(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6798883号
(P6798883)
(45)発行日　令和2年12月9日(2020.12.9)　(24)登録日　令和2年11月24日(2020.11.24)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/62	(2006.01)	C07K	14/62	ZNA
A61K 38/28	(2006.01)	A61K	38/28	
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10	

請求項の数 23　(全 38 頁)

(21)出願番号	特願2016-536147(P2016-536147)
(86)(22)出願日	平成26年12月4日(2014.12.4)
(65)公表番号	特表2017-501991(P2017-501991A)
(43)公表日	平成29年1月19日(2017.1.19)
(86)国際出願番号	PCT/IB2014/066588
(87)国際公開番号	WO2015/083114
(87)国際公開日	平成27年6月11日(2015.6.11)
審査請求日	平成29年10月18日(2017.10.18)
(31)優先権主張番号	1321489.5
(32)優先日	平成25年12月5日(2013.12.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)

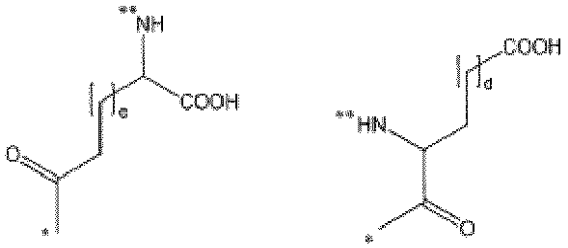
(73)特許権者　513042676
ケミカル　アンド　バイオファーマシューティカル　ラボラトリーズ　オブ　パトラ　エス．エー．
ギリシャ国，パトラ，ジーアール－２６０００，ビルディング　スクエア　１，インダストリアル　エリア　オブ　パトラ
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物学的活性なインスリン誘導体

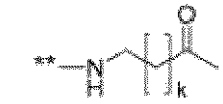
(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
（Ａ）ヒト又は動物インスリン、又はその類似体のＡ鎖、ここで、当該類似体は、（ａ）１又は２以上のアミノ酸残基が天然に存在するか又は天然に存在しないアミノ酸残基により置換されているか、（ｂ）複数のアミノ酸残基の順序が逆にされているか、（ｃ）（ａ）及び（ｂ）の両者が一緒に存在するか、を意味する変異体である；
（Ｂ）ヒト又は動物インスリン、又はその類似体のＢ鎖、ここで、当該類似体は、（ａ）１又は２以上のアミノ酸残基が天然に存在するか又は天然に存在しないアミノ酸残基により置換されているか、（ｂ）複数のアミノ酸残基の順序が逆にされているか、（ｃ）（ａ）及び（ｂ）の両者が一緒に存在するか、を意味する変異体である；
（Ｃ）前記Ａ鎖とＢ鎖との間の１又は２以上のジスルフィド結合；及び
（Ｄ）（ｉ）前記Ａ鎖のカルボキシル末端アミノ酸もしくはその類似体と、（ｉｉ）前記Ｂ鎖の位置２９のリジン残基の側鎖もしくはその類似体との間の追加の共有結合Ｌ、
を含んで成る単鎖インスリン類似体。
【請求項２】
前記追加の共有結合Ｌが、直鎖結合である、請求項１に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項３】
前記追加の共有結合Ｌが、前記Ａ鎖のＣ末端アミノ酸でのアスパラギン酸残基又はグルタミン酸残基の側鎖と、前記Ｂ鎖におけるＬｙｓ残基の側鎖アミノ官能基との間の直接結合である、請求項２に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項４】
前記追加の共有結合Ｌが、
（ｉ）少なくとも１つの基Ｘ；及び／又は
（ｉｉ）少なくとも１つの基Ｙ；及び／又は
（ｉｉｉ）少なくとも１つの基Ｚ、を
含んで成る基であり；
ここで、Ｘは、下記式1ａ又は１ｂ：
【化１】

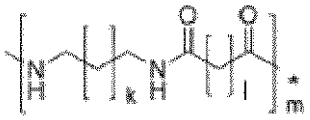


1a 1b

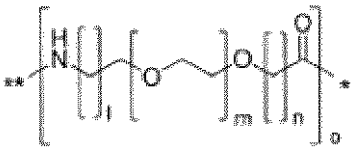
［式中、ｄ及びｅは、それぞれ独立して、０～１０から選択された整数であり、そして＊及び＊＊は、それぞれの隣接する基への結合点を示す］
で表される基であり；
Ｙは、下記式：
【化２】



4



5

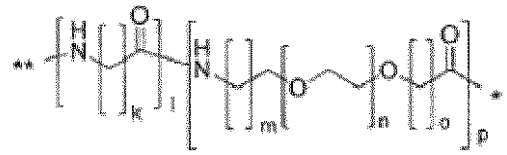


6

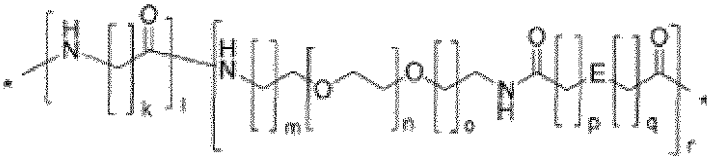
【化３】



7



8

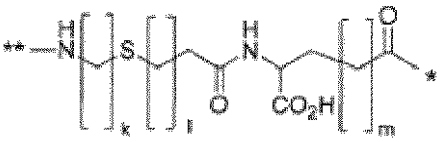


9

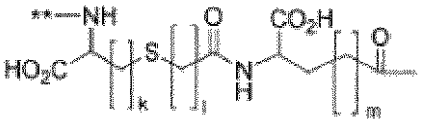
【化４】



１０

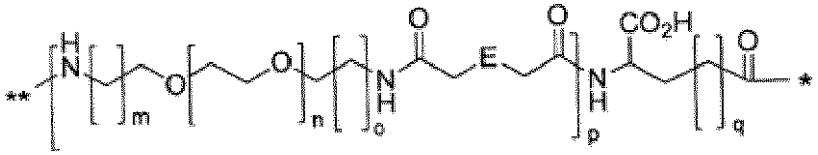


１１

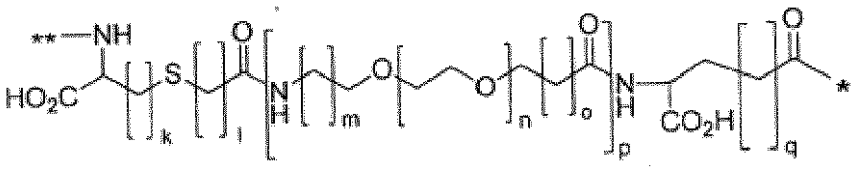


１２

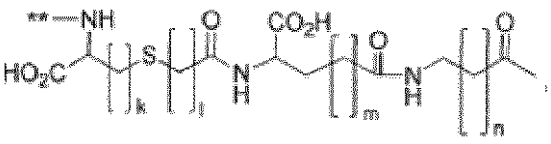
【化５】



１３

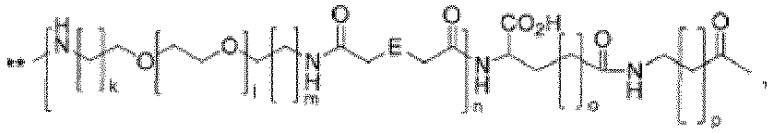


１４

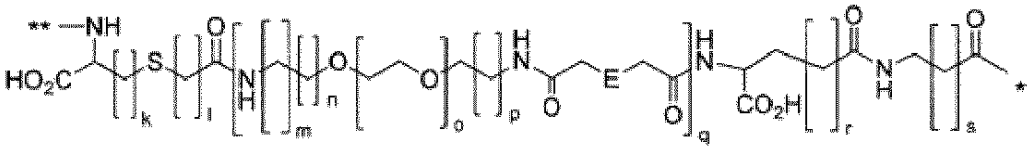


１５

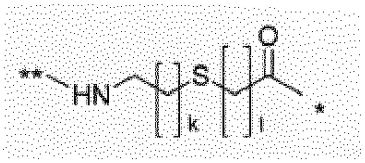
【化６】



１６



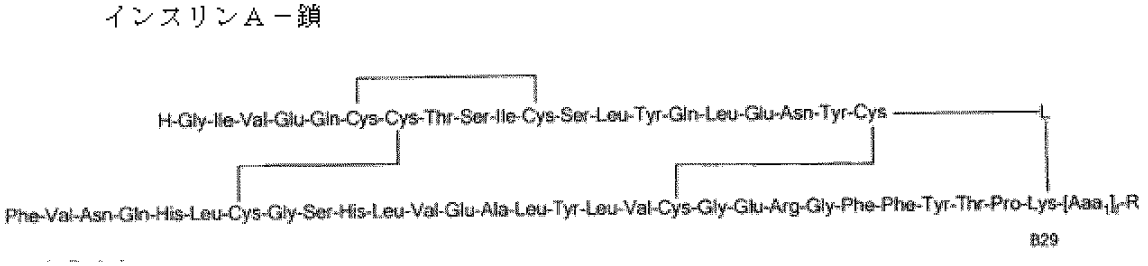
１７



１８

［式中、
＊及び＊＊は、それぞれの隣接する基への結合点を示し；
ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、及びｓは、それぞれ独立して０～１８から選択された整数であり；そして
Ｅは、不在であるか、又はＣＨ$_2$、Ｏ、Ｓ及びＮＲ（ここで、Ｒは、Ｈ、アルキル又はアラルキルである）から選択される］
から選択された基であり；そして
Ｚは、天然又は非天然のアミノ酸である、請求項１に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項５】
前記Ａ鎖が、前記Ａ鎖のＮ末端から数えて、ヒトインスリンのアミノ酸１～２１又は１～２０を含む、請求項１～４の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項６】
前記Ｂ鎖が、前記Ａ鎖のＮ末端から数えて、ヒトインスリンのアミノ酸１～２９を含む、請求項１～５の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項７】
前記インスリンのＢ鎖が、前記Ｃ末端で２０個までの追加の天然又は非天然のアミノ酸を含む、請求項６に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項８】
（ｉ）前記インスリンＡ鎖の位置７におけるシステインと、前記インスリンＢ鎖の位置７におけるシステインとの間の分子間ジスルフィド結合；
（ｉｉ）前記インスリンＡ鎖の位置２０におけるシステインと、前記インスリンＢ鎖の位置１９におけるシステインとの間の分子間ジスルフィド結合；
（ｉｉｉ）前記インスリンＡ鎖における位置６におけるシステインと、位置１１におけるシステインとの間の分子内ジスルフィド結合
の１又は２以上を含む、請求項１～７の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項９】
下記式（Ｉ）：
【化７】



（Ｉ）

［式中、
Ｌは、請求項１に定義された通りであり；
各Aaa_1は独立して、天然又は非天然のアミノ酸であり；
ｆは、０～２０から選択された整数であり；
Ｒは、ＯＨ又はNH_2である］
のものである、請求項１～８の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項１０】
ＲがＯＨであり、ｆが０、１、２又は３であり、そして各Aaa_1が、独立して、天然のアミノ酸、より好ましくは、Ａｒｇ及びＴｈｒから選択されたアミノ酸である、請求項９に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項１１】
Ｌが、下記群：
（i）　－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－
（ii）　－（Ｙ）ｂ－（Ｘ）ａ－（Ｚ）ｃ－
（iii）　－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－（Ｘ）ａ－
（iv）　－（Ｘ）ａ－（Ｘ）ｃ－（Ｙ）ｂ－
（v）　－（Ｚ）ｃ－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－
（vi）　－（Ｚ）ｃ－（Ｙ）ｂ－（Ｘ）ａ－
から選択され、ここでａ、ｂ及びｃは、それぞれ独立して、０～５から選択された整数である、請求項１～１０の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項１２】
ａ、ｂ及びｃがそれぞれ独立して、０、１又は２である、請求項１１に記載の単鎖インスリン類似体。
【請求項１３】
Ｌが、

（i）　　－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－（ここで、ａは１であり、そしてｂ及びｃは両者とも０である）；
（ii）　　－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－（ここで、ａ及びｂは１であり、そしてｃは０である）；
（iii）　　－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－（ここで、ａは１であり、ｂは２であり、そしてｃは０である）；
（iv）　　－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－（ここで、ａは１であり、ｂは０であり、そしてｃは２である）；及び
（v）　　－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－（ここで、ａは０であり、ｂは０であり、そしてｃは１である）、
から選択される、請求項１１又は１２に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項１４】
Ｘが、式1ａの基である、請求項４に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項１５】
Ｙが、請求項４に定義されるような式６の基である、請求項４に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項１６】
Ｙが、下記式６ａ又は６ｂ：

【化８】

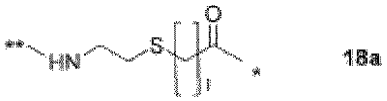


［式中、＊及び＊＊は、それぞれ隣接する基への結合点を示す］
で表される基である、請求項１５に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項１７】
Ｙが、請求項６に定義されるような式１８の基である、請求項１～１４の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項１８】
Ｙが、下記式１８ａ：

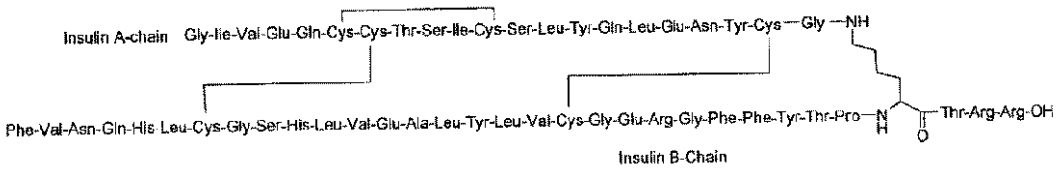
【化９】



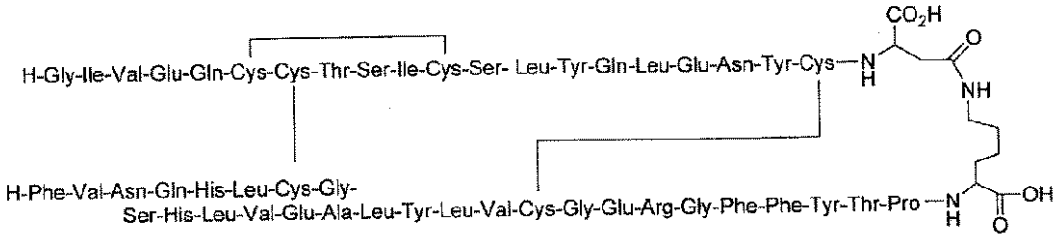
［式中、ｌは、１、２、３、４又は５であり、そして＊及び＊＊はそれぞれ隣接する基への接合点を示す］
で表される基である、請求項１７に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項１９】
下記式：

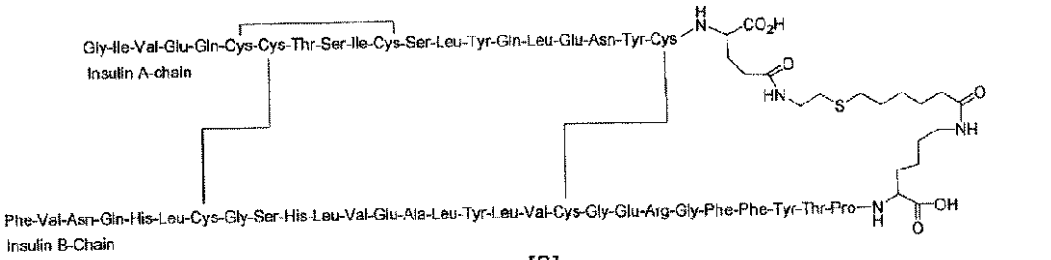
【化１０】



[1]

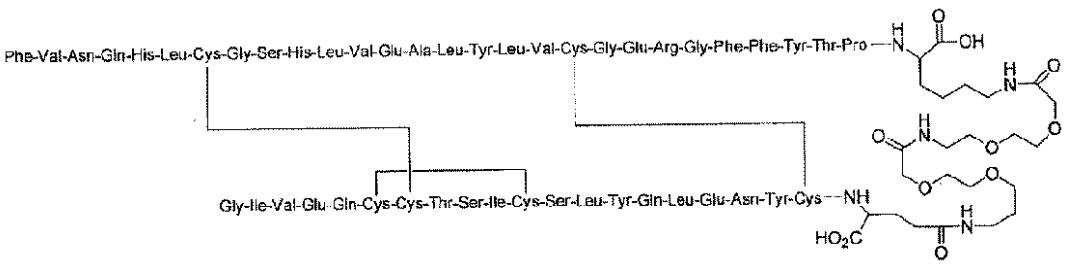


[2]

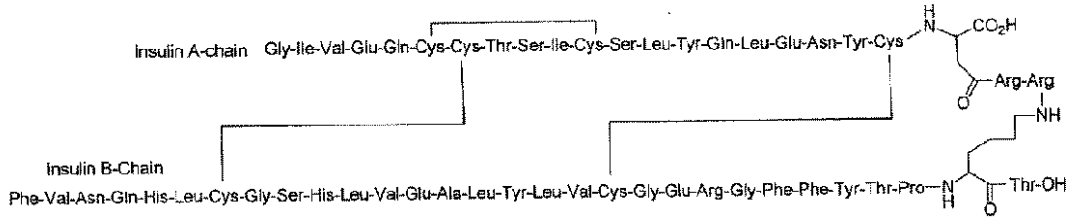


[3]

【化１１】



[4]



[5]

［式中、insulin A-chain＝インスリンA－鎖；insulin B-chain＝インスリンB－鎖］から選択される、請求項１に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項２０】

請求項１～１９の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体、及び医薬的に許容できる希釈剤、賦形剤又は担体を含んで成る医薬組成物。

【請求項２１】

薬剤としての使用のための、請求項１～１９の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体。

【請求項２２】

糖尿病の治療のための、又は高血糖症の治療又は予防のための薬剤の調製のための、請求項１～１９の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体の使用。

【請求項２３】

治療的有効量の請求項１～１９の何れか１項に記載の単鎖インスリン類似体を含む、糖尿病の治療、又は高血糖症の治療又は予防が必要な対象における、糖尿病を治療するか、又は高血糖症を治療するか又は予防するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、糖尿病の治療への治療用途を有するインスリン類似体に関する。より具体的には、但し限定的ではないが、本発明は、インスリンのＡ鎖及びＢ鎖を含む単鎖インスリン類似体に関し、ここで分子間ジスルフィド結合の他に、鎖は、Ａ又はＢ鎖におけるアミノ酸側鎖の官能基を通して一緒に結合される。

【背景技術】

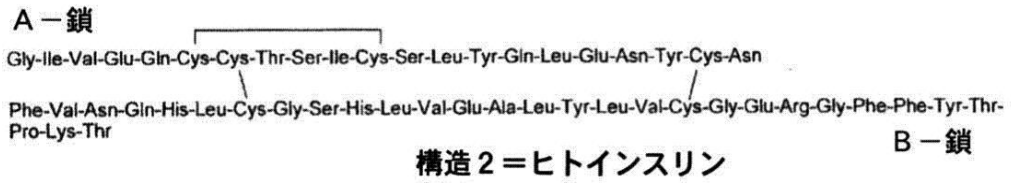
【０００２】

発明の背景

インスリンは、膵臓のβ細胞により分泌されるペプチドホルモンである。それは、２つの分子間ジスルフィド結合により連結される、２種のペプチド鎖Ａ及びＢから成る。Ａ鎖はまた、追加の分子内ジスルフィド結合も含む。ヒトインスリンは、下記構造２を有する。

【０００３】

【化１】



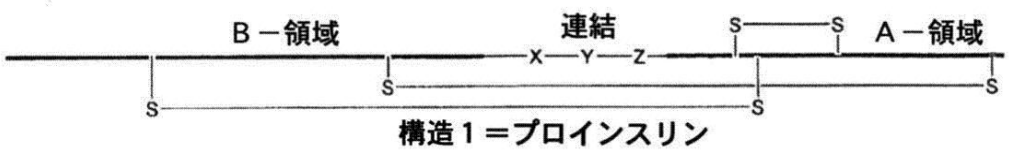
構造２＝ヒトインスリン

【０００４】

インスリンは、２４個のアミノ酸のプロペプチド、続いて、８６個のアミノ酸を含むプロインスリンから成る、単鎖前駆体プレプロインスリンとして生成される。プレプロペプチドの配列は、プレペプチド－［Ｂ－鎖］－Ａｒｇ－Ａｒｇ－［連結ペプチド］－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－［Ａ－鎖］であり、ここで前記連結ペプチドは３１個のアミノ酸から成る。プレペプチドの酵素による除去の後、３個のジスルフィド結合が形成され、そしてプロインスリンが生成される。

【０００５】

【化２】



構造１＝プロインスリン

【０００６】

次に、成熟インスリンが、Ａｒｇ－Ａｒｇ及びＬｙｓ－Ａｒｇ部位での連結ペプチドの酵素分解により遊離される。

【０００７】
プロインスリンは、天然インスリンよりもインスリン受容体に対して１００倍、低い親和性を有し、なぜならば、受容体への結合のための、すなわちＡ鎖のＮ末端アミノ機能及びＢ鎖のＣ末端カルボキシル機能のための必須残基がブロックされているからである。
【０００８】
インスリンの安定性及び溶解性特性は、インスリン治療において重要である。多くのインスリン類似体が当業界において知られている。
【０００９】
例によれば、インスリン活性を有する単鎖インスリン類似体は、欧州特許第１１９３２７２号に開示されている。それらの単鎖インスリンは、５～１８個のアミノ酸の修飾されたＣ－ペプチドを有し、そして４２％までのインスリン活性を有することが報告されている。
【００１０】
米国特許第５，５９７，７９６号は、複数のアミノ酸残基がＧｌｕ及び／又はＡｓｐにより置換されているインスリン類似体を開示する。同様に、米国特許公開第２００９００６９２１６号及び国際公開第２００７／０９６３３２号は、修飾されたＢ鎖及び連結ペプチドを含む即効性単鎖インスリンを開示する。それらの得られる類似体は、特に良く、経皮投与のために適切である。フィブリル化耐性インスリン及びインスリン類似体が、米国特許第８，１９２，９５７号に開示されている。ＰＥＧ化単鎖インスリンが米国特許公開第２０１０／０２１６６９０号に開示されており、そしてアシル化単鎖インスリンが国際公開第２００７／１０４７３８号に開示されている。
【００１１】
国際公開第２００５／０５４２９１号は、Ａ鎖及びＢ鎖が５～１１個のアミノ酸の連結ペプチドにより連結されている、単鎖インスリン類似体を開示する。同様に、国際公開第９５／１６７０８号はまた、Ａ鎖及びＢ鎖が１～１５個のアミノ酸の連結ペプチドにより連結され、そしてＣ末端アミノ酸残基がＬｙｓ又はＡｒｇ以外である、単鎖インスリン類似体を開示する。欧州特許第０４２７２９６号は、一般式Ｂ（１－２９）－Ｘｎ－Ｙ－Ａ（１－２１）（式中、Ｘｎはn個の天然に存在するアミノ酸残基を有するペプチド鎖である）のヒトインスリン前駆体を開示する。同様に、欧州特許第０７４１１８８号は、有意なインスリン活性を有する式ｂ－ＢＰ－ａの単鎖インスリン誘導体を開示し；それらの単鎖インスリンは、インスリン活性も、またＩＧＦ－１受容体に対する高い親和性も有することが報告されている。
【００１２】
それらのＡ１位置でＤ－アミノ酸を含むインスリン誘導体は、それらの生物学的活性を保持することが示されている［Geiger R, Geisen K, Regitz G, Summ HD, Langner D., Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1980 Apr;361 (4):563-70］。Ｂ２１位置でＤ－Ｇｌｕを含むインスリン誘導体は、天然インスリンと同等の効果があることが示されている［Wang SH, Hu SQ, Burke GT, Katsoyannis PG. J Protein Chem. 1991 Jun; 10(3):313-24］。
【００１３】
本発明は、２つのインスリン鎖がＡ鎖又はＢ鎖における少なくとも１つのアミノ酸のアミノ酸側鎖を通して連結される、有用な治療特性を示す新規単鎖インスリン類似体を提供することを目的とする。
【発明の概要】
【００１４】
発明の説明
本発明の第１の側面は、
（Ａ）ヒト又は動物インスリン、又はその類似体又は誘導体のＡ鎖；
（Ｂ）ヒト又は動物インスリン、又はその類似体又は誘導体のＢ鎖；
（Ｃ）前記Ａ鎖とＢ鎖との間の１又は２以上のジスルフィド結合；及び
（Ｄ）前記Ａ鎖におけるアミノ酸の官能基と、前記Ｂ鎖におけるアミノ酸の官能基との

間の追加の共有結合Ｌ（前記官能基の少なくとも１つは、アミノ酸側鎖官能基である）、を含んで成る単鎖インスリン類似体に関する。

【００１５】

本発明のインスリン類似体は、２つのインスリン鎖が既にインスリンＡ鎖又はＢ鎖の一部を形成するアミノ酸の少なくとも１つの側鎖の官能基を通して連結されている事実により、当業界において知られているそれらの類似体とは異なる。この観点から、それらは従来の単鎖ペプチドとは異なり、そして「プロインスリン様（proinsulin-like）」ペプチドとして見なされ得ない。

【００１６】

プロインスリン様ペプチド（それらの多くは、文献に記載されており、そして自然界で知られている）は、インスリン鎖の１つのＮ末端アミノ酸が他の１つのＣ末端アミノ酸に連結されている、従来の連結ペプチドを含む。そのようなペプチドは、従来の組換えＤＮＡ技法により生成され得る。しかしながら、組換えＤＮＡ方法又は他の生物学的方法により、本発明のインスリンを生成することは不可能である。従って、本明細書に記載されるインスリン類似体は、当該技術分野においてはこれまで知られていないインスリンの新規鎖グループのプロトタイプである。

【００１７】

１つの鎖のアミノ酸の官能基と、他の鎖のアミノ酸の側鎖官能基との間への結合の組込みは、生物学的活性、すなわちＡ鎖のＮ末端アミノ機能又はＢ鎖のＣ末端カルボキシル機能のための必須基の少なくとも１つが遊離したまま存続することを意味する。

【００１８】

好都合には、Ａ鎖とＢ差との間への追加の結合の組込みは、鎖の柔軟性を低め、これが順に、フィブリル化及び沈殿を低め、そして化学及び酵素安定性を高める。Ａ鎖及びＢ鎖がＣペプチドを通して連結されている単鎖インスリンはしばしば、より高い化学的安定性を示すが、ところが、Ａ鎖のＮ末端アミノ機能及びＢ鎖のＣ末端カルボキシル機能がブロックされるので、インスリン受容体に対して低い親和性を示す傾向がある。本発明の単鎖インスリン類似体は、柔軟性を低めるために鎖間の追加の結合の利点を保持すると共に、同時に、活性のために必要である１又は両末端基を開放することにより、低親和性の問題を軽減する。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

詳細な記載

本明細書に記載される単鎖インスリン類似体は、Ａ及びＢ鎖がＡ又はＢ鎖に含まれるアミノ酸の少なくとも１つの側鎖官能基を通して共有結合されている、構造的に関連するタンパク質群を包含する。

【００２０】

従って、好ましい実施形態によれば、分子間ジスルフィド結合の他に、Ａ鎖のアミノ酸の官能基と、Ｂ鎖のアミノ酸の官能基との間で形成される追加のリンカー（ここで、それらの官能基の少なくとも１つはアミノ酸の側鎖上にある）により、一緒に連結される、ヒト又は動物インスリン、又はその類似体のＡ鎖及びＢ鎖を含む単鎖インスリン類似体に関する。

【００２１】

本明細書において使用される場合、用語［インスリン類似体（insulin analogue）］とは、自然界において存在する何れとも異なるが、しかし血糖コントロールの点でヒトインスリンと同じ作用を実施するために人体にまだ利用できる、インスリンの変形を意味する。基礎となるＤＮＡの遺伝子操作を通して、インスリンのアミノ酸配列は、その吸収、分布、代謝及び排泄特性を変えるために変更され得る。公式には、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）は、それらはより一般的には、インスリン類似体と呼ばれるが、「インスリン受容体リガンド（insulin receptor ligands）」として、それらを言及する。修飾は、食事時間で必要とされるボーラスレベルのインスリン（食事インスリン）を提供することが意図さ

れる、注射部位から容易に吸収され、そして従って、皮下注射される天然インスリンよりも早く作用するインスリン類似体；及び日中、及び特に夜間での基本レベルのインスリン（基本インスリン）を供給することが意図される、８～２４時間にわたって、ゆっくり放出されるそれらのインスリン類似体を包含する。早く作用するインスリン類似体は、インスリンリスプロ（Elililly and Company）及びインスリンアスパルト（Novo Nordisk）を包含し、そして長く作用するインスリン類似体は、ＮＰＨインスリン、インスリングルリジン（Sanofi-Aventis）、インスリンデテミル（Novo Nordisk）及びインスリングラルギン（Sanofi-Aventis）を包含する。

【００２２】

インスリン類似体は、インスリンの変異体を包含する。本明細書において使用される場合、用語「変異体（variant）」とは、（ａ）１又は２以上のアミノ酸残基が天然に存在するか又は天然に存在しないアミノ酸残基により置換されているか、（ｂ）複数のアミノ酸残基の順序が逆にされているか、（ｃ）（ａ）及び（ｂ）の両者が一緒に存在するか、（ｄ）スペーサー基が任意の２つのアミノ酸残基間に存在するか、（ｅ）１又は２以上のアミノ酸残基がペプチド形で存在するか、（ｆ）ペプチドの１又は２以上のアミノ酸残基の（Ｎ－Ｃ－Ｃ）主鎖が修飾されているか、又は（ａ）－（ｆ）の何れかの組合せである任意の変異を包含する。好ましくは、変異体は、（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の１つから発生する。

【００２３】

より好ましくは、１又は２つのアミノ酸残基が１又は２以上の他のアミノ酸残基により置換される。さらにより好ましくは、１つのアミノ酸残基が別のアミノ酸残基により置換される。好ましくは、置換は相同である。

【００２４】

相同置換（置換及び交換は、存在するアミノ酸残基の、他の残基による交換を意味するよう、本明細書で両者とも使用される）は、塩基性アミノ酸に代わる塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸に代わる酸性アミノ酸、極性アミノ酸に代わる極性アミノ酸、等のような置換で発生することができる。非相同置換はまた、１つの種類の残基～別の種類の残基の置換で発生し、又は他方では、非天然のアミノ酸、例えばオルニチン、ジアミノ酪酸オルニチン、ノルロイシンオルニチン、ピリジルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン及びフェニルグリシン（それらのより詳細な列挙は下記の通りである）も包含する。複数のアミノ酸残基が一度に修飾され得る。

【００２５】

本明細書において使用される場合、アミノ酸は、次の種類に従って分類され；

塩基性：Ｈ、Ｋ、Ｒ

酸性：Ｄ、Ｅ

非極性：Ａ、Ｆ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｐ、Ｖ、Ｗ

極性：Ｃ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｙ

（国際的に認められている１文字アミノ酸標記を使用して）、そして相同及び非相同置換がそれらの分類を用いて定義される。従って、相同置換は同じクラス内からの置換を参照するために使用されるが、ところが非相同置換は、異なったクラスからの又は非天然のアミノ酸による置換を言及する。

【００２６】

担体部分の任意の２つのアミノ酸残基間に挿入され得る適切なスペーサー基は、アミノ酸スペーサー、例えばグリシン又はβ－アラニン残基の他に、アルキル基、例えばメチル、エチル又はプロピル基を含む。ペプトイド形で１又は２以上のアミノ酸残基の存在を包含する、さらなる変動形タイプ（ｅ）は、当業者により十分に理解されるであろう。誤解を避けるために、「ペプトイド形（peptoid from）」は、アミノ酸残基の変異体を言及するために使用され、ここでα－炭素置換基は、α－炭素よりもむしろ残基の窒素原子上に存在する。ペプトイド形でのペプチドを調製するための方法は、当業界において知られている（Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 and Horwell DC, Trends Bio

technol. (1995) 13(4), 132-134）。タイプ（ｆ）修飾は、国際特許出願ＰＣＴ／ＧＢ９９／０１８５５号に記載されるそれらの方法により発生することができる。

【００２７】

好ましくは、タイプ（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸変動が独立して、任意の位置で生じることは好ましい。上述のように、２つ以上の相同又は非相同の置換は、同時に生じることができる。さらなる変動は、配列内の多くのアミノ酸残基の配列の逆転により発生することができる。

【００２８】

１つの実施形態によれば、置換アミノ酸残基は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンの残基から選択される。

【００２９】

置換アミノ酸残基はさらに、下記に記載されるような非天然アミノ酸から選択され得る。

【００３０】

本明細書において使用される場合、用語「誘導体（derivative）」とは、Ｎ末端及び／又はＣ末端でのアミノ酸側鎖に化学的修飾を受けたインスリンを意味する。好ましくは、化学的修飾は、類似体の吸収、分布、代謝及び排泄の特性を変更するよう作用する。半合成インスリンは、動物インスリンの化学的修飾に基いて、しばらくの間、臨床学的に使用され、例えばNovo Nordiskは、ヒト変種から変化する単一アミノ酸を除去し、そしてヒトアミノ酸を化学的に付加することにより、ブタインスリンを、半合成「ヒト」インスリンに酵素的に転換した。

【００３１】

１つの好ましい実施形態によれば、インスリンは、その等電点を変更するために化学的に修飾される。通常の非修飾インスリンは、生理学的ｐＨで可溶性である。シフトされた等電点を有する修飾されたインスリン誘導体が創造されており、結果的に、それらは、溶解平衡状態で存在し、ここでそれらは、ほとんどが沈殿するが、しかしゆっくりと血流に溶解し、そして最終的に腎臓により分泌される。

【００３２】

１つの好ましい実施形態によれば、本発明の単鎖インスリン類似体は、動物インスリンに由来する。

【００３３】

異なった哺乳類における動物インスリンのアミノ酸配列は、ヒトインスリン（インスリンヒトＩＮＮ）に類似することができる。しかしながら、脊椎動物種内に相当の変動性が存在する。ブタインスリンは、ヒト種からの単一のアミノ酸変動のみを有し、そしてウシインスリンは３個のアミノ酸により異なる。両者ともほぼ同じ長さを有するヒト受容体に対して活性的である。ウシインスリン及びブタインスリンは、生合成ヒトインスリン（インスリンヒトｒＤＮＡ）が利用できない時点で、最初に臨床学的に使用されたインスリン類似体（天然に存在する、動物膵臓からの抽出により生成された）であった。サメ及び魚類のいくつかの種からのインスリンもまた、効果的であり得る。

【００３４】

好ましくは、本発明の単鎖インスリン類似体は、動物インスリン、又はその類似体又は誘導体のＡ鎖を含む。

【００３５】

好ましくは、本発明の単鎖インスリン類似体は、動物インスリン、又はその類似体又は誘導体のＢ鎖を含む。

【００３６】

別の好ましい実施形態によれば、本発明の単鎖インスリン類似体は、ヒトインスリン又はその類似体に由来する。より好ましくは、インスリンは、生合成インスリン（インスリ

ンヒトｒＤＮＡ）である。
【００３７】
好ましくは、本発明の単鎖インスリン類似体は、ヒトインスリン、又はその類似体又は誘導体のＡ鎖を含む。
【００３８】
好ましくは、本発明の単鎖インスリン類似体は、ヒトインスリン、又はその類似体又は誘導体のＢ鎖を含む。
【００３９】
１つの好ましい実施形態によれば、共有結合Ｌは、前記Ａ鎖におけるアミノ酸の官能基と、前記Ｂ鎖におけるアミノ酸の側鎖官能基との間に存在する。
【００４０】
本明細書において使用される場合、用語「官能基（functional group）」とは、分子の特徴的化学反応を担当する分子内の原子又は結合の特定基を意味する。
【００４１】
別の好ましい実施形態によれば、共有結合Ｌは、前記Ａ鎖におけるアミノ酸の側鎖官能基と、前記Ｂ鎖におけるアミノ酸の側鎖官能基との間に存在する。
【００４２】
１つの好ましい実施形態によれば、共有結合Ｌは、前記Ａ鎖のＣ末端アミノ酸と、前記Ｂ鎖におけるアミノ酸の側鎖官能基との間に存在する。
【００４３】
１つの好ましい実施形態によれば、共有結合Ｌは、直接結合である。
【００４４】
１つの好ましい実施形態によれば、共有結合Ｌは、Ａ鎖のＣ末端アミノ酸でのアスパラギン酸残基又はグルタミン酸残基の側鎖と、Ｂ鎖におけるＬｙｓ残基の側鎖アミノ官能基との間の直接結合である。
【００４５】
１つの好ましい実施形態によれば、２つのインスリン鎖は、それぞれのインスリン鎖を形成するアミノ酸の官能基を通して直接的に連結される。例えば、１つの特に好ましい実施形態によれば、Ａ及びＢ鎖は、最も簡単な場合、インスリン鎖の１つの少なくとも１つのアミノ酸側鎖の官能基と、他のインスリン鎖の末端アミノ酸との間に創造される結合により連結される。一例として、１つの好ましい実施形態によれば、前記結合は、Ａ鎖のＣ末端アミノ酸と、Ｂ鎖おけるアミノ酸の側鎖との間で直接的に形成される。
【００４６】
１つの非常に好ましい実施形態によれば、２つの鎖は、インスリンのＡ鎖のＣ末端アミノ酸として含まれるアスパラギン酸残基又はグルタミン酸残基の側鎖、及びインスリンのＢ鎖のＣ末端アミノ酸として含まれるＬｙｓ残基の側鎖アミノ官能基を通して直接的に連結される。
【００４７】
本発明の別の実施形態によれば、２つのインスリン鎖は、個々のパーツＸ、Ｙ、Ｚをそれ自体含むことができる基Ｌを通して連結される。この特定の実施形態のためには、基Ｘ、Ｙ及びＺは、インスリンの生来のＡ又はＢ鎖の一部を形成しない。
【００４８】
１つの好ましい実施形態によれば、基Ｌは、１又は２以上の天然又は非天然のアミノ酸、ペプチド（非天然のアミノ酸残基を含むことができる）、又は種々のペプチドモディファイア、例えば二酸、ジアミン、ポリ及びオリゴエチレングリコール、チアーアミノ酸、アミノチオール、等を含むことができる。成分Ｘ、Ｙ及びＺは、それらの配列において交換可能であり、そして任意には、反復される。
【００４９】
より特定には、リンカー基Ｌは、基Ｘ又は基Ｙの形で、少なくとも１つの「モディファイア（modifier）」を含む。さらに、リンカー基Ｌはさらに、１又は２以上の従来のアミ

ノ酸／ペプチド残基（Ｚ）を含むことができる。

【００５０】

本明細書において使用される場合、用語「モディファイア（modifier）」とは、ペプチドの生物学的及び生理化学的性質を修飾できる任意の基を意味する。

【００５１】

１つの特に好ましい実施形態によれば、前記共有結合Ｌは、

（ｉ）少なくとも１つの基Ｘ；及び／又は

（ｉｉ）少なくとも１つの基Ｙ；及び／又は

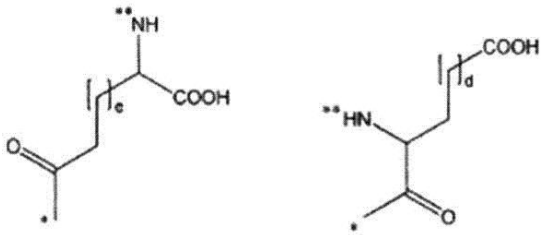
（ｉｉｉ）少なくとも１つの基Ｚ、を含んで成る基であり；

ここで、

Ｘは、下記式1ａ又は１ｂ：

【００５２】

【化３】



1a　　1b

【００５３】

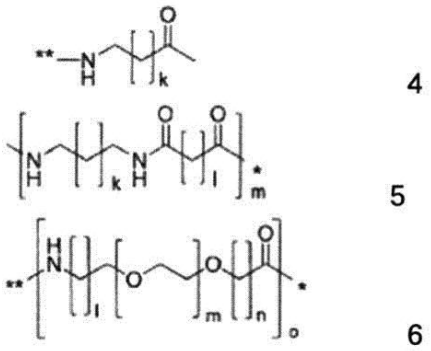
［式中、ｄ及びｅは、それぞれ独立して、０～１０から選択された整数であり、そして＊及び＊＊は、それぞれの隣接する基への結合点を示す］

で表される基であり；

Ｙは、下記式：

【００５４】

【化４】



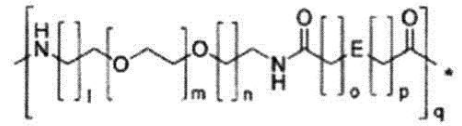
4

5

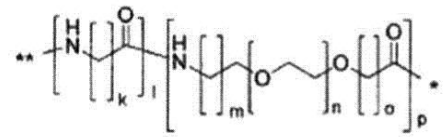
6

【００５５】

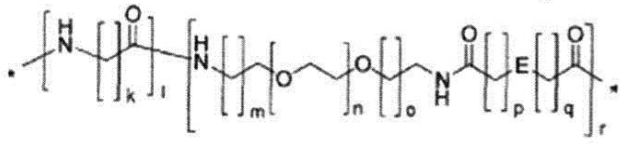
【化５】



7

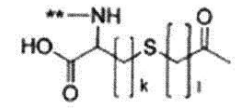


8

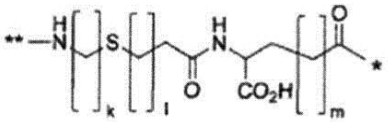


9

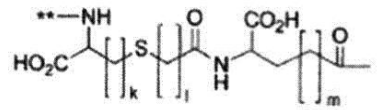
【００５６】
【化６】



10

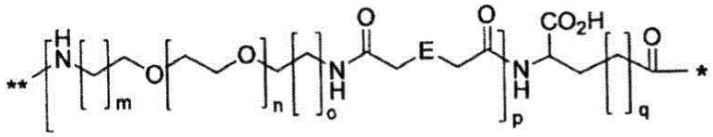


11

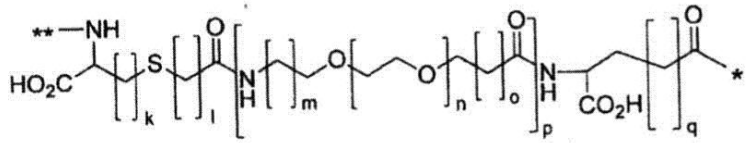


12

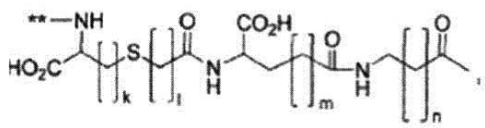
【００５７】
【化７】



13



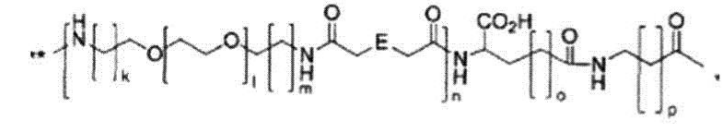
14



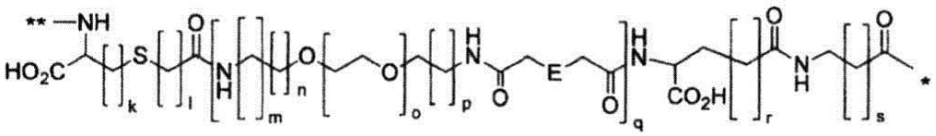
15

【００５８】

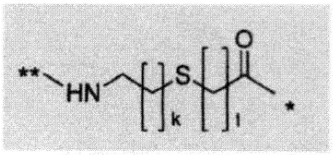
【化８】



16



17



18

【００５９】

［式中、＊及び＊＊は、それぞれの隣接する基への結合点を示し；

ｋ、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、及びｓは、それぞれ独立して０～１８から選択された整数であり；そして

Ｅは、不在であるか、又はＣＨ$_2$、Ｏ、Ｓ及びＮＲ（ここで、Ｒは、Ｈ、アルキル又はアラルキルである）から選択される］

から選択された基であり；そして

Ｚは、天然又は非天然のアミノ酸である。

【００６０】

本明細書において使用される場合、用語「アルキル（alkyl）」とは、置換され得るか（モノ－、又はポリ－）、又は置換され得ない、飽和直鎖又は分岐アルキルの両基を包含する。好ましくは、アルキル基は、Ｃ$_{1-20}$アルキル基、より好ましくはＣ$_{1-15}$、さらにより好ましくはＣ$_{1-12}$アルキル基、さらにより好ましくはＣ$_{1-6}$アルキル基、より好ましくはＣ$_{1-3}$アルキル基である。特に好ましいアルキル基は、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル及びヘキシルを包含する。適切な置換基は、例えばＯＨ、Ｏ－アルキル、ハロゲン、ＮＨ$_2$、ＮＨ－アルキル、Ｎ－(アルキル)$_2$、ＣＦ$_3$、Ｎ０$_2$、ＣＮ、ＣＯＯ－アルキル、ＣＯＯＨ、ＣＯＮＨ$_2$、ＣＯ－ＮＨ－アルキル、ＣＯ－Ｎ(アルキル)$_2$、Ｓ０$_2$－アルキル、Ｓ０$_2$ＮＨ$_2$ 及び Ｓ０$_2$－ＮＨ－アルキルから選択される１又は２以上の基を包含する。

【００６１】

本明細書において使用される場合、用語「アリール（ａｒｙｌ）」とは、置換され得るか（モノ－又はポリ－）又は置換され得ないＣ$_{1-12}$芳香族基を言及する。典型的な例は、フェニル、ナフチル、等を包含する。適切な置換基は、例えばＯＨ、Ｏ－アルキル、ハロゲン、ＮＨ$_2$、ＮＨ－アルキル、Ｎ－(アルキル)$_2$、ＣＦ$_3$、Ｎ０$_2$、ＣＮ、ＣＯＯ－アルキル、ＣＯＯＨ、ＣＯＮＨ$_2$、ＣＯ－ＮＨ－アルキル、ＣＯ－Ｎ(アルキル)$_2$、Ｓ０$_2$－アルキル、Ｓ０$_2$ＮＨ$_2$ 及び Ｓ０$_2$－ＮＨ－アルキルから選択される１又は２以上の基を包含する。

【００６２】

用語「アルキル（ａｒａｌｋｙｌ）」とは、上記のような用語アルキル及びアリールと併用して使用される。

【００６３】

天然アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン

、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを包含する。

【００６４】

本明細書において使用される場合、用語「非天然のアミノ酸（ｎｏｎ－ｎａｔｕｒａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ）」又は「非天然アミノ酸（ｕｎｎａｔｕｒａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ）」とは、α－二置換アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、乳酸、天然アミノ酸のハロゲン化誘導体、例えばトリフルオロチロシン、ｐ－Ｃｌ－フェニルアラニン、ｐ－Ｆ－フェニルアラニン、ｐ－Ｂｒ－フェニルアラニン、ｐ－フェニルアラニン、ｐ－NO_2－フェニルアラニン、フェニルグリシン、サルコシン、ペニシラミン、Ｄ－２－メチルトリプトファン、ホスホセリン、ホスホスレオニン、ホスホチロシン、ｐ－ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－アリルグリシン、β－アラニン、β－アスパラギン酸、β－シクロヘキシルアラニン、シトルリン、ホモセリン、ホモシステイン、ピログルタミン酸、Ｌ－α－アミノ酪酸、Ｌ－γ－アミノ酪酸、Ｌ－α－アミノイソ酪酸、α－シクロヘキシルグリシン、ジアミノ酪酸、ジアミノピメリン酸、Ｎ-εジニトロフェニル－リジン、Ｌ－１－ナフチルアラニン、Ｌ－２－ナフチルアラニン、３－（２－ピリジル）－Ｌ－アラニン、３－（３－ピリジル）－Ｌ－アラニン、３－（４－ピリジル）－Ｌ－アラニン、Ｎ－ε－メチル－リジン、Ｎ、Ｎ－ε－ジメチル－リジン、Ｎ、Ｎ、Ｎ－ε－トリメチルリジン、３－メルカプトプロピオン酸、Ｌ－ε－アミノカプロン酸、７－アミノヘプタン酸、６－アミノヘキサン酸Ｌ－メチオニンスルホン、オルニチン、Ｌ－ノルロイシン、Ｌ－ノルバリン、ｐ－ニトロ－Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、γ－グルタミン酸、γ－アミノ酪酸、Ｌ－チオプロリン、フェニルアラニン（Phe）のメチル誘導体、例えば４－メチル－Phe、ペンタメチル－Phe、Ｌ－Phe（4-アミノ）、Ｌ－Tyr（メチル）、Ｌ－Pheを（４－イソプロピル）、Ｌ－Tic（１、２、３、４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸）、Ｌ－ジアミノプロピオン酸及びＬ－Phe（４－ベンジル）を包含する。

【００６５】

好都合には、非天然アミノ酸の導入は、ペプチドの酵素安定性の上昇を導く。

【００６６】

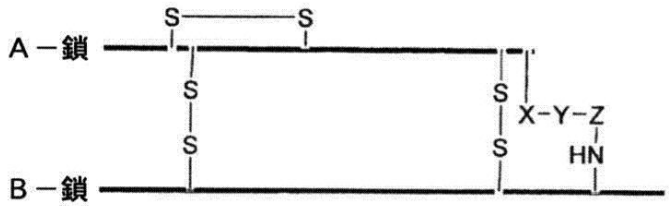
本発明のインスリン類似体は、Ｌ又はＤ形でのアミノ酸を含むことができ、すなわち１又は２以上の残基、好ましくはすべての残基はＬ又はＤ形で存在することができる。１つの好ましい実施形態によれば、鎖間の結合は、ヒト又は動物インスリン、又はその類似体又は誘導体のＡ鎖のＣ末端のアミノ酸と、ヒト又は動物インスリン、又はその類似体又は誘導体のＢ鎖の位置２９でのリシン残基の側鎖との間で形成される。

【００６７】

１つの好ましい実施形態によれば、リンカー基Ｌは、Ａ鎖のＣ末端部分に存在する１つのアミノ二酸の側鎖カルボキシル基と、好ましくは限定的ではないが、Ｂ鎖のＢ２９位に位置する二アミノ酸の側鎖との間に存在する（構造３を参照のこと）。本明細書において使用される場合、用語「Ｃ－末端部分（Ｃ－ｔｅｒｍｉｎａｌ ｐａｒｔ）」とは、可能なペプチド拡張を包含する、Ａ鎖の最後の１０個のアミノ酸を意味する。

【００６８】

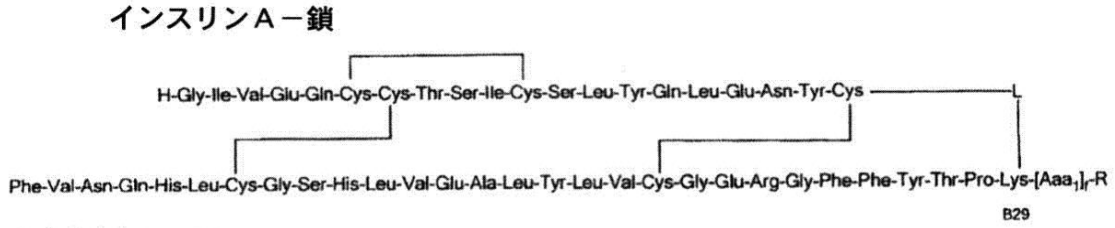
【化９】



構造３＝単鎖インスリンにおける側鎖連結

【００６９】
リンカーは、単鎖インスリン類似体がグルコース摂取及びインスリン受容体結合効果を有するために必要な構造コンホメーションを、前記リンカーが提供するのにできるだけ長いものであり得る。
【００７０】
Ｌｙｓ（Ｂ２９）側鎖でのリンカー基の組込みが特に好ましい。１つの非常に好ましい実施形態によれば、リンカーは親油性モディファイアを含むか、又は親油性及び親水性特性を兼ね備えているモディファイアを含む。
【００７１】
１つの好ましい実施形態によれば、Ａ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて、ヒトインスリンのアミノ酸１～２１を含む。
【００７２】
１つの好ましい実施形態によれば、Ａ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて、ヒトインスリンのアミノ酸１～２１から成る。
【００７３】
別の好ましい実施形態によれば、Ａ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて、ヒトインスリンのアミノ酸１～２０を含む。
【００７４】
別の好ましい実施形態によれば、Ａ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて、ヒトインスリンのアミノ酸１～２０から成る。
【００７５】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｂ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて、ヒトインスリンのアミノ酸１～２９を含む。
【００７６】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｂ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて、ヒトインスリンのアミノ酸１～２９から成る。
【００７７】
１つの好ましい実施形態によれば、インスリンのＢ鎖はさらに、そのＣ末端で２０個までの追加の天然又は非天然のアミノ酸を含む。好ましくは、そのＢ鎖はさらに、そのＣ末端で１～１０個、又はより好ましくは、１～５個の追加の天然又は非天然のアミノ酸を含む。１つの非常に好ましい実施形態によれば、Ｂ鎖はさらに、そのＣ末端で１，２又は３個の追加の天然又は非天然のアミノ酸を含む。さらにより好ましくは、Ｂ鎖はさらに、そのＣ末端で１，２又は３個の追加の天然アミノ酸を含む。
【００７８】
１つの好ましい実施形態によれば、単鎖インスリン類似体は、
（ｉ）前記インスリンＡ鎖の位置７におけるシステムと、前記インスリンＢ鎖の位置７におけるシステインとの間の分子間ジスルフィド結合；
（ｉｉ）前記インスリンＡ鎖の位置２０におけるシステインと、前記インスリンＢ鎖の位置１９におけるシステインとの間の分子間ジスルフィド結合；
（ｉｉｉ）前記インスリンＡ鎖における位置６におけるシステインと、位置１１におけるシステインとの間の分子内ジスルフィド結合の１又は２以上を含む。
【００７９】
１つの好ましい実施形態によれば、単鎖インスリン類似体は、上記（ｉ）、（ii）及び（iii）の１つを含む。
【００８０】
別の好ましい実施形態によれば、単鎖インスリン類似体は、上記（ｉ）、（ii）及び（iii）の２つを含む。
【００８１】
別の好ましい実施形態によれば、単鎖インスリン類似体は、上記（ｉ）、（ii）及び（iii）を含む。

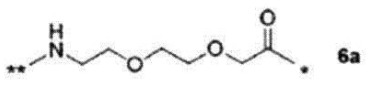
【００８２】
１つの好ましい実施形態によれば、単鎖インスリン類似体は、
下記式（Ｉ）：
【００８３】
【化１０】



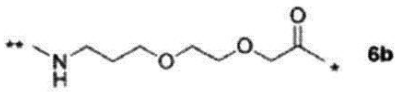
（Ｉ）

【００８４】
［式中、Ｌは、請求項１に定義された通りであり；
各Aaa_1は独立して、天然又は非天然のアミノ酸であり；
ｆは、０～２０から選択された整数であり；
Ｒは、ＯＨ又はNH_2である］
のものである。
【００８５】
１つの好ましい実施形態によれば、ＲはＯＨであり、ｆは０，１，２又は３であり、そして各Aaa_1は独立して、天然アミノ酸である。より好ましくは、天然アミノ酸は、Ａｒｇ及びＴｈｒから選択される。
【００８６】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｌは、下記群：
（ｉ）　－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－
（ｉｉ）　－（Ｙ）ｂ－（Ｘ）ａ－（Ｚ）ｃ－
（ｉｉｉ）　－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－（Ｘ）ａ－
（ｉｖ）　－（Ｘ）ａ－（Ｘ）ｃ－（Ｙ）ｂ－
（ｖ）　－（Ｚ）ｃ－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－
（ｖｉ）　－（Ｚ）ｃ－（Ｙ）ｂ－（Ｘ）ａ－
から選択され、ここでａ、ｂ及びｃは、それぞれ独立して、０～５から選択された整数である。
【００８７】
１つの好ましい実施形態によれば、ａ、ｂ及びｃはそれぞれ独立して、０、１又は２である。
【００８８】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｌは、－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－
であり、ここでaは１であり、そしてｂ及びｃは両者とも０である。
【００８９】
別の好ましい実施形態によれば、Ｌは、－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－
であり、ここでa及びｂは１であり、そしてｃは０である。
【００９０】
別の好ましい実施形態によれば、Ｌは、－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－
であり、ここでaは１であり、ｂは２であり、そしてｃは０である。
【００９１】
別の好ましい実施形態によれば、Ｌは、－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－

であり、ここでaは１であり、ｂは０であり、そしてｃは２である。
【００９２】
別の好ましい実施形態によれば、Ｌは、－（Ｘ）ａ－（Ｙ）ｂ－（Ｚ）ｃ－
であり、ここでaは０であり、ｂは０であり、そしてｃは１又は２である。
【００９３】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｌは直接結合であり、すなわちａ、ｂ及びｃはすべて０である。
【００９４】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｘは、上記に定義されるような式１ａの基である。
【００９５】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｙは、上記に定義されるような式６の基である。
【００９６】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｙは、下記式６ａ又は６ｂ：
【００９７】
【化１１】

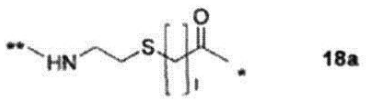


6a



6b

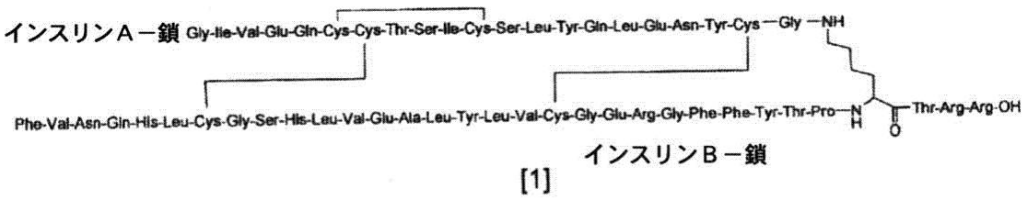
【００９８】
［式中、＊及び＊＊は、それぞれ隣接する基への結合点を示す］で表される基である。
【００９９】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｙは、上記に定義されるような式１８ａの基である。
【０１００】
１つの好ましい実施形態によれば、Ｙは、下記式１８ａ：
【０１０１】
【化１２】



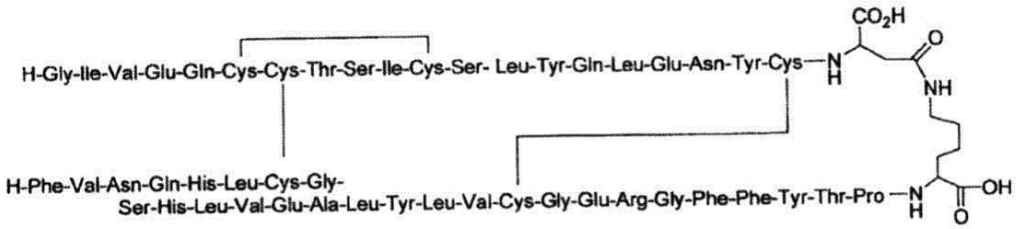
18a

【０１０２】
［式中、ｌは、１、２、３、４又は５であり、そして＊及び＊＊はそれぞれ隣接する基への接合点を示す］
で表される基である。
【０１０３】
１つの好ましい実施形態によれば、単鎖インスリンは、下記式：
【０１０４】

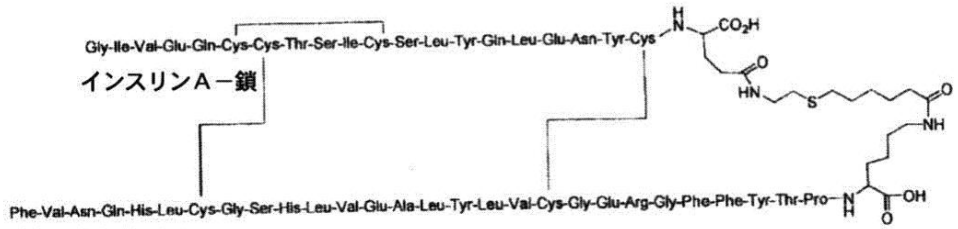
【化１３】



[1]

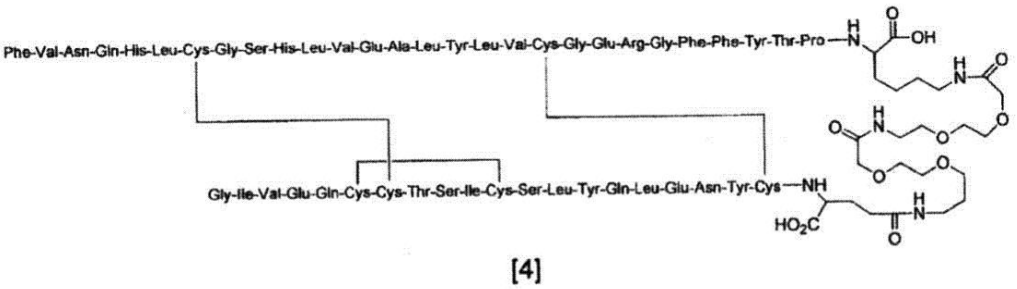


[2]

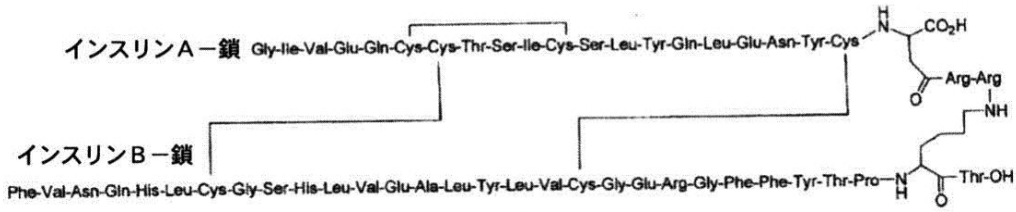


[3]

【０１０５】
【化１４】



[4]



[5]

【０１０６】
から選択される。
【０１０７】
医薬組成物
本発明の１つの観点は、医薬的に許容できる希釈剤、賦形剤又は担体、又はその混合物

と共に混合される本発明のインスリン類似体を含んで成る医薬組成物に関する。本発明の類似体（それらの医薬的に許容できる塩、エステル及び医薬的に許容できる溶媒和物を含む）は単独で投与され得るにもかかわらず、それらは一般的に、特にヒト治療のために、医薬担体、賦形剤又は希釈剤と組合して投与されるであろう。前記医薬組成物は、ヒト及び獣医学におけるヒト又は動物用途のためであっても良い。

【０１０８】

本明細書に記載される種々の異なった形の医薬組成物のためのそのような適切な賦形剤の例は、"Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Wellerに見出され得る。

【０１０９】

治療使用のための許容できる担体又は希釈剤は、医薬業界において良く知られており、そして例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。

【０１１０】

適切な担体の例は、ラクトース、澱粉、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトール及び同様のものを包含する。適切な希釈剤の例は、エタノール、グリセロール及び水を包含する。

【０１１１】

医薬担体、賦形剤又は希釈剤の選択は、意図される投与経路及び標準的薬務に関連して選択され得る。医薬組成物は、担体、賦形剤又は希釈剤として、又はその他に、任意の適切な結合剤、潤滑剤、懸濁化剤、コーティング剤、可溶化剤を含むことができる。

【０１１２】

適切な結合剤の例は、澱粉、ゼラチン、天然糖、例えばグルコース、無水ラクトース、自由流動ラクトース、β－ラクトース、コーン甘味剤、天然及び合成ゴム、例えばアカシア、トラガカント又はアルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース及びポリエチレングリコールを包含する。

【０１１３】

適切な潤滑剤の例は、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム及び同様のものを包含する。

【０１１４】

保存剤、安定剤、色素及びさらに風味剤が、医薬組成物に提供され得る。保存剤の例は、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、及びｐ－ヒドロキシ安息香酸のエステルを包含する。酸化防止剤及び懸濁剤もまた使用され得る。

【０１１５】

塩／エステル

本発明のインスリン類似体は、塩又はエステル、特に医薬的に許容できる塩又はエステルとして存在することができる。

【０１１６】

本発明の類似体の医薬的に許容できる塩は、その適切な酸付加塩又はその塩基付加塩を包含する。適切な医薬塩の再考は、Berge et al, J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977)に見出され得る。塩は、例えば強無機酸、例えば鉱酸、例えば硫酸、リン酸又はハロゲン化水素酸により；強有機カルボン酸、例えば置換されないか又は置換される（例えば、ハロゲンにより）、１～４個の炭素原子のカルカンカルボン酸、例えば酢酸により；飽和又は不飽和ジカルボン酸、例えばシュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸又はテレフタル酸；ヒドロキシカルボン酸、例えばアスコルビン酸、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸により；アミノ酸、例えばアスパラギン酸又はグルタミン酸により；安息香酸により；又は有機スルホン酸、例えば置換されていないか、又は置換される（例えば、ハロゲンにより）、（C_1－C_4）－アルキル－又はアリール－スルホン酸、例えばメタン－又はｐ－トルエンスルホン酸により形成される。

【０１１７】
エステルは、エステル化される官能基に依存して、有機酸又はアルコール／水酸化物の何れかを用いて形成される。有機酸は、カルボン酸、例えば置換されていないか、又は置換された（例えば、ハロゲンにより）、１～１２個の炭素原子のアルカンカルボン酸；飽和又は不飽和ジカルボン酸、例えばシュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸又はテレフタル酸；ヒドロキシカルボン酸、例えばアスコルビン酸、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、又はクエン酸；アミノ酸、例えばアスパラギン酸又はグルタミン酸；安息香酸；又は有機スルホン酸、例えば置換されていないか又は置換された（例えば、ハロゲンにより）（C_1－C_4）－アルキル－又はアリール－スルホン酸、例えばメタン－又はｐ－トルエンスルホン酸である。適切な水酸化物は、無機水酸化物、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アルミニウムを包含する。アルコールは、置換されていないか又は置換され得る（例えば、ハロゲンにより）、１～１２個の炭素原子のアルカンアルコールを包含する。

【０１１８】
鏡像異性体／互変異性体
前に論じられた本発明のすべての側面によれば、本発明は、適切な場合、本発明の類似体のすべての鏡像異性体及び互変異性体を包含する。当業者は、光学性質（１又は２以上のキラル炭素原子）又は互変異性特性を有する化合物を認識するであろう。その対応する鏡像異性体及び／又は互変異性体は、当業界において知られている方法により単離され得る／調製され得る。

【０１１９】
立体及び幾何異性体
本発明の類似体のいくつかは、立体異性体及び／又は幾何異性体として存在することができ、例えばそれらは１又は２以上の非対称及び／又は幾何学的中心を有することができ、そして結果的に、複数の立体異性体及び／又は幾何学的形で存在することができる。本発明は、それらの類似体の個々の立体異性体及び幾何異性体、及びそれらの混合物のすべての使用を意図する。本請求項に使用される用語は、それらの形が適切な機能的活性（必ずしも同じ程度ではないが）を保持する限り、それらの形を包含する。

【０１２０】
本発明はまた、本発明の類似体又は医薬的に許容できるその塩のすべての適切な同位体変形を包含する。同位体変形は、少なくとも１つの原子が、同じ原子番号を有するが、しかし通常自然界に見られる原子質量とは異なる原子質量を有する原子により置換されたものとして定義される。剤及びその医薬的に許容できる塩中に組込まれ得る同位体の例は、水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、弗素及び塩素の同位体、例えば^{2}Ｈ、^{3}Ｈ、^{13}Ｃ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{17}Ｏ、^{18}Ｏ、^{31}Ｐ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{18}Ｆ及び^{36}Ｃｌを包含する。特定の同位体変形、例えば放射性同位体、例えば^{3}Ｈ又は^{14}Ｃが組込まれているそれらは、薬剤及び／又は基質組織分布研究において有用である。トリチウム化された、すなわち^{3}Ｈ、及び炭素－１４、すなわち^{14}Ｃ同位体が、調製及び検出の容易さのために、特に好ましい。さらに、同位体による置換、例えば重水素、すなわち^{2}Ｈは、より高い代謝安定性に起因する特定の治療上の利点、例えば高められたインビボ半減期又は低められた必要用量を提供することができ、そして従って、いくつかの状況において好ましい。本発明の類似体及びその医薬的に許容できる塩の同位体変形は一般的に、適切な試薬の適切な同位体変形を用いて、従来の手順により調製され得る。

【０１２１】
溶媒和物
本発明はまた、本発明の類似体の溶媒和物形も包含する。本明細書に使用される用語は、それらの形を包含する。

【０１２２】
多形体
本発明はさらに、それらの種々の結晶形、多形体及び含水（無水）形での本発明の類似

体に関する。化合物が、そのような化合物の合成調製に使用される溶媒からの精製及び／又は単離方法をわずかに変更することにより、そのような形のいずれかで単離され得ることは、医薬業界内で十分に確立されている。

【０１２３】

プロドラッグ

本発明はさらに、プロドラッグ形での本発明の類似体を包含する。そのようなプロドラッグは、一般的に、本発明の類似体であり、ここで１又は２以上の適切な基が修飾されており、結果的に、この修飾が、ヒト又は哺乳類対象への投与に基いて復帰され得る。そのような復帰は通常、インビボで復帰を実施するために、第２の剤がそのようなプロドラッグと共に投与され得るが、そのような対象に天然において存在する酵素により実施される。そのような修飾の例は、エステル（例えば、上記に記載されるそれらの何れか）を包含し、ここで復帰はエステラーゼ、等により行われ得る。他のそのようなシステムは、当業者に良く知られている。

【０１２４】

投与

本発明の医薬組成物は、経口、直腸、膣内、非経口、筋肉内、腹腔内、動脈内、髄腔内、気管支内、皮下、皮内、静脈内、鼻腔、口腔又は舌下投与経路に適合され得る。

【０１２５】

経口投与のためには、圧縮錠剤は、用量当たり１～２５０ｍｇ及びより好ましくは、１０～１００ｍｇの活性成分を含む。

【０１２６】

他の投与形は、静脈内、動脈内、髄腔内、皮下、皮内、腹腔内又は筋肉内注入され得、そして無菌又は滅菌可能な溶液から調製される溶液又はエマルジョンを含む。本発明の医薬組成物はまた、坐剤、ペッサリー、懸濁液、エマルション、ローション、軟膏、クリーム、ゲル、スプレー、溶液又は散布剤の形ででも存在することができる。

【０１２７】

経皮投与の他の手段は、皮膚パッチの使用によるものである。例えば、活性成分は、ポリエチレンクリコール又は液体パラフィンの水性エマルジョンから成るクリーム中に導入され得る。活性成分はまた、必要とされるような安定剤及び保存剤と一緒に、白蝋又は白色軟パラフィンから成る軟膏中に、１～１０重量％の濃度で組込まれ得る。

【０１２８】

注入可能形は、用量当たり、１０～１０００ｍｇ、好ましくは１～２５０ｍｇの活性成分を含むことができる。

【０１２９】

組成物は、単位剤形で、すなわち単位用量、又は単位用量の複数又はサブユニットを含む別々の部分の形で製剤化され得る。

【０１３０】

投与量

当業者は、過度の実験なしに、対象に投与する本発明の組成物の１つの適切な用量を容易に決定することができる。典型的には、医師は、個々の患者に最も適した実際の投与量を決定し、そしてそれは、使用される特定の化合物の活性、その化合物の代謝安定性及び作用の長さ、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与の様式及び時間、排泄速度、薬剤の組合せ、特定状態の重症度及び治療を受ける個人を包含する種々の要因に存在するであろう。本明細書に開示される投与量は、平均的な場合の例である。もちろん、より高いか又は低い投与量範囲が有益であり、そしてそれは本発明の範囲内である個々の事例が存在する。

【０１３１】

必要に応じて、剤は、０．０１～３０ｍｇ／ｋｇ体重、例えば０．１～１０ｍｇ／ｋｇ、より好まくは０．１～１ｍｇ／ｋｇ体重の用量で投与され得る。

【０１３２】

典型的な実施形態によれば、１日当たり１０～１５０ｍｇの１又は２以上の用量が、患者に投与されるであろう。

【０１３３】

治療的使用

本発明の別の側面は、薬剤として使用のための上記単鎖インスリン類似体に関する。

【０１３４】

本発明の別の側面は、糖尿病の治療又は予防、又は高血糖症の治療又は予防への使用のための上記単鎖インスリン類似体に関する。

【０１３５】

本発明の別の側面は、糖尿病の治療又は予防、又は高血糖症の治療又は予防への使用のための薬剤の調製への上記単鎖インスリン類似体の使用にも関する。

【０１３６】

本明細書において使用される場合、用語「薬物の調製（preparation of a medicament）」とは、さらなる治療剤のためのスクリーニングプログラム、又はそのような薬剤の製造の何れかの階段へのその使用の他に、薬剤としての本発明の類似体の直接的使用を包含する。

【０１３７】

本発明の別の側面は、治療的有効量の上記単鎖インスリン類似体の投与を包含する、その必要な対象における糖尿病を治療し、又は高血糖症を治療し、又は予防するための方法に関する。

【０１３８】

本発明はさらに、次の非制限的例により記載される。

【実施例】

【０１３９】

略語

Boc	ｔ－ブチルオキシカルボニル
CTC	塩化クロロトリチル
NMP	Ｎ－メチルピロリドン
DCM	ジクロロメタン
TFA	トリフルオロ酢酸
RE	回転蒸発器
DEE	ジエチルエーテル
DIC	Ｎ、Ｎ'－ジイソプロピルカルボジイミド
HOBt	ヒドロキシベンゾトリアゾール
HOSu	Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド
DMF	ジメチルホルムアミド
EDAC	１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド
RT	室温
DTT	ジチオスレイトール
DMSO	ジメチルスルホキシド
MMT	モノメトキシトリチル
Trt	トリチル
DIPEA	Ｎ、Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン
Fmoc	フルオレニルメチルオキシカルボニル
MeOH	メタノール
AcOH	酢酸
TFE	トリフルオロエチルアルコール
Dde	Ｎ－（１ － （４，４－ジメチル‐２,６－ジオキソ シクロヘキシリデン）エチル）

【０１４０】

実施例１

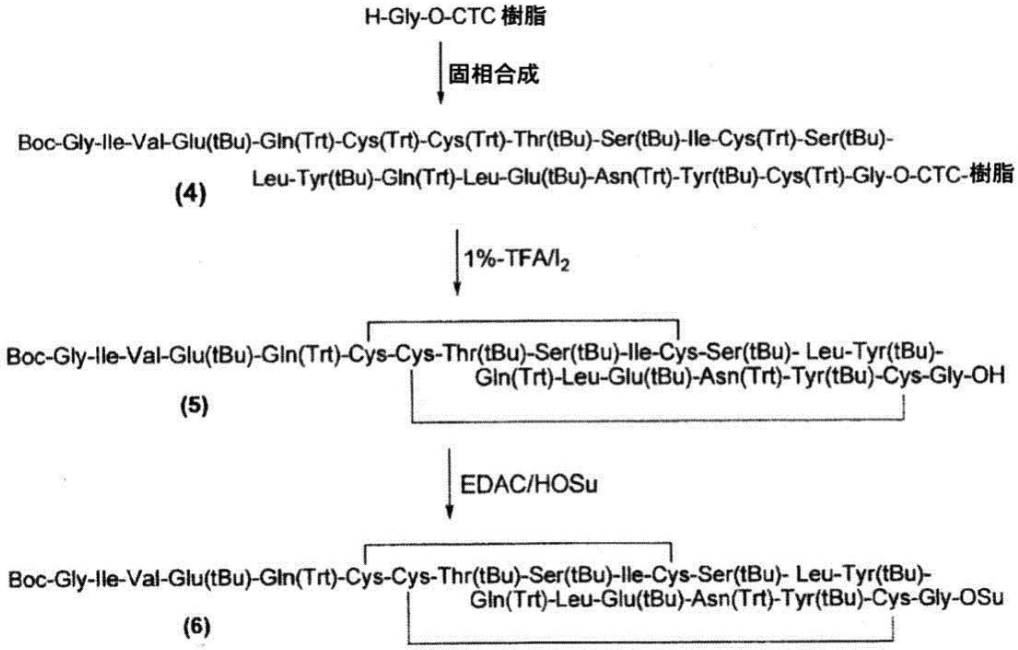
構造１０の単鎖インスリンの合成

（Ａ）構造６の部分的に保護された及びカルボキシル基活性化されたインスリンＧｌｙ（Ａ２１）－鎖の合成

３．０ｇ（１．０ｍモル）のＨ－Ｇｌｙ－Ｏ－ＣＴＣ樹脂（市販のＣＢＬ－Patrasの製品）を、アミノ酸の活性化のためにＦｍｏｃ－アミノ酸（ＣＢＬ－Patrasの製品）及びＤＩＣ／ＨＯＢｔを用いて、樹脂－結合の保護されたＧｌｙ（Ａ２１）－鎖に伸長し、但しＢｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨを用いて導入されたＧｌｙ（Ａ１）樹脂を除く。次に、樹脂をＮＭＰにより４度、ＤＣＭにより６度、洗浄し、そして次に、保護されたペプチドを樹脂から切断し、そして２０．０ｍモルのヨウ素を含むＤＣＭ中、１％－ＴＦＡにより８度、洗浄することにより、同時に酸化した。１％ＴＦＡ洗浄液からの濾液を、３％$Na_2S_2O_3$溶液中に滴下し、ＤＣＭ層を$Na_2S_2O_3$溶液及び水により洗浄し、ＲＥにおいて濃縮し、そして次に、保護されたペプチドをＤＥＥの添加により沈殿し、ＤＥＥにより洗浄し、そして真空下で一定の重量に乾燥した。収量＝３．０４ｇ（９０．０％）。

【０１４１】

【化１５】



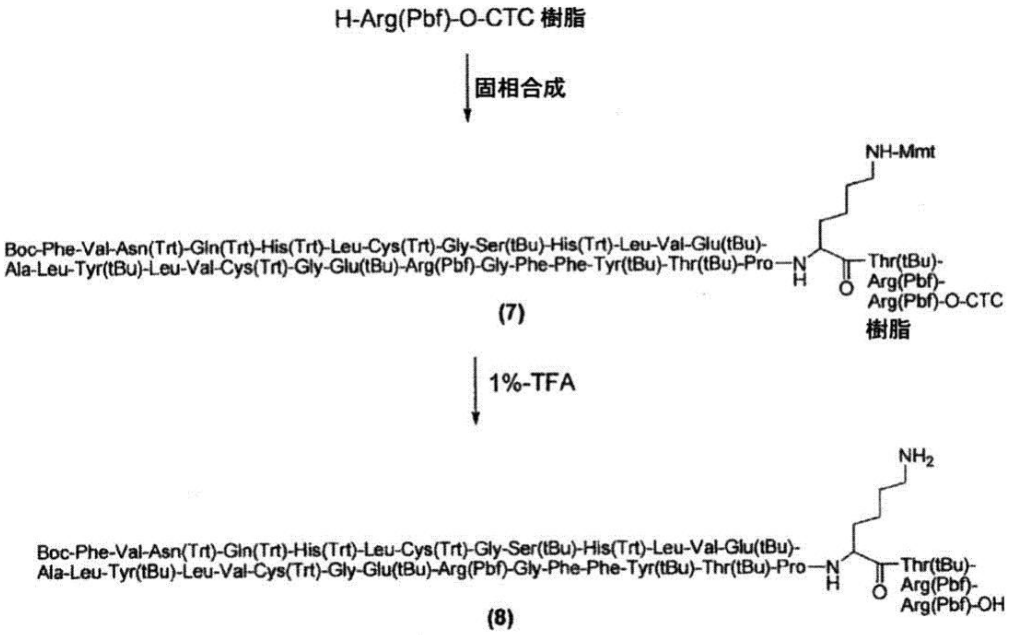
【０１４２】

（Ｂ）構造８のLys^{29}で選択的に脱保護されたＢ（Ａｒｇ３１）、Ｂ（Ａｒｇ３２）ヒトインスリンＢ鎖での固相合成

４．０ｇ（１．０ｍモル）のＨ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－Ｏ－ＣＴＣ樹脂（市販のＣＢＬ－Patrasの製品）を、アミノ酸の活性化のためにＦｍｏｃ－アミノ酸及びＤＩＣ／ＨＯＢｔを用いて、樹脂－結合の保護されたＡｒｇ（Ｂ３１）、Ａｒｇ（Ｂ３２）－鎖に伸長し、但しＢｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨを用いて導入されたＰｈｅ（Ｂ１）樹脂を除く。次に、樹脂をＮＭＰにより４度、ＤＣＭにより６度、洗浄し、そして次に、保護されたペプチドを樹脂から、ＤＣＭ中、１％－ＴＦＥによる８度の洗浄により切断した。１％ＴＦＡ洗浄液からの濾液を、１％－ピリジンの水溶液中に滴下し、ＤＣＭ層を水により洗浄し、ＲＥにおいて濃縮し、そして次に、保護されたペプチドをＤＥＥの添加により沈殿し、ＤＥＥにより洗浄し、そして真空下で一定の重量に乾燥した。収量＝５．６１ｇ（９０．２％）。

【０１４３】

【化１６】



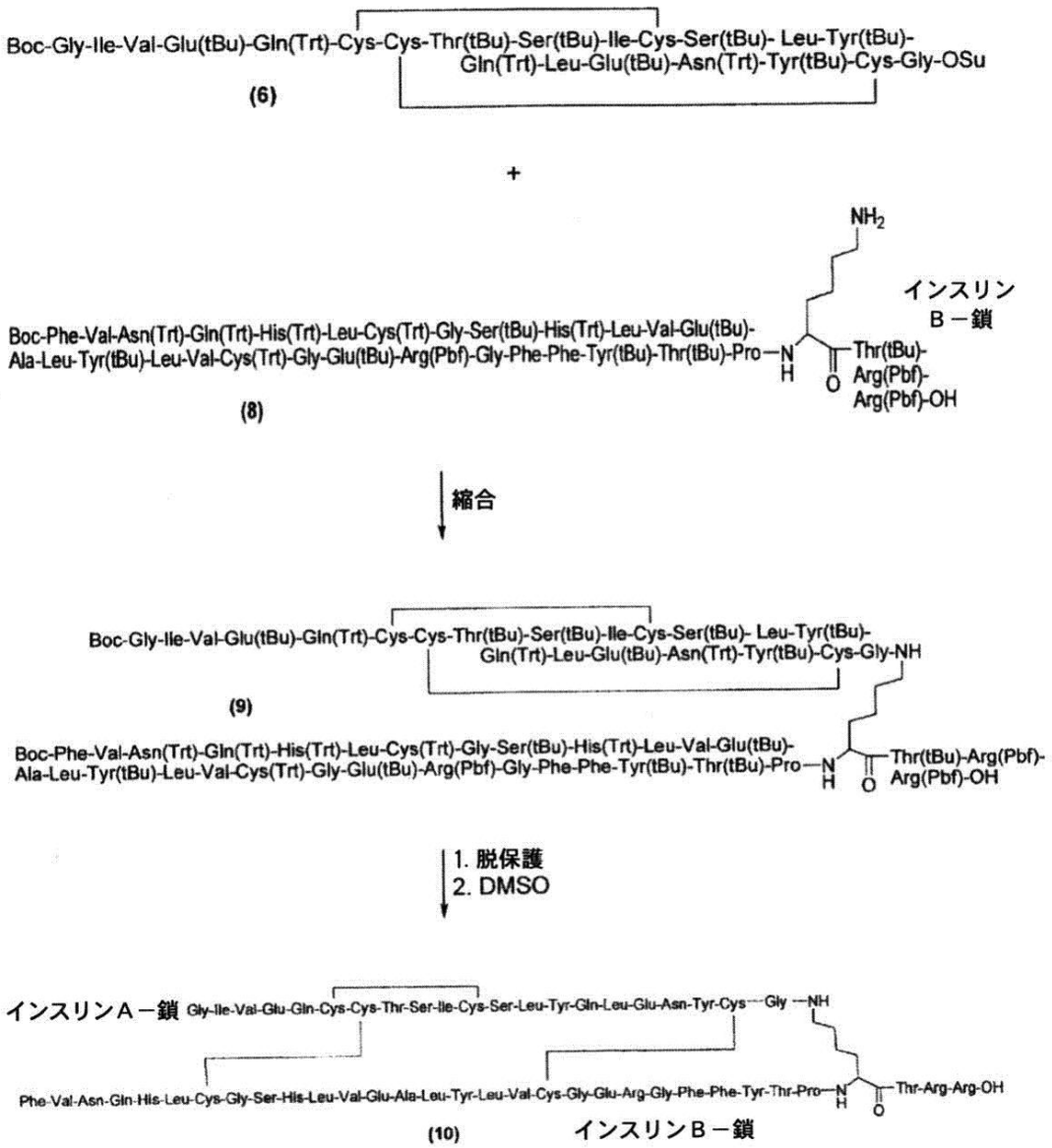
【０１４４】

（Ｃ）溶液中での縮合－単鎖インスリンＮｒ．１０の合成

１０．０ｍｌのＤＭＦ中、４２７．１ｍｇ（０．１ｍモル）の保護されたＡ鎖Ｎｒ．６の溶液に、０．１２ｇ（０．１ｍモル）のＨＯＳｕ及び０．１７ｇ（０．１ｍモル）のＥＤＡＣを添加し、そしてその混合物をＲＴで２０分間、攪拌した。次に、６２１．９（０．１ｍモル）のＢ鎖で選択的に脱保護されたインスリンＢ鎖Ｎｒ．８を添加し、そして得られる混合物を、ＲＴでさらに６時間、攪拌した。次に、得られる溶液を、１００ｍｌの氷冷却水に滴下し、そして得られる固形物を濾過し、水により洗浄し、そして真空下で乾燥した。次に、固形物を、３０ｍｌの０℃で予備冷却されたＴＦＡ／ＤＴＴ／水（９４；３：３）の混合物に溶解し、そして１時間、攪拌し、そして次に、その混合物をＲＴに暖め、そしてＲＴでさらに３時間、攪拌した。次に、その混合物を、ＲＥ上で真空下で約５ｍｌに濃縮し、そして１００ｍｌの氷冷却ＤＥＥを添加した。沈殿された固形物を濾過し、そしてＤＥＥにより洗浄し、そして真空下で一定重量に乾燥した。次に、粗リンスリンを、ｐＨ＝７．８でのNa_2HPO_4溶液中、２０％ＤＭＳＯに溶解し、そしてＲＴでさらに４８時間、攪拌した。次に、得られる溶液を、酸性化し、そしてＣ１８　Ｃｈｒｏｍａｓｉｌカラムに負荷し、そしてＨＰＬＣにより精製した。主生成物を含んだ画分を集め、そして凍結乾燥した。収量：６２．３ｍｇの純ペプチド（１０．７％）。

【０１４５】

【化１７】



【０１４６】

実施例２

構造１５を有する単鎖インスリンの合成

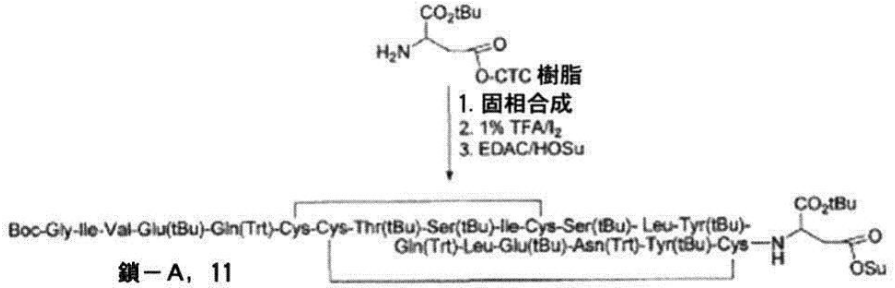
（Ａ）構造１１の保護され、カルボキシル基活性化され、そして酸化されたＡｓｐ^{21}インスリンＡ鎖の合成

４．０ｇ（１．０ｍモル）のＨ－Ａｓｐ（ＣＴＣ樹脂）－Ｏ^{t}Ｂｕ（市販のＣＢＬ－Patrasの製品）を、アミノ酸の活性化のためにＦｍｏｃ－アミノ酸（ＣＢＬ－Patrasの製品）及びＤＩＣ／ＨＯＢｔを用いて、樹脂－結合の保護されたＡｓｐ（Ａ２１）－鎖に伸長し、但しＢｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨを用いて導入されたＧｌｙ（Ａ１）樹脂を除く。次に、樹脂をＮＭＰにより４度、ＤＣＭにより６度、洗浄し、そして次に、保護されたペプチドを樹脂から切断し、そして２０．０ｍモルのヨウ素を含むＤＣＭ中、１％－ＴＦＡにより８度、洗浄することにより、同時に酸化した。１％ＴＦＡ洗浄液からの濾液を、３％$Na_2S_2O_3$溶液中に滴下し、ＤＣＭ層を$Na_2S_2O_3$溶液及び水により洗浄し、ＲＥ下で濃縮し、そして次に、保護されたペプチドをＤＥＥの添加により沈殿し、ＤＥＥにより洗

浄し、そして真空下で一定の重量に乾燥した。収量＝２．９７ｇ（８７．５％）。

【０１４７】

【化１８】



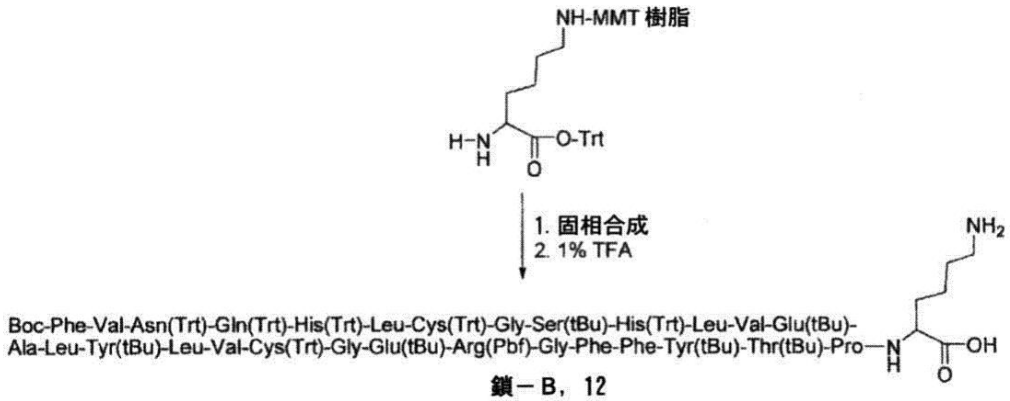
【０１４８】

（Ｂ）構造１２のＬｙｓ[29]で選択的に側鎖脱保護されたｄｅｓ－Ｔｈｒ[30]ヒトインスリンの合成

３．２ｇ（１．０ｍモル）のＨ－Ｌｙｓ（ＭＭＴ樹脂）－ＯＴｒｔ（ＤＣＭ中でのＦｍｏｃ－Ｌｙｓ－ＯＨと、ＭＭｔ－塩化物樹脂及びＤＩＰＥＡとの反応、Ｔｒｔ－塩化物により得られた樹脂結合Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ－ＯＨの続くエステル化により生成された）を、アミノ酸の活性化のためにＦｍｏｃ－アミノ酸（Patrasの製品）及びＤＩＣ／ＨＯＢｔを用いて、樹脂－結合の保護されたｄｅｓＴｈｒ（Ｂ３０）ヒトインスリンＢ－鎖に伸長し、但しＢｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨを用いて導入されたＰｈｅ（Ｂ１）樹脂を除く。次に、樹脂をＮＭＰにより４度、ＤＣＭにより６度、洗浄し、そして次に、保護されたペプチドを樹脂から、ＤＣＭ中、１％－ＴＦＥによる８度の洗浄により切断した。１％ＴＦＡ洗浄液からの濾液を、１％－ピリジンの水溶液中に滴下し、ＤＣＭ層を水により洗浄し、ＲＥにおいて濃縮し、そして次に、保護されたペプチドをＤＥＥの添加により沈殿し、ＤＥＥにより洗浄し、そして真空下で一定の重量に乾燥した。収量＝４．９３ｇ（９４．１％）。

【０１４９】

【化１９】



【０１５０】

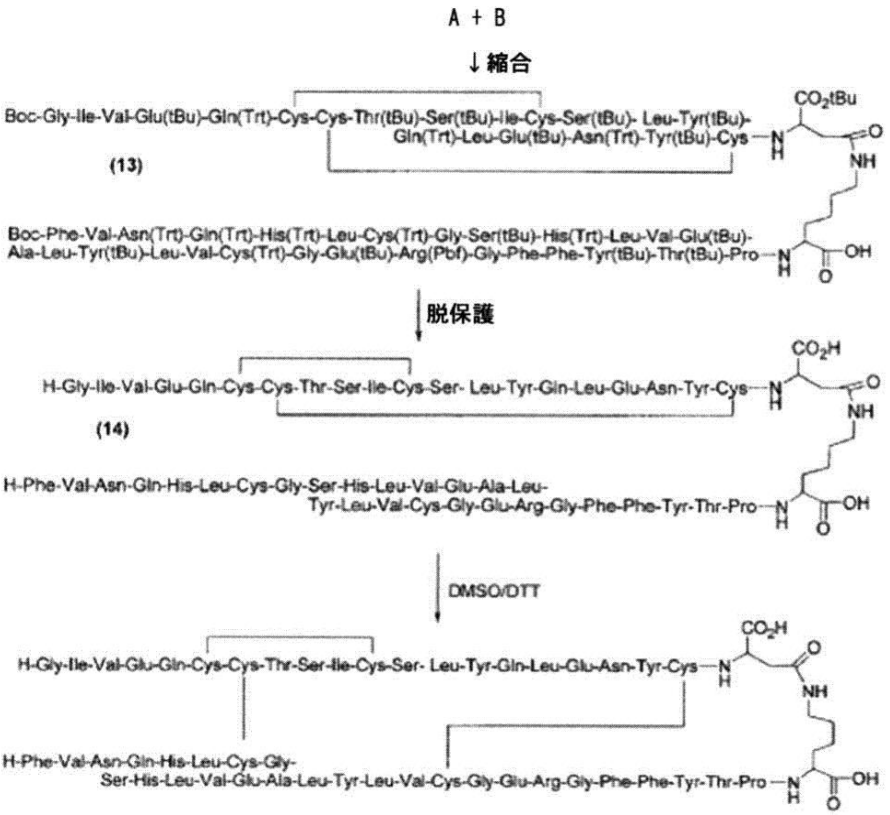
（Ｃ）溶液化での部分的に保護されたインスリン鎖Ａ及びＢの縮合

１０．０ｍｌのＤＭＦ中、３３９．６ｍｇ（０．１ｍモル）の保護されたＡ鎖Ｎｒ．１１の溶液に、０．１２ｇ（０．１ｍモル）のＨＯＳｕ及び０．１７ｇ（０．１ｍモル）のＥＤＡＣを添加し、そしてその混合物をＲＴで２０分間、攪拌した。次に、５２４．５（

０．１ｍモル）のＢ鎖で選択的に脱保護されたインスリンＢ鎖Ｎｒ．１２を添加し、そして得られる混合物を、ＲＴでさらに６時間、攪拌した。次に、得られる溶液を、１００ｍｌの氷冷却水に滴下し、そして得られる固形物を濾過し、水により洗浄し、そして真空下で乾燥した。次に、固形物を、３０ｍｌの０℃で予備冷却されたＴＦＡ／ＤＴＴ／水（９４；３：３）の混合物に溶解し、そして１時間、攪拌し、そして次に、その混合物をＲＴに暖め、そしてＲＴでさらに３時間、攪拌した。次に、その混合物を、ＲＥ上で真空下で約５ｍｌに濃縮し、そして１００ｍｌの氷冷却ＤＥＥを添加した。沈殿された固形物を濾過し、そしてＤＥＥにより洗浄し、そして真空下で一定重量に乾燥した。次に、粗リンスリンを、ｐＨ＝７．８でのNa_2HPO_4溶液中、２０％ＤＭＳＯに溶解し、そしてＲＴでさらに４８時間、攪拌した。次に、得られる溶液を、酸性化し、そしてＣ１８　Ｃｈｒｏｍａｓｉｌカラムに負荷し、そしてＨＰＬＣにより精製した。主生成物を含んだ画分を集め、そして凍結乾燥した。収量：７８．９ｍｇの純ペプチド（１４．５％）。

【０１５１】

【化２０】



【０１５２】

実施例３

構造１９を有する単鎖リンスリンの合成

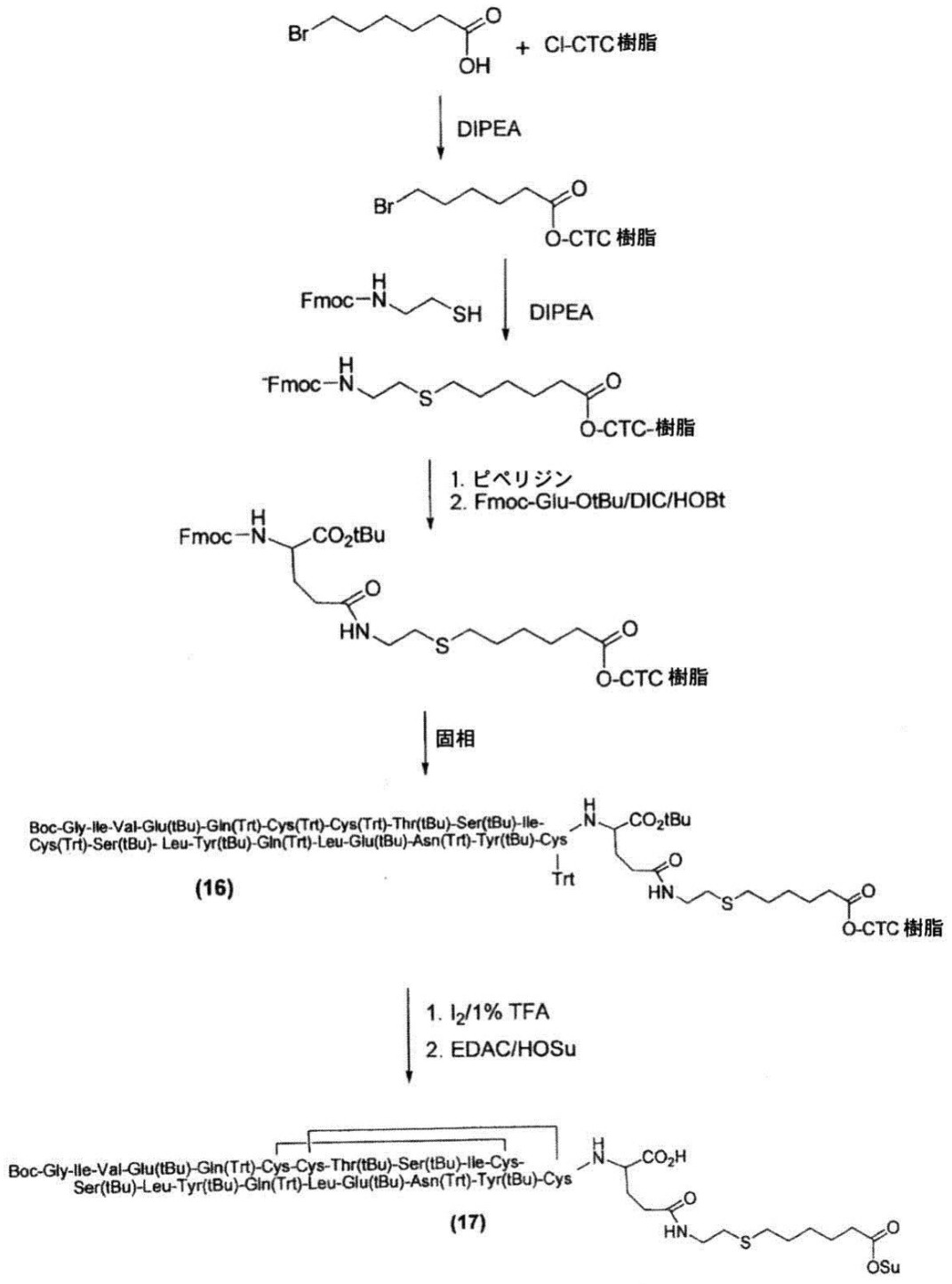
（Ａ）構造１７を有する保護インスリン鎖Ａの合成

Ｆｍｏｃ－システアミン及び６－ブロモヘキサンから、当業界において良く知られている手順により得られた６－Ｆｍｏｃ－アミノ（エチルチオ）ヘキサン酸４．１３ｇ（１０．０ｍモル）を、２００ｍｌのＤＣＭに溶解し、そして次に２０．０ｇ（１．６ｍモル／ｇ）のＣＴＣ－塩化物樹脂及び７．７５ｇ（６０ｍモル）のＤＩＰＥＡを添加し、そしてその混合物をＲＴで２時間、振盪した。次に、１０．０ｍｌのＭｅＯＨを添加し、そしてその混合物を、さらに１時間、振盪した。樹脂を濾過し、そしてＤＣＭ／ＤＩＰＥＡ／ＭｅＯＨにより３度、ＤＣＭにより６度、洗浄した。次に得られる樹脂結合アミノ酸を、その樹脂結合の保護ペプチド１６へのＦｍｏｃ－アミノ酸及びそれらの活性化のためのＤＩ

Ｃ／ＨＯＢｔの連続的カップリングにより伸長した。次に、樹脂１６を、ＮＭＰにより４度及びＤＣＭにより６度、洗浄し、そして保護ペプチドを、樹脂から切断し、そして２００．０ｍモルのヨウ素を含むＤＣＭ中、１％－ＴＦＡにより８度、洗浄することにより、同時に酸化した。１％ＴＦＡ洗浄液からの濾過を、１％－ピリジンの水溶液中に滴下し、ＤＣＭ層を水により洗浄し、ＲＥ下で濃縮し、そして次に、保護ペプチドを、ＤＥＥの添加により濾過し、ＤＥＥにより洗浄し、そして真空下で一定重量に乾燥した。収量＝３４．７ｇ（９０．８％）

【０１５３】

【化２１】



【０１５４】

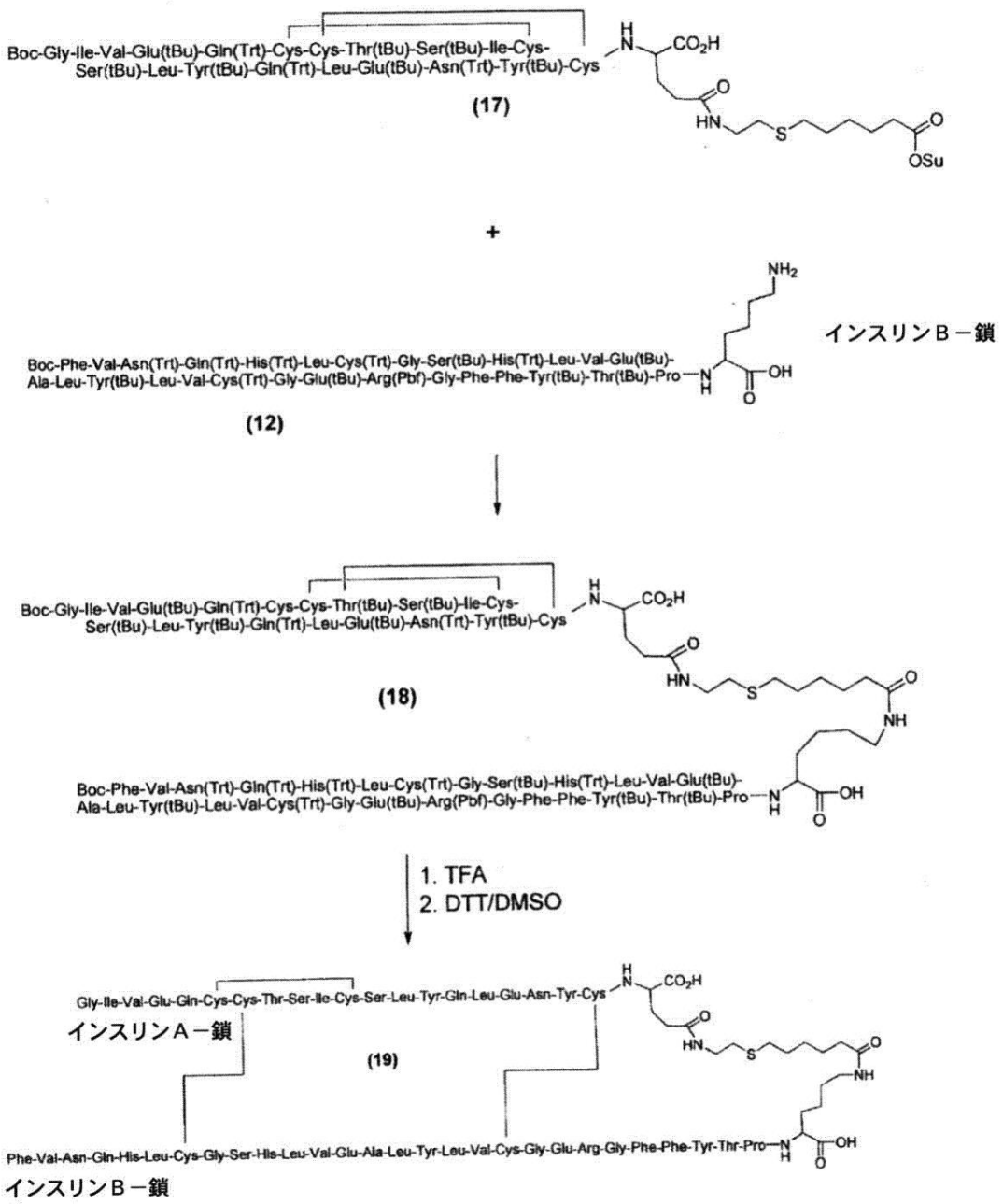
（Ｂ）構造１２のｄｅｓ Ｔｈｒ（Ｂ３０）インスリンの部分的に保護された鎖Ｂと、構造１７の部分的に保護され、そして修飾されたインスリン鎖Ａとの溶液における縮合

１０．０ｍｌのＤＭＦ中、３８２．３ｍｇ（０．１ｍモル）の保護されたＡ鎖Ｎｒ．１７の溶液に、０．１２ｇ（０．１ｍモル）のＨＯＳｕ及び０．１７ｇ（０．１ｍモル）のＥＤＡＣを添加し、そしてその混合物をＲＴで２０分間、撹拌した。次に、５２４．５（０．１ｍモル）のＬｙｓ（Ｂ２９）の側鎖で選択的に脱保護されたｄｅｓ（Ｂ３０）イン

スリンＢ鎖Ｎｒ．１２を添加し、そして得られる混合物を、ＲＴでさらに６時間、攪拌した。次に、得られる溶液を、１００ｍｌの氷冷却水に滴下し、そして得られる固形物を濾過し、水により洗浄し、そして真空下で乾燥した。次に、固形物を、３０ｍｌの０℃で予備冷却されたＴＦＡ／ＤＴＴ／水（９４；３：３）の混合物に溶解し、そして１時間、攪拌し、そして次に、その混合物をＲＴに暖め、そしてＲＴでさらに３時間、攪拌した。次に、その混合物を、ＲＥ上で真空下で約５ｍｌに濃縮し、そして１００ｍｌの氷冷却ＤＥＥを添加した。沈殿された固形物を濾過し、そしてＤＥＥにより洗浄し、そして真空下で一定重量に乾燥した。次に、粗リンスリンを、ｐＨ＝７．８でのNa_2HPO_4溶液中、２０％ＤＭＳＯに溶解し、そしてＲＴでさらに４８時間、攪拌した。次に、得られる溶液を、酸性化し、そしてＣ１８　Ｃｈｒｏｍａｓｉｌカラムに負荷し、そしてＨＰＬＣにより精製した。主生成物を含んだ画分を集め、そして凍結乾燥した。収量：１２７．４ｍｇの純ペプチド（２２．８％）。

【０１５５】

【化２２】



【０１５６】

実施例４

構造２３の単鎖インスリンの合成

インスリン鎖がＧｌｕ（Ａ２１）及びＬｙｓ（Ｂ２９）の側鎖及びオリゴエチレングリコールモディファイアを通して連結されている、側鎖インスリンＧｌｕ（Ａ２１）、ｄｅｓ　Ｔｈｒ（Ｂ３０）の固相合成

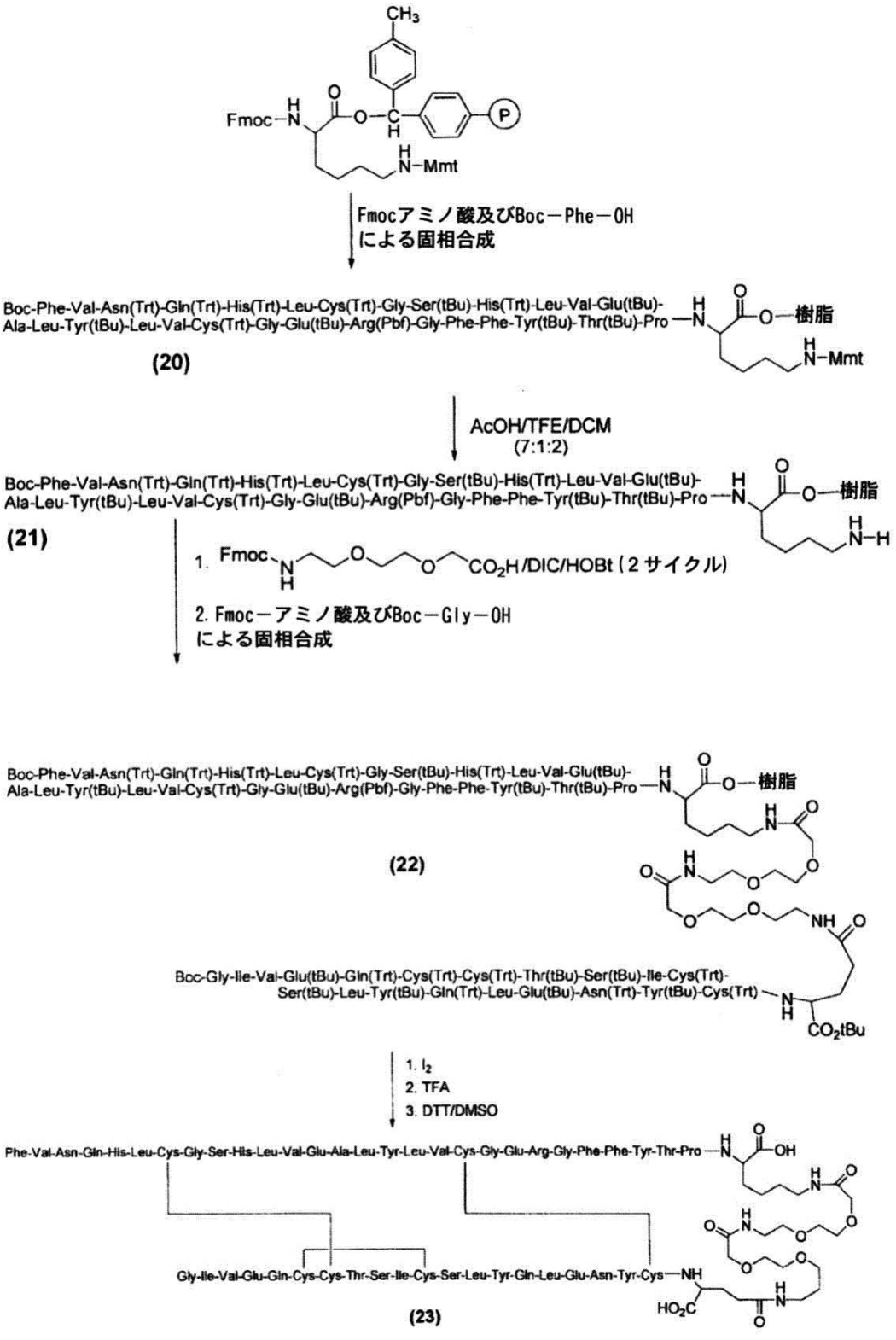
【０１５７】

合成を、４－メチル－ベンズヒドリル（ジフェニルメチル）樹脂上でのＢ鎖の固相合成により開始した。合成の完結の後、側鎖Ｌｙｓ（Ｂ２９）Ｍｍｔ機能を、ＲＴで３時間、ＤＣＭ／ＴＦＥ／ＡｃＯＨ（７：２：１）による樹脂の処理により除去し、構造２１の部分的に保護された樹脂結合ペプチドを提供した。次に、Ｌｙｓ側鎖上に、２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）酢酸の２つの基を、その対応するＦｍｏｃ誘導体を用いて

、続いてＦｍｏｃ－Ｇｌｕ－ＯｔＢｕによるカップリングにより導入した。Ｇｌｕ（Ａ２１）のＮａ－官能基上に、Ａ鎖の残りを、Ｆｍｏｃ－アミノ酸を用いてアセンブルした。合成の完結の後、樹脂結合ペプチドを、ジスルフィド結合を構築するために、ＤＣＭ／ＴＦＥ（９：１）中、１％I_2により処理した。次に、樹脂を、ＤＣＭにより洗浄し、そしてＴＦＡ／ＤＴＴ／H_2O（９４：３：３）により０℃で１５分間、処理し、そして濾過した。次に、樹脂をＴＦＡ溶液により３度、洗浄し、そして組合わされた濾液を、０℃で、さらに３時間、放置した。濾液をＲＥ上で濃縮し、そして残る油状物を、氷冷却ＤＥＥに滴下した。沈殿された物質を濾過し、ＤＥＥにより洗浄し、そして真空下で乾燥した。次に、粗リンスリンを、ｐＨ＝７．８でのNa_2HPO_4溶液中、２０％ＤＭＳＯに溶解し、そしてＲＴでさらに４８時間、攪拌した。次に、得られる溶液を、酸性化し、そしてＣ１８　Ｃｈｒｏｍａｓｉｌカラムに負荷し、そしてＨＰＬＣにより精製した。主生成物２３を含んだ画分を集め、そして凍結乾燥した。収量：８２．４ｍｇの純ペプチド（１４．２９％）。

【０１５８】

【化２３】



【０１５９】

実施例５

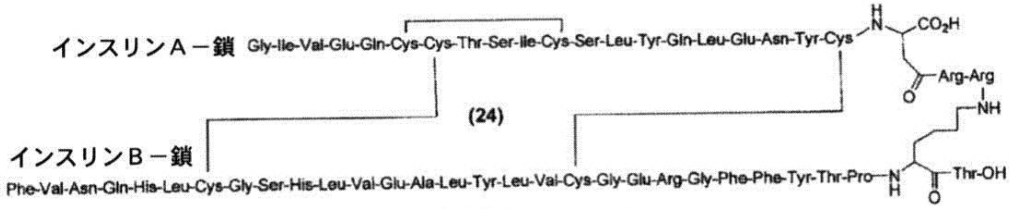
２－クロロトリチル樹脂上での構造２４の単鎖インスリンの合成

合成を、１．００ｍモルのＨ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－Ｏ－ＣＴＣ樹脂から開始し、そして実施例３に記載の通りに実施し、但しＬｙｓ（Ｂ２９）の導入のために、Ｆｍｏｘ－Ｌｙｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨの代わりに、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｄｄｅ）－ＯＨを使用し、そしてＤ

ｄｅの選択的除去を、ＮＭＰ中、２％ヒドラジンにより、通常通りに実施した。収量：９４．３ｍｇ（１５．４％）。

【０１６０】

【化２４】



単一側鎖結合インスリン

【０１６１】

本発明の記載される側面の種々の修飾及び変更は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明は特定の好ましい実施形態に関して記載されて来たが、請求される本発明は不当にそのような特定の実施形態に限定されるべきではないことが理解されるべきである。実際、関連分野の当業者に明らかである本発明を実施するための記載される様式の種々の修飾は、以下の請求の範囲内にあることが意図される。

【配列表】

0006798883000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(74)代理人 100134784
弁理士 中村 和美
(72)発明者 クレオメニス バルロス
ギリシャ国, パトラ ２６０００, スクエア １, インダストリアル エリア オブ パトラ, シー／オー ケミカル アンド バイオファーマシューティカル ラボラトリーズ オブ パトラ エス. エー.
(72)発明者 ディミトリオス ガトス
ギリシャ国, パトラ ２６０００, スクエア １, インダストリアル エリア オブ パトラ, シー／オー ケミカル アンド バイオファーマシューティカル ラボラトリーズ オブ パトラ エス. エー.
(72)発明者 コスタス バルロス
ギリシャ国, パトラ ２６０００, スクエア １, インダストリアル エリア オブ パトラ, シー／オー ケミカル アンド バイオファーマシューティカル ラボラトリーズ オブ パトラ エス. エー.
(72)発明者 ミハイル ジオバス
ギリシャ国, パトラ ２６０００, スクエア １, インダストリアル エリア オブ パトラ, シー／オー ケミカル アンド バイオファーマシューティカル ラボラトリーズ オブ パトラ エス. エー.

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第２０１１／０３１６６２（WO, A1）
特表２００８－５０２３１３（ＪＰ, A）
特表２０１０－５３５８５１（ＪＰ, A）
特表２０１３－５３３８６４（ＪＰ, A）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １４／６２
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）