１倍の増殖培地／５％透析ＦＢＳ±インスリン類似体５０ｎＭを重ね、１２日間３倍／週で再培養した。９日目および１２日目にコロニー（>６０μｍ）を計数した。９日目に計数したコロニーを基にした代表的データを図１１に示す。

【０１０２】

糖尿病患者の治療法は、本明細書に説明した単鎖インスリン類似体の投与を有する。前記単鎖インスリン類似体は酵母（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）において調製するか、または天然フラグメントを連結することで完全に化学合成することも本発明の別の観点である。調製の合成経路はＤ－アミノ酸置換、ＰｈｅまたはＴｙｒの芳香環内のハロゲン置換、または炭水化物によるセリンまたはトレオニンのＯ結合修飾などの非標準的修飾の場合に好ましいが、拡大遺伝子コード技術または４塩基コドン技術により非標準的修飾を含む単鎖類似体のサブセットを製造することは可能と考えられる（レビューについては、Ｈｏｈｓａｋａ，　Ｔ．，　＆　Ｓｉｓｉｄｏ，　Ｍ．，　２０１２を参照）。非標準的アミノ酸置換が、前記単鎖インスリン類似体の化学的分解または物理的分解に対する抵抗性を増大できることも、本発明のさらに別の観点である。我々はさらに、糖尿病または代謝症候群の治療法を提供する本発明の類似体を想定する。前記インスリン類似体の送達経路は、シリンジまたはペン型器具を使用した皮下注射とする。本発明のインスリン類似体には、Ｂ２５位またはＢ２６位のハロゲン原子など、他の修飾を含んでもよい。また、本発明のインスリン類似体は、残基Ｂ１－Ｂ３の欠失による短縮Ｂ鎖を含んでもよい。

【０１０３】

医薬組成物がそのようなインスリン類似体を有してもよく、選択的に亜鉛を含んでもよい。本発明のインスリン類似体は古典的な亜鉛安定化六量体を形成しないため（また、安定性を得るためにそのような会合は実際に必要ないため）、主にインスリン六量体を含む製剤に典型的に利用されるよりも低い、様々な亜鉛イオン：タンパク質比で亜鉛が含まれてもよく、そのような比率はインスリン類似体１モル当たりの亜鉛イオン０．０１～０．１０モルの範囲とすることができる。前記製剤のｐＨはｐＨ７．０～８．０の範囲であり、緩衝液（典型的にはリン酸ナトリウムまたはＴｒｉｓ塩酸塩）はあってもなくてもよい。そのような製剤では、インスリン類似体の濃度が典型的には約０．６～５．０ｍＭであ

り、バイアルまたはペンでは最高５ｍＭの濃度が使用可能であり、著しいインスリン抵抗性を有する患者では、より濃縮した製剤（Ｕ－２００以上）が特に有益であると考えられる。賦形剤にはグリコール、グリシン、アルギニン、Ｔｒｉｓ、その他の緩衝液および塩、およびフェノールおよびメタークレゾールなどの抗菌性保存剤が含まれ、後者の保存剤はインスリン六量体の安定性を向上することが知られている。そのような医薬組成物は、患者に生理学的に有効な量の前記組成物を投与することにより、糖尿病または他の医学的疾患を有する患者の治療に使用することができる。

【０１０４】

前述の開示をもとに、提供された２本鎖インスリン類似体が、本明細書で上述された目的を実行することは今や明らかである。つまり、これらのインスリン類似体は（哺乳類に皮下または静脈内注射した場合の血糖濃度を低下させるために必要なタンパク質単量体のナノモル数により定義される）生物活性の向上を示し、即効的な作用が０．６ｍＭ（当該分野で既知のＵ－１００の強度の製剤で典型的に利用される濃度）～３．０ｍＭ（製剤Ｈｕｍｕｌｉｎ（登録商標）Ｒ　Ｕ－５００製剤で使用される濃度、Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ　ａｎｄ　Ｃｏ．）のインスリン類似体で保持される。したがって、すべての明らかな変形形態が請求された発明の範囲に入るため、本明細書で開示および説明された本発明の精神から離れずに、特定の成分元素の選択を決定できることは理解される。

【０１０５】

以下の文献は、本明細書で説明された検査および試験が当業者に理解されるものであることを示すために引用する。

Ｂｒａｎｇｅ　Ｊ１，　Ｒｉｂｅｌ　Ｕ，　Ｈａｎｓｅｎ　ＪＦ，　Ｄｏｄｓｏｎ　Ｇ，　Ｈａｎｓｅｎ　ＭＴ，　Ｈａｖｅｌｕｎｄ　Ｓ，　Ｍｅｌｂｅｒｇ　ＳＧ，　Ｎｏｒｒｉｓ　Ｆ，　Ｎｏｒｒｉｓ　Ｋ，　Ｓｎｅｌ　Ｌ，　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　ｉｎｓｕｌｉｎｓ　ｏｂｔａｉｎｅｄ　ｂｙ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ａｎｄ　ｔｈｅｉｒ　ｍｅｄｉｃａｌ　ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｎａｔｕｒｅ　３３３：６７９－８２．

Ｂａｒｎｅｓ－Ｓｅｅｍａｎ，　Ｄ．，　Ｂｅｃｋ，　Ｊ．，　ａｎｄ　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，　Ｃ．（２０１４）　Ｆｌｕｏｒｉｎａｔｅｄ　ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ　ｉｎ　ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：　ｒｅｃｅｎｔ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，　ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ａｄｖａｎｃｅｓ　ａｎｄ　ｍａｔｃｈｅｄ－ｐａｉｒ　ａｎａｌｙｓｅｓ．Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．１４：８５５－６４．

Ｂｒａｎｇｅ　Ｊ，　ｅｄｉｔｏｒ．（１９８７）　Ｇａｌｅｎｉｃｓ　ｏｆ　Ｉｎｓｕｌｉｎ：　Ｔｈｅ　Ｐｈｙｓｉｃｏ－ｃｈｅｍｉｃａｌ　ａｎｄ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ａｓｐｅｃｔｓ　ｏｆ　Ｉｎｓｕｌｉｎ　ａｎｄ　Ｉｎｓｕｌｉｎ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎｓ．Ｂｅｒｌｉｎ：　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｂｅｒｌｉｎ　Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ．

Ｈｏｈｓａｋａ，　Ｔ．，　ａｎｄ　Ｓｉｓｉｄｏ，　Ｍ．（２０１２）　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｎｏｎ－ｎａｔｕｒａｌ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄｓ　ｉｎｔｏ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．６，　８０９－１５．

Ｋａｌｒａ，　Ｓ．，　Ｂａｌｈａｒａ，　Ｙ．，　Ｓａｈａｙ，　Ｂ．，　Ｇａｎａｐａｔｈｙ，　Ｂ．，　ａｎｄ　Ｄａｓ，　Ａ．（２０１３）　Ｗｈｙ　ｉｓ　ｐｒｅｍｉｘｅｄ　ｉｎｓｕｌｉｎ　ｔｈｅ　ｐｒｅｆｅｒｒｅｄ　ｉｎｓｕｌｉｎ？　Ｎｏｖｅｌ　ａｎｓｗｅｒｓ　ｔｏ　ａ　ｄｅｃａｄｅ－ｏｌｄ　ｑｕｅｓｔｉｏｎ．Ｊ．　Ａｓｓｏｃ．Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ　Ｉｎｄｉａ　６１，　９－１１．

Ｌｉｕ，　Ｍ．，　Ｈｕａ，　Ｑ．Ｘ．，　Ｈｕ，　Ｓ．Ｑ．，　Ｊｉａ，　Ｗ．，　Ｙａｎｇ，　Ｙ．，　Ｓａｉｔｈ，　Ｓ．Ｅ．，　Ｗｈｉｔｔａｋｅｒ，　Ｊ．，　Ａｒｖａｎ，　Ｐ．，　ａｎｄ　Ｗｅｉｓｓ，　Ｍ．Ａ．（２０１０）　Ｄｅｃｉｐｈｅｒｉｎｇ　ｔｈｅ　ｈｉｄｄｅｎ　ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌ　ｃｏｎｔｅｎｔ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ：　ｆｏｌｄａｂｉｌｉｔｙ　ｏｆ　ｐｒｏｉｎｓｕ

lin hinges on a flexible arm that is dispensable in the mature hormone. J. Biol. Chem. 285:30989-1001.
Voloshchuk, N., Zhu, A. Y., Snydacker D., and Montclare, J. K. (2009) Positional effects of monofluorinated phenylalanines on histone acetyltransferase stability and activity. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19:5449-51.
V?lund, A., Brange, J., Drejer, K., Jensen, I., Markussen, J., Ribel, U., S?rensen, A. R., and Schlichtkrull, J. (1991) In vitro and in vivo potency of insulin analogues designed for clinical use. Diabet. Med. 8:839-47.
Wang, Z. X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule FEBS Lett. 360: 111-114.
Whittaker, J., and Whittaker, L. (2005) Characterization of the functional insulin binding epitopes of the full-length insulin receptor. J. Biol. Chem. 280: 20932-20936.
Yang, Y., Petkova, A., Huang, K., Xu, B., Hua, Q. X., Ye, I. J., Chu, Y. C., Hu, S. Q., Phillips, N. B., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., Mackin, R. B., Katsoyannis, P. G., Tycko, R., and Weiss, M. A. (2010) An Achilles' heel in an amyloidogenic protein and its repair: insulin fibrillation and therapeutic design. J. Biol. Chem. 285:10806-21.
Yuvienco, C., More, H. T., Haghpanah, J. S., Tu, R. S., and Montclare, J. K. (2012) Modulating supramolecular assemblies and mechanical properties of engineered protein materials by fluorinated amino acids. Biomacromolecules 13:2273-8.

【図１Ａ】

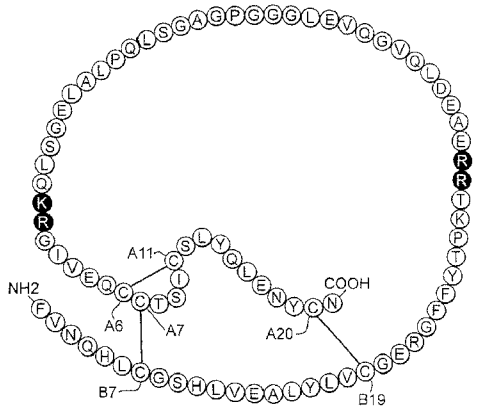


FIG. 1A

（先行技術）
プロインスリン

【図１Ｂ】

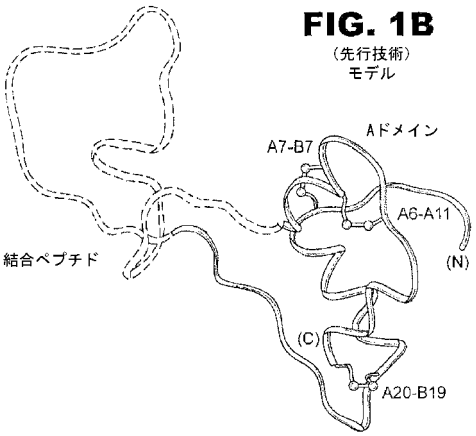


FIG. 1B

（先行技術）
モデル

【図１Ｃ】

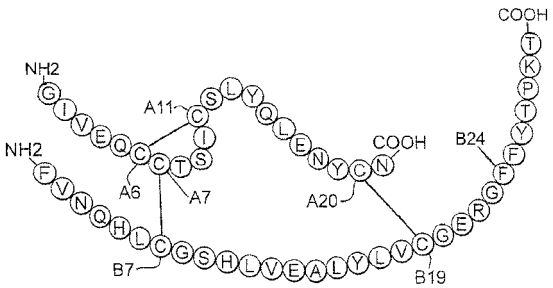


FIG. 1C

（先行技術）

【図２】

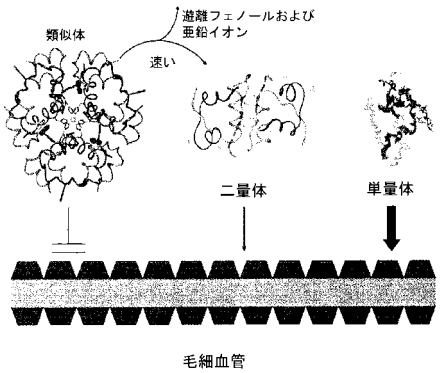
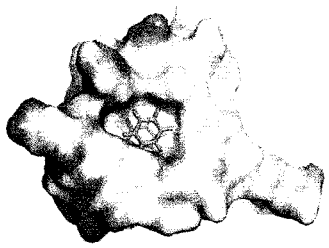


FIGURE 2

【図３】



残基B24

FIGURE 3

【図４】

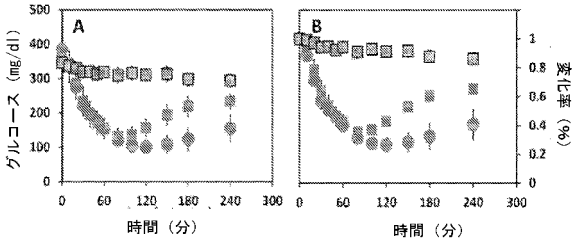


FIGURE 4

【図５】

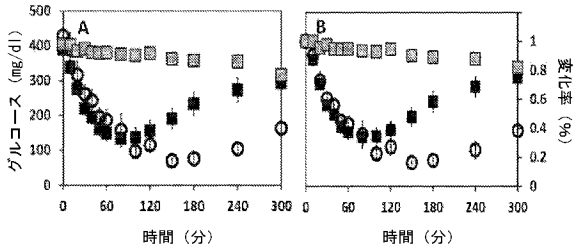


FIGURE 5

【図６】

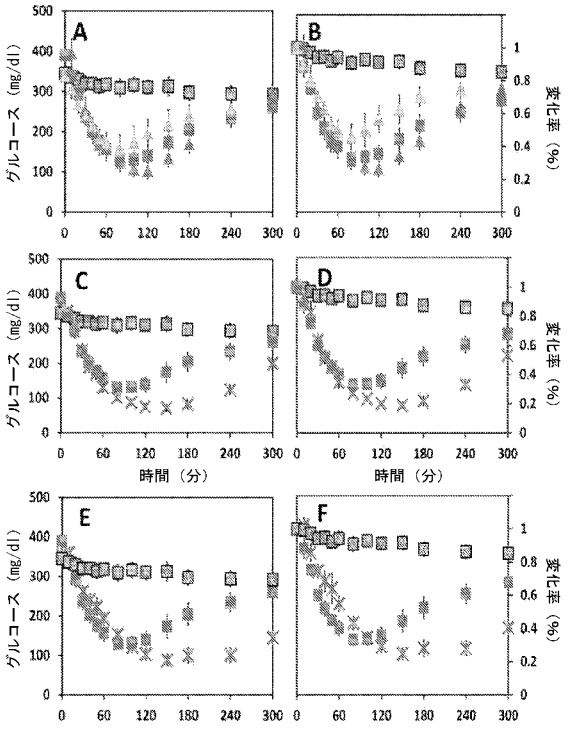


FIGURE 6

【図７】

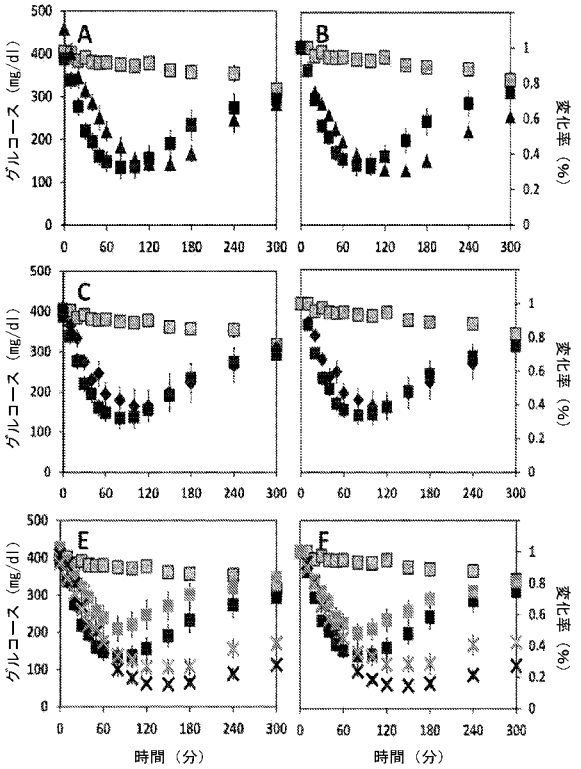


FIGURE 7

【図８】

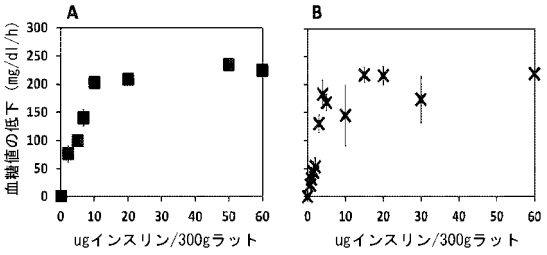


FIGURE 8

【図９】

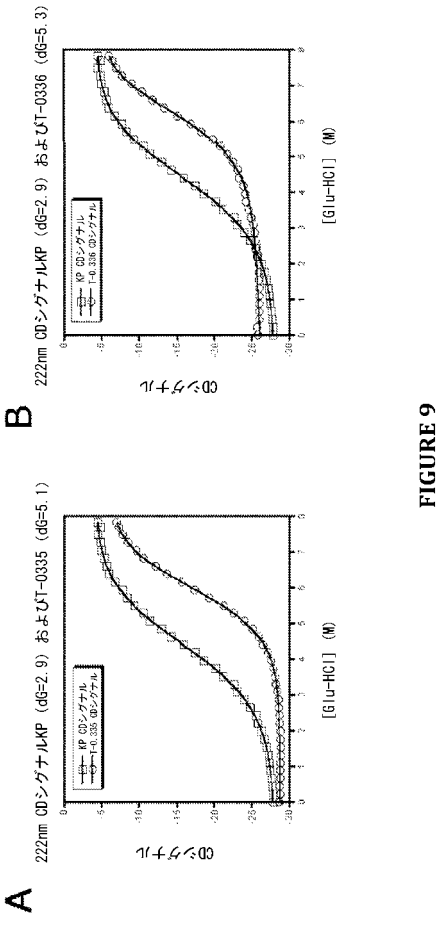


FIGURE 9

【図１０】

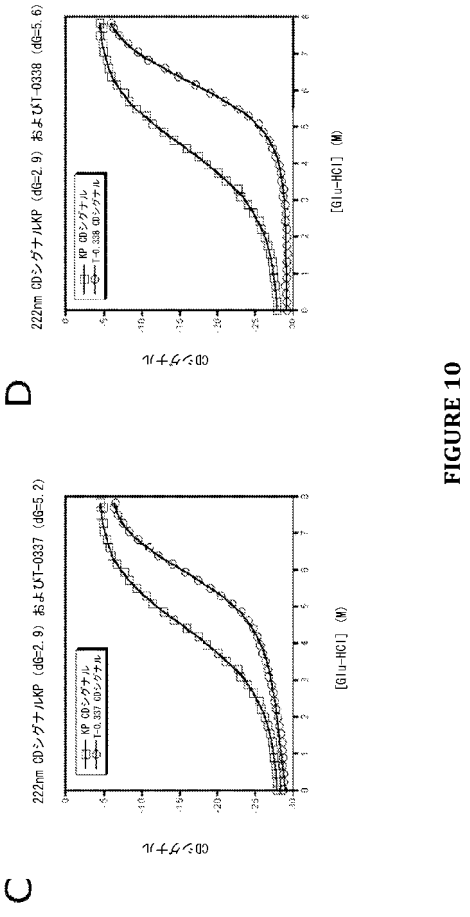


FIGURE 10

【図１１】

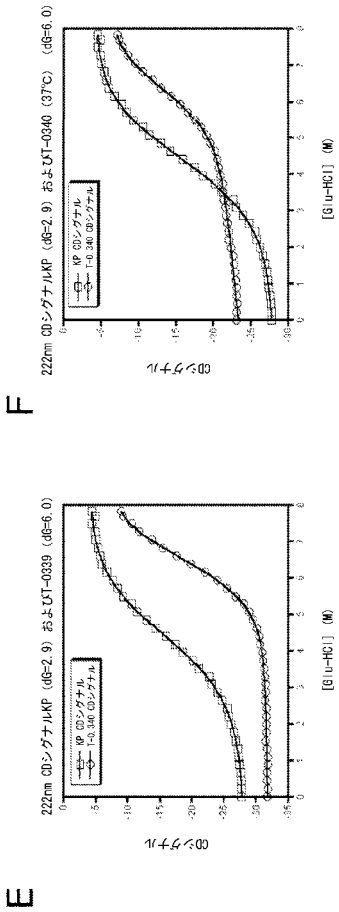


FIGURE 11

【図１２】

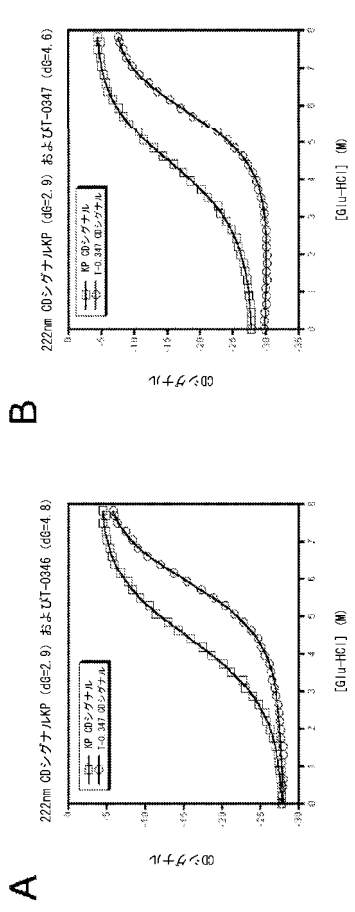


FIGURE 12

【図１３】

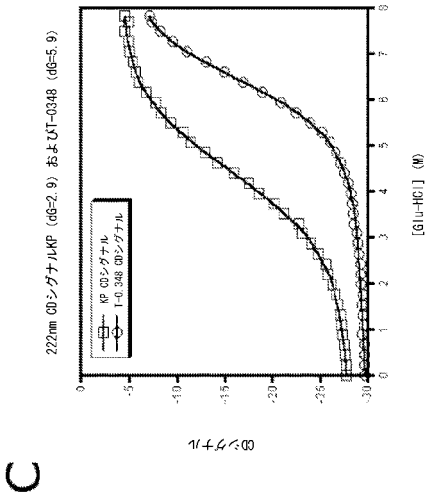


FIGURE 13

【図１４】

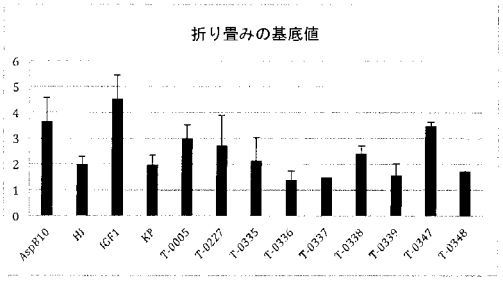


FIGURE 11

【配列表】
2017537065000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成29年7月7日(2017.7.7)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６１】
本発明の修飾インスリンのアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４及び５として一般形態で示され、６つのシステイン残基が対になり、野生型ヒトインスリン同様、３つのジスルフィド架橋を提供する。
配列ＩＤ番号：４（インスリン類似体）
Ａ鎖
Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{1}$－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｘａａ$_{2}$－Ｘａａ$_{3}$－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{4}$
配列ＩＤ番号：５（Ｂ鎖）
Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$－Ｘａａ$_{7}$－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{8}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{9}$－Ｘａａ$_{10}$－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{11}$－Ｘａａ$_{12}$
式中、Ｘａａ$_{1}$（Ａ８位）はＴｈｒまたはＧｌｕであり、Ｘａａ$_{2}$はＬｅｕ、Ｔｙｒ、またはＴｒｐであり、Ｘａａ$_{3}$はＴｙｒまたはＧｌｕであり、Ｘａａ$_{4}$はＡｓｎ、Ａｓｐ、Ａｌａ、またはＧｌｙであり、Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$－Ｘａａ$_{7}$は野生型ヒトインスリンではＰｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ、またはＮ末端欠失変異体Ｖａｌ－Ａｓｎ（ｄｅｓ－Ｂ１）、Ａｓｎ（ｄｅｓ－Ｂ１，Ｂ２）、またはなし（ｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３）であり、Ｘａａ$_{8}$は芳香環の１若しくはそれ以上の水素原子がフッ素（Ｆ）、塩素（Ｃ）、または臭素（Ｂｒ）の群のハロゲン原子で置換されたフェニルアラニン誘導体であり、Ｘａａ$_{9}$またはＸａａ$_{10}$の少なくとも１つが酸性アミノ酸であり、選択的に、Ｘａａ$_{11}$－Ｘａａ$_{12}$がＢ鎖のＣ末端ジペプチド伸長を提供し、少なくとも１つの残基が酸性側鎖である。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６２】
本発明のインスリン類似体のアミノ酸配列は、一部、配列ＩＤ番号：６～９（完全Ｂ鎖を含む）および配列ＩＤ番号：１０～１２（Ｎ末端短縮Ｂ鎖を含む）で示され、略して野生型ヒトインスリンと比較した特定の修飾のみが提供される（すなわち、具体的な配列の例はＸａａ$_{1}$、Ｘａａ$_{2}$、Ｘａａ$_{3}$、Ｘａａ$_{4}$、Ｘａａ$_{5}$、Ｘａａ$_{6}$、Ｘａａ$_{7}$、Ｘａａ$_{8}$、Ｘａａ$_{9}$、Ｘａａ$_{10}$、Ｘａａ$_{11}$、およびＸａａ$_{12}$を特徴とする。配列ＩＤ番号：６～９で示される分子は、Ｂ鎖のＢ１、Ｂ２、およびＢ３位のそれぞれに野生型残基Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎを含み、配列ＩＤ番号：１０～１２で示される分子は残基Ｂ１－Ｂ３がない短縮Ｂ鎖を含む。各ケースで、残基Ｂ２４はオルト－フルオロ－フェニルアラニンを含む。配列ＩＤ番号：６で示される配列は、配列ＩＤ番号：５のインスリン類似体の具体例を提供するが、これらの例は配列ＩＤ番号：５で定義される類似体を組み合わせた空間を制限する意図はない。提供された配列コードは、分子命名の内部コードに関する。

ID/コード	B10	B24 ハロゲン	他の酸性/非酸性置換
配列ID番号:4+6 T-0335	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluB29
配列ID番号:4+7 T-0336	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluB29 GluB31 GluB32
配列ID番号:4+8 T-0338	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 LysB28 ProB29
配列ID番号:4+9 T-0339	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 GluB29
配列ID番号:4+8 T-0346	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GlyA21 LysB28 ProB29
配列ID番号:4+9 T-0347	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GlyA21 GluB29
配列ID番号:4+9 T-0348	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 GlyA21 GluB29

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６３】
本発明の類似体は、これに制限されるものではないが、配列ＩＤ番号：１０～１２で例示されるＢ鎖のＮ末端欠失（ｄｅｓ－Ｂ１、ｄｅｓ－Ｂ１，Ｂ２、またはｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３）を選択的に含んでもよい。これらのＮ末端残基は受容体結合に必要ないが、生合成単鎖前駆体に存在すると、小胞体の天然型ジスルフィド対の有効性を高めるため、生産収率が上昇すると考えられる。

ID/コード	B10	B24 ハロゲン	他の酸性/非酸性置換	B 鎖欠失または伸長（ext.）
配列ID番号:4+10 T-0337	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluB29	*des*-B1-B3
				C 末端の伸長なし
配列ID番号:4+11 T-0351	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluB29 GluB31 GluB32	*des*-B1-B3
				GluB31 GluB32
配列ID番号:4+12 T-0338	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 LysB28 ProB29	*des*-B1-B3
				C 末端の伸長なし
配列ID番号:4+10 T-0339	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 GluB29	*des*-B1-B3
				C 末端の伸長なし
配列ID番号:4+12 T-0355	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GlyA21 LysB28 ProB29	*des*-B1-B3
				C 末端の伸長なし
配列ID番号:4+10 T-0349	AspB10	オルトフルオロ-PheB24	GlyA21 GluB29	*des*-B1-B3
				C 末端の伸長なし
配列ID番号:4+10 T-0350	AspB10	オルト-フルオロ-PheB24	GluA8 GlyA21 GluB29	*des*-B1-B3
				C 末端の伸長なし

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６５】
５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：１３として示す。
配列ＩＤ番号：１３
ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴ

ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴＡＡ

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６６】
５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：１４として示す。
配列ＩＤ番号：１４
ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴ
ＡＡ
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６７】
５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８、およびＧｌｕＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：１５として示す。
配列ＩＤ番号：１５
ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴ
ＡＡ
【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６８】
非標準的アミノ酸がコドンＢ２４位（ＴＡＧ）のナンセンス抑制により挿入されるように、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：１６として示す。
配列ＩＤ番号：１６
ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴ
ＡＡ
【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】００６９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６９】
非標準的アミノ酸がコドンＢ２４位（ＴＡＧ）のナンセンス抑制により挿入されるように、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードし、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換およびＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する遺伝子のセンス鎖は、配列ＩＤ番号：１７として示す。
配列ＩＤ番号：１７
ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡＴＴＧＴＡＣＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴ
ＡＡ
【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７０】
配列ＩＤ番号：１８～２２で提供される合成遺伝子群は、上記に示されたアミノ酸配列に従い、選択的にＡ１３およびＡ１４位に特定のアミノ酸置換をコードした一連のＤＮＡ配列を提供する。酵母の核遺伝子では、ロイシンがＤＮＡコドンＴＴＡ、ＴＴＧ、ＣＴＴ、ＣＴＣ、およびＣＴＧでコードされ、チロシンがＤＮＡコドンＴＡＴおよびＴＡＣによりコードされ、トリプトファンがＤＮＡコドンＴＧＧによりコードされ、グルタミン酸がＤＮＡコドンＧＡＡおよびＧＡＧによってコードされることは、当該分野で既知である。
【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７１】
配列ＩＤ番号：１８は、Ａ１３位のコドン（XXX_1）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（XXX_2）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ｔｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：１８
ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－XXX_1－XXX_2－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７２】
配列ＩＤ番号：１９は、Ａ１３位のコドン（XXX_1）が選択的にロイシン、チロシン

、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：１９

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ

【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７３】

配列ＩＤ番号：２０は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：２０

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ

【手続補正１３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７４】

配列ＩＤ番号：２１は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：２１

ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ

【手続補正１４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７５
【補正方法】変更
【補正の内容】

【００７５】
配列ＩＤ番号：２２は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（XXX_1）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（XXX_2）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードするように、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２２
ＴＴＣＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧ
ＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡ
ＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－XXX_1－XXX_2－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧ
ＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正１５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７６】
配列ＩＤ番号：２３～３７で提供される合成遺伝子群は、配列ＩＤ番号：１８～２２で定義される配列の特徴に加え、選択的にＢ１（配列ＩＤ番号：２３～２７）、Ｂ２（配列ＩＤ番号：２８～３２）またはＢ３（配列ＩＤ番号：３３～３７）の３つのコドン位置の１つでリジン残基をコードする一連のＤＮＡ配列を提供し、生合成単鎖インスリン前駆体のそのようなリジン置換により、Ｂ鎖が上記のアミノ酸配列に従い、Ｎ末端欠失ｄｅｓ－Ｂ１、ｄｅｓ－Ｂ１、Ｂ２、またはｄｅｓ－Ｂ１－Ｂ３を含む本発明のインスリン類似体を産生することができる。これらのＮ末端切断は、それぞれ生合成単鎖インスリン前駆体Ｂ１、Ｂ２、またはＢ３位の置換により方向づけられる。酵母の核遺伝子では、リジンがＤＮＡコドンＡＡＡおよびＡＡＧによりコードされることは、当該分野で既知である。上述のとおり、酵母の核遺伝子では、ロイシンがＤＮＡコドンＴＴＡ、ＴＴＧ、ＣＴＴ、ＣＴＣ、およびＣＴＧでコードされ、チロシンがＤＮＡコドンＴＡＴおよびＴＡＣによりコードされ、トリプトファンがＤＮＡコドンＴＧＧによりコードされ、グルタミン酸がＤＮＡコドンＧＡＡおよびＧＡＧによってコードされることは、当該分野で既知である。
【手続補正１６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７７】
配列ＩＤ番号：２３は、Ａ１３位のコドン（XXX_1）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（XXX_2）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、XXX_3がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２３
XXX_3ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－XXX_1－XXX_2－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正１７】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７８】
配列ＩＤ番号：２４は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ａｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２４
ＸＸＸ$_3$ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正１８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００７９】
配列ＩＤ番号：２５は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ａｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２５
ＸＸＸ$_3$ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正１９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８０】
配列ＩＤ番号：２６は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ｔｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２６
ＸＸＸ$_3$ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ

ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正２０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８１】
配列ＩＤ番号：２７は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（$ＸＸＸ_{1}$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（$ＸＸＸ_{2}$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、$ＸＸＸ_{3}$がリジンをコードするように、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２７
$ＸＸＸ_{3}$ＧＴＣＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－$ＸＸＸ_{1}$－$ＸＸＸ_{2}$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正２１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８２】
配列ＩＤ番号：２８は、Ａ１３位のコドン（$ＸＸＸ_{1}$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（$ＸＸＸ_{2}$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、$ＸＸＸ_{3}$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２８
ＴＴＣ$ＸＸＸ_{3}$ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－$ＸＸＸ_{1}$－$ＸＸＸ_{2}$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正２２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８３】
配列ＩＤ番号：２９は、Ａ１３位のコドン（$ＸＸＸ_{1}$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（$ＸＸＸ_{2}$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、$ＸＸＸ_{3}$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＡｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：２９
ＴＴＣ$ＸＸＸ_{3}$ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ

ＣＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴＡＡ

【手続補正２３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８４】
配列ＩＤ番号：３０は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ａｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：３０
ＴＴＣＸＸＸ$_3$ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴＡＡ

【手続補正２４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８５】
配列ＩＤ番号：３１は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ｔｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：３１
ＴＴＣＸＸＸ$_3$ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴＧＣＡＡＣＴＡＡ

【手続補正２５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８６】
配列ＩＤ番号：３２は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ｔｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。

配列ＩＤ番号：３２
ＴＴＣＸＸＸ$_3$ＡＡＴＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正２６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８７】
配列ＩＤ番号：３３は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ｔｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：３３
ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ$_3$ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正２７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８８】
配列ＩＤ番号：３４は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ３がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＡｌａＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ａｌａ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：３４
ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ$_3$ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＴＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＴＡＡＧＧＣＴＧＣＴＡＡＧＧＧＡＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＣＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正２８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８９】
配列ＩＤ番号：３５は、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０、ＧｌｕＡ８およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、Ｃドメインの Ａｌａ－Ｌｙｓを有する、５

３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：３５
ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ$_3$ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＣＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正２９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９０】
配列ＩＤ番号：３６は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＡｓｐＢ１０およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：３６
ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ$_3$ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＡＣ
ＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正３０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９１】
配列ＩＤ番号：３７は、非標準的アミノ酸がコドン位置Ｂ２４（ＴＡＧ）のナンセンス抑制に挿入され、Ａ１３位のコドン（ＸＸＸ$_1$）が選択的にロイシン、チロシン、またはトリプトファンをコードし、Ａ１４位のコドン（ＸＸＸ$_2$）が選択的にチロシンまたはグルタミン酸をコードし、ＸＸＸ$_3$がリジンをコードするように、ＧｌｕＡ８、ＡｓｐＢ１０、およびＧｌｕＢ３０の置換を有し、ＣドメインのＴｒｐ－Ｌｙｓを有する、５３残基の単鎖インスリン類似体をコードする遺伝子のセンス鎖を提供する。
配列ＩＤ番号：３７
ＴＴＣＧＴＣＸＸＸ$_3$ＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＧＴＧＧＴＡＧＴＧＡＣＴＴＧＧＴＣＧＡＧ
ＧＣＡＴＴＧＴＡＣＴＴＧＧＴＣＴＧＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＧＧＡＴＴＣＴＴＣＴＡＧＡ
ＣＣＣＣＡＡＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＣＧＴＴＧＡＧＣＡＡＴＧＴＴＧＴＧＡ
ＡＴＣＣＡＴＣＴＧＣＴＣＡ－ＸＸＸ$_1$－ＸＸＸ$_2$－ＣＡＡＴＴＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＴ
ＧＣＡＡＣＴＡＡ
【手続補正３１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９４】

【表１】

表1. *インスリン受容体に対するインスリン類似体の親和性（イソ型B）*

類似体	K_d	標準誤差	相対的親和性
インスリン	0.16	0.003	100
T-0335（配列ID番号:4+6）	0.39	0.006	41
T-0336（配列ID番号:4+7）	0.91	0.015	17
T-0338（配列ID番号:4+8）	0.31	0.005	52
T-0339（配列ID番号:4+9）	0.37	0.005	43
T-0346（配列ID番号:4+8）	0.27	0.004	59
T-0347（配列ID番号: 4+9）	0.38	0.006	42
T-0348（配列ID番号: 4+9）	0.36	0.005	44

【手続補正３２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９５】
【表２】

表2. *1型IGF受容体（IGF-1R）に対するインスリン類似体の親和性*

類似体	解離定数（nM）	
	K_d	標準誤差
T-0335（配列ID番号:4+6）	31	6
T-0336（配列ID番号:4+7）	78	21
T-0338（配列ID番号:4+8）	7	1
T-0339（配列ID番号:4+9）	20	4
T-0346（配列ID番号:4+8）	10	2
T-0347（配列ID番号:4+9）	27	5
T-0348（配列ID番号:4+9）	24	5
インスリン	11	2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US15/55057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/28, 38/27 (2015.01)
CPC - A61K 38/00, 38/28
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)
IPC(8): A61K 38/28, 38/27 (2016.01)
CPC: C07K 14/62; A61K 38/00, 38/28, 47/48215, 47/48246; C07K 14/00, 2319/31, 2319/91

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)
PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; NCBI/PubMed; Dialog ProQuest; insulin, molecule, human, patient, subject, chain, peptide, 'A chain,' 'B chain,' 'aspartic acid,' 'glutamic acid'

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/098386 A1 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION); June 27, 2013; page 3, lines 5-25; page 4, lines 22-33; page 5, lines 1-33; page 22, lines 4-12; page 24, lines 10-32; page 69, lines 25-27	1-4, 7-9, 12-14
A	US 2009/0170750 A1 (KJELDSEN, TB et al.); July 02, 2009; abstract	1-4, 7-9, 12-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
05 January 2016 (05.01.2016)	02 FEB 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/55057

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.: 5, 6, 10, 11, 15-22
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 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.

フロントページの続き

(81)指定国 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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,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

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 DB34 MA66 NA05 ZC35
4H045 AA10 AA30 CA40 DA37 EA27 FA74