(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5508438号
(P5508438)
(45)発行日　平成26年5月28日(2014.5.28)　(24)登録日　平成26年3月28日(2014.3.28)

(51)Int.Cl.　F I
A61K 38/28 (2006.01)　A61K 37/26
A61K 47/48 (2006.01)　A61K 47/48
A61P 3/10 (2006.01)　A61P 3/10

請求項の数 25　(全 192 頁)

(21)出願番号　特願2011-548259 (P2011-548259)
(86)(22)出願日　平成22年1月27日 (2010.1.27)
(65)公表番号　特表2012-516341 (P2012-516341A)
(43)公表日　平成24年7月19日 (2012.7.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/022268
(87)国際公開番号　WO2010/088294
(87)国際公開日　平成22年8月5日 (2010.8.5)
審査請求日　平成24年7月24日 (2012.7.24)
(31)優先権主張番号　61/163,084
(32)優先日　平成21年3月25日 (2009.3.25)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/252,857
(32)優先日　平成21年10月19日 (2009.10.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)

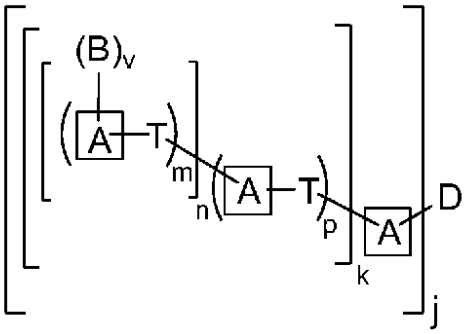
(73)特許権者　511181289
スマートセルズ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・０１９１５、ベバリー、スーツ・４１９・イー、カミングス・センター・１００
(74)代理人　100146318
弁理士　岩瀬　吉和
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100119253
弁理士　金山　賢教
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉　道明
(74)代理人　100129713
弁理士　重森　一輝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】制御された薬物送達のための複合体に基づくシステム

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
1以上のリガンドが複合体化しているインスリン分子を含む複合体であって、少なくとも１つのリガンドは、第一の糖である分岐三糖又はＬ－フコースを含み、ここで、リガンドは、ポリマー性又は非ポリマー性構造によりインスリンに複合化し、そしてここで、該複合体を外因性多価糖結合分子の非存在下で哺乳類に投与したとき、少なくとも１つの複合体の薬物動態または薬力学的特性が、哺乳類の血清中に存在する第二の糖の血清濃度に対し感受性を示すことを特徴とする、複合体。
【請求項２】
第二の糖がグルコース又はα－メチルマンノースである、請求項１に記載の複合体。
【請求項３】
インスリン分子が、Ａ１アミノ酸残基を介して、Ｂ１アミノ酸残基を介して、又はLys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化している、請求項１に記載の複合体。
【請求項４】
インスリン分子がトランケートされている、請求項１に記載の複合体。
【請求項５】
複合体が、２個以上の別のリガンドを含み、少なくとも一つのリガンドは、分岐三糖又はＬ－フコースである、請求項１に記載の複合体。
【請求項６】
リガンドが、分岐トリマンノース、及びグルコース、マンノースおよびＬ－フコースか

らなる群から選択される糖である、第一の糖を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項７】
分岐三糖が、分岐状トリマンノースである、請求項１に記載の複合体。
【請求項８】
リガンドが、第一の糖およびアミン基を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項９】
第一の糖およびアミン基が、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル基によって分離されている、請求項８に記載の複合体。
【請求項１０】
複合体が、一般式（ＩＩ）：
【化１】



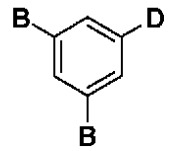
II

を有する、請求項１～９のいずれか一項に記載の複合体。
（式中、
［（Ａ－Ｔ）］は、それぞれ、複合体内のポテンシャル分岐部を示し；
（Ａ－Ｔ）は、それぞれ、複合体の分岐部内のポテンシャル繰返部を示し；
－Ａ－は、それぞれ独立して、共有結合、炭素原子、ヘテロ原子、または場合によっては置換されたアシル、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリールおよび、Ｎ、Ｏ又はＳで置換されていてもよいヘテロ環からなる群から選択される基であり；
Ｔは、それぞれ独立して、共有結合、または２価の、直鎖または分岐状、飽和または不飽和の、場合によっては置換された又は未置換のＣ$_{1-30}$炭化水素鎖であって、ここで、Ｔの１個以上のメチレン単位は、場合により、独立して、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｎ（Ｒ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、－Ｎ（Ｒ）ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$Ｎ（Ｒ）－、複素環基、アリール基またはヘテロアリール基で置き換えられていてもよく；
Ｒは、それぞれ独立して、水素、アミノ保護基もしくはヒドロキシ保護基、またはアシル部分、アリールアルキル部分、脂肪族部分、アリール部分、ヘテロアリール部分、またはヘテロ脂肪族部分であり；
－Ｂは、－Ｔ－Ｌ^B－Ｘであり；
Ｘは、それぞれ独立して、糖を含むリガンドであって、ここで、少なくとも一つのリガンドは、分岐三糖又はＬ－フコースを含み；
Ｌ^{B}は、それぞれ独立して、共有結合、またはＴのＸとの共有複合から誘導される基であり；
－Ｄは－Ｔ－Ｌ^D－Ｗであり；
Ｗは、インスリンであり；
Ｌ^{D}は、共有結合、またはＴのＷとの共有複合から誘導される基であり、これは、アミド、アミン、エステル、エーテル、チオエーテル、イソウレア及びイミンから選択される結合を含んでよく；

ｋは、１～１２の整数であり；
ｊは、１～４の整数であり；
ｐは、それぞれ独立して、１～５の整数であり；
ｎは、それぞれ独立して、０～５の整数であり；
ｍは、それぞれ独立して、１～５の整数であり；および
ｖは、それぞれ独立して、０～５の整数であり、ただし、
各ｋ－分岐部内で、ｎの少なくとも１つが≧１であり、およびｖの少なくとも１つが≧１である。）

【請求項１１】
複合体が、式（ＶＩａ）：

【化２】

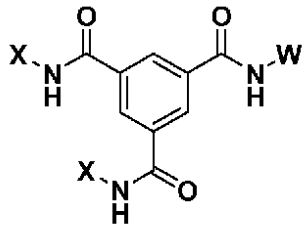


VIa

である、請求項１０に記載の複合体。

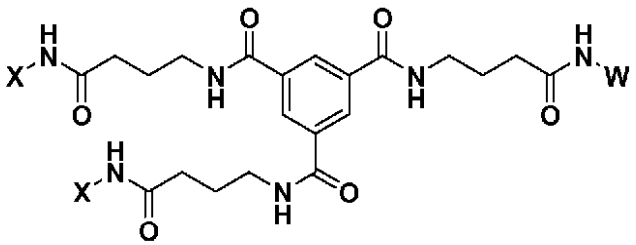
【請求項１２】
複合体が、以下の式（ＶＩａ）：

【化３】



VIa-1

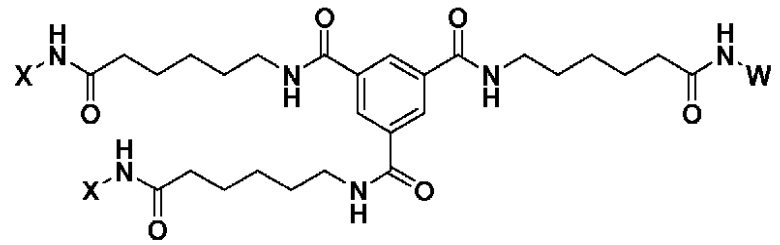
【化４】



VIa-2

または

【化５】



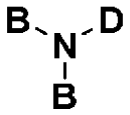
VIa-3

である、請求項１１に記載の複合体。

【請求項１３】

複合体が、式（ＶＩｂ）：

【化６】



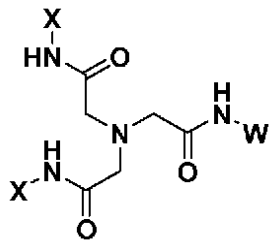
VIb

である、請求項１０に記載の複合体。

【請求項１４】

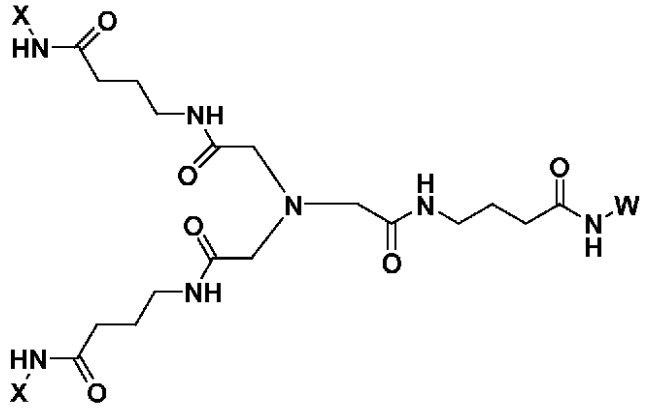
複合体が、以下の式：

【化７】



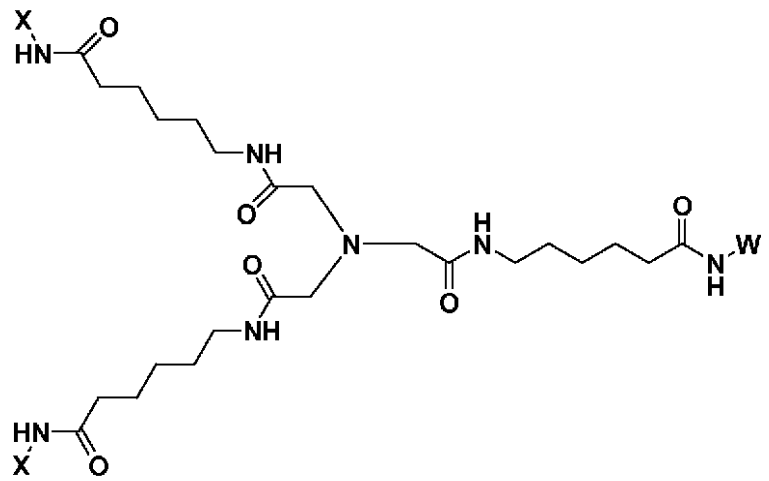
VIb-1

【化８】



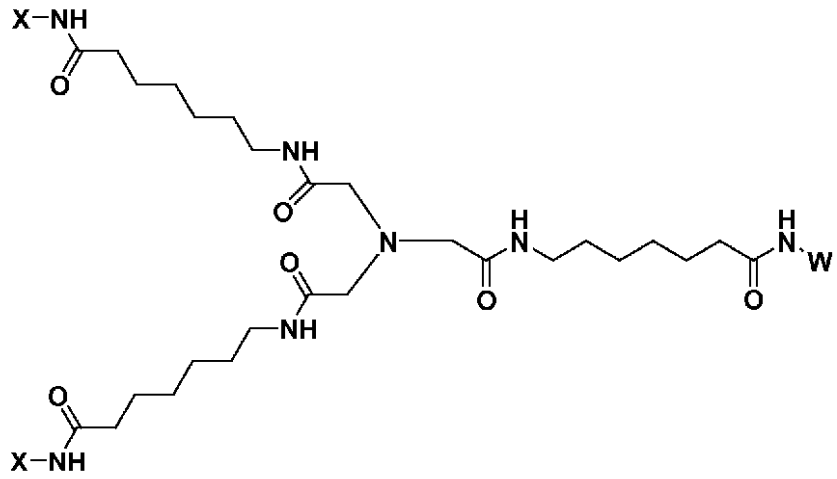
VIb-2

【化９】



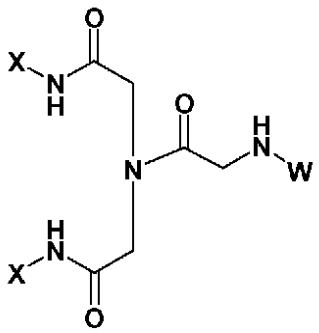
VIb-3

【化１０】



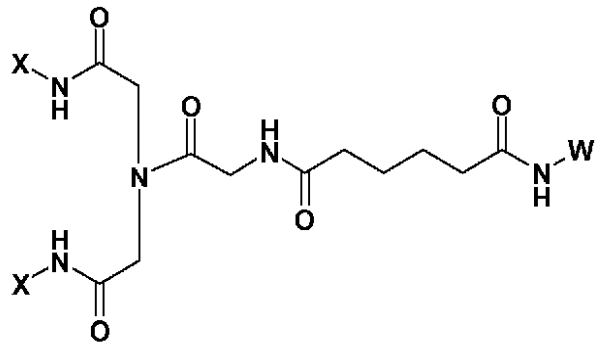
VIb-4

【化１１】



VIb-5

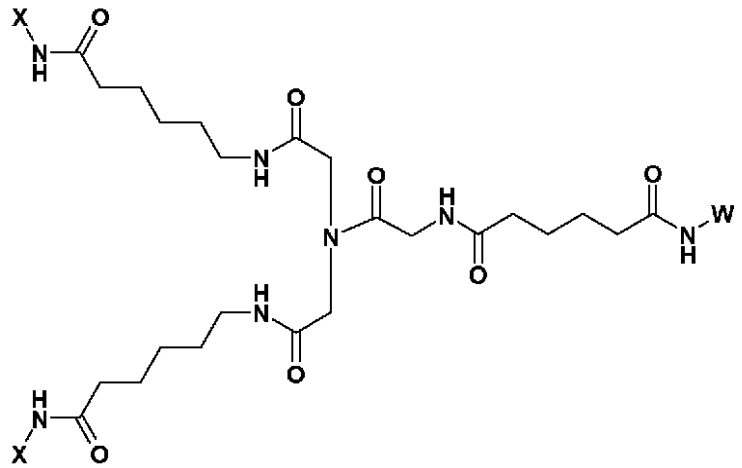
【化１２】



VIb-6

または

【化１３】



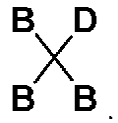
VIb-7

である、請求項１３に記載の複合体。

【請求項１５】

複合体が、式（ＶＩｃ）：

【化１４】



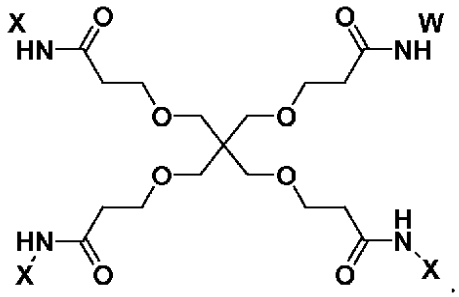
VIc

である、請求項１０に記載の複合体。

【請求項１６】

複合体が、以下の式：

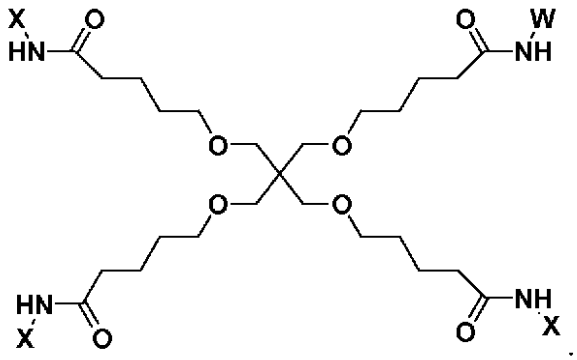
【化１５】



VIc-1

または

【化１６】



VIc-2

である、請求項１５に記載の複合体。

【請求項１７】

請求項１～１６のいずれか一項に記載の複合体を含む徐放性製剤。

【請求項１８】

製剤がプロタミンおよび亜鉛を含む、請求項１７に記載の製剤。

【請求項１９】

請求項１～１６のいずれか一項の複合体を含むポンプ・デリバリー・システムであって、該ポンプ・デリバリー・システムは、前記複合体を哺乳類に注入することにより動くポンプ・デリバリー・システム。

【請求項２０】

高血糖症を治療するための、請求項１７または１８に記載の製剤。

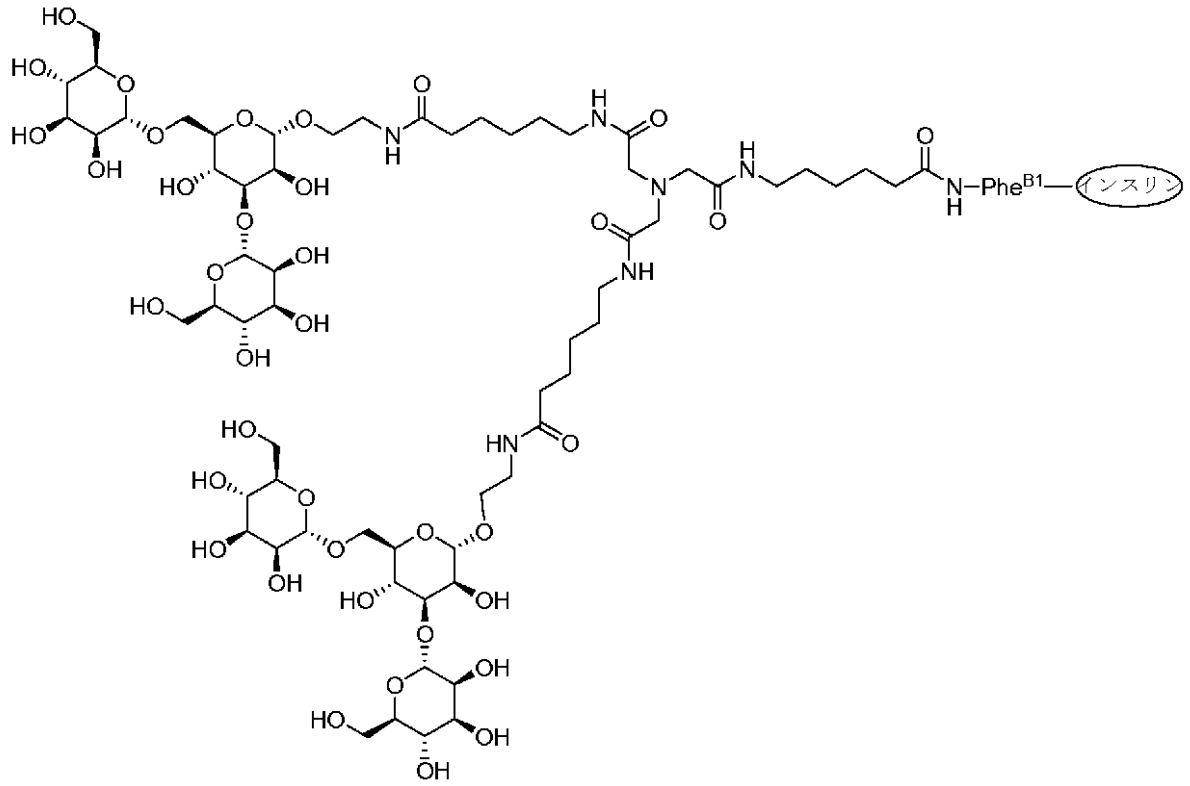
【請求項２１】

糖尿病を治療するための、請求項１～１６のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項２２】

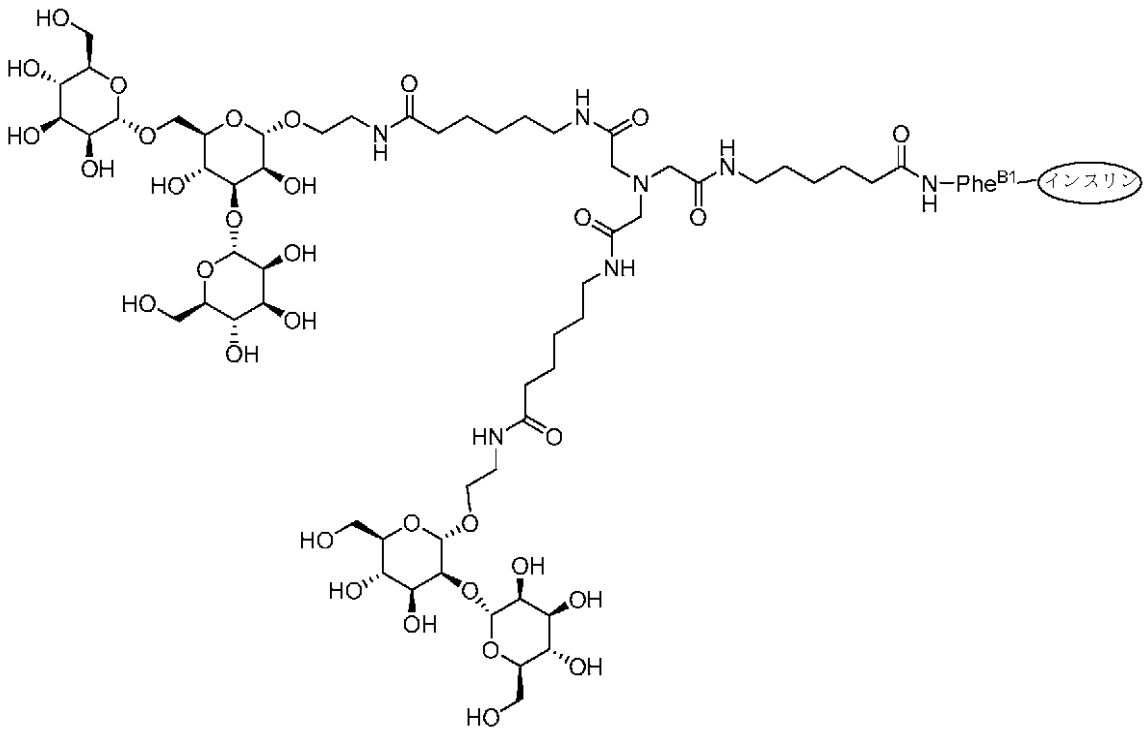
以下よりなる群から選択される式を含む、複合体。

【化１７】



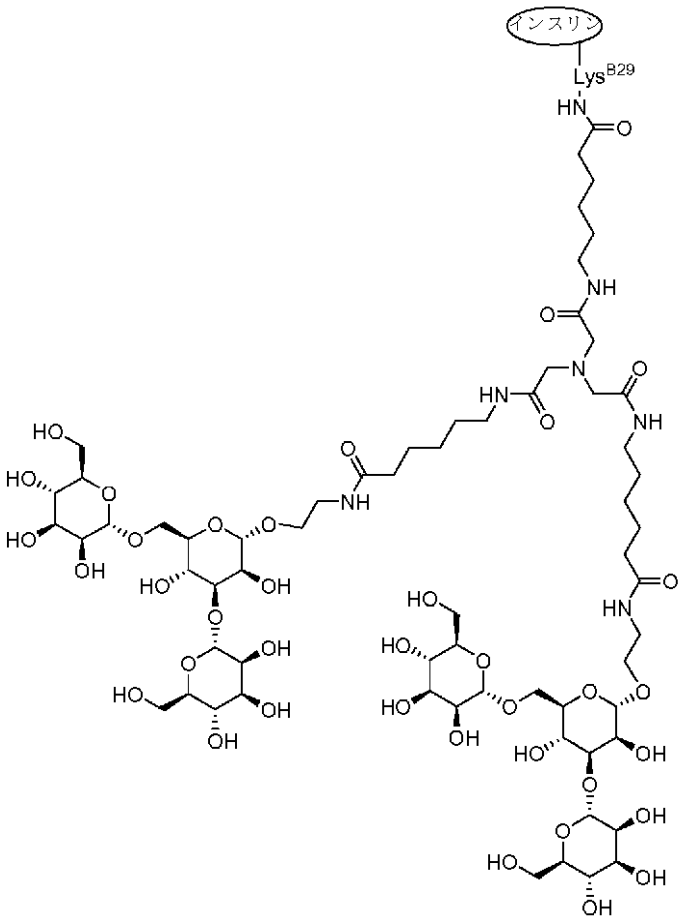
I-2

【化１９】



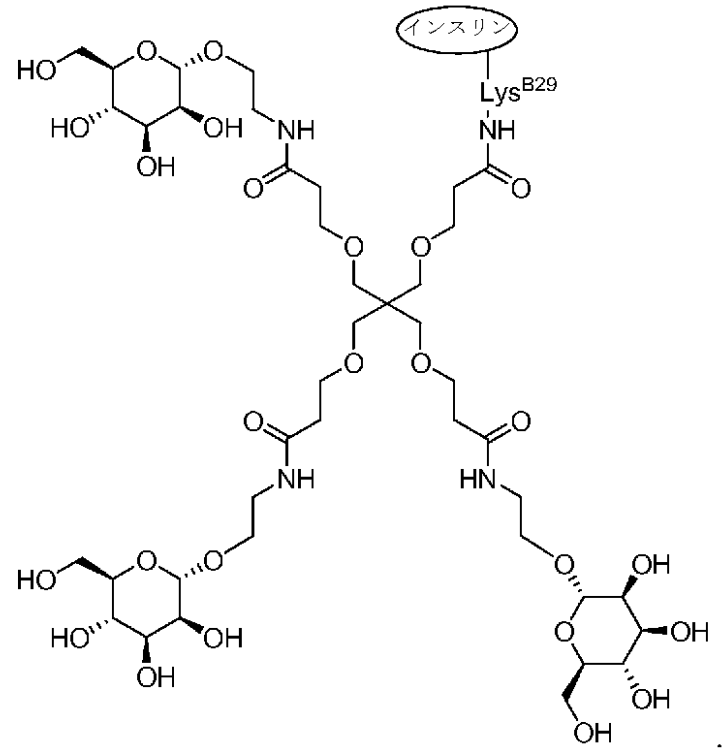
I-4

【化２１】


インスリン
Lys B29
HN
O
NH
O
N
O
HN
O
NH
O
NH
HO
HO
O
HO
OH
O
O
O
HO
OH
O
O
OH
HO
OH
OH
HN
O
HO
HO
O
HO
OH
O
O
O
HO
OH
O
O
OH
HO
OH
OH

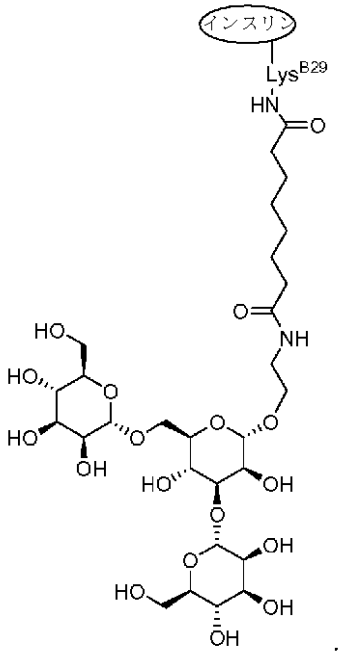
I-6

【化２５】



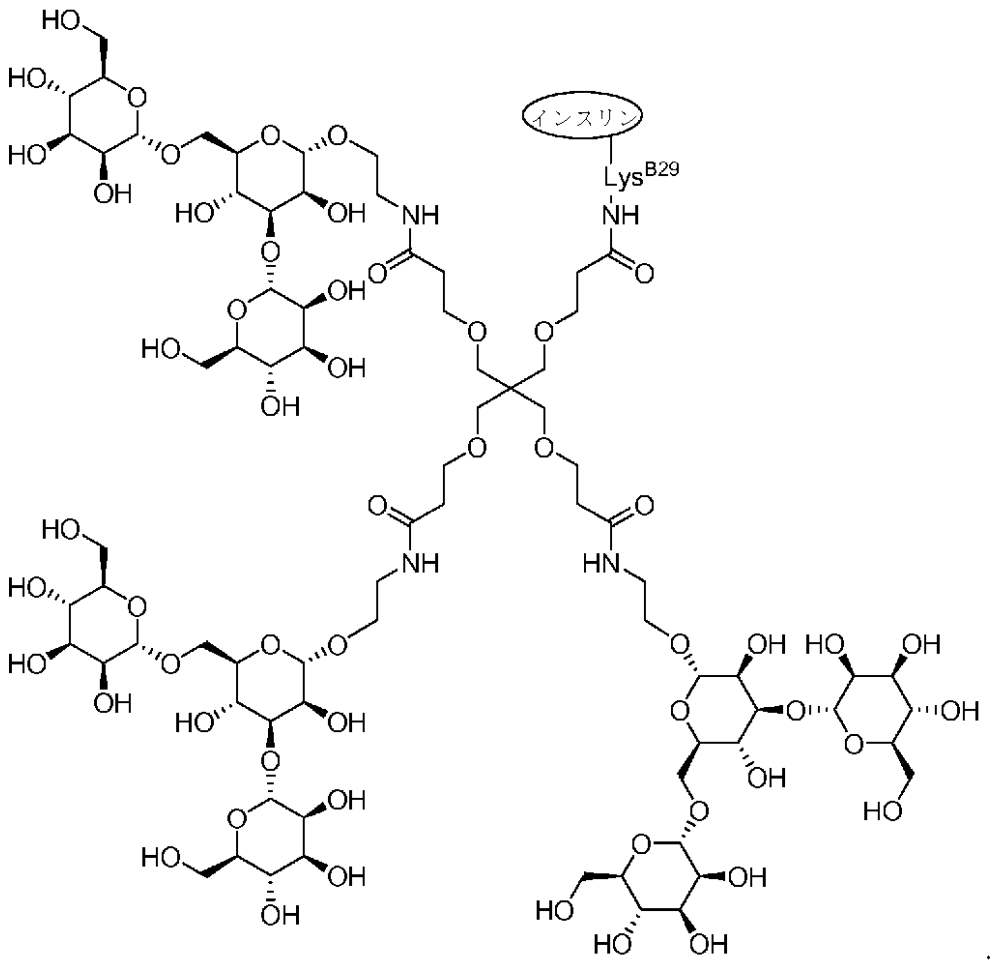
I-9

【化２６】



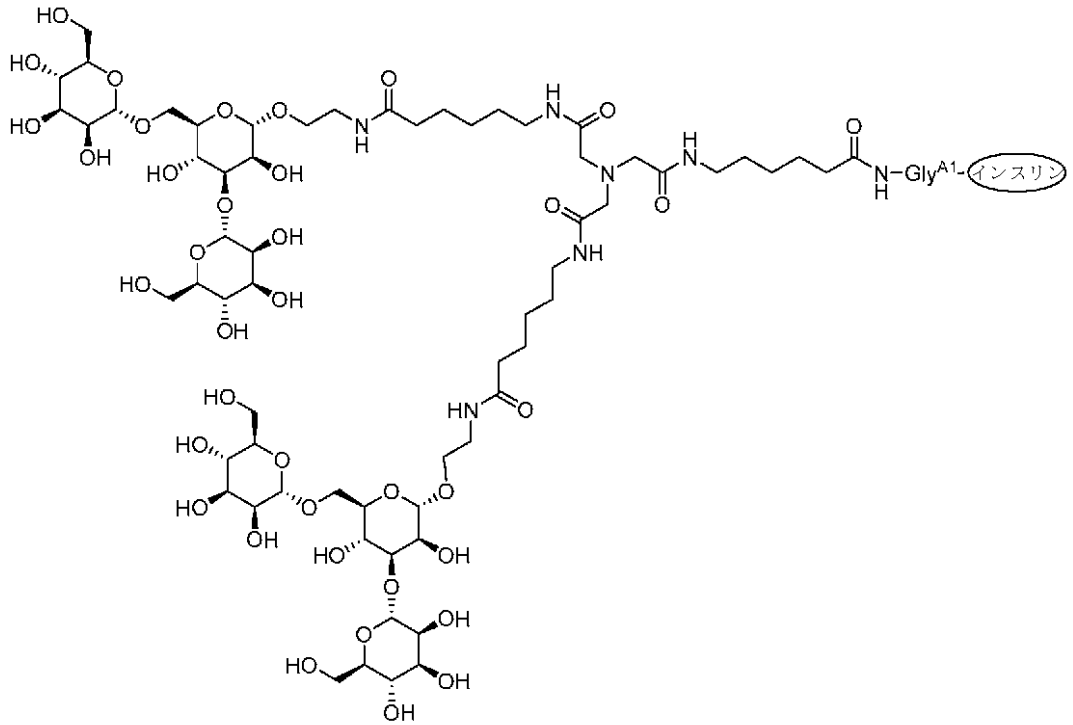
I-10

【化２７】



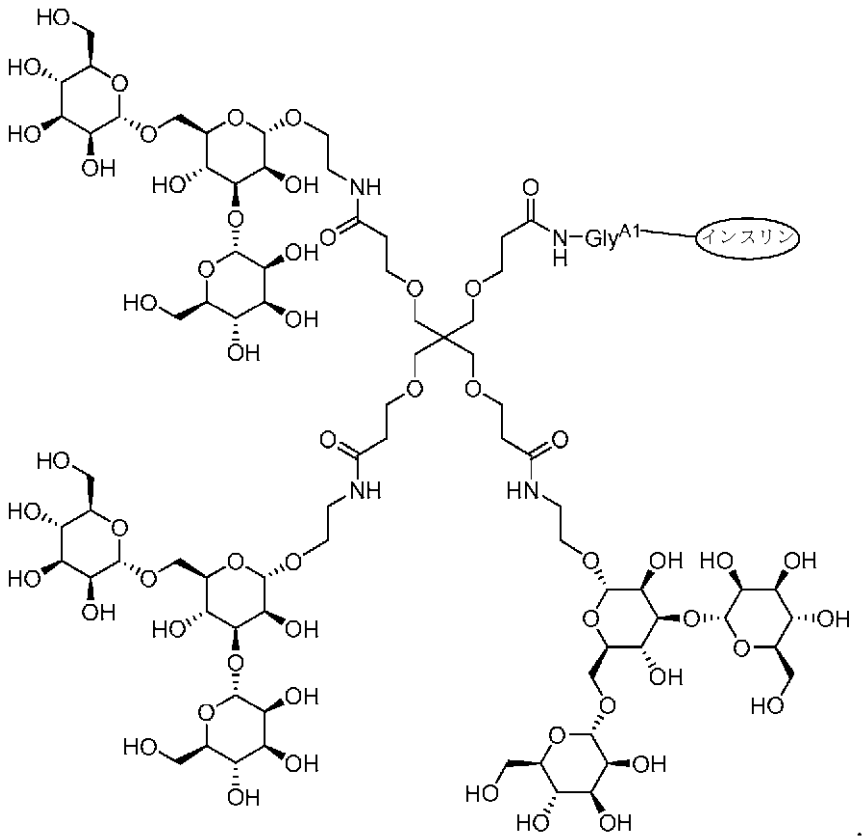
I-11

【化２８】



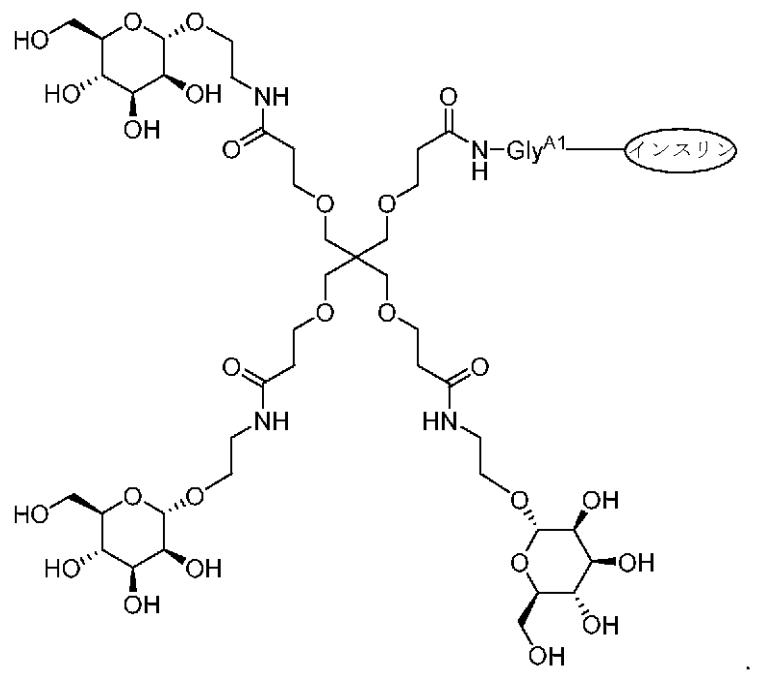
I-12

【化３０】



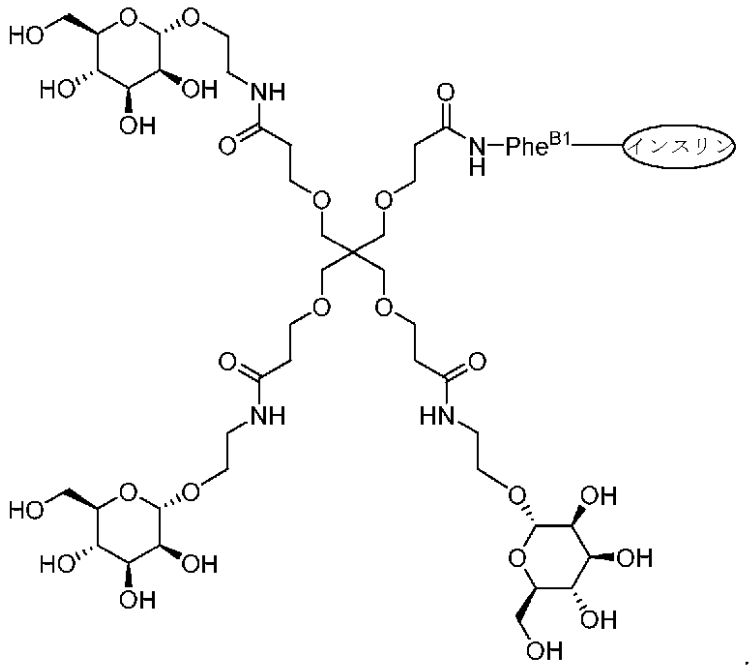
I-14

【化３１】



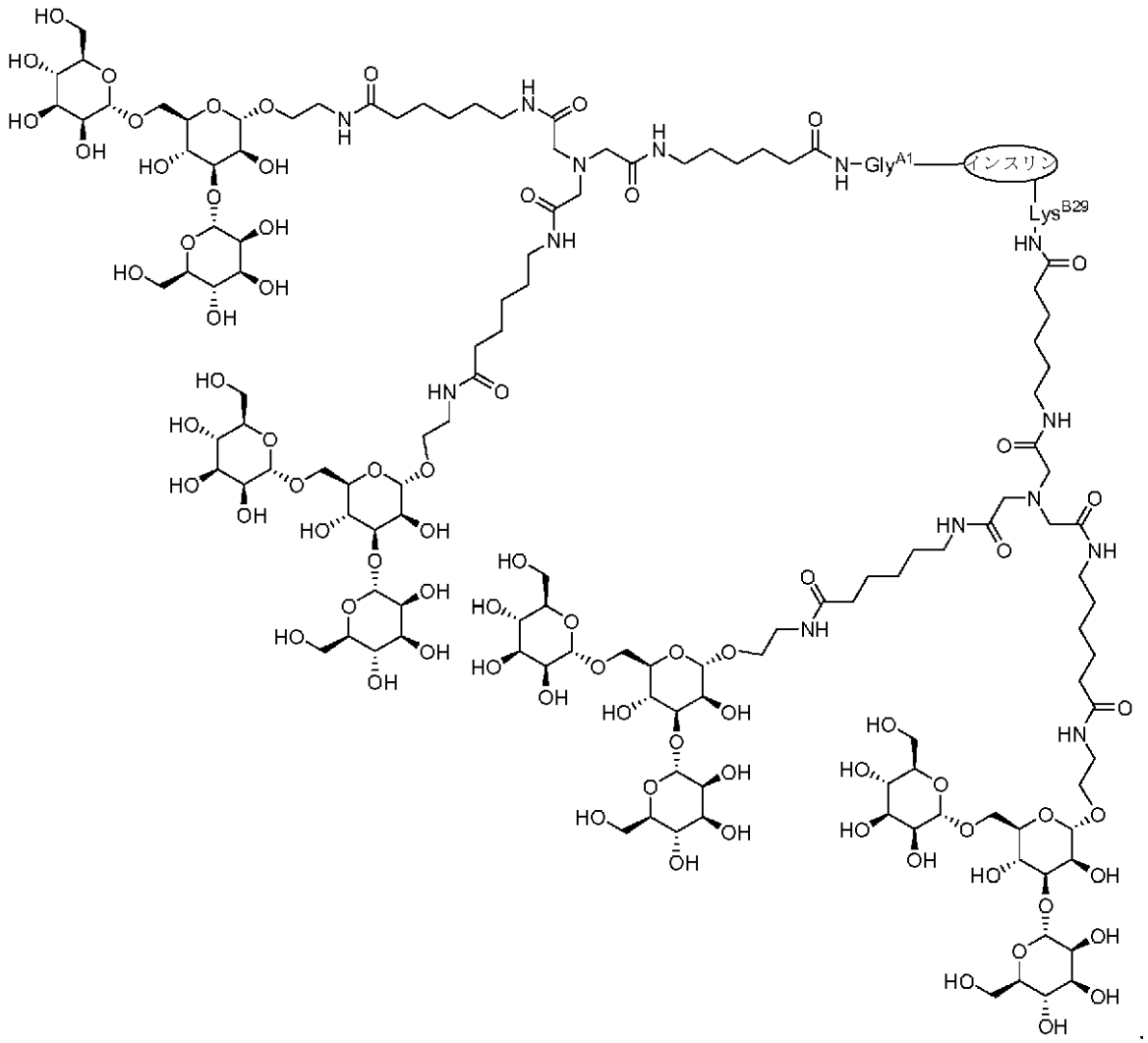
I-15

【化３２】



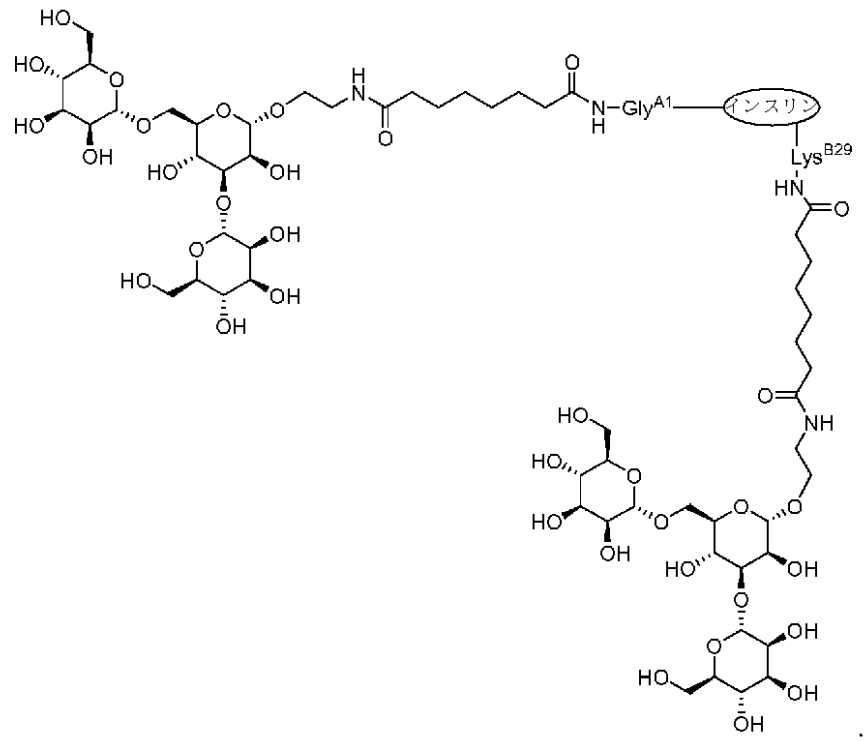
I-16

【化３５】



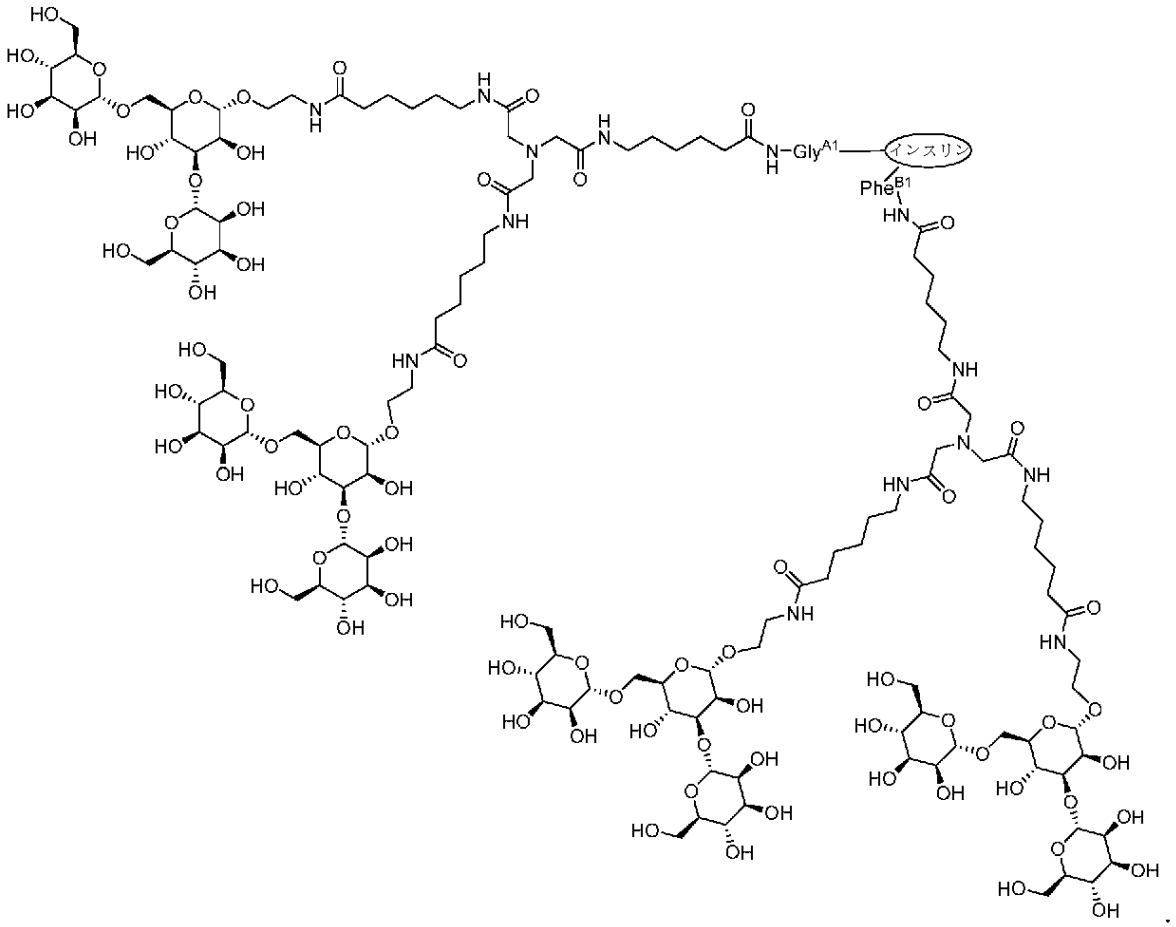
II-2

【化３６】



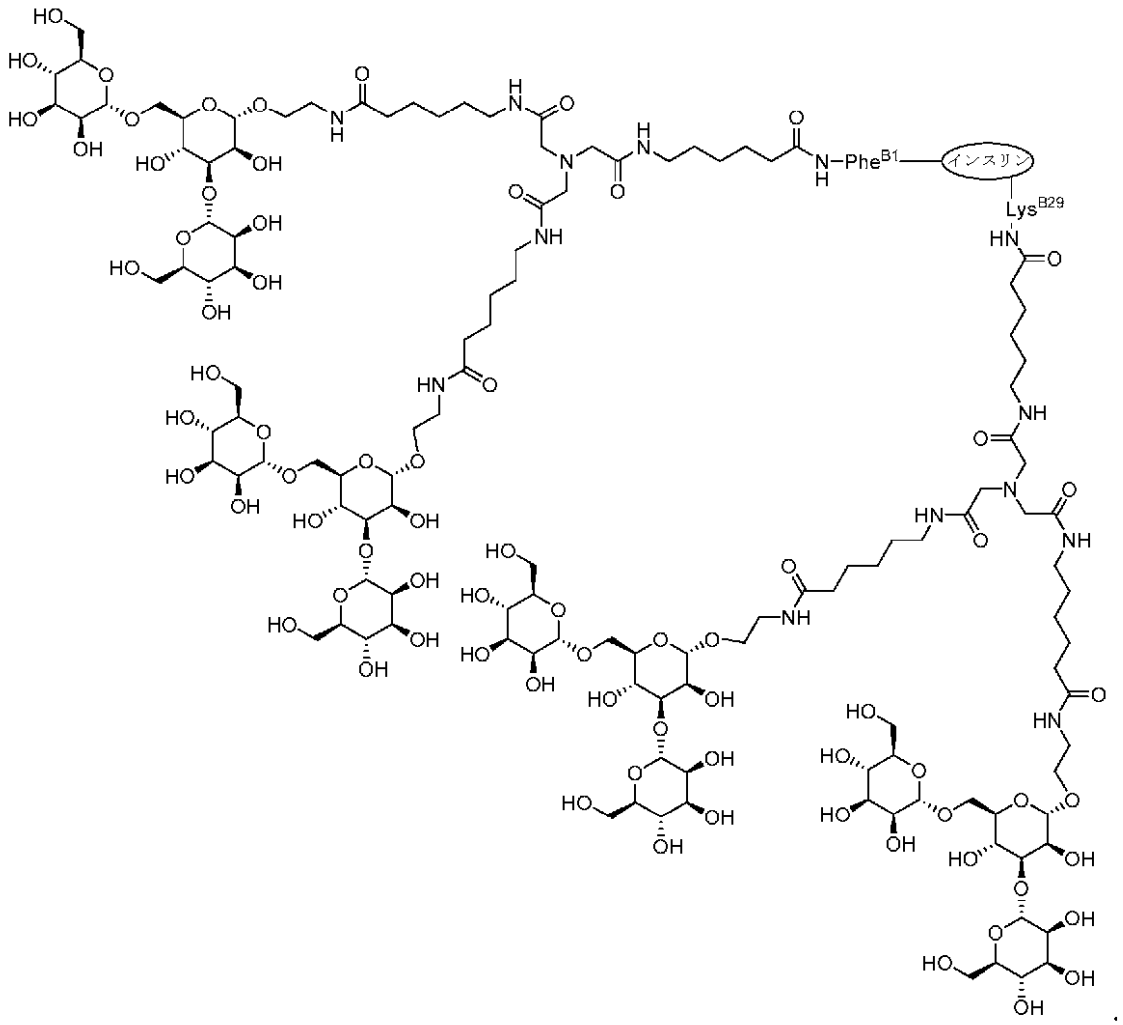
II-3

【化３８】



II-5

【化３９】



II-6

【請求項２３】

アミノエチルトリマンノース（ＡＥＴＭ）、およびアミノエチルフコース（ＡＥＦ）からなる群から独立して選択される１個以上のリガンドにポリマー性又は非ポリマー性構造により複合体骨核に複合化したインスリン分子を含む複合体。

【請求項２４】

インスリン分子が、Ａ１アミノ酸残基を介して、Ｂ１アミノ酸残基を介して、またはＬｙｓ^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化している、請求項２３に記載の複合体。

【請求項２５】

インスリン分子が、２個以上の異なるリガンドに複合体化している、請求項２３に記載の複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本出願は、２００９年１月２８日出願の米国仮特許出願第６１／１４７，８７８号、２００９年３月１２日出願の米国仮特許出願第６１／１５９，６４３号、２００９年３月２０日出願の米国仮特許出願第６１／１６２，１０７号、２００９年３月２５日出願の米国仮特許出願第６１／１６３，０８４号、２００９年６月２４日出願の米国仮特許出願第６１／２１９，８９７号、２００９年６月２４日出願の米国仮特許出願第６１／２１９，８９７号、２００９年７月７日出願の米国仮特許出願第６１／２２３，５７２号および２０

０９年１０月１９日出願の米国仮特許出願第６１／２５２，８５７号の優先権を主張し、これらそれぞれの内容全体は、参照により、本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００２】

従来技術で公知の大半の「制御放出」薬物送達システム（たとえば、米国特許第４，１４５，４１０号、Ｓｅａｒｓ、これは酵素的に不安定なカプセルからの薬物放出を記載する）では、ヒトの体内に存在する分子指標物質（たとえば、代謝産物）の量に直接比例した間隔および濃度で、薬物を患者に与えるのは不可能である。したがって、これらの従来技術システムにおける薬物は、厳密な意味では「制御され」ているのではなく、単に外部または内部要因とは独立した、低速度放出フォーマットにより提供されるだけである。

【０００３】

インスリン注射剤による真性糖尿病の治療は、インスリンの制御されていない低速度放出は望ましくないという周知の研究された例である。事実、ホルモンの単純な置き換えは、この疾患に関連する病理学的後遺症を予防するのには不十分であることは明らかである。これらの後遺症の進展は、患者が経験する血糖濃度の変化に比例した外因性インスリンの投与ができないことを反映していると考えられる。この問題を解決するために、より生理学的なインスリン・デリバリー・システムを開発するいくつかの生物学的および生物工学的な取組みが提案されている（たとえば、米国特許第４，３４８，３８７号、Ｂｒｏｗｎｌｅｅら；米国特許第５，８３０，５０６号、第５，９０２，６０３号および第６，４１０，０５３号、Ｔａｙｌｏｒら、ならびに米国特許出願公開公報第２００４－０２０２７１９号、Ｚｉｏｎら参照）。

【０００４】

これらのシステムはそれぞれ、多価グルコース結合分子（たとえば、レクチンＣｏｎＡ）と多価グルコース結合分子によって可逆的に結合された糖ベース成分との組合わせに依存する。残念ながら、ＣｏｎＡおよび他の多くの入手容易なレクチンは、リンパ球増殖を刺激する可能性がある。ある種のリンパ球の表面上の炭水化物受容体に結合することにより、これらのいわゆる「分裂促進的な」レクチンは、リンパ球の有糸分裂を誘発する可能性があり、これによりリンパ球を増殖させる。ＣｏｎＡを含む最も分裂促進的なレクチンは、選択的Ｔ細胞マイトジェンである。２、３のレクチンは、選択性が殆どなく、Ｔ細胞およびＢ細胞の両方を刺激する。分裂促進的なレクチンへの局所または全身インビボ曝露は、炎症、細胞毒性、マクロファージ消化およびアナフィラキシーを始めとするアレルギー反応を起こす結果となり得る。さらに、植物レクチンは、特に、高い力価の抗レクチン特異抗体の産生をもたらす、免疫原生であることが知られている。したがって、分裂促進的なレクチンは、これらの放出を防ぐために十分な注意を払わない限り、インビボ方法および装置用に、原型で使用できないことは理解されることである。たとえば、米国特許第５，８３０，５０６号、Ｔａｙｌｏｒは、ＣｏｎＡを使用することに関連する毒性のリスクを際立たせ、薬物送達装置の内外で自由に拡散するために、これもグルコースおよびインスリン分子を必要とする薬物送達装置内でＣｏｎＡを含有することの重要性および困難性を強調する。

【０００５】

レクチンを必要としない代替制御薬物送達システムを提供することができれば、レクチンのこれらおよび他のインビボ用途に関連するリスクおよび困難性を、大きく軽減させることができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】米国特許第４，１４５，４１０号

【特許文献２】米国特許第４，３４８，３８７号

【特許文献３】米国特許第５，８３０，５０６号

【特許文献４】米国特許第５，９０２，６０３号

【特許文献５】米国特許第６，４１０，０５３号
【特許文献６】米国特許出願公開公報第２００４－０２０２７１９号
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
一態様において、本開示は、インスリンのような薬物の薬物動態学的（ＰＫ）および／または薬力学的（ＰＤ）プロファイルを、グルコースのような糖の全身濃度に応答する様式で、制御する方法を提供する。実施例で検討するように、該方法は、部分的に、あるインスリン複合体を高親和性糖リガンドを含むように修飾した場合、たとえＣｏｎＡのような外因性多価糖が結合する分子が存在しなくても、糖濃度の変化に応答するＰＫ／ＰＤプロフィールを発揮するように作ることができたという発見に基づいている。この発見は、予期し得ぬことであり、単純なレクチンのない糖応答性薬物システムを作る前例のない機会を提供する。別の態様では、該開示は、例示的な複合体およびそれらを製造する方法を提供する。一般的に、これらの複合体は、薬物およびそれぞれ糖を含む１種以上の別のリガンドを含む。ある実施形態では、リガンドは、内因性糖に結合する分子に結合するために、糖（たとえば、グルコースまたはマンノース）と競合することができる。ある実施形態では、リガンドは、ＣｏｎＡと結合するために、グルコースまたはマンノースと競合することができる。以下でより詳しく検討するように、ある実施形態では、リガンドおよび薬物は、複合体骨格に、共有結合でまたは非共有結合で結合してもよい。ある実施形態では、骨格は非重合体である。ある実施形態では、複合体は、多分散指数１、および約２０，０００Ｄａ未満のＭＷを有してもよい。ある実施形態では、複合体は、持続型である（すなわち、溶解型組換えヒトインスリン、すなわちＲＨＩより持続するＰＫプロフィールを示す）。
【０００８】
以下により詳しく検討するように、本明細書で記載される方法、複合体および製剤は、断じて、インスリンの送達に限定されるものではなく、任意の薬物を送達するのに使用することができることは理解されることである。さらに、本方法は、グルコース以外の糖に応答して薬物を送達するために使用してもよいことは理解されることである。特に、実施例で検討するように、例示的な複合体は、α－メチルマンノースおよびＬ－フコースのような外因性糖に応答することも示されている。ある実施形態では、これは、これらの外因性糖の１つの投与によってコントロールすることができる（すなわち、内因性グルコースの変動によるコントロールに代えて、あるいはそれに加えて）複合体を調製するために使用することができる。
【０００９】
定義
以下、本明細書全体で使用される特定の官能基、化学用語および一般用語との定義を、さらに詳細に記載する。本発明の目的のため、化学元素は、元素の周期表、ＣＡＳバージョン、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｐｈｙｓｉｃｓ，第７５編、表紙裏に従って表し、特定の官能基は、一般的に、本明細書に記載するように定義する。さらに、有機化学の一般原則および特定の官能部分および反応性は、Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｔｈｏｍａｓ Ｓｏｒｒｅｌｌ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｂｏｏｋｓ，Ｓａｕｓａｌｉｔｏ，１９９９；ＳｍｉｔｈおよびＭａｒｃｈ Ｍａｒｃｈ’ｓ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，第５編，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ社，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２００１；Ｌａｒｏｃｋ，Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ，ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ社，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９；Ｃａｒｒｕｔｈｅｒｓ，Ｓｏｍｅ Ｍｏｄｅｒｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，第３編，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，１９８７に記載されている。
【００１０】

アシル－　本明細書で使用される用語「アシル」は、一般式：－Ｃ（＝Ｏ）$Ｒ^{Ｘ１}$、－Ｃ（＝Ｏ）$ＯＲ^{Ｘ１}$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）$Ｒ^{Ｘ１}$、－Ｃ（＝Ｏ）$ＳＲ^{Ｘ１}$、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（$Ｒ^{Ｘ１}$）$_2$、－Ｃ（＝Ｓ）$Ｒ^{Ｘ１}$、－Ｃ（＝Ｓ）Ｎ（$Ｒ^{Ｘ１}$）$_2$および－Ｃ（＝Ｓ）Ｓ（$Ｒ^{Ｘ１}$）、－Ｃ（＝$ＮＲ^{Ｘ１}$）$Ｒ^{Ｘ１}$、－Ｃ（＝$ＮＲ^{Ｘ１}$）$ＯＲ^{Ｘ１}$、－Ｃ（＝$ＮＲ^{Ｘ１}$）$ＳＲ^{Ｘ１}$および－Ｃ（＝$ＮＲ^{Ｘ１}$）Ｎ（$Ｒ^{Ｘ１}$）$_2$（式中、$Ｒ^{Ｘ１}$は、水素；ハロゲン；置換または非置換ヒドロキシル；置換または非置換チオール；置換または非置換アミノ；置換または非置換アシル；環状または非環状、置換または非置換、分岐状または非分岐状脂肪族；環状または非環状、置換または非置換、分岐状または非分岐状ヘテロ脂肪族；環状または非環状、置換または非置換、分岐状または非分岐状アルキル；環状または非環状、置換または非置換、分岐状または非分岐状アルケニル；置換または非置換アルキニル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、脂肪族オキシ、ヘテロ脂肪族オキシ、アルキルオキシ、ヘテロアルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、脂肪族チオキシ、ヘテロ脂肪族チオキシ、アルキルチオキシ、ヘテロアルキルチオキシ、アリールチオキシ、ヘテロアリールチオキシ、モノまたはジ脂肪族アミノ、モノまたはジヘテロ脂肪族アミノ、モノまたはジアルキルアミノ、モノまたはジヘテロアルキルアミノ、モノまたはジアリールアミノ、またはモノまたはジヘテロアリールアミノ；または２個の$Ｒ^{Ｘ１}$基は一緒になって、５～６員複素環を形成する）を有する基をさす。アシル基の例として、アルデヒド（－ＣＨＯ）、カルボン酸（－$ＣＯ_2Ｈ$）、ケトン、アシルハライド、エステル、アミド、イミン、カーボネート、カルバメート、および尿素が挙げられる。アシル置換基として、本明細書に記載する任意の置換であって、適切な部分を形成する置換基（たとえば、脂肪族、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロ脂肪族、複素環、アリール、ヘテロアリール、アシル、オキソ、イミノ、チオオキソ、シアノ、イソシアノ、アミノ、アジド、ニトロ、ヒドロキシル、チオール、ハロ、脂肪族アミノ、ヘテロ脂肪族アミノ、アルキルアミノ、ヘテロアルキルアミノ、アリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、アルキルアリール、アリールアルキル、脂肪族オキシ、ヘテロ脂肪族オキシ、アルキルオキシ、ヘテロアルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、脂肪族チオキシ、ヘテロ脂肪族チオキシ、アルキルチオキシ、ヘテロアルキルチオキシ、アリールチオキシ、ヘテロアリールチオキシ、アシルオキシなど、これらはそれぞれ、さらに置換されてもされなくてもよい）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００１１】

脂肪族－　本明細書で使用される用語「脂肪族」または「脂肪族基」は、場合によっては置換された炭化水素部分であって、直鎖（すなわち、非分岐）、分岐状、または環状（「炭素環状」）であってもよく、完全に飽和されまたは不飽和部分を１個以上含有してもよく、しかし芳香族ではない炭化水素部分を示す。特に明記しない限り、脂肪族基は１～１２個の炭素原子を含有する。いくつかの実施形態では、脂肪族基は１～６個の炭素原子を含有する。いくつかの実施形態では、脂肪族基は１～４個の炭素原子を含有し、さらに他の実施形態では、脂肪族基は１～３個の炭素原子を含有する。適切な脂肪族基として、直鎖または分岐状アルキル、アルケニルおよびアルキニル基、およびこれらの混成体、たとえば、（シクロアルキル）アルキル、（シクロアルケニル）アルキルまたは（シクロアルキル）アルケニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００１２】

アルケニル－　本明細書で使用される用語「アルケニル」は、炭素－炭素二重結合を少なくとも１個有する直鎖または分岐鎖状脂肪族部分から１個の水素原子の脱離により誘導された、場合によっては置換された１価の基を示す。ある実施形態では、本発明で使用されるアルケニル基は、２～６個の炭素原子を含有する。ある実施形態では、本発明で使用されるアルケニル基は、２～５個の炭素原子を含有する。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるアルケニル基は、２～４個の炭素原子を含有する。別の実施形態では、使用されるアルケニル基は、２～３個の炭素原子を含有する。アルケニル基として、たとえば、エテニル、プロペニル、ブテニル、１－メチル－２－ブテン－１－イルなどが挙げら

れる。

【００１３】

アルキル－　本明細書で使用される用語「アルキル」は、１～６個の炭素原子を含有する脂肪族部分から１個の水素原子の脱離により誘導された、場合によっては置換された、飽和の直鎖または分岐鎖状炭化水素ラジカルをさす。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるアルキル基は、１～５個の炭素原子を含有する。別の実施形態では、使用されるアルキル基は、１～４個の炭素原子を含有する。さらに他の態様では、アルキル基は、１～３個の炭素原子を含有する。さらに別の態様では、アルキル基は１～２個の炭素を含有する。アルキルラジカルの例として、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｓｅｃ－ペンチル、イソペンチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、ネオペンチル、ｎ－ヘキシル、ｓｅｃ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチル、ｎ－デシル、ｎ－ウンデシル、ドデシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００１４】

アルキニル－　本明細書で使用される用語「アルキニル」は、少なくとも１個の炭素－炭素三重結合を有する直鎖または分岐鎖状脂肪族部分から１個の水素原子の脱離により誘導された、場合によっては置換された１価の基をさす。ある実施形態では、本発明で使用されるアルキニル基は、２～６個の炭素原子を含有する。ある実施形態では、本発明で使用されるアルキニル基は、２～５個の炭素原子を含有する。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるアルキニル基は、２～４個の炭素原子を含有する。別の実施形態では、使用されるアルキニル基は、２～３個の炭素原子を含有する。代表的なアルキニル基として、エチニル、２－プロピニル（プロパルギル）、１－プロピニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００１５】

アリール－　本明細書で使用される用語「アリール」であって、単独でまたは「アラルキル」、「アラルコキシ」または「アリールオキシアルキル」におけるような、より大きな部分の一部として使用される「アリール」は、合計５～１０環員を有する、場合によっては置換された単環式および二環式環構造であって、該構造中の少なくとも１個の環が芳香族であり、該構造中のそれぞれの環は、３～７環員を含有する環構造である。用語「アリール」は、用語「アリール環」と互換的に使用されてもよい。本発明のある実施形態では、「アリール」は、芳香族環構造をさし、フェニル、ビフェニル、ナフチル、アントラシルなどが挙げられるが、これらに限定されず、１個以上の置換基を有してもよい。

【００１６】

アリールアルキル－　本明細書で使用される用語「アリールアルキル」は、アリール基（たとえば、芳香族またはヘテロ芳香族基）で置換されたアルキル基をさす。

【００１７】

２価の炭化水素鎖－　本明細書で使用される用語「２価の炭化水素鎖」（「２価のアルキレン基」ともいう）は、ポリメチレン基、すなわち、－（ＣＨ$_2$）$_z$－（式中、ｚは、１～３０、１～２０、１～１２、１～８、１～６、１～４、１～３、１～２、２～３０、２～２０、２～１０、２～８、２～６、２～４、または２～３の自然数である）である。置換された２価の炭化水素鎖は、１個以上のメチレン水素原子が置換基で置き換えられているポリメチレン基である。適切な置換基として、以下の置換された脂肪族基に関して記載されるものが挙げられる。

【００１８】

カルボニル－　本明細書で使用される用語「カルボニル」は、炭素－酸素二重結合を含有する１価または２価の部分をさす。カルボニル基の非限定的な例として、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、エノン、アシルハライド、無水物、尿素、カルバメート、カーボネート、チオエステル、ラクトン、ラクタム、ヒドロキサメート、イソシアネートおよびクロロホルメートが挙げられる。

【００１９】

シクロ脂肪族－　本明細書で使用される用語「シクロ脂肪族」、「炭素環」または「炭素環状」であって、単独でまたはより大きな部分の一部として使用される「シクロ脂肪族」、「炭素環」または「炭素環状」は、本明細書で記載するような、３～１０員を有する、場合によっては置換された飽和または部分的に不飽和の環状脂肪族単環式または二環式環構造をさす。シクロ脂肪族基として、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、シクロヘプテニル、シクロオクチル、シクロオクテニルおよびシクロオクタジエニルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、３～６個の炭素を有する。

【００２０】

ハロゲン－　本明細書で使用される用語「ハロ」および「ハロゲン」は、フッ素（フルオロ、－Ｆ）、塩素（クロロ、－Ｃｌ）、臭素（ブロモ、－Ｂｒ）およびヨウ素（ヨード、－Ｉ）から選択される原子をさす。

【００２１】

ヘテロ脂肪族－　本明細書で使用される用語「ヘテロ脂肪族」または「ヘテロ脂肪族基」は、炭素原子に加えて１～５個のヘテロ原子を有する、場合によっては置換された炭化水素部分であって、直鎖（すなわち、非分岐）、分岐状、または環状（「複素環」）であってもよく、および完全に飽和されていてもよく、または１個以上の不飽和単位を含有してもよい、しかし、芳香族ではない炭化水素部分を示す。特に明記しない限り、ヘテロ脂肪族基は、１～６個の炭素原子を含有し、ここで１～３個の炭素原子は、場合によってはおよび独立して、酸素、窒素およびイオウから選択されるヘテロ原子で置き換えられている。いくつかの実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、１～４個の炭素原子を含有し、ここで、１～２個の炭素原子は、場合によってはおよび独立して、酸素、窒素およびイオウから選択されるヘテロ原子で置き換えられている。さらに他の実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、１～３個の炭素原子を含有し、ここで、１個の炭素原子は、場合によってはおよび独立して、酸素、窒素およびイオウから選択されるヘテロ原子で置き換えられている。適切なヘテロ脂肪族基として、直鎖または分岐状ヘテロアルキル、ヘテロアルケニルおよびヘテロアルキニル基が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２２】

ヘテロアラルキル－　本明細書で使用される用語「ヘテロアラルキル」は、ヘテロアリールで置換されたアルキル基であって、該基中のアルキルおよびヘテロアリール部分は、独立して、場合によっては置換されている基をさす。

【００２３】

ヘテロアリール－　本明細書で使用される用語「ヘテロアリール」であって、単独またはより大きな部分、たとえば「ヘテロアラルキル」または「ヘテロアラルコキシ」の一部として使用される「ヘテロアリール」は、５～１０個の環原子、好ましくは５、６または９個の環原子を有し、サイクリック配列で共有された６、１０または１４π電子を有し、炭素原子に加えて、１～５個のヘテロ原子を有する場合によっては置換された基をさす。ヘテロアリール基として、チエニル、フラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、インドリジニル、プリニル、ナフチリジニルおよびプテリジニルが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される用語「ヘテロアリール」および「ヘテロアル－」は、ヘテロ芳香族環が１個以上のアリール環、炭素環または複素環と縮合し、ここで、ラジカルまたは結合点が、ヘテロ芳香族環上にある基も含む。非限定的な例として、インドリル、イソインドリル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、ジベンゾフラニル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンズチアゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、４Ｈ－キノリジニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、テトラヒドロキノリニルおよびテトラヒドロイソキノリニルが挙げられる。ヘテロアリール基

は、単環でも二環でもよい。用語「ヘテロアリール」は、用語「ヘテロアリール環」、「ヘテロアリール基」または「ヘテロ芳香族」と互換的に使用してもよく、これらの用語はどれも、場合によっては置換された環を含む。

【００２４】

ヘテロ原子－　本明細書で使用される用語「ヘテロ原子」は、窒素、酸素またはイオウをさし、窒素またはイオウの任意の酸化形態を含み、および塩基性窒素の任意の四級化形態を含む。用語「窒素」は、置換された窒素も含む。

【００２５】

複素環－　本明細書で使用される用語「ヘテロ環」、「ヘテロサイクリル」、「複素環ラジカル」および「複素環リング」は、互換的に使用され、安定な、飽和または部分的に不飽和の、場合によっては置換された５～７員単環式または７～１０員二環式複素環部分であって、炭素原子に加えて、１個以上の先に定義したヘテロ原子を有する部分である。複素環リングは、安定な構造になる、任意のヘテロ原子または炭素原子で側鎖基と結合することができ、および環原子のいずれも、場合によっては置換され得る。そのような飽和または部分的に不飽和の複素環ラジカルの例として、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、ピロリジニル、ピロリドニル、ピペリジニル、ピロリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オキサゾリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、ジオキソラニル、ジアゼピニル、オキサゼピニル、チアゼピニル、モルホリニルおよびキヌクリジニルが挙げられるが、これらに限定されない。用語「ヘテロ環」、「ヘテロサイクリル」、「複素環リング」、「複素環基」、「複素環部分」および「複素環ラジカル」は、本明細書では互換的に使用され、複素環リングが１個以上のアリール、ヘテロアリールまたは炭素環状リングに縮合する基、たとえば、インドリニル、３Ｈ－インドリル、クロマニル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロキノリニルであって、結合するラジカルまたは結合点は、ヘテロサイクリル環上である基も含む。ヘテロサイクリル基は、単環式でも二環式でもよい。用語「ヘテロサイクリルアルキル」は、ヘテロサイクリルで置換されたアルキル基であって、アルキルおよびヘテロサイクリル部は、独立して、場合によっては置換されているアルキル基をさす。

【００２６】

不飽和－　本明細書で使用される用語「不飽和」は、ある部分が１個以上の二重結合または三重結合を有することを意味する。

【００２７】

部分的に不飽和－　本明細書で使用される用語「部分的に不飽和」は、少なくとも１個の二重結合または三重結合を含む環部分をさす。用語「部分的に不飽和」は、複数の不飽和部分を有する環を包含するものと意図されるが、本明細書で定義した、アリールまたはヘテロアリール部分は包含しないと意図される。

【００２８】

場合によっては置換－　本明細書で記載するように、本発明の化合物は、「場合によっては置換」された部分を含有してもよい。一般的に用語「置換」は、用語「場合によっては」が先についていてもついていなくても、指定された部分の１個以上の水素が、適切な置換基で置き換えられていることを意味する。他に示されていなければ、「場合によっては置換された」基は、該基の置換可能なそれぞれの位置に、適切な置換基を有してよく、任意の所与の構造体の複数の位置が特定の群から選択される複数の置換基で置換され得る場合は、該置換基は、各位置で、同じまたは異なってもよい。本発明で考える置換基の組合わせは、安定なまたは化学的に実施可能な化合物となるものが好ましい。本明細書で使用される用語「安定な」は、これらの製造、検出、および、ある実施形態では、回収、精製、および本明細書で開示する１つ以上の目的を可能にする条件に供された場合、実質的に変化しない化合物をさす。

【００２９】

「場合によっては置換されている」基の置換可能な炭素原子上の適切な１価の置換基は、独立して、ハロゲン；－（CH_2）$_{0-4}R^{o}$；－（CH_2）$_{0-4}OR^{o}$；－Ｏ－（

$CH_2)_{0-4}C(O)OR^o$；－$(CH_2)_{0-4}CH(OR^o)_2$；－$(CH_2)_{0-4}SR^o$；－$(CH_2)_{0-4}$Ph、これはR^oで置換されてもよい；－$(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$Ph、これは$R^o$で置換されてもよい；－CH＝CHPh、これは$R^o$で置換されてもよい；－$NO_2$；－CN；－$N_3$；－$(CH_2)_{0-4}N(R^o)_2$；－$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)R^o$；－$N(R^o)C(S)R^o$；－$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)NR^o_2$；－$N(R^o)C(S)NR^o_2$；－$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)OR^o$；－$N(R^o)N(R^o)C(O)R^o$；－$N(R^o)N(R^o)C(O)NR^o_2$；－$N(R^o)N(R^o)C(O)OR^o$；－$(CH_2)_{0-4}C(O)R^o$；－$C(S)R^o$；－$(CH_2)_{0-4}C(O)OR^o$；－$(CH_2)_{0-4}C(O)SR^o$；－$(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^o_3$；－$(CH_2)_{0-4}OC(O)R^O$；－$OC(O)(CH_2)_{0-4}SR$－；$SC(S)SR^O$；－$(CH_2)_{0-4}SC(O)R^O$；－$(CH_2)_{0-4}C(O)NR^o_2$；－$C(S)NR^o_2$；－$C(S)SR^o$；－$SC(S)SR^o$，－$(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^o_2$；－$C(O)N(OR^o)R^o$；－$C(O)C(O)R^o$；－$C(O)CH_2C(O)R^o$；－$C(NOR^o)R^o$；－$(CH_2)_{0-4}SSR^o$；－$(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^o$；－$(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^o$；－$(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^o$；－$S(O)_2NR^o_2$；－$(CH_2)_{0-4}S(O)R^o$；－$N(R^o)S(O)_2NR^o_2$；－$N(R^o)S(O)_2R^o$；－$N(OR^o)R^o$；－$C(NH)NR^o_2$；－$P(O)_2R^o$；－$P(O)R^o_2$；－$OP(O)R^o_2$；－$OP(O)(OR^o)_2$；$SiR^o_3$；－（$C_{1-4}$直鎖または分岐状アルキレン）O－$N(R^o)_2$；または－（$C_{1-4}$直鎖または分岐状アルキレン）C（O）O－$N(R^o)_2$であり、ここで各$R^o$は、以下に定義するように置換されてもよく、独立して、水素、C_{1-6}脂肪族、－CH_2Ph、－O$(CH_2)_{0-1}$Ph、または窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する、５～６員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環、または、先の定義にもかかわらず、２個の独立したR^oは、中間に位置する原子と一緒になって、窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する３～１２員飽和、部分的に不飽和、またはアリール単環式または二環式リングであって、以下に定義するように置換されていてもよい環を形成する。

【００３０】

R^o（または２個の独立したR^oがそれらの中間にある原子と一緒になって形成される環）上の適切な１価の置換基は、独立して、ハロゲン、－$(CH_2V_2R$、－（ハロR）、－$(CH_2)_{0-2}OH$、－$(CH)_{0-2}OR$、－$(CH_2)_{0-2}CH(OR)_2$；－O（ハロR）、－CN、－N_3、－$(CH_2)_{0-2}C(O)R$、－$(CH_2)_{0-2}C(O)OH$、－$(CH_2)_{0-2}C(O)R$、－$(CH_2)_{0-2}SR$、－$(CH_2)_{0-2}SH$、－$(CH_2)_{0-2}NH_2$、－$(CH_2)_{0-2}NHR$、－$(CH_2)_{0-2}NR_2$、－NO_2、－SiR_3、－$OSiR_3$、－C（O）SR、－（C_{1-4}直鎖または分岐状アルキレン）C（O）OR、または－SSRであり、ここで、各Rは、非置換、または「ハロ」が先に記載されている場合、１個以上のハロゲンのみで置換され、独立して、C_{1-4}脂肪族、－CH_2Ph、－O$(CH_2)_{0-1}$Ph、または窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する、５～６員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環である。R^oの飽和炭素原子上の適切な二価の置換基として、＝Oおよび＝Sが挙げられる。

【００３１】

「場合によっては置換されている」基の飽和炭素原子上の適切な二価の置換基として、＝O、＝S、＝NNR^*_2、＝NNHC（O）R^*、＝NNHC（O）OR^*、＝NNH$S(O)_2R^*$、＝NR^*、＝NOR^*、－O$(C(R^*_2))_{2-3}$O－、または－S$(C(R^*_2))_{2-3}$S－が挙げられ、ここで、R^*は、それぞれ独立して、水素、C_{1-6}脂肪族（これは、以下に定義するように置換されてもよい）、または窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する、非置換５～６員飽和、部分的に不飽和またはアリール環から選択される。「場合によっては置換されている」

基の隣接する置換可能な炭素に結合する適切な二価の置換基として、－Ｏ（ＣＲ＊$_2$）$_{2-3}$Ｏ－が挙げられ、ここで、Ｒ＊は、それぞれ独立して、水素、Ｃ$_{1-6}$脂肪族（これは、以下に定義するように置換されてもよい）、または窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する、非置換５～６員飽和、部分的に不飽和またはアリール環から選択される。

【００３２】

Ｒ＊の脂肪族基上の適切な置換基は、独立して、ハロゲン、－Ｒ、－（ハロＲ）、－ＯＨ、－ＯＲ、－Ｏ（ハロＲ）、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＮＨ$_2$、－ＮＨＲ、－ＮＲ$_2$または－ＮＯ$_2$であり、ここで各Ｒは、非置換、または「ハロ」が先に記載されている場合、１個以上のハロゲンのみで置換され、独立して、Ｃ$_{1-4}$脂肪族、－ＣＨ$_2$Ｐｈ、－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_{0-1}$Ｐｈ、または窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する、５～６員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環である。

【００３３】

「場合によっては置換されている」基の置換可能な窒素上の適切な置換基として、－Ｒ^t、－ＮＲ$^t_2$、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^t、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^t、－Ｃ（Ｏ）Ｃ（Ｏ）Ｒ^t、－Ｃ（Ｏ）ＣＨ$_2$Ｃ（Ｏ）Ｒ^t、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ^t、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＮＲ$^t_2$、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ$^t_2$、－Ｃ（ＮＨ）ＮＲ$^t_2$または－Ｎ（Ｒ^t）Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒ^{t}が挙げられ、ここで、各Ｒ^{t}は、独立して、水素、Ｃ$_{1-6}$脂肪族（これは以下に定義するように置換されてもよい）、非置換－ＯＰｈ、または窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する、非置換５～６員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環、または、先の定義にもかかわらず、２個の独立したＲ^{t}は、中間に位置する原子と一緒になって、窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する３～１２員飽和、部分的に不飽和、またはアリール単環式または二環式リングであって、以下に定義するように置換されていてもよい環を形成する。

【００３４】

Ｒ^{t}の脂肪族基上の適切な置換基は、独立して、ハロゲン、－Ｒ、－（ハロＲ）、－ＯＨ、－ＯＲ、－Ｏ（ハロＲ）、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ、－ＮＨ$_2$、－ＮＨＲ、－ＮＲ$_2$または－ＮＯ$_2$であり、ここで各Ｒは、非置換、または「ハロ」が先に記載されている場合、１個以上のハロゲンのみで置換され、独立して、Ｃ$_{1-4}$脂肪族、－ＣＨ$_2$Ｐｈ、－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_{0-1}$Ｐｈ、または窒素、酸素またはイオウから独立して選択される０～４個のヘテロ原子を有する、５～６員飽和、部分的に不飽和、またはアリール環である。

【００３５】

適切な保護基－　本明細書で使用される用語「適切な保護基」は、化合物内のその位置によってアミノ保護基または水酸基保護基をさし、Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｔ．Ｗ．ＧｒｅｅｎｅおよびＰ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ，第３編，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，１９９９のＰｒｏｔｅｃｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐｓに詳しく記載されているものも含む。

【００３６】

適切なアミノ保護基は、メチルカルバメート、エチルカルバメート、９－フルオレニルメチルカルバメート（Ｆｍｏｃ）、９－（２－スルホ）フルオレニルメチルカルバメート、９－（２，７－ジブロモ）フルオロエルメチルカルバメート、２，７－ジ－ｔ－ブチル－［９－（１０，１０－ジオキソ－１０，１０，１０，１０－テトラヒドロチオキサンチル）］メチルカルバメート（ＤＢＤ－Ｔｍｏｃ）、４－メトキシフェナシルカルバメート（Ｐｈｅｎｏｃ）、２，２，２－トリクロロエチルカルバメート（Ｔｒｏｃ）、２－トリメチルシリルエチルカルバメート（Ｔｅｏｃ）、２－フェニルエチルカルバメート（ｈＺ）、１－（１－アダマンチル）－１－メチルエチルカルバメート（Ａｄｐｏｃ）、１，１－ジメチル－２－ハロエチルカルバメート、１，１－ジメチル－２，２－ジブロモエチルカルバメート（ＤＢ－ｔ－ＢＯＣ）、１，１－ジメチル－２，２，２－トリクロロエチル

カルバメート（ＴＣＢＯＣ）、１－メチル－１－（４－ビフェニルイル）エチルカルバメート（Ｂｐｏｃ）、１－（３，５－ジ－ｔ－ブチルフェニル）－１－メチルエチルカルバメート（ｔ－Ｂｕｍｅｏｃ）、２－（２’－および４’－ピリジル）エチルカルバメート（Ｐｙｏｃ）、２－（Ｎ，Ｎ－ジシクロヘキシルカルボキサミド）エチルカルバメート、ｔ－ブチルカルバメート（ＢＯＣ）、１－アダマンチルカルバメート（Ａｄｏｃ）、ビニルカルバメート（Ｖｏｃ）、アリルカルバメート（Ａｌｌｏｃ）、１－イソプロピルアリルカルバメート（Ｉｐａｏｃ）、シンナミルカルバメート（Ｃｏｃ）、４－ニトロシンナミルカルバメート（Ｎｏｃ）、８－キノリルカルバメート、Ｎ－ヒドロキシピペリジニルカルバメート、アルキルジチオカルバメート、ベンジルカルバメート（Ｃｂｚ）、ｐ－メトキシベンジルカルバメート（Ｍｏｚ）、ｐ－ニトベンジルカルバメート、ｐ－ブロモベンジルカルバメート、ｐ－クロロベンジルカルバメート、２，４－ジクロロベンジルカルバメート、４－メチルスルフィニルベンジルカルバメート（Ｍｓｚ）、９－アントリルメチルカルバメート、ジフェニルメチルカルバメート、２－メチルチオエチルカルバメート、２－メチルスルホニルエチルカルバメート、２－（ｐ－トルエンスルホニル）エチルカルバメート、［２－（１，３－ジチアニル）］メチルカルバメート（Ｄｍｏｃ）、４－メチルチオフェニルカルバメート（Ｍｔｐｃ）、２，４－ジメチルチオフェニルカルバメート（Ｂｍｐｃ）、２－ホスホニオエチルカルバメート（Ｐｅｏｃ）、２－トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバメート（Ｐｐｏｃ）、１，１－ジメチル－２－シアノエチルカルバメート、ｍ－クロロ－ｐ－アシルオキシベンジルカルバメート、ｐ－（ジヒドロキシボリル）ベンジルカルバメート、５－ベンズイソキサゾリルメチルカルバメート、２－（トリフルオロメチル）－６－クロモニルメチルカルバメート（Ｔｃｒｏｃ）、ｍ－ニトロフェニルカルバメート、３，５－ジメトキシベンジルカルバメート、ｏ－ニトロベンジルカルバメート、３，４－ジメトキシ－６－ニトロベンジルカルバメート、フェニル（ｏ－ニトロフェニル）メチルカルバメート、フェノチアジニル－（１０）－カルボニル誘導体、Ｎ’－ｐ－トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、Ｎ’－フェニルアミノチオカルボニル誘導体、ｔ－アミルカルバメート、Ｓ－ベンジルチオカルバメート、ｐ－シアノベンジルカルバメート、シクロブチルカルバメート、シクロヘキシルカルバメート、シクロペンチルカルバメート、シクロプロピルメチルカルバメート、ｐ－デシルオキシベンジルカルバメート、２，２－ジメトキシカルボニルビニルカルバメート、ｏ－（Ｎ，Ｎ－ジメチルカルボキサミド）ベンジルカルバメート、１，１－ジメチル－３－（Ｎ，Ｎ－ジメチルカルボキサミド）プロピルカルバメート、１，１－ジメチルプロピニルカルバメート、ジ（２－ピリジル）メチルカルバメート、２－フラニルメチルカルバメート、２－ヨードエチルカルバメート、イソボルニルカルバメート、イソブチルカルバメート、イソニコチニルカルバメート、ｐ－（ｐ’－メトキシフェニルアゾ）ベンジルカルバメート、１－メチルシクロブチルカルバメート、１－メチルシクロヘキシルカルバメート、１－メチル－１－シクロプロピルメチルカルバメート、１－メチル－１－（３、５－ジメトキシフェニル）エチルカルバメート、１－メチル－１－（ｐ－フェニルアゾフェニル）エチルカルバメート、１－メチル－１－フェニルエチルカルバメート、１－メチル－１－（４－ピリジル）エチルカルバメート、フェニルカルバメート、ｐ－（フェニルアゾ）ベンジルカルバメート、２，４，６－トリ－ｔ－ブチルフェニルカルバメート、４－（トリメチルアンモニウム）ベンジルカルバメート、２，４，６－トリメチルベンジルカルバメート、ホルムアミド、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトアミド、フェニルアセトアミド、３－フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、３－ピリジルカルボキサミド、Ｎ－ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、ベンズアミド、ｐ－フェニルベンズアミド、ｏ－ニトフェニルアセトアミド、ｏ－ニトロフェノキシアセトアミド、アセトアセトアミド、（Ｎ’－ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ）アセトアミド、３－（ｐ－ヒドロキシフェニル）プロパンアミド、３－（ｏ－ニトロフェニル）プロパンアミド、２－メチル－２－（ｏ－ニトロフェノキシ）プロパンアミド、２－メチル－２－（ｏ－フェニルアゾフェノキシ）プロパンアミド、４－クロロブタンアミド、３－メチル－３－ニトロブタンアミド、ｏ－ニトロシンナミド、Ｎ－アセチルメチオニ

ン誘導体、ｏ－ニトロベンズアミド、ｏ－（ベンゾイルオキシメチル）ベンズアミド、４，５－ジフェニル－３－オキサゾリン－２－オン、Ｎ－フタルイミド、Ｎ－ジチアスクシンイミド（Ｄｔｓ）、Ｎ－２，３－ジフェニルマレイミド、Ｎ－２，５－ジメチルピロール、Ｎ－１，１，４，４－テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物（ＳＴＡＢＡＳＥ）、５－置換１，３－ジメチル－１，３，５－トリアザシクロヘキサン－２－オン、５－置換１，３－ジベンジル－１，３，５－トリアザシクロヘキサン－２－オン、１－置換３，５－ジニトロ－４－ピリドン、Ｎ－メチルアミン、Ｎ－アリルアミン、Ｎ－［２－（トリメチルシリル）エトキシ］メチルアミン（ＳＥＭ）、Ｎ－３－アセトキシプロピルアミン、Ｎ－（１－イソプロピル－４－ニトロ－２－オキソ－３－ピロリン－３－イル）アミン、四級アンモニウム塩、Ｎ－ベンジルアミン、Ｎ－ジ（４－メトキシフェニル）メチルアミン、Ｎ－５－ジベンゾスベリルアミン、Ｎ－トリフェニルメチルアミン（Ｔｒ）、Ｎ－［（４－メトキシフェニル）ジフェニルメチル］アミン（ＭＭＴｒ）、Ｎ－９－フェニルフルオレニルアミン（ＰｈＦ）、Ｎ－２，７－ジクロロ－９－フルオレニルメチレンアミン、Ｎ－フェロセニルメチルアミノ（Ｆｃｍ）、Ｎ－２－ピコリルアミノＮ’－オキシド、Ｎ－１，１－ジメチルチオメチレンアミン、Ｎ－ベンジリデンアミン、Ｎ－ｐ－メトキシベンジリデンアミン、Ｎ－ジフェニルメチレンアミン、Ｎ－［（２－ピリジル）メシチル］メチレンアミン、Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノメチレン）アミン、Ｎ，Ｎ’－イソプロピリデンジアミン、Ｎ－ｐ－ニトロベンジリデンアミン、Ｎ－サリチリデンアミン、Ｎ－５－クロロサリチリデンアミン、Ｎ－（５－クロロ－２－ヒドロキシフェニル）フェニルメチレンアミン、Ｎ－シクロヘキシリデンアミン、Ｎ－（５，５－ジメチル－３－オキソ－１－シクロヘキセニル）アミン、Ｎ－ボラン誘導体、Ｎ－ジフェニルボリン酸誘導体、Ｎ－［フェニル（ペンタカルボニルクロムまたはタングステン）カルボニル］アミン、Ｎ－銅キレート、Ｎ－亜鉛キレート、Ｎ－ニトロアミン、Ｎ－ニトロソアミン、アミンＮ－オキシド、ジフェニルホスフィンアミド（Ｄｐｐ）、ジメチルチオホスフィンアミド（Ｍｐｔ）、ジフェニルチオホスフィンアミド（Ｐｐｔ）、ジアルキルホスホロアミデート、ジベンジルホスホロアミデート、ジフェニルホスホロアミデート、ベンゼンスルフェンアミド、ｏ－ニトロベンゼンスルフェンアミド（Ｎｐｓ）、２，４－ジニトロベンゼンスルフェンアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェンアミド、２－ニトロ－４－メトキシベンゼンスルフェンアミド、トリフェニルメチルスルフェンアミド、３－ニトロピリジンスルフェンアミド（Ｎｐｙｓ）、ｐ－トルエンスルホンアミド（Ｔｓ）、ベンゼンスルホンアミド、２，３，６，－トリメチル－４－メトキシベンゼンスルホンアミド（Ｍｔｒ）、２，４，６－トリメトキシベンゼンスルホンアミド（Ｍｔｂ）、２，６－ジメチル－４－メトキシベンゼンスルホンアミド（Ｐｍｅ）、２，３，５，６－テトラメチル－４－メトキシベンゼンスルホンアミド（Ｍｔｅ）、４－メトキシベンゼンスルホンアミド（Ｍｂｓ）、２，４，６－トリメチルベンゼンスルホンアミド（Ｍｔｓ）、２，６－ジメトキシ－４－メチルベンゼンスルホンアミド（ｉＭｄｓ）、２，２，５，７，８－ペンタメチルクロマン－６－スルホンアミド（Ｐｍｃ）、メタンスルホンアミド（Ｍｓ）、β－トリメチルシリルエタンスルホンアミド（ＳＥＳ）、９－アントラセンスルホンアミド、４－（４’，８’－ジメトキシナフチルメチル）ベンゼンスルホンアミド（ＤＮＭＢＳ）、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミド、およびフェナシルスルホンアミドが挙げられる。

【００３７】

適切な水酸基保護基として、メチル、メトキシルメチル（ＭＯＭ）、メチルチオメチル（ＭＴＭ）、ｔ－ブチルチオメチル、（フェニルジメチルシリル）メトキシメチル（ＳＭＯＭ）、ベンジルオキシメチル（ＢＯＭ）、ｐ－メトキシベンジルオキシメチル（ＰＭＢＭ）、（４－メトキシフェノキシ）メチル（ｐ－ＡＯＭ）、グアイアコールメチル（ＧＵＭ）、ｔ－ブトキシメチル、４－ペンテニルオキシメチル（ＰＯＭ）、シロキシメチル、２－メトキシエトキシメチル（ＭＥＭ）、２，２，２－トリクロロエトキシメチル、ビス（２－クロロエトキシ）メチル、２－（トリメチルシリル）エトキシメチル（ＳＥＭＯＲ）、テトラヒドロピラニル（ＴＨＰ）、３－ブロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロ

チオピラニル、１－メトキシシクロヘキシル、４－メトキシテトラヒドロピラニル（ＭＴＨＰ）、４－メトキシテトラヒドロチオピラニル、４－メトキシテトラヒドロチオピラニルＳ，Ｓ－ジオキシド、１－［（２－クロロ－４－メチル）フェニル］－４－メトキシピペリジン－４－イル（ＣＴＭＰ）、１，４－ジオキサン－２－イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、２，３，３ａ，４，５，６，７，７ａ－オクタヒドロ－７，８，８－トリメチル－４，７－メタノベンゾフラン－２－イル、１－エトキシエチル、１－（２－クロロエトキシ）エチル、１－メチル－１－メトキシエチル、１－メチル－１－ベンジルオキシエチル、１－メチル－１－ベンジルオキシ－２－フルオロエチル、２，２，２－トリクロロエチル、２－トリメチルシリルエチル、２－（フェニルセレニル）エチル、ｔ－ブチル、アリル、ｐ－クロロフェニル、ｐ－メトキシフェニル、２，４－ジニトロフェニル、ベンジル、ｐ－メトキシベンジル、３，４－ジメトキシベンジル、ｏ－ニトロベンジル、ｐ－ニトロベンジル、ｐ－ハロベンジル、２，６－ジクロロベンジル、ｐ－シアノベンジル、ｐ－フェニルベンジル、２－ピコリル、４－ピコリル、３－メチル－２－ピコリルＮ－オキシド、ジフェニルメチル、ｐ，ｐ’－ジニトロベンズヒドリル、５－ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、α－ナフチルジフェニルメチル、ｐ－メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ（ｐ－メトキシフェニル）フェニルメチル、トリ（ｐ－メトキシフェニル）メチル、４－（４’－ブロモフェナシルオキシフェニル）ジフェニルメチル、４，４’，４’’－トリス（４，５－ジクロロフタルイミドフェニル）メチル、４，４’，４’’－トリス（レブリノイルオキシフェニル）メチル、４，４’，４’’－トリス（ベンゾイルオキシフェニル）メチル、３－（イミダゾール－１－イル）ビス（４’，４’’－ジメトキシフェニル）メチル、１，１－ビス（４－メトキシフェニル）－１’－ピレニルメチル、９－アントリル、９－（９－フェニル）キサンテニル、９－（９－フェニル－１０－オキソ）アントリル、１，３－ベンゾジチオラン－２－イル、ベンズイソチアゾリルＳ，Ｓ－ジオキシド、トリメチルシリル（ＴＭＳ）、トリエチルシリル（ＴＥＳ）、トリイソプロピルシリル（ＴＩＰＳ）、ジメチルイソプロピルシリル（ＩＰＤＭＳ）、ジエチルイソプロピルシリル（ＤＥＩＰＳ）、ジメチルｔヘキシルシリル、ｔ－ブチルジメチルシリル（ＴＢＤＭＳ）、ｔ－ブチルジフェニルシリル（ＴＢＤＰＳ）、トリベンジルシリル、トリ－ｐ－キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル（ＤＰＭＳ）、Ｊ－ブチルメトキシフェニルシリル（ＴＢＭＰＳ）、ホルメート、ベンゾイルホルメート、アセテート、クロロアセテート、ジクロロアセテート、トリクロロアセテート、トリフルオロアセテート、メトキシアセテート、トリフェニルメトキシアセテート、フェノキシアセテート、ｐ－クロロフェノキシアセテート、３－フェニルプロピオネート、４－オキソペンタノエート（レブリネート）、４，４－（エチレンジチオ）ペンタノエート（レブリノイルジチオアセタール）、ピバロエート、アダマントエート、クロトネート、４－メトキシクロトネート、ベンゾエート、ｐ－フェニルベンゾエート、２，４，６－トリメチルベンゾエート（メシトエート）、アルキルメチルカーボネート、９－フルオレニルメチルカーボネート（Ｆｍｏｃ）、アルキルエチルカーボネート、アルキル２，２，２－トリクロロエチルカーボネート（Ｔｒｏｃ）、２－（トリメチルシリル）エチルカーボネート（ＴＭＳＥＣ）、２－（フェニルスルホニル）エチルカーボネート（Ｐｓｅｃ）、２－（トリフェニルホスホニオ）エチルカーボネート（Ｐｅｏｃ）、アルキルイソブチルカーボネート、アルキルビニルカーボネートアルキルアリルカーボネート、アルキルｐ－ニトロフェニルカーボネート、アルキルベンジルカーボネート、アルキルｐ－メトキシベンジルカーボネート、アルキル３，４－ジメトキシベンジルカーボネート、アルキルｏ－ニトロベンジルカーボネート、アルキルｐ－ニトロベンジルカーボネート、アルキルＳ－ベンジルチオカーボネート、４－エトキシ－１－ナフチルカーボネート、メチルジチオカーボネート、２－ヨードベンゾエート、４－アジドブチレート、４－ニトロ－４－メチルペンタノエート、ｏ－（ジブロモメチル）ベンゾエート、２－ホルミルベンゼンスルホネート、２－（メチルチオメトキシ）エチル、４－（メチルチオメトキシ）ブチレート、２－（メチルチオメトキシメチル）ベンゾエート、２，６－ジクロロ－４－メチルフェノキシアセテート、２，６－ジクロロ－４－（１，１，３，３－テトラメチル

ブチル）フェノキシアセテート、２，４－ビス（１，１－ジメチルプロピル）フェノキシアセテート、クロロジフェニルアセテート、イソブチレート、モノスクシノエート、（Ｅ）－２－メチル－２－ブテノエート、ｏ－（メトキシカルボニル）ベンゾエート、α－ナフトエート、ニトレート、アルキルＮ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルホスホロジアミデート、アルキルＮ－フェニルカルバメート、ボレート、ジメチルホスフィノチオイル、アルキル２，４－ジニトロフェニルスルフェネート、サルフェート、メタンスルホネート（メシレート）、ベンジルスルホネート、およびトシレート（Ｔｓ）が挙げられる。１，２－または１，３－ジオールを保護するための保護基として、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、１－ｔ－ブチルエチリデンケタール、１－フェニルエチリデンケタール、（４－メトキシフェニル）エチリデンアセタール、２，２，２－トリクロロエチリデンアセタール、アセトニド、シクロペンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘプチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、ｐ－メトキシベンジリデンアセタール、２，４－ジメトキシベンジリデンケタール、３，４－ジメトキシベンジリデンアセタール、２－ニトロベンジリデンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、ジメトキシメチレンオルソエステル、１－メトキシエチリデンオルソエステル、１－エトキシエチリジンオルソエステル、１，２－ジメトキシエチリデンオルソエステル、α－メトキシベンジリデンオルソエステル、１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）エチリデン誘導体、α－（Ｎ，Ｎ’－ジメチルアミノ）ベンジリデン誘導体、２－オキサシクロペンチリデンオルソエステル、ジ－ｔ－ブチルシリレン基（ＤＴＢＳ）、１，３－（１，１，３，３－テトライソプロピルジシロキサニリデン）誘導体（ＴＩＰＤＳ）、テトラ－ｔ－ブトキシジシロキサン－１，３－ジイリデン誘導体（ＴＢＤＳ）、環状カーボネート、環状ボロネート、エチルボロネートおよびフェニルボロネートが挙げられる。

【００３８】

化学的な可変要素（たとえば、Ｒ基）が、環の結合を横切った結合に付いているように示されている場合は、いかなるときも、１個以上のそのような変化し得る部分が、場合によっては、その横切った結合を有する環に結合していることを意味する。そのような環上の各Ｒ基は、任意の適切な位置に結合することができ、これは、一般的に、該基は、親環上の水素原子の代わりに結合していることを意味すると理解される。これは、２個のＲ基が、同じ環原子に結合し得る可能性を含む。さらに、複数のＲ基が環に存在する場合、それぞれのＲ基は、それに結合する他のＲ基と同じ、または異なってもよく、各基は、たとえ、同じ識別記号で表されていても、同じ分子上の他で結合してもよい他の基から、独立して定義される。

【００３９】

生物分解性－　本明細書で使用される用語「生物分解性」は、生理学的なまたはエンドソーム条件下で分解する（すなわち、少なくとも何らかの共有結合構造を失う）分子をさす。生物分解性分子は、必ずしも、加水分解的に分解可能である必要はなく、分解に酵素作用を必要としてもよい。

【００４０】

生体分子－　本明細書で使用される用語「生体分子」は、一般的に細胞および組織で見出される、天然のまたは人工的に作り出される（たとえば、合成法または組換え法）の分子（たとえば、ポリペプチド、アミノ酸、ポリヌクレオチド、ヌクレオチド、多糖類、糖質、脂質、核タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、ステロイド、代謝産物など）をさす。生体分子の特定のクラスとして、酵素、受容体、神経伝達物質、ホルモン、サイトカイン、成長因子および走化因子のような細胞応答調節剤、抗体、ワクチン、ハプテン、毒物、インターフェロン、リボザイム、アンチセンス剤、プラスミド、ＤＮＡおよびＲＮＡが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４１】

薬物－　本明細書で使用される用語「薬物」は、生物学的現象を変化する、抑制する、活性化する、または他に影響する小分子または生体分子をさす。たとえば、該薬物として

、抗ＡＩＤＳ物質、抗癌物質、抗生物質、抗糖尿病性物質、免疫抑制剤、抗ウィルス物質、酵素抑制剤、神経毒、オピオイド、睡眠薬、抗ヒスタミン、潤滑剤、トランキライザー、抗痙攣薬、筋弛緩剤および抗パーキンソン物質、チャネルブロッカー、縮瞳薬およびコリン作用抑制剤を始めとする鎮痙薬および筋肉収縮剤、抗緑内障化合物、抗寄生虫化合物および／または抗原虫化合物、細胞成長抑制剤および抗接着分子を始めとする細胞外基質相互作用の調節剤、血管拡張剤、ＤＮＡ、ＲＮＡまたはタンパク質合成の抑制剤、降圧剤、鎮痛剤、解熱剤、ステロイド系および非ステロイド系抗炎症剤、抗血管新生因子、抗分泌因子、抗凝固剤および／または抗血栓剤、局所麻酔薬、点眼剤、プロスタグランジン、抗うつ剤、抗神経病物質、制吐剤、およびイメージング剤が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の使用に適した、例示的な薬物のさらに完成したリストは、Ａｘｅｌ　Ｋｌｅｅｍａｎｎおよび Ｊｕｒｇｅｎ　Ｅｎｇｅｌによる「Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｕｂｓｔａｎｃｅｓ：Ｓｙｎｔｈｅｓｅｓ，Ｐａｔｅｎｔｓ，Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」，Ｔｈｉｅｍｅ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，１９９９；Ｓｕｓａｎ　Ｂｕｄａｖａｒｉらにより編集された「Ｍｅｒｃｋ　Ｉｎｄｅｘ：Ａｎ　Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ　ｏｆ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｄｒｕｇｓ，ａｎｄ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ」，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，１９９６，およびUｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｐｈａｒｍｃｏｐｅｉａｌ　Ｃｏｎｖｅｎｔｉｏｎ社により刊行されたｔｈｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ－２５／Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ－２０，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ　ＭＤ，２００１にある。

【００４２】

外因性－　本明細書で使用される「外因性」分子は、患者に投与されない限り、患者の体内には有意濃度で存在しない分子である。ある実施形態では、患者は、哺乳類、たとえば、ヒト、イヌ、ネコ、ラット、小型ブタなどである。本明細書で使用される場合、その種の患者の正常血清中に０．１ｍＭ未満の分子しか含まれていない場合、分子は、患者中に有意な濃度で存在していない。ある実施形態では、患者の正常血清に、０．０８ｍＭ未満、０．０６ｍＭ未満、または０．０４ｍＭ未満の分子を含んでもよい。

【００４３】

多分岐－　本明細書で使用される「多分岐」構造は、少なくとも１つの分岐された分岐部（たとえば、デンドリマー構造）を含む共有結合構造である。多分岐構造は、ポリマーおよび／または非ポリマー下部構造を含んでもよい。

【００４４】

正常血清－　本明細書で使用される「正常血清」は、５人以上の非糖尿病患者からのほぼ等しい量の凝固全血の液状部をプールすることにより得られる血清である。非糖尿病のヒト患者は、採血のとき、糖尿病の症状のない１８～３０歳の患者を無作為に選択する。

【００４５】

ポリマー－　本明細書で使用される「ポリマー」または「ポリマー構造」は、一連の共有結合されたモノマーを含む構造である。ポリマーは、１種類のモノマー、または複数の種類のモノマーから作り出すこともできる。したがって、用語「ポリマー」は、異なる種類のモノマーがポリマー全体内に分離してグループ化しているブロック共重合体を始めとする共重合体を包含する。ポリマーは、直鎖でも分岐状でも可能である。

【００４６】

ポリヌクレオチド－　本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドのポリマーである。用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用してもよい。該ポリマーとして、天然ヌクレオシド（すなわち、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシンおよびデオキシシチジン）、ヌクレオシド類縁体（たとえば、２－アミノアデノシン、２－チオチミジン、イノシン、ピロロ－ピリミジン、３－メチルアデノシン、５－メチルシチジン、Ｃ５－ブロモウリジン、Ｃ５－フルオロウリジン、Ｃ５－ヨードウリジン、Ｃ５－プロピニル－ウリジン、Ｃ５－プロピニル－シチジン、Ｃ５－メチルシチジン、７－デアザアデノシン、７－デアザグアノシン、８－オキソアデノシン

、８－オキソグアノシン、Ｏ（６）－メチルグアニン、４－アセチルシチジン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、ジヒドロウリジン、メチルプソイドウリジン、１－メチルアデノシン、１－メチルグアノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、および２－チオシチジン）、化学的に修飾された塩基、生物学的に修飾された塩基（たとえば、メチル化塩基）、介在塩基、修飾糖類（たとえば、２’－フルオロリボース、リボース、２’－デオキシリボース、２’－Ｏ－メチルシチジン、アラビノース、およびヘキソース）、または修飾されたリン酸塩基（たとえば、ホスホロチオエートおよび５’－Ｎ－ホスホルアミダイト結合）が挙げられる。

【００４７】

ポリペプチド－　本明細書で使用される「ポリペプチド」は、アミノ酸のポリマーである。用語「ポリペプチド」、「タンパク質」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は互換的に使用してもよい。ポリペプチドは、当分野で知られているように、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸（すなわち、自然界に存在しないが、ポリペプチド鎖に導入することができる化合物）および／またはアミノ酸類縁体を含有してもよい。また、ポリペプチド中の１個以上のアミノ酸残基は、たとえば、炭水化物基、リン酸塩基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、複合体化、官能基化または他の修飾用のリンカーなどのような化学物質の添加によって修飾してもよい。これらの修飾として、ペプチドの環化、Ｄ－アミノ酸の導入などが挙げられる。

【００４８】

多糖類－　本明細書で使用される「多糖類」は、糖のポリマーである。用語「多糖類」、「炭水化物」および「オリゴ糖」は、互換的に使用してもよい。ポリマーとして、天然の糖類（たとえば、アラビノース、リキソース、リボース、キシロース、リブロース、キシルロース、アロース、アルトロース、ガラクトース、グルコース、グロース、イドース、マンノース、タロース、フルクトース、プシコース、ソルボース、タガトース、マンノヘプツロース、セドヘプツロース、オクトロースおよびシアロース）および／または修飾糖類（たとえば、２’－フルオロリボース、２’－デオキシリボース、およびヘキソース）が挙げられる。例示的な二糖類として、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ゲンチオビオース、イソマルトース、コジビオース、ラミナリビオース、マンノビオース、メリビオース、ニゲロース、ルチノースおよびキシロビオースが挙げられる。

【００４９】

小分子－　本明細書で使用される用語「小分子」は、天然のものまたは人工的に作られた（たとえば、化学合成により）に関わらず、比較的低い分子量を有する分子をさす。通常、小分子は、単量体であり、約１５００Ｄａ未満の分子量を有する。好ましい小分子は、動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトにおいて、局所または全身的な効果を作り出す点で、生物学的に活性である。ある好ましい実施形態では、小分子は薬物である。薬物は、適切な政府機関や団体によって、使用に際し安全で効果的であることがすでに示されているものが好ましいが、必ずしもこれに限らない。たとえば、ＦＤＡ、２１Ｃ．Ｆ．Ｒ．§§３３０．５、３３１～３６１および４４０～４６０に挙げられているヒトに使用される薬物、およびＦＤＡ、２１Ｃ．Ｆ．Ｒ．§§５００～５８９に挙げられている獣医学で使用される薬物は、全て、本発明による使用にふさわしいと考えられる。

【００５０】

治療－　本明細書で使用される用語「治療」（または「治療している」、「治療された」、「治療」など）は、状態（たとえば、糖尿病）、症状または状態の症状（たとえば、高血糖症）、またはある状態に対する素因を、緩和、軽減、変更、寛解、改善または影響する目的で、本開示の複合体を、それを必要とする対象へ投与することをさす。

【図面の簡単な説明】

【００５１】

【図１】（ａ）スカフォールドとしてＴＳＡＴ－Ｃ６を、リガンドとしてＡＥＭを、および薬物としてＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを使用して合成した例示的な複合体（複合体Ｉ－１）で得たＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムと、（ｂ）実施例

３２により合成したインスリン－グリコーゲン複合体で得たＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムとの比較。
【図２】ＰＢＳ緩衝液中での複合体Ｉ－１（□）、複合体Ｉ－１６（△）、およびＲＨＩ（◆）の加速安定性試験（ＡＳＴ）凝集アッセイ。複合体は、医薬品等級のＲＨＩより大きく促進された安定性を示す。
【図３】加速安定性試験（ＡＳＴ）化学安定性の結果。（ａ）ＲＰ－ＨＰＬＣ　ＡＳＴ複合体の安定性および（ｂ）ＡＳＴ複合体のＬＣ／ＭＳデータ。
【図４】新しい複合体（▲）および７２時間ＡＳＴ複合体（○）に関する、非糖尿病雄スプラーグ－ドーレイ（ＳＤ）ラット（ｎ＝４）におけるインビボ生物活性。７２時間ＡＳＴ複合体の生物活性は、新しい複合体の生物活性と区別できなかった（全ての時点に関し、ｐ＞０．２１）。
【図５】約２０Ｕのインスリン当量／ｋｇの用量で皮下注射された、（▲）インスリン－デキストラン（７０Ｋ）に関する、非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）における血中グルコースの低下プロフィール。
【図６】約２．５Ｕのインスリン当量／ｋｇの用量で皮下注射された、（■）インスリン－グリコーゲン（ＩＩ型カキ）に関する、非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）における血中グルコースの低下プロフィール。
【図７】雄非糖尿病ＳＤラットにおける、３．５Ｕ当量インスリン／ｋｇの皮下用量の（◆）ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２インスリン複合体Ｉ－１、および（□）溶解型組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）から得た血糖値。それぞれのデータは、ｎ＝６ラットの平均および標準偏差を表す。
【図８】雄非糖尿病ＳＤラットにおける、３．５Ｕ当量インスリン／ｋｇの皮下用量の（◆）ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２インスリン複合体Ｉ－１、および（□）溶解型組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）から得た血清インスリン濃度。それぞれのデータは、ｎ＝６ラットの平均および標準偏差を表す。
【図９】非糖尿病雄ＳＤラットへ、０時で、ＴＳＡＴ－６－ＡＥＭ－２（Ｂ２９－置換）インスリン複合体Ｉ－７（５Ｕ／ｋｇ）の皮下注射後の（◆）血清インスリン濃度および（○）血糖値のグラフ。データは、ｎ＝３匹のラットの平均および標準偏差を示す。
【図１０】ＡＥＧ、ＡＥＭ、ＡＥＢＭおよびＡＥＴＭの化学構造式。これらの糖に基づくリガンドのＣｏｎＡに対する親和力は、図のように増加する。
【図１１】いくつかの例示的な非デンドリマー複合体中間体の化学構造式。説明の目的のために、糖を含む例示的な複合体リガンドも示す（ＡＥＧ、ＡＥＭ、ＡＥＢＭ、ＡＥＴＭ、ＡＥＧＡおよびＡＥＦ）。
【図１２】非糖尿病雄ＳＤラットへ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２インスリン複合体Ｉ－１（◆）、溶解型組換えヒトインスリン（○）およびインスリンリスプロ（△）（全て、３．５Ｕ／ｋｇ）を皮下注射した後の、血清インスリン濃度（左）および血糖値（右）のグラフ。データは、ｎ＝６匹のラットの平均および標準偏差を示す。
【図１３】非糖尿病雄ＳＤラット（各製剤に関し、ｎ＝３）へ、０時で、示された異なるリガンドを有するＴＳＡＴ－Ｃ６に基づくインスリン複合体を皮下注射した後の、血糖値のグラフ。グルコース低下応答は、リガンドの親和力が増すにしたがって、減少する。
【図１４】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２複合体Ｉ－１（３．５Ｕ／ｋｇ）を皮下注射した後の、血清インスリン濃度（左）および血糖値（右）のグラフ。
【図１５】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＢＭ－２Ｉ－３複合体（５Ｕ／ｋｇ）を皮下注射した後の、血清インスリン濃度（左）および血糖値（右）のグラフ。
【図１６】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＢＭ－１ＡＥＴＭ－１複合体Ｉ－４（５Ｕ／ｋｇ）を皮下注射した後の、血清インスリン濃度（左）および血糖値（右）のグラフ。
【図１７】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２

複合体Ｉ－２（５Ｕ／ｋｇ）を皮下注射した後の、血清インスリン濃度（左）および血糖値（右）のグラフ。
【図１８】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－２の皮下注射、次いで１５分後、α－メチルマンノース（左）または生理食塩水（右）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。α－メチルマンノースは、ＣｏｎＡのようなレクチンに結合するためにＡＥＴＭと競合することができる、非常に高い親和力を持つ糖である。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールの変化は、非常に大きい（ｐ＜０．０５）。
【図１９】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で可溶性組換えヒトインスリンの皮下注射、次いで１５分後、α－メチルマンノース（左）または生理食塩水（右）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールの変化は見られない（ｐ＞＞０．０５）。
【図２０】非糖尿病雄ＳＤラット（各実験に関してｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－２を皮下注射し、次いで１５分後、α－メチルマンノース（◆）、Ｌ－フコース（■）または生理食塩水（▲）の腹腔内注射の後の血清インスリン濃度のグラフ。図示するように、α－メチルマンノースおよびＬ－フコースは、同じ種類の効果を示したようである。
【図２１】非糖尿病雄ＳＤラットへ、０時で、ＴＳＡＴ－６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－２を皮下注射し、次いで１５分後、グルコース（◆）、ガラクトース（■）または生理食塩水（▲）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度のグラフ。図示するように、ガラクトースは、生理食塩水と比べて何の効果も示さない。グルコースは小さな効果を示すように見えるが、これは、複合体からの外因性インスリンが、グルコースを素早く低下させるという事実により複雑化され、したがって、α－メチルマンノースおよびＬ－フコースで観察された持続効果はない。
【図２２】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、（ａ）１Ｍのα－メチルマンノースを含有する緩衝生理食塩水または（ｂ）緩衝生理食塩水のいずれかに５Ｕ／ｋｇ溶解した、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－２溶液を皮下注射した後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。（ａ）では、続いて１５分で、ラットに、同体積の（ｂ）で使用した生理食塩水を、複合体溶液で使用した部位とは異なる皮下部位に注射した。（ｂ）では、続いて１５分で、ラットに、同体積の（ａ）で使用した１Ｍのα－メチルマンノース溶液を、複合体溶液で使用した部位とは異なる皮下部位に注射した。図示するように、実験（ｂ）に比べて実験（ａ）では、血清インスリン濃度は増加せず、血糖値は減少しない。
【図２３】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－２溶液を５Ｕ／ｋｇで皮下注射した、血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。複合体注射後、１５分、６０分、１２０分または２４０分で、ラットに、４ｇ／ｋｇのａ－ＭＭの腹腔内注射を行った。
【図２４】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－６－ＡＥＭ－２複合体Ｉ－７の皮下注射、次いで１５分後、α－メチルマンノース（左）または生理食塩水（右）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。α－メチルマンノースは、ＣｏｎＡのようなレクチンに結合するためにＡＥＭと競合することができる、非常に高親和性の糖である。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールの変化は、非常に大きい（ｐ＜０．０５）。
【図２５】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時で、ＴＳＡＴ－６－ＧＡ－２複合体Ｉ－５の皮下注射、次いで１５分後、α－メチルマンノース（左）または生理食塩水（右）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。α－メチルマンノースは、ＣｏｎＡのようなレクチンに結合するためにＡＥＭと競合することができる、非常に高親和性の糖である。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールの変化は、有意でない。
【図２６】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時でＤＳＳ－Ｃ６－ＡＥＭ－１複合体

Ｉ－８の皮下注射、次いで１５分後、α－メチルマンノース（左）または生理食塩水（右）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。α－メチルマンノースは、ＣｏｎＡのようなレクチンに結合するためにＡＥＭと競合することができる、非常に高親和性の糖である。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールの変化は、有意でない。

【図２７】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時でＴＳＰＥ－ＡＥＭ－３　複合体Ｉ－９の皮下注射、次いで１５分後、α－メチルマンノース（左）または生理食塩水（右）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。α－メチルマンノースは、ＣｏｎＡのようなレクチンに結合するためにＡＥＭと競合することができる、非常に高親和性の糖である。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールの変化は、有意である（ｐ＜０．０５）。

【図２８】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時でＤＳＳ－ＡＥＴＭ－Ｉ　複合体Ｉ－１０の皮下注射、次いで１５分後、α－メチルマンノース（左）または生理食塩水（右）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。α－メチルマンノースは、ＣｏｎＡのようなレクチンに結合するためにＡＥＭと競合することができる、非常に高親和性の糖である。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールの変化は、有意である（ｐ＜０．０５）。

【図２９】非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）へ、０時でＴＳＰＥ－ＡＥＴＭ－３複合体Ｉ－１１の皮下注射、次いで１５分後、α－メチルマンノース（左）または生理食塩水（右）の腹腔内注射後の血清インスリン濃度および血糖値のグラフ。α－メチルマンノースは、ＣｏｎＡのようなレクチンに結合するためにＡＥＭと競合することができる、非常に高親和性の糖である。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールの変化は、有意である（ｐ＜０．０５）。

【図３０】非糖尿病雄ＳＤラット（１群当たりｎ＝３）へ、（◆）ＲＨＩおよび（▲）ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－６、０．４ｍｇ／ｋｇの静脈注射に関し、時間を関数とする血清インスリン濃度のグラフ。データ（ｎ＝３の平均）は、２分画２項分布モデルを使用して適合させる。ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体は、ＲＨＩよりも非常に速く血清から排出される。

【図３１－１】非糖尿病雄ＳＤラット（１用量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）複合体を皮下注射し、その後２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射した血清インスリン濃度（◆）および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５１に記載のように調製した。（ａ）１×Ｐ－１×Ｚ、（ｂ）４×Ｐ－４×Ｚ、および（ｃ）１０×Ｐ－４×Ｚ。

【図３１－２】非糖尿病雄ＳＤラット（１用量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）複合体を皮下注射し、その後２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射した血清インスリン濃度（◆）および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５１に記載のように調製した。（ａ）１×Ｐ－１×Ｚ、（ｂ）４×Ｐ－４×Ｚ、および（ｃ）１０×Ｐ－４×Ｚ。

【図３２】非糖尿病雄ＳＤラット（１用量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）複合体を皮下注射、その後２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射した血清インスリン濃度（◆）および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５２に記載のように調製した。（ａ）４×Ｐ－１×Ｚおよび（ｂ）４×Ｐ－２×Ｚ。

【図３３】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（１－６）複合体の皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５２に記載のように調製した。（ａ）１０×Ｐ－１×Ｚおよび（ｂ）１０×Ｐ－２×Ｚ。

【図３４】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）複合体を皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／

ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５３に記載のように調製した。（ａ）クレゾールなしおよび（ｂ）４×クレゾール。

【図３５－１】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）複合体を皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５４に記載のように調製した。（ａ）塩なし、（ｂ）３．３×塩および（ｃ）グリセロール。

【図３５－２】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）複合体を皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５４に記載のように調製した。（ａ）塩なし、（ｂ）３．３×塩および（ｃ）グリセロール。

【図３６－１】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）複合体を皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５５に記載するように、非修飾インスリンの量を連続して増加させて調製した。（ａ）１／２４、（ｂ）１／１２および（ｃ）１／６。

【図３６－２】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）複合体を皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。製剤は、実施例５５に記載するように、非修飾インスリンの量を連続して増加させて調製した。（ａ）１／２４、（ｂ）１／１２および（ｃ）１／６。

【図３７】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、実施例５６に従って調製した持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－６の皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。

【図３８】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、実施例５７に従って調製した持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－６の皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。物質は、２－８℃で、（ａ）１週間または（ｂ）２週間保存した後注射した。

【図３９】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、実施例５７に従って調製した持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－６の皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。物質は、室温で、（ａ）１週間または（ｂ）２週間保存した後注射した。

【図４０－１】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、実施例５８に従って調製した持続型複合体製剤の皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。複合体は、ＤＳＳ－ＡＥＭ－１（Ｉ－８）、ＤＳＳ－ＡＥＴＭ－１（Ｉ－１０）、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２（Ｉ－７）、Ｃ６－アミド－ＡＥＭ－２（Ｉ－１７）、ＴＳＰＥ－ＡＥＭ－３（Ｉ－９）およびＴＳＰＥ－ＡＥＴＭ－３（Ｉ－１１）である。

【図４０－２】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、実施例５８に従って調製した持続型複合体製剤の皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。複合体は、ＤＳＳ－ＡＥＭ－１（Ｉ－８）、ＤＳＳ－ＡＥＴＭ－１（Ｉ－１０）、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２（Ｉ－７）、Ｃ６－アミド－ＡＥＭ－２（Ｉ－１７）、ＴＳＰＥ－ＡＥＭ－３（Ｉ－９）およびＴＳＰＥ－ＡＥＴＭ－３（Ｉ－１１）である。

【図４０－３】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、実施例５８に

従って調製した持続型複合体製剤の皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。複合体は、ＤＳＳ－ＡＥＭ－１（Ｉ－８）、ＤＳＳ－ＡＥＴＭ－１（Ｉ－１０）、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２（Ｉ－７）、Ｃ６－アミド－ＡＥＭ－２（Ｉ－１７）、ＴＳＰＥ－ＡＥＭ－３（Ｉ－９）およびＴＳＰＥ－ＡＥＴＭ－３（Ｉ－１１）である。

【図４１】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、実施例５９に従って調製した持続型複合体製剤の皮下注射、次いで２４０分でα－メチルマンノース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。複合体は、（ａ）ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）および（ｂ）ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＧＡ－２である。

【図４２－１】非糖尿病（正常）および糖尿病（ＤＭ）雄ＳＤラットへ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｂ２９－置換、ＰＺＩ）複合体Ｉ－６を皮下注射した血糖値のグラフ。複合体は、５、１０および２０Ｕ／ｋｇで投与した。図示するように、非糖尿病雄ＳＤラットは、低血糖を示さなかったが、糖尿病雄ＳＤラットにおけるグルコース濃度は、最も高い用量で８時間にわたり続く明らかな用量比例応答を示した。

【図４２－２】非糖尿病（正常）および糖尿病（ＤＭ）雄ＳＤラットへ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｂ２９－置換、ＰＺＩ）複合体Ｉ－６を皮下注射した血糖値のグラフ。複合体は、５、１０および２０Ｕ／ｋｇで投与した。図示するように、非糖尿病雄ＳＤラットは、低血糖を示さなかったが、糖尿病雄ＳＤラットにおけるグルコース濃度は、最も高い用量で８時間にわたり続く明らかな用量比例応答を示した。

【図４３】非糖尿病（正常）および糖尿病（ＤＭ）雄ＳＤラットへ、０時で、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｂ２９－置換、ＰＺＩ）複合体Ｉ－６を皮下注射した、２４時間にわたる血糖値のグラフ。複合体は、７、１４および２８Ｕ／ｋｇで投与した。

【図４４】非糖尿病雄ＳＤラット（投与量当たりｎ＝３）へ、０時で、実施例６７に従って調製した持続型複合体Ｉ－１７製剤の皮下注射、次いで２４０分でグルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射後の血清インスリン（◆）濃度および血糖値（○）のグラフ。

【図４５－１】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－２】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－３】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－４】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－５】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－６】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－７】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－８】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－９】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－１０】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－１１】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－１２】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－１３】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトイ

ンスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－１４】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－１５】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－１６】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４５－１７】例示的なインスリン複合体の構造式。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４５で示される楕円の中の記号「インスリン」は、本来、野生型ヒトインスリンを表すものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。

【図４６】グルコースを含むまたは含まない複合体Ｉ－６もしくはＲＨＩ（左）またはα－メチルマンノース（右）の注射の、時間を関数とする血清インスリン濃度のグラフ。

【図４７－１】最初の２つのパネルは、非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）への、ＲＨＩ（３．５ｍＵ／分）またはＩ－６（１５ｍＵ／分）の定速静脈内（ｉ．ｖ．）注入後の血清インスリン濃度（◆）および血糖値（○）のグラフを示す。グルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射は、２４０分に行った。次の３つのパネルでは、グルコース（４、２または１ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射を２４０分に行った場合の、非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）への、ＲＨＩ（３．５ｍＵ／分）またはＩ－６（１５ｍＵ／分）の定速静脈内（ｉ．ｖ．）注入後の血清インスリン濃度（◆）およびグルコース濃度（○）を比較する。

【図４７－２】最初の２つのパネルは、非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）への、ＲＨＩ（３．５ｍＵ／分）またはＩ－６（１５ｍＵ／分）の定速静脈内（ｉ．ｖ．）注入後の血清インスリン濃度（◆）および血糖値（○）のグラフを示す。グルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射は、２４０分に行った。次の３つのパネルでは、グルコース（４、２または１ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射を２４０分に行った場合の、非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）への、ＲＨＩ（３．５ｍＵ／分）またはＩ－６（１５ｍＵ／分）の定速静脈内（ｉ．ｖ．）注入後の血清インスリン濃度（◆）およびグルコース濃度（○）を比較する。

【図４７－３】最初の２つのパネルは、非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）への、ＲＨＩ（３．５ｍＵ／分）またはＩ－６（１５ｍＵ／分）の定速静脈内（ｉ．ｖ．）注入後の血清インスリン濃度（◆）および血糖値（○）のグラフを示す。グルコース（４ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射は、２４０分に行った。次の３つのパネルでは、グルコース（４、２または１ｇ／ｋｇ）の腹腔内注射を２４０分に行った場合の、非糖尿病雄ＳＤラット（ｎ＝３）への、ＲＨＩ（３．５ｍＵ／分）またはＩ－６（１５ｍＵ／分）の定速静脈内（ｉ．ｖ．）

注入後の血清インスリン濃度（◆）およびグルコース濃度（○）を比較する。
【図４８】グルコースまたはα－メチルマンノースとともに、あるいはなしで、複合体の注射の後の時間の関数としての血清インスリン濃度のグラフ。ラットに、糖質溶液を、ｔ＝－６０分で静脈内注入し、試験中ずっと続けた。各複合体は、０時で１０Ｕ／ｋｇ静脈内注射し、血清複合体濃度を測定した。
【図４９】非糖尿病小型ブタ糖依存性排出半減期試験において試験した、インスリン複合体の比較。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図４９の模式図は、主に、野生型ヒトインスリンを表すためのものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。
【図５０】グルコース、α－メチルマンノースまたは生理食塩水注入の間の非糖尿病小型ブタにおけるβ－フェーズ排出半減期の結果。
【図５１】デュアル血管アクセスポート（１検査当たりｎ＝３）を装着した非糖尿病雄Ｙｕｃａｔａｎ小型ブタへ、０．１Ｕ／ｋｇの静脈注射した、（ａ）組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）および（ｂ）ジ－Ｓｕｂ－ＡＥＴＭ－２インスリン複合体ＩＩ－２の血清濃度のグラフ。各実験で、動物は、（◆）α－メチルマンノース（ａ－ＭＭ）溶液（２５％ｗ／ｖを８０ｍｌ／時間の定速度で注入）を静脈に注入し、または（▲）溶液の注入はなしであった。データは、２分画２項分布モデルから誘導された曲線に適合させた平均値としてプロットする。
【図５２】（ａ）糖静脈注入なしまたは（ｂ）α－メチルマンノース（ａ－ＭＭ）を静脈注入（２５％ｗ／ｖを８０ｍｌ／時間の定速度で注入）の条件下で、デュアル血管アクセスポート（１検査当たりｎ＝３）を装着した非糖尿病雄Ｙｕｃａｔａｎ小型ブタに、０．１Ｕ／ｋｇで複合体を静脈注射した、血中グルコース低下曲線。（■）ＲＨＩ、（○）Ｉ－７、（◆）Ｉ－６、（▲）Ｉ－１１および（●）ＩＩ－２。
【図５３】可溶性ジ－Ｓｕｂ－ＡＥＴＭ－２インスリン複合体ＩＩ－２を０．２５、０．５０および１．００Ｕ／ｋｇの用量で０時でｓｕｂ－Ｑ注射した後、絶食条件下での、（ａ、－、塗りつぶした記号）アロキサン糖尿病Ｙｕｃａｔａｎ小型ブタ（１用量当たりｎ＝３）および（ｂ、－－－－、白抜きの記号）非糖尿病Ｙｕｃａｔａｎ小型ブタ（１用量当たりｎ＝３）における血糖値。データは、平均値±１標準偏差でプロットしている。注）図５３（ｂ）のスケールは、明確にするため、拡大している。
【図５４】溶解型組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）を（▲、△）０．０６３および（■、□）０．１２５Ｕ／ｋｇの用量で０時でｓｕｂ－Ｑ注射した後、絶食条件下での、（ａ、－、塗りつぶした記号）アロキサン糖尿病Ｙｕｃａｔａｎ小型ブタ（１用量当たりｎ＝３）および（ｂ、－－－－、白抜きの記号）非糖尿病Ｙｕｃａｔａｎ小型ブタ（１用量当たりｎ＝３）における血糖値。データは、平均値±１標準偏差でプロットしている。注：図５４（ｂ）のスケールは、明確にするため、拡大している。
【図５５】非糖尿病小型ブタの糖依存性排出半減期検査での使用のための追加のインスリン複合体。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（図６３の野生型ヒトインスリンの構造を参照）。したがって、図５５の図解は、主に、野生型ヒトインスリンを表すことを目的とする。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。
【図５６】ラットおよび小型ブタにおけるＲＨＩまたは複合体Ｉ－６の投与の、時間を関数とする血清インスリン濃度のグラフ。
【図５７】追加のインスリン複合体の、小型ブタにおける静注半減期結果のまとめ。
【図５８】糖尿病および正常小型ブタにおける、０．２５、０．５および１Ｕ／ｋｇのインスリン複合体ＩＩ－２の単一皮下注射後の血清インスリン濃度のグラフ。
【図５９】ａ－ＭＭ注入ありまたはなしの小型ブタにおける、ＲＨＩ、および複合体Ｉ－６、ＩＩ－３およびＩＩ－２の静脈注射後の血清グルコース濃度のグラフ。

【図６０】インスリン複合体Ｉ－６、Ｉ－１２、ＩＩ－２およびＩＩ－３とともに、コントロールとして小型ブタで試験した選択されたインスリン複合体（Ｃ３、Ｃ４およびＣ７）の構造。実施例で記載するように、これらの複合体は、それぞれ、組換え野生型ヒトインスリンで調製した（野生型ヒトインスリンの構造式に関しては、図６３を参照）。したがって、図６０の模式図は、主に、野生型ヒトインスリンを表すためのものである。本明細書で検討するように、本開示が特に、野生型ヒトインスリン以外のインスリン分子を含む、これらおよび他の複合体の変種も包含することは理解される。
【図６１】ａ－ＭＭ注入ありまたはなしの小型ブタにおける、ＲＨＩおよびインスリン複合体Ｉ－６、Ｉ－１２、ＩＩ－２およびＣ３の静脈注射後の血清グルコース濃度のグラフ。
【図６２】ａ－ＭＭ注入ありまたはなしの小型ブタにおける、ＲＨＩおよびインスリン複合体Ｃ７、Ｃ４、ＩＩ－３およびＩＩ－２の静脈注射後の血清グルコース濃度のグラフ。
【図６３】野生型ヒトインスリンの構造。
【発明を実施するための形態】
【００５２】
本出願は、特許および非特許文献を含む数多くの文献を引用する。これらの文献はそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【００５３】
一態様において、本開示は、インスリンの薬物動態学的（ＰＫ）および／または薬力学的（ＰＤ）プロファイルを、グルコースのような糖の全身濃度に応答する様式で、制御する方法を提供する。実施例で検討するように、本方法は、部分的に、あるインスリン複合体を高親和性糖リガンドを含むように修飾した場合、たとえＣｏｎＡのような外因性多価糖が結合する分子が存在しなくても、糖濃度の変化に応答するＰＫ／ＰＤプロフィールを発揮するように作ることができたという発見に基づいている。この発見は、予期し得ぬことであり、単純なレクチンのない糖応答性薬物システムを作る前例のない機会を提供する。別の態様では、該開示は、例示的な複合体およびそれらを製造する方法を提供する。一般的に、これらの複合体は、薬物およびそれぞれ糖を含む１種以上の別のリガンドを含む。ある実施形態では、リガンドは、内因性糖に結合する分子に結合するために、糖（たとえば、グルコースまたはマンノース）と競合することができる。ある実施形態では、リガンドは、ＣｏｎＡと結合するために、グルコースまたはマンノースと競合することができる。以下でより詳しく検討するように、ある実施形態では、リガンドおよび薬物は、複合体骨格に、共有結合でまたは非共有結合で結合してもよい。ある実施形態では、骨格は非重合体である。ある実施形態では、複合体は、多分散指数１、および約２０，０００Ｄａ未満のＭＷを有してもよい。ある実施形態では、本明細書で定義し記載する式（Ｉ）または（ＩＩ）の複合体である。ある実施形態では、複合体は、持続型である（すなわち、溶解型組換えヒトインスリン、すなわちＲＨＩより持続するＰＫプロフィールを示す）。
【００５４】
以下により詳しく検討するように、本明細書で記載される方法、複合体および製剤は、断じて、インスリンの送達に限定されるものではなく、任意の薬物を送達するのに使用することができることは理解されることである。さらに、本方法は、グルコース以外の糖に応答して薬物を送達するために使用してもよいことは理解されることである。特に、実施例で検討するように、例示的な複合体は、α－メチルマンノースおよびＬ－フコースのような外因性糖に応答することも示されている。ある実施形態では、これは、これらの外因性糖の１つの投与によってコントロールすることができる（すなわち、内因性グルコースの変動によるコントロールに代えて、あるいはそれに加えて）複合体を調製するために使用することができる。
【００５５】
複合体：
一態様において、本開示は、薬物と第一の糖を含むリガンドとを含む結晶性複合体を提供する。リガンド（または、複合体が複数のリガンドを含む場合は、複数のリガンド）は

、複合体を哺乳類に投与した場合、少なくとも１つの複合体の薬物動態または薬力学的特性が、第二の糖の血清濃度に対し感受性を示すようなものである。ある実施形態では、複合体のＰＫおよび／またはＰＤ特性は、グルコースのような内在性糖の血清濃度に対して感受性を示す。ある実施形態では、複合体のＰＫおよび／またはＰＤ特性は、外因性糖、たとえば、マンノース、Ｌ－フコース、Ｎ－アセチルグルコサミンおよび／またはα－メチルマンノース（これらに限定されない）の血清濃度に対して感受性を示す。

【００５６】

以下でより詳しく検討するように、ある実施形態では、リガンドおよび薬物は、共有結合または非共有結合で、複合体骨格に結合してもよい。

【００５７】

ある実施形態では、薬物のない複合体の分子量は、約１０，０００Ｄａ未満である。たとえば、薬物のない複合体の分子量は、約２５０～約５，０００Ｄａ、約４５０～約３，５００Ｄａ、約７５０～約２，５００Ｄａ、または約９００～約２，０００Ｄａの範囲であってもよい。

【００５８】

ある実施形態では、薬物を含む複合体の分子量は、約２０，０００Ｄａ未満である。たとえば、薬物を含む複合体の分子量は、約２，０００～約１８，０００Ｄａ、約４，０００～約１５，０００Ｄａ、約５，０００～約１００００Ｄａ、または約６，５００～約８，０００Ｄａの範囲であってもよい。

【００５９】

ある実施形態では、複合体は、独特の分子量を有する（すなわち、分子量の多分散指数を有する）。

【００６０】

ＰＫおよびＰＤ特性：

種々の実施形態で、複合体（すなわち複合体化薬物および／または化学的または酵素的分解により複合体から放出された薬物）の薬物動態および／または薬力学的挙動は、糖の血清濃度の変化によって変更されてもよい。

【００６１】

たとえば、薬物動態（ＰＫ）的な見方から、糖（たとえば、グルコース）の血清濃度が増えた場合、または糖の血清濃度が閾値を横切った場合（たとえば、正常グルコース濃度を超えた場合）、血清濃度曲線は上方にシフトする。

【００６２】

ある実施形態では、絶食させかつ高血糖状態の哺乳類に投与した場合、複合体の血清濃度曲線は、実質的に異なる。本明細書で使用される用語「実質的に異なる」は、２つの曲線がスチューデントｔ検定で測定して統計的に異なる（ｐ＜０．０５）ことを意味する。本明細書で使用される用語「絶食させた状態」は、血清濃度曲線が、５個以上の絶食させた非糖尿病個体からのデータを組合わせて得られたことを意味する。ある実施形態では、絶食させた、非糖尿病個体は、採血時に糖尿病の症状がなく、採血時前１２時間は食事をしていない無作為に選択された１８～３０歳のヒトである。本明細書で使用される用語「高血糖状態」は、血清濃度曲線が、高血糖状態（グルコースC_{max}が、絶食状態下で観察された平均グルコース濃度を少なくとも１００ｍｇ／ｄＬ上回る）が、複合体およびグルコースの並行投与によって誘発された、５個以上の絶食させた非糖尿病個体からのデータを組合わせることによって得られたことを意味する。複合体およびグルコースの並行投与は、グルコースC_{max}が、複合体が血清中に測定可能な濃度で存在する時間中に起こることを必要とするだけである。たとえば、グルコース注射（または摂取）は、複合体を投与する直前、同時または直後に行うことができる。ある実施形態では、複合体およびグルコースが、異なる経路によってまたは異なる部位に投与される。たとえば、ある実施形態では、複合体を皮下投与し、グルコースを経口または静脈内に投与する。

【００６３】

ある実施形態では、複合体の血清C_{max}は、絶食させた状態に比べて高血糖状態下の

ほうが高い。これに加え、または代わりに、ある実施形態では、複合体の曲線下の血清面積（ＡＵＣ）は、絶食させた状態に比べて高血糖状態下のほうが高い。種々の実施形態で、複合体の血清排出速度は、絶食させた状態に比べて高血糖状態下のほうが遅い。実施例で検討するように、本発明者らは、ある実施形態で、複合体の血清濃度曲線を、１つは短半減期および１つは長半減期の２分画２項分布モデルを使用して、適合させることができることを発見した。長半減期は、特に、グルコース濃度に対して感受性を示すようである。したがって、ある実施形態では、長半減期は、絶食させた状態と比べて高血糖状態下がより長い。ある実施形態では、絶食させた状態として、１００ｍｇ／ｄＬ未満（たとえば、８０ｍｇ／ｄＬ、７０ｍｇ／ｄＬ、６０ｍｇ／ｄＬ、５０ｍｇ／ｄＬなど）のグルコース$Ｃ_{ｍａｘ}$を含む。ある実施形態では、高血糖状態として、２００ｍｇ／ｄＬを超える（たとえば３００ｍｇ／ｄＬ、４００ｍｇ／ｄＬ、５００ｍｇ／ｄＬ、６００ｍｇ／ｄＬなど）グルコース$Ｃ_{ｍａｘ}$を含む。平均血清残存時間（ＭＲＴ）、平均血清吸収時間（ＭＡＴ）などのような他のＰＫパラメータも先に記載したパラメータの代わりに、あるいはそれと組合わせて使用できることは理解されることである。

【００６４】

ヒト、イヌ、ネコおよびラットにおけるグルコース濃度の正常範囲は、６０～２００ｍｇ／ｄＬである。当業者であれば、異なる正常範囲を有する種に関する以下の値を推定することができる（たとえば、小型ブタのグルコース濃度の正常範囲は、４０～１５０ｍｇ／ｄｌである）。６０ｍｇ／ｄＬ未満のグルコース濃度は、低血糖と考えられる。２００ｍｇ／ｄＬを超えるグルコース濃度は、高血糖と考えられる。ある実施形態では、複合体のＰＫ特性を、グルコースクランプ法（実施例参照）を使用して試験してもよく、５０および２００ｍｇ／ｄＬ、５０および３００ｍｇ／ｄＬ、５０および４００ｍｇ／ｄＬ、５０および５００ｍｇ／ｄＬ、５０および６００ｍｇ／ｄＬ、１００および２００ｍｇ／ｄＬ、１００および３００ｍｇ／ｄＬ、１００および４００ｍｇ／ｄＬ、１００および５００ｍｇ／ｄＬ、１００および６００ｍｇ／ｄＬ、２００および３００ｍｇ／ｄＬ、２００および４００ｍｇ／ｄＬ、２００および５００ｍｇ／ｄＬ、２００および６００ｍｇ／ｄＬなどのグルコース濃度で投与した場合、複合体の血清濃度曲線は、実質的に異なり得る。これに加えてまたは代わりに、血清$Ｔ_{ｍａｘ}$、血清$Ｃ_{ｍａｘ}$、平均血清残存時間（ＭＲＴ）、平均血清吸収時間（ＭＡＴ）および／または血清半減期は、２種類のグルコース濃度で、実質的に異なり得る。以下で検討するように、ある実施形態では、１００ｍｇ／ｄＬおよび３００ｍｇ／ｄＬを、グルコース濃度の比較に使用してもよい。しかし、本開示は、以下の組の任意の１つ（限定ではない）を始めとする、比較グルコース濃度の代わりの組に関するこれらの実施形態のそれぞれを包含することは理解されることである。５０および２００ｍｇ／ｄＬ、５０および３００ｍｇ／ｄＬ、５０および４００ｍｇ／ｄＬ、５０および５００ｍｇ／ｄＬ、５０および６００ｍｇ／ｄＬ、１００および２００ｍｇ／ｄＬ、１００および４００ｍｇ／ｄＬ、１００および５００ｍｇ／ｄＬ、１００および６００ｍｇ／ｄＬ、２００および３００ｍｇ／ｄＬ、２００および４００ｍｇ／ｄＬ、２００および５００ｍｇ／ｄＬ、２００および６００ｍｇ／ｄＬなど。

【００６５】

したがって、ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬグルコース）の高い濃度で哺乳類に投与した場合、複合体の$Ｃ_{ｍａｘ}$はより高い。ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬグルコース）の高い濃度で哺乳類に投与した場合、複合体の$Ｃ_{ｍａｘ}$は、少なくとも５０％（たとえば、少なくとも１００％、少なくとも２００％または少なくとも４００％）高い。

【００６６】

ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬグルコース）の高い濃度で哺乳類に投与した場合、複合体のＡＵＣはより高い。ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬグルコース）の高い濃度で哺乳類に投与した場合、複合体のＡＵＣは、少なくとも５０％（たとえば、少

なくとも１００％、少なくとも２００％または少なくとも４００％）高い。
【００６７】
ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬグルコース）の高い濃度で哺乳類に投与した場合、複合体の血清排出速度はより遅い。ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、１００対３００ｍｇ／ｄＬグルコース）の低い濃度で哺乳類に投与した場合、複合体の血清排出速度は、少なくとも２５％（たとえば、少なくとも５０％、少なくとも１００％、少なくとも２００％、または少なくとも４００％）速い。
【００６８】
実施例で検討するように、本発明者らは、ある実施形態で、複合体の血清濃度曲線を、１つは短半減期および１つは長半減期の２分画２項分布モデルを使用して、適合させることができることを発見した。長半減期は、特に、グルコース濃度に対して感受性を示すようである。したがって、ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬグルコース）の高い濃度で哺乳類に投与した場合、長半減期はより長くなる。ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬグルコース）の高い濃度で哺乳類に投与した場合、長半減期は、少なくとも５０％（たとえば、少なくとも１００％、少なくとも２００％または少なくとも４００％）長い。
【００６９】
ある実施形態では、本開示は、複合体の血清濃度曲線を、２つの異なるグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬのグルコース）で得、２つの曲線を、１つは短半減期および１つは長半減期の２分画２項分布モデルを使用して適合し、および２つのグルコース濃度下で得られる長半減期を比較する方法を提供する。ある実施形態では、この方法を、１種以上の複合体のグルコース感受性を試験または比較するアッセイとして使用してもよい。
【００７０】
ある実施形態では、本開示は、複合体化薬物（たとえば、本開示のインスリン複合体）および薬物の複合体化されていないもの（たとえば、ＲＨＩ）の血清濃度曲線を、同じ条件（たとえば、絶食条件）下で得、２つの曲線は、１つは短半減期および１つは長半減期の２分画２項分布モデルを使用して適合し、および複合体化薬物および複合体化されていない薬物で得られた長半減期を比較する方法を提供する。ある実施形態では、この方法を、複合体化されていない薬物より迅速に排除される複合体を同定するアッセイとして使用してもよい。
【００７１】
ある実施形態では、高血糖状態下の哺乳類に投与した場合、複合体の血清濃度曲線は、薬物を複合体化されていない変種の血清濃度曲線と実質的に同じである。本明細書で使用される用語「実質的に同じ」は、スチューデントｔ検定によって測定して、２つの曲線の間に統計的差異がない（ｐ＞０．０５）ことを意味する。ある実施形態では、絶食させた状態下で投与した場合、複合体の血清濃度曲線は、薬物の複合体化されていない変種の血清濃度曲線と実質的に異なる。ある実施形態では、高血糖状態下で投与した場合、複合体の血清濃度曲線は、薬物の複合体化されていない変種の血清濃度曲線と実質的に同じであり、絶食させた状態下で投与した場合、実質的に異なる。ある実施形態では、高血糖状態として、２００ｍｇ／ｄＬを超える（たとえば３００ｍｇ／ｄＬ、４００ｍｇ／ｄＬ、５００ｍｇ／ｄＬ、６００ｍｇ／ｄＬなど）グルコースC_{max}を含む。ある実施形態では、絶食させた状態として、１００ｍｇ／ｄＬ未満（たとえば、８０ｍｇ／ｄＬ、７０ｍｇ／ｄＬ、６０ｍｇ／ｄＬ、５０ｍｇ／ｄＬなど）のグルコースC_{max}を含む。血清T_{max}、血清C_{max}、ＡＵＣ、平均血清残存時間（ＭＲＴ）、平均血清吸収時間（ＭＡＴ）および／または血清半減期のような先に記載したＰＫパラメータの任意のものを比較することもできることは理解されることである。
【００７２】
薬力学的（ＰＤ）的な見方から、グルコース濃度が増加する、またはグルコース濃度が

閾値を横切る、すなわち正常グルコース濃度より高い場合、複合体の生物活性は増加し得る。ある実施形態では、複合体の生物活性は、高血糖状態と比べた場合、絶食させた状態下で投与した場合がより低い。ある実施形態では、絶食させた状態として、１００ｍｇ／ｄＬ未満（たとえば、８０ｍｇ／ｄＬ、７０ｍｇ／ｄＬ、６０ｍｇ／ｄＬ、５０ｍｇ／ｄＬなど）のグルコース$Ｃ_{ｍａｘ}$を含む。ある実施形態では、高血糖状態として、２００ｍｇ／ｄＬを超える（たとえば３００ｍｇ／ｄＬ、４００ｍｇ／ｄＬ、５００ｍｇ／ｄＬ、６００ｍｇ／ｄＬなど）グルコース$Ｃ_{ｍａｘ}$を含む。

【００７３】

ある実施形態では、複合体のＰＤ特性は、定常グルコース濃度を維持するのに必要なグルコース注入速度（ＧＩＲ）を測定することにより、試験してもよい。そのような実施形態によれば、５０および２００ｍｇ／ｄＬ、５０および３００ｍｇ／ｄＬ、５０および４００ｍｇ／ｄＬ、５０および５００ｍｇ／ｄＬ、５０および６００ｍｇ／ｄＬ、１００および２００ｍｇ／ｄＬ、１００および３００ｍｇ／ｄＬ、１００および４００ｍｇ／ｄＬ、１００および５００ｍｇ／ｄＬ、１００および６００ｍｇ／ｄＬ、２００および３００ｍｇ／ｄＬ、２００および４００ｍｇ／ｄＬ、２００および５００ｍｇ／ｄＬ、２００および６００ｍｇ／ｄＬなどのグルコース濃度で投与した場合、複合体の生物活性は実質的に異なり得る。したがって、ある実施形態では、哺乳類に２つのグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬのグルコース）より高い濃度で投与した場合、複合体の生物活性はより高くなる。ある実施形態では、２種類のグルコース濃度（たとえば、３００対１００ｍｇ／ｄＬグルコース）の高い濃度で哺乳類に投与した場合、複合体の生物活性は、少なくとも２５％（たとえば、少なくとも５０％または少なくとも１００％）高い。

【００７４】

ある実施形態では、複合体は、薬物として、インスリン分子を含む。このような実施形態によると、最小血糖濃度に到達する時間（$Ｔ_{ｎａｄｉｒ}$）、血糖値が初期値のある割合未満を保つ持続時間（たとえば、初期値の７０％、$Ｔ_{７０％ＢＧＬ}$）などを比べることによってインスリンのＰＤ挙動を観察することができる。

【００７５】

一般的に、この項で検討したＰＫおよびＰＤ特性はどれも、種々の公開されている薬物動態および薬力学的方法の任意のものにしたがって測定できることは理解される（たとえば、皮下送達に適した方法について、Ｂａｕｄｙｓら，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．９：１７６－１８３，１９９８参照）。また、ＰＫおよび／またはＰＤ特性は、任意の哺乳類（たとえば、ヒト、ラット、ネコ、小型ブタ、イヌなど）において測定してもよいことも理解される。ある実施形態では、ＰＫおよび／またはＰＤ特性は、ヒトで測定される。ある実施形態では、ＰＫおよび／またはＰＤ特性は、ラットで測定される。ある実施形態では、ＰＫおよび／またはＰＤ特性は、小型ブタで測定される。ある実施形態では、ＰＫおよび／またはＰＤ特性は、イヌで測定される。

【００７６】

また、これまでグルコース応答性複合体に照らして記載してきたが、同じ特性およびアッセイを、外因性糖、たとえば、マンノース、Ｌ－フコース、Ｎ－アセチルグルコサミン、α－メチルマンノースなどを含む他の糖に応答する複合体にもあてはまることも理解される。以下および実施例でより詳しく検討するように、絶食および高血糖条件下でＰＫおよび／またはＰＤ特性を比較する代わりに、ＰＫおよび／またはＰＤ特性を、絶食条件下で、外因性糖の投与を伴う場合と伴わない場合とで比較してもよい。複合体は、投与された外因性糖の異なる$Ｃ_{ｍａｘ}$値に応答するよう設計することができることは理解される。

【００７７】

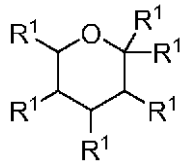
リガンド：

一般的に、複合体は、少なくとも１種のリガンドを含む。ある実施形態では、複合体は、単一のリガンドを含む。ある実施形態では、複合体は、少なくとも２個の分離リガンド、たとえば、２、３、４、５個またはそれ以上のリガンドを含む。複数のリガンドが存在する場合、該リガンドは、同じまたは異なる化学構造を有してもよい。

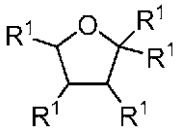
【００７８】
ある実施形態では、リガンドは、内在性糖結合分子（たとえば、界面活性タンパク質ＡおよびＤ、またはセレクチンファミリーのメンバーが挙げられるが、これらに限定されない）に結合する糖（たとえば、グルコースまたはマンノース）と競合することができる。ある実施形態では、リガンドは、細胞表面糖質受容体（たとえば、マクロファージマンノース受容体、グルコーストランスポータリガンド、内皮細胞糖質受容体、または肝細胞糖質受容体が挙げられるが、これらに限定されない）に結合する糖（たとえば、グルコースまたはマンノース）と競合することができる。ある実施形態では、リガンドは、内在性グルコース－結合分子（たとえば、界面活性タンパク質ＡおよびＤ、またはセレクチンファミリーのメンバーが挙げられるが、これらに限定されない）に結合するグルコースと競合することができる。ある実施形態では、リガンドは、非ヒトレクチン（たとえば、ＣｏｎＡ）に結合する糖と競合することができる。ある実施形態では、リガンドは、非ヒトレクチン（たとえば、ＣｏｎＡ）に結合するグルコースまたはマンノースと競合することができる。例示的なグルコース結合レクチンとして、カルネキシン、カルレティキュリン、Ｎ－アセチルグルコサミン受容体、セレクチン、アシアロ糖タンパク質受容体、コレクチン（マンノース結合レクチン）、マンノース受容体、アグリカン、バーシカン、ピスム・サティブム凝集素（ＰＳＡ）、ソラマメ・レクチン、レンズマメ・レクチン、ダイズ・レクチン、ピーナツ・レクチン、レンリソウ・レクチン、イガマメ・レクチン、ソフォラ・ジャポニカ・レクチン、ボーリンギア・ミルブラエディ（ｂｏｗｒｉｎｇｉａ　ｍｉｌｂｒａｅｄｉｉ）レクチン、コンカナバリンＡ（ＣｏｎＡ）およびポークウィード・マイトジェンが挙げられる。

【００７９】
ある実施形態では、リガンドは、式（ＩＩＩａ）または（ＩＩＩｂ）のリガンドである。

【化１】



IIIa



IIIb

【００８０】
（式中、
Ｒ^{1}は、それぞれ独立して、水素、－ＯＲ^{y}、－Ｎ（Ｒ^{y}）$_{2}$、－ＳＲ^{y}、－Ｏ－Ｙ、－Ｇ－ＺまたはＣＨ$_{2}$Ｒ^{X}であり；
Ｒ^{x}は、それぞれ独立して、水素、－ＯＲ^{y}、－Ｎ（Ｒ^{y}）$_{2}$、－ＳＲ^{y}または－Ｏ－Ｙであり；
Ｒ^{y}は、それぞれ独立して、－Ｒ^{2}、－ＳＯ$_{2}$Ｒ^{2}、－Ｓ（Ｏ）Ｒ^{2}、－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ^{2}）$_{2}$、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{2}、－ＣＯ$_{2}$Ｒ^{2}または－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{2}）$_{2}$であり；
Ｙは、それぞれ独立して、単糖、二糖、または三糖であり；
Ｇは、それぞれ独立して、共有結合、または場合によっては置換されたＣ$_{1-9}$アルキレンであり、ここで、Ｇの１個以上のメチレン単位は、場合によっては、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｎ（Ｒ^{2}）－、－Ｃ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{2}）－、－Ｎ（Ｒ^{2}）Ｃ（Ｏ）－、－Ｎ（Ｒ^{2}）Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ^{2}）－、－ＳＯ$_{2}$－、－ＳＯ$_{2}$Ｎ（Ｒ^{2}）－、－Ｎ（Ｒ^{2}）ＳＯ$_{2}$－または－Ｎ（Ｒ^{2}）ＳＯ$_{2}$Ｎ（Ｒ^{2}）－で置き換えられ；
Ｚは、それぞれ独立して、ハロゲン、－Ｎ（Ｒ^{2}）$_{2}$、－ＯＲ^{2}、－ＳＲ^{2}、－Ｎ$_{3}$、－Ｃ≡ＣＲ^{2}、－ＣＯ$_{2}$Ｒ^{2}、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{2}または－ＯＳＯ$_{2}$Ｒ^{2}であり；および
Ｒ^{2}は、それぞれ独立して、水素、または場合によっては置換された基であって、Ｃ$_{1}$

$_{-6}$脂肪族、フェニル、窒素、酸素またはイオウから選択される１～２個のヘテロ原子を有する４～７員複素環、または窒素、酸素またはイオウから選択される１～４個のヘテロ原子を有する５～６員単環式ヘテロアリール環から選択される基である。）

ある実施形態では、式（ＩＩＩａ）または（ＩＩＩｂ）のリガンドは、単糖である。ある実施形態では、該リガンドは二糖である。ある実施形態では、該リガンドは三糖である。ある実施形態では、該リガンドは四糖である。ある実施形態では、該リガンドは、合計４個以下の単糖部分を含む。

【００８１】

先に一般的に定義したように、各R^1は、独立して、水素、－OR^y、－$N(R^y)_2$、－SR^y、－Ｏ－Ｙ、－Ｇ－Ｚまたは－CH_2R^Xである。ある実施形態では、R^1は水素である。ある実施形態では、R^1は－ＯＨである。他の実施形態では、R^1は－ＮＨＣ（Ｏ）CH_3である。ある実施形態では、R^1は－Ｏ－Ｙである。他のある実施形態では、R^1は－Ｇ－Ｚである。いくつかの実施形態では、R^1は－CH_2ＯＨである。他の実施形態では、R^1は－CH_2－Ｏ－Ｙである。さらに他の実施形態では、R^1は－NH_2である。当業者であれば、式（ＩＩＩａ）または（ＩＩＩｂ）における各R^1置換基は、（Ｒ）または（Ｓ）立体化学であり得ることは理解する。

【００８２】

先に一般的に定義したように、R^xは、それぞれ独立して、水素、－OR^y、－$N(R^y)_2$、－SR^yまたは－Ｏ－Ｙである。いくつかの実施形態では、R^xは水素である。ある実施形態では、R^xは－ＯＨである。他の実施形態では、R^xは－Ｏ－Ｙである。

【００８３】

先に一般的に定義したように、R^yは、それぞれ独立して、－R^2、－SO_2R^2、－Ｓ（Ｏ）R^2、－Ｐ（Ｏ）$(OR^2)_2$、－Ｃ（Ｏ）R^2、－CO_2R^2または－Ｃ（Ｏ）Ｎ$(R^2)_2$である。いくつかの実施形態では、R^yは水素である。他の実施形態では、R^yは－R^2である。いくつかの実施形態では、R^yは－Ｃ（Ｏ）R^2である。ある実施形態では、R^yはアセチルである。他の実施形態では、R^yは－SO_2R^2、－Ｓ（Ｏ）R^2、－Ｐ（Ｏ）$(OR^2)_2$、－CO_2R^2または－Ｃ（Ｏ）Ｎ$(R^2)_2$である。

【００８４】

先に一般的に定義したように、Ｙは、単糖、二糖または三糖である。ある実施形態では、Ｙは単糖である。いくつかの実施形態では、Ｙは二糖である。他の実施形態では、Ｙは三糖である。いくつかの実施形態では、Ｙは、マンノース、グルコース、フルクトース、ガラクトース、ラムノースまたはキシロピラノースである。いくつかの実施形態では、Ｙは、スクロース、マルトース、ツラノース、トレハロース、セロビオースまたはラクトースである。ある実施形態では、Ｙはマンノースである。ある実施形態では、ＹはＤ－マンノースである。当業者は、糖Ｙは、アノマー炭素を介して－Ｏ－Ｙ酸素基に結合し、グルコシド結合を形成することを理解する。グルコシド結合は、α配置でもβ配置でもよい。

【００８５】

先に一般的に定義したように、各Ｇは、独立して、共有結合、または場合によっては置換されているC_{1-9}アルキレンであり、ここで、Ｇの１個以上のメチレン単位は、場合によっては、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｎ（R^2）－、－Ｃ（Ｏ）－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^2）－、－Ｎ（R^2）Ｃ（Ｏ）－、－Ｎ（R^2）Ｃ（Ｏ）Ｎ（R^2）－、－SO_2－、－SO_2Ｎ（R^2）－、－Ｎ（R^2）SO_2－または－Ｎ（R^2）SO_2Ｎ（R^2）－で置き換える。いくつかの実施形態では、Ｇは、共有結合である。ある実施形態では、Ｇは－Ｏ－C_{1-8}アルキレンである。ある実施形態では、Ｇは－ＯCH_2CH_2－である。

【００８６】

先に一般的に定義したように、各Ｚは、独立して、ハロゲン、－Ｎ$(R^2)_2$、－OR^2、－SR^2、－N_3、－Ｃ≡ＣR^2、－CO_2R^2、－Ｃ（Ｏ）R^2または－OSO_2R^2である。いくつかの実施形態では、Ｚは、ハロゲンまたは－OSO_2R^2である。

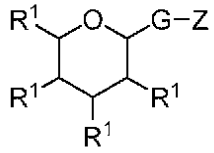
【００８７】

他の実施形態では、Ｚは－Ｎ$_3$または－Ｃ≡ＣＲ^{2}である。ある実施形態では、Ｚは、－Ｎ（Ｒ^2）$_2$、－ＯＲ^{2}または－ＳＲ^{2}である。ある実施形態では、Ｚは－ＳＨである。ある実施形態では、Ｚは－ＮＨ$_2$である。ある実施形態では、－Ｇ－Ｚは－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$である。

【００８８】

いくつかの実施形態では、式（ＩＩＩａ）のＣ１炭素上のＲ^{1}置換基は、－Ｇ－Ｚであり、式（ＩＩＩａ－ｉ）：

【化２】



IIIa-*i*

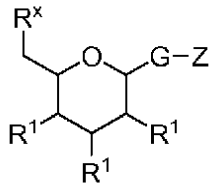
【００８９】

（式中、Ｒ^1、ＧおよびＺは、本明細書で定義し、記載した通りである）の化合物を与える。

【００９０】

いくつかの実施形態では、リガンドは、式（ＩＩＩａ－ｉｉ）：

【化３】



IIIa-*ii*

【００９１】

（式中、Ｒ^1、Ｒ^x、ＧおよびＺは、本明細書で定義し、記載した通りである）のリガンドである。

【００９２】

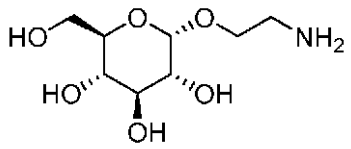
ある実施形態では、リガンドは、グルコースと同じ化学構造を有してもよいし、またはグルコースの化学的近縁種であってもよい。種々の実施形態では、リガンドは、たとえば、複合体のグルコース応答を微調整するために、グルコースとは異なる化学構造を有するのが有利な場合もある。たとえば、ある実施形態では、グルコース、マンノース、Ｌ－フコースまたはこれらの誘導体（たとえば、α－Ｌ－フコピラノシド、マンノサミン、β架橋Ｎ－アセチルマンノサミン、メチルグルコース、メチルマンノース、エチルグルコース、エチルマンノース、プロピルグルコース、プロピルマンノースなど）および／またはこれら高次組合せ（たとえば、ビマンノース、直鎖および／または分岐状トリマンノースなど）を含有するリガンドを使用してもよい。

【００９３】

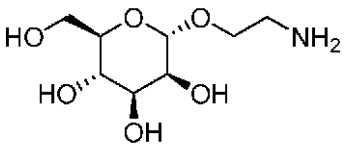
ある実施形態では、リガンドは、単糖を含む。ある実施形態では、リガンドは二糖を含む。ある実施形態では、リガンドは、三糖を含む。いくつかの実施形態では、リガンドは、糖と、１個以上のアミン基とを含む。ある実施形態では、糖およびアミン基は、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル基、たとえば、Ｃ$_1$－Ｃ$_3$アルキル基で分離されている。いくつかの実施形態では、リガンドは、アミノエチルグルコース（ＡＥＧ）である。いくつかの実施形態では、リガンドは、アミノエチルマンノース（ＡＥＭ）である。いくつかの実施形態では、リガンドは、アミノエチルビマンノース（ＡＥＢＭ）である。いくつかの実施形態では、リガンドは、アミノエチルトリマンノース（ＡＥＴＭ）である。いくつかの実施形態では

、リガンドは、β－アミノエチル－Ｎ－アセチルグルコサミン（ＡＥＧＡ）である。いくつかの実施形態では、リガンドは、アミノエチルフコース（ＡＥＦ）である。ある実施形態では、糖リガンドは、「Ｄ」配置のものである。他の実施形態では、糖リガンドは、「Ｌ」配置のものである。以下に、本発明者らはこれらの例示的なリガンドの構造を示す。当業者は、他の例示的なリガンドも、認識する。

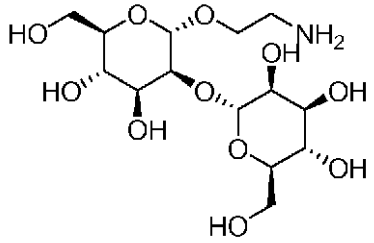
【化４】



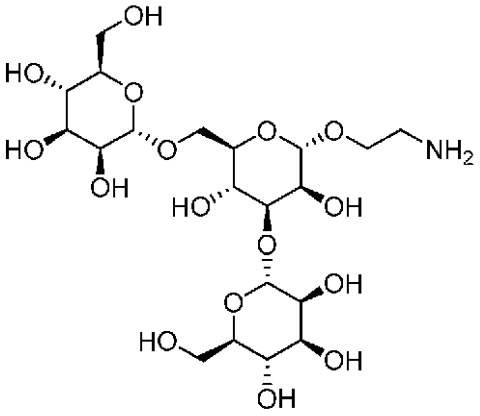
AEG



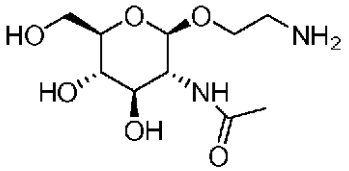
AEM



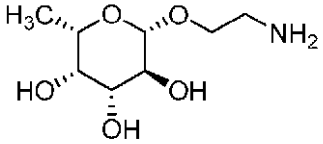
AEBM



AETM



AEGA



AEF

【００９４】

一般的に、リガンドは、薬物に直接または間接的に（すなわち、リンカーまたは骨格を介して）複合体化してもよい。以下により詳しく検討するように、リガンドは、複合体骨格内に自然に（たとえば、ポリマー骨格の一部として、またはモノマーの側鎖として）存在してもよい。あるいは（またはこれに加えて）、リガンドは、複合体骨格に人工的に導入（たとえば、複合体骨格に合成的に付加された化学基の形態で）されてもよい。ある実施形態では、複合体は、５個以上、１０個以上、または２０個以上のリガンドを含む骨格を含んでもよい。ある実施形態では、複合体は、１、２、３、４または５個のような少ない数の分離リガンドを含んでもよい。

【００９５】

ある実施形態では、少なくとも２個の分離リガンドが、異なる複合点を介して、薬物に複合体化している。ある実施形態では、少なくとも２個の分離リガンドが、これも薬物に複合体化している単一の複合体骨格に複合体化している。いくつかの実施形態では、ＡＥＴＭ、ＡＥＧ、ＡＥＭ、ＡＥＢＭ、ＡＥＧＡまたはＡＥＦのようなリガンドの少なくとも１個が、１個のインスリン分子に複合体化している。ある実施形態では、少なくとも１個のＡＥＴＭリガンドが、１個のインスリン分子に複合体化している。いくつかの実施形態では、ＡＥＴＭ、ＡＥＧ、ＡＥＭ、ＡＥＢＭ、ＡＥＧＡまたはＡＥＦのようなリガンドの少なくとも２個が、１個の複合点または複数の複合点のいずれかを介して、１個のインスリン分子に複合体化している。ある実施形態では、少なくとも２個のリガンドは、同じリ

ガンドではない。ある実施形態では、少なくとも２個のリガンドは、同じリガンドである。ある実施形態では、少なくとも２個のＡＥＴＭリガンドが、１個の複合点または複数の複合点のいずれかを介して、１個のインスリン分子に複合体化している。ある例示的な複合体骨格に関して以下でより詳しく検討するように、ある実施形態では、別のリガンドおよび薬物（たとえば、インスリン分子）は、それぞれ、分岐した複合体骨格の別の分岐部上に位置してもよい。たとえば、リガンドおよび薬物は、これらの分岐部の末端に位置してもよい。ある実施形態では、多分岐複合体骨格を使用してもよい。ポリマーおよび非ポリマー複合体骨格のどちらも包含される。

【００９６】

以下、リガンドを複合体骨格に複合体化する方法をより詳しく検討する。ある実施形態では、１個以上のリガンド内の糖が、Ｃ１、Ｃ２またはＣ６位を介して、（直接またはリンカーによって間接的に）複合体化している。ある実施形態では、複合体化は、Ｃ１位が関与する。糖のＣ１位は、アノマー炭素とも称され、αまたはβ配置で、薬物または複合体骨格に結合することがある。ある実施形態では、Ｃ１位は、αアノマーとして構成される。他の実施形態では、Ｃ１位は、βアノマーとして構成される。

【００９７】

薬物：

複合体は、いかなる薬物も含むことができることが理解される。複合体は、同じ薬物の複数のコピーを含むことができおよび／または複数の種類の薬物を含むことができる。複合体は、いかなる特定の薬物にも限定されず、および小分子薬物または生体分子薬物を含んでもよい。一般的に、使用される薬物は、治療されるべき疾患または障害に依存する。本明細書で使用される用語「薬物」は、薬物の塩の形態および塩でない形態を包含する。たとえば、用語「インスリン分子」は、インスリン分子の全ての塩の形態および塩でない形態を包含する。塩形態は、薬物により、アニオン性でもカチオン性でもよいことは理解される。

【００９８】

たとえば、限定ではないが、種々の実施形態で、複合体は、以下の薬物の任意の１つを含むことができる。ジクロフェナク、ニフェジピン、リバスチグミン、メチルフェニデート、フルオロキセチン、ロシグリタゾン、プレドニゾン、プロドニゾロン、コデイン、エチルモルヒネ、デキストロメトルファン、ノスカピン、ペントキシベリン、アセチルシステイン、ブロムヘキシン、エピネフィリン、イソプレナリン、オルシプレナリン、エフェドリン、フェノテロール、リミテロール、イプラトロピウム、コリンテオフィリネート、プロキシフィリン、ベクロメタゾン、ブデソニド、デスラノシド、ジゴキシン、ジギトキシン、ジソピラミド、プロスシラリジン、キニジン、プロカインアミド、メキシレチン、フレカイニド、アルプレノロール、プロプラノロール、ナドロール、ピンドロール、オクスプレノロール、ラベタロール、チモロール、アテノロール、４硝酸ペンタエリスリトール、イソソルビドナイトレート、イソソルビドモノナイトレート、ニフェジピン、フェニルアミン、ベラパミル、ジルチアゼム、シクランデラル、ニコチニルアルコール、ニコチン酸イノシトール、アルプロスタジル、エチレフリン、プレナルテロール、ドブタミン、ドーパミン、ジヒドロエルゴタミン、グアネチジン、ベタニジン、メチルドパ、レセルピン、グアンファシン、トリメタファン、ヒドララジン、ジヒドララジン、プラゾシン、ジアゾキシド、カプトプリル、ニフェジピン、エナラプリル、ニトロプルシド、ベンドロフルメチアジド、ヒドロクロロチアジド、メチクロチアジド、ポリチアジド、クロルタリドン、シネタゾン、クロパミド、メフルシド、メトラゾン、ブメタニド、エタクリナシド、スピロノラクトン、アミロリド、クロフィブラート、ニコチン酸、ニケリトロール、ブロムフェニルアミン、シンナリジン、デクスクロルフェニラミン、クレマスチン、アンタゾリン、シクロヘプタジン、プロエタジン、シメチジン、ラニチジン、スクラルファート、パパベリン、モクサベリン、アトロピン、ブチルスコポラミン、エメプロン、グリコピロン、ヒヨスチアミン、メペンソラール、メチルスコポラミン、オキシフェンサイクリミン、プロバンテリン、テロジリン、センナグリコシド、サグラダエキストラクト、ダントロ

ン、ビサコジル、ピコスルファートナトリウム、エテュロス、ジフェノキシレート、ロペラミド、サラゾスルファピリジン、ピルビン、メベンダゾール、ジメチコン、フェロフマレート、フェロスクシネート、フェリテトラセミナトリウム、シアノコバラミン、葉酸ヘパリン、ヘパリン補助因子、ジクロマロール、ワルファリン、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、第ＶＩＩＩ因子、第ＩＸ因子、ビタミンＫ、チオペタ、ブスルファン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メルファラン、カルムスチン、メルカプトプリン、チオグアニン、アザチオプリン、シタラビン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、プロカルバジン、ダカルバジン、ロムスチン、エストラムスチン、テニポシド、エトポシド、シスプラチン、アムサクリン、アミノグルテチミド、ホスフェストロール、メドロキシプログレステロン、ヒドロキシプロゲステロン、メゲステロール、ノレチステロン、タモキシフェン、シクロスポリン、スルファジミジン、ベンジルペニシリン、フェノキシメチルペニシリン、ジクロキサシリン、クロキサシリン、フルクロキサシリン、アンピシリン、アモキシシリン、ピバンピシリン、バカンピシリン、ピペラシリン、メジオシリン、メシリナム、ピブメシリナム、セファロチン、セファレキシン、セフラジン、セファドロキシル、セファクロル、セフロキシム、セフォタキシム、セフタジディム、セフォキシチン、アズトレオナム、イミペネム、シラスタチン、テトラサイクリン、リメサイクリン、デメクロサイクリン、メタサイクリン、オキシテトラサイクリン、ドキシサイクリン、クロラムフェニコール、スピラマイシン、フシジン酸、リンコマイシン、クリンダマイシン、スペクチノマイシン、リファンピシン、アムホテリシンＢ、グリセオフルビン、ナイスタチン、バンコマイシン、メトロニダゾール、チニダゾール、トリメトプリム、ノルフロキサシン、サラゾスルファピリジン、アミノサリル、イソニアジド、エサンブトール、ニトロフラントイン、ナリジクス酸、メタンアミン、クロロキン、ヒドロオキシクロロキン、チニダゾール、ケトコナゾール、アシクロビル、インターフェロンヨードクスウリジン、レチナール、チアミン、デクスパンテノール、ピリドキシン、葉酸、アスコルビン酸、トコフェロール、フィトミナジオン、フェンフルラミン、コルチコトロピン、テトラコスアクチド、チロトロピン、ソマトトロピン、ソマトレム、バソプレシン、リプレシン、デスモプレシン、オキシトシン、コリオゴナドトロピン、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、フルドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、フルオキシメステロン、メステロロン、ナンドロロン、スタノゾロール、オキシメトロン、シプロテロン、レボチロキシン、リオチロニン、プロピルチオウラシル、カルビマゾール、チアマゾール、ジヒドロタキステロール、αカルシドール、カルシチロール、インスリン、トルブタミド、クロルプロパミド、トラザミド、グリピジド、グリベンクラミド、フェノバルビタール、メチプリロン、ピリチイディオン、メプロバメート、クロルジアゼポキシド、ジアゼパム、ニトラゼパム、バクロフェン、オキサゼパム、ジカルシウムクロラゼパート、ロラゼパム、フルニトラゼパム、アルプラゾラム、ミダゾラム、ヒドロキシジン、ダントロレン、クロルメチアゾール、プロピオンマジン、アリメマジン、クロルプロマジン、レボメプロマジン、アセトフェナジン、フルフェナジン、ペルフェナジン、プロクロルペラジン、トリフルオペラジン、ジキシラジン、チオジラジン、ペリシアジン、クロルプロチキセン、チザニジン、ザレプロン、ズクロペンチゾール、フルペンチゾール、チチキセン、ハロペリドール、トリミプラミン、オピプラモール、クロムイプラミン、デシプラミン、ロフェプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、マプトロチリン、カフェイン、シンナリジン、シクリジン、ジメンヒドリナート、メクロジン、プロメタジン、チエチルペラジン、メトクロプラミド、スコポラミン、フェノバルビタール、フェニトイン、エトスクシミド、プリミドン、カルバマゼピン、クロナゼパム、オルフェナドリン、アトロピン、ベンサトロピン、ビペリデン、メチキセン、プロシリジン、レボドーパ、ブロモクリプチン、アマンタジン、アンベノン、ピリドスチグミン、シンスチグミン、ジスルフィラム、モルヒネ、コデイン、ペンタゾシン、ブプレノルフィン、ペチジン、フェノペリジン、フェンタニル、メタドン、ピリトラミド、デキストロプロポキシフェン、ケトベミドン、アセチルサリチル酸、セレコキシブ、フェナゾン、フェニルブタゾン、アザプロパゾン、ピロキシカム、エルゴタミン、ジヒドロエルゴタミン、シプロヘプタジン、ピジチ

フェン、フルメドロキソン、アロプリノール、プロベネシド、ソジウムマウロチオマレートオーロノフィン、ペニシラミン、エストラジオール、吉草酸エストラジオール、エストリオール、エチニルエストラジオール、ジヒドロゲステロン、リネストレノール、メドロキシプロゲステロン、ノルエチステロン、シクロフェニレ、クロミフェン、レボノルゲストレル、メストラノール、オルニダゾール、チニダゾール、エコナゾール、クロトリマゾール、ナタマイシン、ミコナゾール、スルベンチン、メチルエルゴタミン、ジノプロスト、ジノプロストン、ゲメプロスト、ブロモクリプチン、フェニルプロパノールアミン、クロモグリク酸ナトリウム、アゼタゾラミド、ジクロフェンアミド、βカロテン、ナロキソン、ホリナートカルシウム、特に、クロニジン、テオフィリン、ジピラダモール、ヒドロクロチアザド、スコポラミン、インドメタシン、フロセミド、塩化カリウム、モルヒネ、イブプロフェン、サルブタモール、テルブタリン、カルシトニンなど。このリストは、例示的なものを挙げたものであり、公知のまたは後に発見される薬物はいかなるものも本開示の複合体において使用してよいことはもちろんである。

【００９９】

種々の実施形態で、複合体は、ホルモン薬物を含んでもよく、それはペプチド系薬物でも非ペプチド系薬物でもよく、たとえば、アドレナリン、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、アトリオペプチン、アルドステロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、テストステロン、ジヒドロテストステロン、カルシトニン、カルシトリオール、カルシジオール、コルチコトロピン、コルチゾール、ドーパミン、エストラジオール、エストロン、エストリオール、エリスロポエチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、グレリン、グルカゴン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒスタミン、ヒト胎盤性ラクトゲン、インスリン、インスリン様成長因子、インヒビン、レプチン、ロイコトリエン、リポトロピン、メラトニン、オレキシン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、プロゲステロン、プロラクチン、プロラクチン放出ホルモン、プロスタグランジン、レニン、セロトニン、セクレチン、ソマトスタチン、トロンボポエチン、甲状腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（またはチロトロピン）、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、チロキシン、トリヨードチロニン、バソプレシンなどがある。ある実施形態では、ホルモンは、グルカゴン、インスリン、インスリン様成長因子、レプチン、甲状腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（またはチロトロピン）、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、チロキシンおよびトリヨードチロニンから選択してもよい。ある実施形態では、薬物は、インスリン様成長因子１（ＩＧＦ－Ｉ）である。このリストは、例示的であることが意図され、公知のものでもまたは後に発見されるものであっても、任意のホルモン薬物を本開示の複合体において使用してもよいことが理解される。

【０１００】

種々の実施形態で、複合体は、甲状腺ホルモンを含んでもよい。

【０１０１】

種々の実施形態で、複合体は、抗糖尿病薬物（すなわち、糖尿病を患う患者に有益な効果を持つ薬物）を含んでもよい。

【０１０２】

種々の実施形態で、複合体は、インスリン分子を含んでもよい。本明細書で使用される用語「インスリン」または「インスリン分子」は、インスリン分子の全ての塩の形態および非塩の形態を包含する。塩形態は、インスリン分子により、アニオン性でもカチオン性でもよいことは理解される。「インスリン」または「インスリン分子」は、生物活性（すなわち、インビボで投与された場合、グルコースの検出可能な還元を起こすことができる）である限り、インスリンの野生型も修飾型も両方包含すると本発明者らは意図する。野生型インスリンとして、精製、合成または組換えの形態を問わず、いかなる種からのインスリン（たとえば、ヒトインスリン、ブタインスリン、ウシインスリン、ウサギインスリン、ヒツジインスリンなど）が挙げられる。これらの数多くが、たとえば、シグマ・アルドリッチ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から、市販されている。インスリンの種々の修飾さ

れた形態が当分野で公知である（たとえば、Ｃｒｏｔｔｙ　ａｎｄ　Ｒｅｙｎｏｌｄｓ，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｅｍｅｒｇ．Ｃａｒｅ．２３：９０３－９０５，２００７、ならびにＧｅｒｉｃｈ，Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．１１３：３０８－１６，２００２およびこれに挙げられた参考文献参照）。インスリンの修飾型は、化学的に修飾（たとえば、以下に記載するように、ＰＥＧ基または脂肪族アシル鎖のような化学的部分の付加によって）してもよく、および／または突然変異を（すなわち、１個以上のアミノ酸の添加、欠失または置換によって）起こさせてもよい。

【０１０３】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、１－１０個の（たとえば、１－９、１－８、１－７、１－６、１－５、１－４、１－３、１－２、２－９、２－８、２－７、２－６、２－５、２－４、２－３、３－９、３－８、３－７、３－６、３－５、３－４、４－９、４－８、４－７、４－６、４－５、５－９、５－８、５－７、５－６、６－９、６－８、６－７、７－９、７－８、８－９、９、８、７、６、５、４、３、２または１）アミノ酸置換、添加および／または欠失の点で、野生型インスリンと異なる。ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、アミノ酸置換のみの点で、野生型インスリンと異なる。ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、アミノ酸添加のみの点で、野生型インスリンと異なる。ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、アミノ酸置換および添加の点で、野生型インスリンと異なる。ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、アミノ酸置換と欠失との点で、野生型インスリンと異なる。

【０１０４】

ある実施形態では、アミノ酸置換を、関与する残基の極性、荷電性、溶解性、疎水性、親水性および／または両親媒性特性における類似性に基づいて行ってもよい。ある実施形態では、置換は保存的であってもよく、すなわち、１つのアミノ酸が、それと類似した形および電荷を持つものと置き換えられてもよい。保存的置換は、当分野で周知であり、通常、以下の群、グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルアミン酸；アルパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リシン、アルギニン；およびチロシン、フェニルアラニン内での置換が挙げられる。ある実施形態では、適切な置換変異の選択において、アミノ酸の疎水性指数を考慮してもよい。ポリペプチドにおける相互作用的生物学的機能の付与における疎水性アミノ酸指数の重要性は、当分野で一般的に理解されている。あるいは、アミノ酸と同じ置換は、親水性に基づいて効果的に行うことができる。ポリペプチドにおける相互作用的生物学的機能の付与における親水性の重要性は、当分野で一般的に理解されている。ポリペプチドの設計における疎水性指数または親水性の使用については、米国特許第５，６９１，１９８号で、さらに検討されている。

【０１０５】

ヒトインスリンの野生型配列（Ａ鎖およびＢ鎖）を、以下および図６３に示す。

【０１０６】

Ａ鎖（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）：ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ

Ｂ鎖（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）：ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＦＹＴＰＫＴ

ヒトインスリンは、ウサギ、ブタ、ウシおよびヒツジのインスリンと、アミノ酸Ａ８、Ａ９、Ａ１０およびＢ３０においてのみ異なる（以下の表を参照）。

【表１】

インスリン	アミノ酸位置			
	A8	A9	A10	B30
ヒト	Thr	Ser	Ile	Thr
ウサギ	Thr	Ser	Ile	Ser
ブタ	Thr	Ser	Ile	Ala
ウシ	Ala	Ser	Val	Ala
ヒツジ	Ala	Gly	Val	Ala

【０１０７】

種々の実施形態で、本開示のインスリン分子は、Ｂ－ペプチド配列のＢ２８および／またはＢ２９位で変異を起こす。たとえば、インスリンリスプロ（ＨＵＭＡＬＯＧ（登録商標））は、Ｂ－ペプチドのＣ末端上の最後から２番目のリシンと、プロリン残基とが逆転した速効性インスリン変異体（$Ｌｙｓ^{Ｂ２８}Ｐｒｏ^{Ｂ２９}$－ヒトインスリン）である。この修飾により、インスリン多量体の形成がブロックされる。インスリンアスパルト（ＮＯＶＯＬＯＧ（登録商標））は、Ｂ２８位のプロリンがアスパラギン酸で置換された他の速効性インスリン変異体（$Ａｓｐ^{Ｂ２８}$－ヒトインスリン）である。この変異体も、多量体の形成を阻止する。いくつかの実施形態では、Ｂ２８および／またはＢ２９位での変異は、インスリンポリペプチドの別の部分での１個以上の変異によって達成される。たとえば、インスリングルリシン（ＡＰＩＤＲＡ（登録商標））は、Ｂ３位のアスパラギン酸がリシン残基で置き換えられ、Ｂ２９位のリシンがグルタミン酸残基で置き換えられた別の速効性インスリン変異体（$Ｌｙｓ^{Ｂ３}Ｇｌｕ^{Ｂ２９}$－ヒトインスリン）でもある。

【０１０８】

種々の実施形態で、本開示のインスリン分子は、ヒトインスリンに対してシフトする等電点を有する。いくつかの実施形態では、等電点のシフトは、１個以上のアルギニン残基を、インスリンＡ－ペプチドのＮ末端および／またはインスリンＢ－ペプチドのＣ末端に付加することによって達成される。そのようなインスリンポリペプチドの例として、$Ａｒｇ^{Ａ０}$－ヒトインスリン、$Ａｒｇ^{Ｂ３１}Ａｒｇ^{Ｂ３２}$－ヒトインスリン、$Ｇｌｙ^{Ａ２１}Ａｒｇ^{Ｂ３１}Ａｒｇ^{Ｂ３２}$－ヒトインスリン、$Ａｒｇ^{Ａ０}Ａｒｇ^{Ｂ３１}Ａｒｇ^{Ｂ３２}$－ヒトインスリン、および$Ａｒｇ^{Ａ０}Ｇｌｙ^{Ａ２１}Ａｒｇ^{Ｂ３１}Ａｒｇ^{Ｂ３２}$－ヒトインスリンが挙げられる。さらなる例として、インスリングラルギン（ＬＡＮＴＵＳ（登録商標））は、$Ａｓｐ^{Ａ２１}$がグリシンで置き換えられ、２個のアルギニン残基がＢ－ペプチドのＣ末端に付加された例示的な持続型インスリン変異体である。これらの変化の効果は、等電点をシフトさせることであり、ｐＨ４で完全に溶解する溶液を作り出す。したがって、いくつかの実施形態では、本開示のインスリン分子は、Ａ２１がＧｌｙであるＡ－ペプチド配列と、Ｂ３１およびＢ３２がＡｒｇ－ＡｒｇであるＢ－ペプチド配列とを含む。本開示は、これらの変異および本明細書で記載される他のいかなる変異（たとえば、$Ｇｌｙ^{Ａ２１}$－ヒトインスリン、$Ｇｌｙ^{Ａ２１}ＡＴｇ^{Ｂ３１}$－ヒトインスリン、$Ａｒｇ^{Ｂ３１}Ａｒｇ^{Ｂ３２}$－ヒトインスリン、$Ａｒｇ^{Ｂ３１}$－ヒトインスリン）の単独および複数の組合せ全てを包含することは理解されるべきである。

【０１０９】

種々の実施形態で、本開示のインスリン分子は、トランケートされる。たとえば、ある実施形態では、本開示のインスリンポリペプチドのＢ－ペプチド配列は、Ｂ１、Ｂ２、Ｂ３、Ｂ２６、Ｂ２７、Ｂ２８、Ｂ２９および／またはＢ３０が欠けている。ある実施形態では、残基の組合せが、本開示のインスリンポリペプチドのＢ－ペプチド配列から欠けている。たとえば、Ｂ－ペプチド配列は、残基Ｂ（１－２）、Ｂ（１－３）、Ｂ（２９－３０）、Ｂ（２８－３０）、Ｂ（２７－３０）および／またはＢ（２６－３０）を欠いてもよい。いくつかの実施形態では、これらの欠失および／またはトランケーションは、先に

記載したいずれのインスリン分子（たとえば、ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンリスプロ、ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリンアスパルト、ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリングルリシン、ｄｅｓ（Ｂ３０）－インスリングラルギンなど（これらに限定されない）を製造するために）にも適用される。

【０１１０】

いくつかの実施形態で、インスリン分子は、ＡまたはＢ－ペプチド配列のＮ－またはＣ－末端上に追加のアミノ酸残基を含有する。いくつかの実施形態では、１個以上のアミノ酸残基が、Ａ０、Ａ２１、Ｂ０および／またはＢ３１位に位置する。いくつかの実施形態では、１個以上のアミノ酸残基がＡ０位に位置する。いくつかの実施形態では、１個以上のアミノ酸残基がＡ２１位に位置する。いくつかの実施形態では、１個以上のアミノ酸残基がＢ０位に位置する。いくつかの実施形態では、１個以上のアミノ酸残基がＢ３１位に位置する。ある実施形態では、インスリン分子は、Ａ０、Ａ２１、Ｂ０またはＢ３１位にはいかなる追加のアミノ酸残基も含まない。

【０１１１】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子を、１個以上のアミド化アミノ酸を酸性型で置き換えるように変異させる。たとえば、アスパラギンを、アスパラギン酸またはグルタミン酸で置き換えてもよい。同様に、グルタミンをアスパラギン酸またはグルタミン酸で置き換えてもよい。特に、Asn^{A18}、Asn^{A21}またはAsn^{B3}、またはこれらの残基の任意の組合せを、アスパラギン酸またはグルタミン酸で置き換えてもよい。Gln^{A15}またはGln^{B4}、または両方を、アスパラギン酸またはグルタミン酸で置き換えてもよい。ある実施形態では、インスリン分子は、Ａ２１位でアスパラギン酸を、またはＢ３位でアスパラギン酸を有し、またはその両方でアスパラギン酸を有する。

【０１１２】

当業者であれば、生物学的活性を保ちつつ、インスリン分子内の他のアミノ酸も変異することが可能であることを認識する。たとえば、以下の修飾も当分野で広く認められているが、これらに限定されるものではない。Ｂ１０位のヒスチジン残基のアスパラギン酸による置換え（$His^{B10} \rightarrow Asp^{B10}$）、Ｂ１位のフェニルアラニン残基のアスパラギン酸による置換え（$Phe^{B1} \rightarrow Asp^{B1}$）、Ｂ３０位のスレオニン残基のアラニンによるによる置換え（$Thr^{B30} \rightarrow Ala^{B30}$）、Ｂ２６位のチロシン残基のアラニンによる置換え（$Tyr^{B26} \rightarrow Ala^{B26}$）、およびＢ９位のセリン残基のアスパラギン酸による置換え（$Ser^{B9} \rightarrow Asp^{B9}$）。

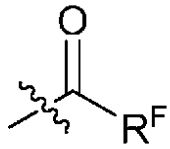
【０１１３】

種々の実施形態で、本開示のインスリン分子は、作用の遅延性プロフィールを有する。従って、ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、脂肪酸でアシル化されてもよい。すなわち、インスリン分子上のアミノ基と脂肪酸のカルボン酸基との間にアミド結合が形成されている。アミノ基は、インスリン分子のＮ末端アミノ酸のα－アミノ基でもよいし、またはインスリン分子のリシン残基のε－アミノ基でもよい。本開示のインスリン分子は、野生型ヒトインスリンに存在する３個のアミノ基の１個以上のアミノ基で、アシル化されてもよいし、または野生型ヒトインスリン配列に導入されているリシン残基でアシル化されてもよい。ある実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１位でアシル化されてもよい。ある実施形態では、インスリン分子は、Ｂ２９位でアシル化されてもよい。ある実施形態では、脂肪酸は、ミリスチン酸（Ｃ１４）、ペンタデシル酸（Ｃ１５）、パルミチン酸（Ｃ１６）、ヘプタデシル酸（Ｃ１７）およびステアリン酸（Ｃ１８）から選択される。たとえば、インスリンデテミル（ＬＥＶＥＭＩＲ（登録商標））は、Thr^{B30}が欠失され、Ｃ１４脂肪酸鎖（ミリスチン酸）がLys^{B29}に結合されている持続型インスリン変異体である。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、Ａ－ペプチドのＮ末端、Ｂ－ペプチドのＮ末端、Ｂ２９位のＬｙｓのε－アミノ基、または本開示のインスリン分子中の任意の他の可能なアミノ基は、一般式：

【化５】



【０１１５】

（式中、R^Fは、水素またはC_{1-30}アルキル基である）の脂肪酸部分に共有結合で結合している。いくつかの実施形態では、R^Fは、C_{1-20}アルキル基、C_{3-19}アルキル基、C_{5-18}アルキル基、C_{6-17}アルキル基、C_{8-16}アルキル基、C_{10-15}アルキル基またはC_{12-14}アルキル基である。ある実施形態では、インスリンポリペプチドは、Ａ１位で前記部分に複合体化する。ある実施形態では、インスリンポリペプチドは、Ｂ１位で前記部分に複合体化する。ある実施形態では、インスリンポリペプチドは、Ｂ２９位のＬｙｓのε－アミノ基で前記部分に複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子のＢ２８位はＬｙｓであり、Lys^{B28}のε－アミノ基が脂肪酸部分に複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子のＢ３位はＬｙｓであり、Lys^{B3}のε－アミノ基が脂肪酸部分に複合体化する。いくつかの実施形態では、脂肪酸鎖は、炭素数８～２０の長さである。いくつかの実施形態では、脂肪酸は、オクタン酸（Ｃ８）、ノナン酸（Ｃ９）、デカン酸（Ｃ１０）、ウンデカン酸（Ｃ１１）、ドデカン酸（Ｃ１２）、またはトリデカン酸（Ｃ１３）である。ある実施形態では、脂肪酸は、ミリスチン酸（Ｃ１４）、ペンタデカン酸（Ｃ１５）、パルミチン酸（Ｃ１６）、ヘプタデカン酸（Ｃ１７）、ステアリン酸（Ｃ１８）、ノナデカン酸（Ｃ１９）またはアラキドン酸（Ｃ２０）である。

【０１１６】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン（インスリンリスプロ）、Asp^{B28}－ヒトインスリン（インスリンアスパルト）、$Lys^{B3}Glu^{B29}$－ヒトインスリン（インスリングルリシン）、$Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン（インスリングラルギン）、$N^{\varepsilon B29}$－ミリストイル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン（インスリンデテミル）、Ala^{B26}－ヒトインスリン、Asp^{B1}－ヒトインスリン、Arg^{A0}－ヒトインスリン、$Asp^{B1}Glu^{B13}$－ヒトインスリン、Gly^{A21}－ヒトインスリン、$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、ｄｅｓ（Ｂ２７）－ヒトインスリン、ｄｅｓ（Ｂ２８－Ｂ３０）－ヒトインスリン、ｄｅｓ（Ｂ１）－ヒトインスリン、ｄｅｓ（Ｂ１－Ｂ３）－ヒトインスリン。

【０１１７】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－パルミトイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ミリストイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－パルミトイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ミリストイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン。

【０１１８】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－パルミトイル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B30}$－ミリストイル－$Thr^{B29}Lys^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B30}$－パルミトイル－$Thr^{B29}Lys^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－（Ｎ－パルミトイル－γ－グルタミル）－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－（Ｎ－リトコリル－γ－グルタミル）－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－（ω－カルボキシヘプタデカノイル）－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B2}$

^{9}－（ω－カルボキシヘプタデカノイル）－ヒトインスリン。

【０１１９】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ミリストイル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B31}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ミリストイル－$Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ミリストイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ミリストイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ミリストイル－$Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ミリストイル－$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$Arg^{B0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン。

【０１２０】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリンポリペプチドの１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B28}$－ミリストイル－$Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ミリストイル－$Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B30}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ミリストイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ミリストイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ミリストイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ミリストイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ミリストイル－$arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－$Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン。

【０１２１】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－$Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－$Arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン。

【０１２２】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Gly^{A21}－ｄｅｓ

（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ａｌａ^{A21}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ａｌａ^{A21}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ａｌａ^{A21}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ａｌａ^{A21}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ａｌａ^{A21}－Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ａｌａ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ａｌａ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ａｌａ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ｇｌｎ^{B3}－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン。

【０１２３】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ａｌａ^{A21}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ａｌａ^{A21}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ａｌａ^{A21}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ａｌａ^{A21}－ヒトインスリン。

【０１２４】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ｇｌｙ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ｇｌｙ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ａｌａ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ａｌａ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ａｌａ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ａｌａ^{A21}Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン。

【０１２５】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ｇｌｎ^{B3}－ヒトインスリン。

【０１２６】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。Ｎ$^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－Ｇｌｕ^{B30}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－Ｇｌｕ^{B30}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－デカノイル－Ｇｌｕ^{B30}－ヒトインスリン、Ｎ$^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－Ｇｌｕ^{B30}－

ヒトインスリン。

【０１２７】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－$Gly^{A21}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－$Gly^{A21}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－$Gly^{A21}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－$Gly^{A21}Glu^{B30}$－ヒトインスリン。

【０１２８】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－$Ala^{A21}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－$Ala^{A21}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－$Ala^{A21}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－$Ala^{A21}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン。

【０１２９】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－トリデカノイル－$Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－テトラデカノイル－$Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－$Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ドデカノイル－$Gln^{B3}Glu^{B30}$－ヒトインスリン。

【０１３０】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－ホルミル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ホルミル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ホルミル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ホルミル－$N^{\alpha B1}$－ホルミル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ホルミル－$N^{\alpha A1}$－ホルミル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ホルミル－$N^{\alpha B1}$－ホルミル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ホルミル－$N^{\alpha A1}$－ホルミル－$N^{\alpha B1}$－ホルミル－ヒトインスリン。

【０１３１】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－アセチル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－アセチル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－アセチル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－アセチル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－アセチル－$N^{\alpha A1}$－アセチル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－アセチル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－アセチル－$N^{\alpha A1}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－アセチル－ヒトインスリン。

【０１３２】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－プロピオニル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－プロピオニル－$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－プロピオニル－$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－ヒトインスリン。

【０１３３】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－ブチリル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ブチリル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ブチリル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ブチリル－$N^{\alpha A1}$－ブチリル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ブチリル－$N^{\alpha A1}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－ヒトインスリン。

【０１３４】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－ペンタノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ペンタノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ペンタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ペンタノイル－$N^{\alpha B1}$－ペンタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ペンタノイル－$N^{\alpha A1}$－ペンタノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ペンタノイル－$N^{\alpha B1}$－ペンタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ペンタノイル－$N^{\alpha A1}$－ペンタノイル－$N^{\alpha B1}$－ペンタノイル－ヒトインスリン。

【０１３５】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－ヘキサノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ヘキサノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ヘキサノイル－$N^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ヘキサノイル－$N^{\alpha A1}$－ヘキサノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ヘキサノイル－$N^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ヘキサノイル－$N^{\alpha A1}$－ヘキサノイル－$N^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－ヒトインスリン。

【０１３６】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－ヘプタノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ヘプタノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ヘプタノイル－$N^{\alpha B1}$－ヘプタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ヘプタノイル－$N^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－$N^{\alpha B1}$－ヘプタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ヘプタノイル－$N^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－$N^{\alpha B1}$－ヘプタノイル－ヒトインスリン。

【０１３７】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\alpha B1}$－オクタノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－オクタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$N^{\alpha B1}$－オクタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$N^{\alpha A1}$－オクタノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－オクタノイル－$N^{\alpha B1}$－オクタノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$N^{\alpha A1}$－オクタノイル－$N^{\alpha B1}$－オクタノイル－ヒトインスリン。

【０１３８】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－ノナノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ノナノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ノナノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ノナノイル－$N^{\alpha B1}$－ノナノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ノナノイル－$N^{\alpha A1}$－ノナノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ノナノイル－$N^{\alpha B1}$－ノナノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ノナノイル－$N^{\alpha A1}$－ノナノイル－$N^{\alpha B1}$－ノナノイル－ヒトインスリン。

【０１３９】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－デカノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－デカノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－$N^{\alpha B1}$－デカノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－$N^{\alpha A1}$－

デカノイル－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－デカノイル－$N^{\alpha B1}$－デカノイル－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－デカノイル－$N^{\alpha A1}$－デカノイル－$N^{\alpha B1}$－デカノイル－ヒトインスリン。

【０１４０】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B28}$－ホルミル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ホルミル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ホルミル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ホルミル－$N^{\alpha B1}$－ホルミル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ホルミル－$N^{\alpha A1}$－ホルミル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ホルミル－$N^{\alpha B1}$－ホルミル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ホルミル－$N^{\alpha A1}$－ホルミル－$N^{\alpha B1}$－ホルミル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－アセチル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－アセチル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－アセチル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－アセチル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン。

【０１４１】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B28}$－アセチル－$N^{\alpha A1}$－アセチル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－アセチル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－アセチル－$N^{\alpha A1}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－アセチル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン。

【０１４２】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B28}$－プロピオニル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－プロピオニル－$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－プロピオニル－$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－プロピオニル－$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン。

【０１４３】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B28}$－ブチリル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ブチリル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ブチリル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ブチリル－$N^{\alpha A1}$－ブチリル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ブチリル－$N^{\alpha A1}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン。

【０１４４】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B28}$－ペンタノイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ペンタノイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ペンタノイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ペンタノイル－$N^{\alpha B1}$－ペンタノイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B28}$－ペンタノイル－$N^{\alpha A1}$－ペンタノイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ペンタノイル－$N^{\alpha B1}$－ペンタノイル－$Lys^{B28}Pro^{B}$

^{29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ペンタノイル－N$^{\alpha A1}$－ペンタノイル－N$^{\alpha B1}$－ペンタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン。

【０１４５】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。N$^{\varepsilon B28}$－ヘキサノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－ヘキサノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ヘキサノイル－N$^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ヘキサノイル－N$^{\alpha A1}$－ヘキサノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－ヘキサノイル－N$^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ヘキサノイル－N$^{\alpha A1}$－ヘキサノイル－N$^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン。

【０１４６】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。N$^{\varepsilon B28}$－ヘプタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha B1}$－ヘプタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ヘプタノイル－N$^{\alpha B1}$－ヘプタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ヘプタノイル－N$^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－N$^{\alpha B1}$－ヘプタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ヘプタノイル－N$^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－N$^{\alpha B1}$－ヘプタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン。

【０１４７】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。N$^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha B1}$－オクタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－オクタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－N$^{\alpha B1}$－オクタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－N$^{\alpha A1}$－オクタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－オクタノイル－N$^{\alpha B1}$－オクタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－オクタノイル－N$^{\alpha A1}$－オクタノイル－N$^{\alpha B1}$－オクタノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン。

【０１４８】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。N$^{\varepsilon B28}$－ノナノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha B1}$－ノナノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－ノナノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ノナノイル－N$^{\alpha B1}$－ノナノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ノナノイル－N$^{\alpha A1}$－ノナノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－ノナノイル－N$^{\alpha B1}$－ノナノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－ノナノイル－N$^{\alpha A1}$－ノナノイル－N$^{\alpha B1}$－ノナノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン。

【０１４９】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。N$^{\varepsilon B28}$－デカノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha B1}$－デカノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－デカノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－デカノイル－N$^{\alpha B1}$－デカノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\varepsilon B28}$－デカノイル－N$^{\alpha A1}$－デカノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリン、N$^{\alpha A1}$－デカノイル－N$^{\alpha B1}$－デカノイル－Ｌｙｓ^{B28}Ｐｒｏ^{B29}－ヒトインスリ

ン、$N^{\varepsilon B28}$－デカノイル－$N^{\alpha A1}$－デカノイル－$N^{\alpha B1}$－デカノイル－$Lys^{B28}Pro^{B29}$－ヒトインスリン。

【０１５０】

ある実施形態では、本開示のインスリン分子は、以下のインスリン分子の１つの変異および／または化学修飾を含む。$N^{\varepsilon B29}$－ペンタノイル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$N^{\alpha B1}$－オクタノイル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－プロピオニル－$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－アセチル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ホルミル－$N^{\alpha A1}$－ホルミル－$N^{\alpha B1}$－ホルミル－$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ホルミル－ｄｅｓ（Ｂ２６）－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－アセチル－$Asp^{B28}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－プロピオニル－$N^{\alpha A1}$－プロピオニル－$N^{\alpha B1}$－プロピオニル－$Asp^{B1}Asp^{B3}AspB^{21}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ペンタノイル－$Gly^{A21}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ヘキサノイル－$Gly^{A21}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ヘプタノイル－$Gly^{A21}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－オクタノイル－$N^{\alpha B1}$－オクタノイル－$Gly^{A21}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－プロピオニル－$N^{\alpha A1}$－プロピオイル－$Gly^{A21}$－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－アセチル－$N^{\alpha B1}$－アセチル－$Gly^{A21}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ホルミル－$N^{\alpha A1}$－ホルミル－$N^{\alpha B1}$－ホルミル－$Gly^{A21}$－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ブチリル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\alpha B1}$－ブチリル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ブチリル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ブチリル－$N^{\alpha A1}$－ブチリル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\alpha A1}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン、$N^{\varepsilon B29}$－ブチリル－$N^{\alpha A1}$－ブチリル－$N^{\alpha B1}$－ブチリル－ｄｅｓ（Ｂ３０）－ヒトインスリン。

【０１５１】

また、本開示は、先に記載した変異および／または化学修飾のいずれか１つを含む、非ヒトインスリン（たとえば、ブタインスリン、ウシインスリン、ウサギインスリン、ヒツジインスリンなど）の修飾型も包含する。

【０１５２】

これらおよび他の修飾インスリン分子は、米国特許第６，９０６，０２８号、第６，５５１，９９２号、第６，４６５，４２６号、第６，４４４，６４１号、第６，３３５，３１６号、第６，２６８，３３５号、第６，０５１，５５１号、第６，０３４，０５４号、第５，９５２，２９７号、第５，９２２，６７５号、第５，７４７，６４２号、第５，６９３，６０９号、第５，６５０，４８６号、第５，５４７，９２９号、第５，５０４，１８８号、第５，４７４，９７８号、第５，４６１，０３１号および第４，４２１，６８５号、ならびに米国特許第７，３８７，９９６号、第６，８６９，９３０号、第６，１７４，８５６号、第６，０１１，００７号、第５，８６６，５３８号および第５，７５０，４９７号に詳しく記載され、これらの全開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

【０１５３】

種々の実施形態で、本開示のインスリン分子は、３つの野生型ジスルフィド架橋（すなわち、１つはＡ鎖の７位とＢ鎖の７位との間にあり、２番目はＡ鎖の２０位とＢ鎖の１９位との間にあり、３番目はＡ鎖の６位と１１位との間にある）を含む。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、インスリン分子は、インスリン受容体に対する親和力を減らすように、修飾および／または変異される。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、修飾（たとえば、アシル化）または変異によるインスリン分子の受容体親和力の

減衰は、インスリン分子が血清から排除される速度を落とし得ると考えられる。いくつかの実施形態では、インビトロでのインスリン受容体親和力減少により、インスリン複合体のインビボ活性が優れた結果となる。ある実施形態では、インスリン分子を変異部位を複合点として使用し、変異部位での複合が、インスリン受容体（たとえば、Lys^{A3}）への結合を減らすように変異させる。ある他の実施形態では、野生型アミノ酸が存在するところまたは末端での複合により、インスリン受容体（たとえば、Gly^{A1}）への結合が減る。いくつかの実施形態では、インスリン分子は、Ａ４、Ａ５、Ａ８、Ａ９またはＢ３０位で複合体化する。ある実施形態では、Ａ４、Ａ５、Ａ８、Ａ９またはＢ３０位での複合は、野生型アミノ酸側鎖（たとえば、Glu^{A4}）により行われる。ある他の実施形態では、インスリン分子は、Ａ４、Ａ５、Ａ８、Ａ９またはＢ３０位で変異を起こし、複合のための部位（たとえば、Lys^{A4}、Lys^{A5}、Lys^{A8}、Lys^{A9}またはLys^{B30}）を提供する。

【０１５５】

インスリン分子を含む薬物を複合体化する方法を、以下に記載する。ある実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基を介して、リガンドまたは複合体骨格に複合体化される。ある実施形態では、Ａ１アミノ酸残基はグリシンである。しかし、本開示は、Ｎ末端複合に限定されず、ある実施形態では、インスリン分子は、末端ではないＡ鎖アミノ酸残基を介して複合体化されてもよいことは理解される。特に、本開示は、Ａ鎖（野生型または部位特異的変異によって導入された）の任意の位置に存在するリシン残基のε－アミン基を介する複合を包含する。Ａ鎖上の異なる複合位置は、インスリン活性の異なる減少を起こし得る。ある実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１アミノ酸残基を介して、複合体骨格に複合体化している。ある実施形態では、Ｂ１アミノ酸残基はフェニルアラニンである。しかし、本開示は、Ｎ末端複合に限定されず、ある実施形態では、インスリン分子は、末端ではないＢ鎖アミノ酸残基を介して複合体化されてもよいことは理解される。特に、本開示は、Ｂ鎖（野生型または部位特異的変異により導入された）の任意の位置に存在するリシン残基のε－アミン基を介する複合を包含する。たとえば、ある実施形態では、インスリン分子はＢ２９リシン残基を介して複合体化されてもよい。インスリングルリジンの場合、Ｂ３リシン残基を介する少なくとも１つのリガンドへの複合を使用してもよい。Ｂ鎖上の異なる複合位置は、インスリン活性の異なる減少を起こし得ると理解される。

【０１５６】

ある実施形態では、リガンドは、複数の複合点を介して、インスリン分子のような薬物に複合体化される。たとえば、インスリン分子は、Ａ１Ｎ－末端およびＢ２９リシンの両方に複合体化できる。いくつかの実施形態では、アミド複合は、炭酸塩緩衝液で起こり、Ｂ２９およびＡ１位で複合体化するが、Ｂ１位では複合体化しない。他の実施形態では、インスリン分子は、Ａ１Ｎ－末端、Ｂ１Ｎ－末端およびＢ２９リシンで複合体化できる。さらに他の実施形態では、保護基は、複合体化がＢ１およびＢ２９またはＢ１およびＡ１位で起こるように使用される。インスリン分子上の複合点の任意の組合せを使用してもよいことは理解される。いくつかの実施形態では、複合点の少なくとも１つは、変異リシン残基、たとえばLys^{A3}である。

【０１５７】

種々の実施形態で、複合体は、インスリン感受性改善薬（すなわち、インスリンの作用を増強する薬物）を含んでもよい。インスリンの効果を増強する薬物として、ビグアナイド（たとえば、メトホルミン）およびグリタゾンが挙げられる。最初のグリタゾン薬物は、重篤な副作用を持つことになるトログリタゾンであった。二世代目のグリタゾンとして、ピオグリタゾンおよびロシグリタゾンが挙げられ、これらは、ロシグリタゾンは、ある治験では、有害な心血管事故を伴ったが、選りすぐれた耐容性を示す。

【０１５８】

種々の実施形態では、複合体は、インスリン分泌促進物質（すなわち、膵臓のβ細胞によりインスリン分泌を刺激する薬物）を含んでもよい。たとえば、種々の実施形態で、複

合体は、スルホニル尿素を含んでもよい。スルホニル尿素は、膵臓のβ細胞により、グルコースの作用にそれらを感作することによって、インスリン分泌を刺激する。さらに、スルホニル尿素は、グルカゴン分泌を抑制し、標的組織をインスリンの作用に感作する。第一世代スルホニル尿素として、トルブタミド、クロルプロパミドおよびカルブタミドが挙げられる。より低い用量で活性な第二世代スルホニル尿素として、グリビジド、グリベンクラミド、グリクラジド、グリボルヌリドおよびグリメピリドが挙げられる。種々の実施形態で、複合体は、メグリチニドを含んでもよい。適切なメグリチニドとして、ナテグリニド、ミチグリニドおよびレパグリニドが挙げられる。これらの血糖降下作用は、スルホニル尿素の作用より速く、短い。他のインスリン分泌促進物質として、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）およびＧＬＰ－１類縁体（すなわち、ＧＬＰ－１とは、１～１０個のアミノ酸置換、付加または欠失および／または化学的修飾で異なるＧＬＰ－１様生物活性を持つペプチド）が挙げられる。ＧＬＰ－１は、胃排出を抑制し、中枢作用により満腹感を増し、およびグルカゴン放出を抑えることによって、食物摂取量を減らす。ＧＬＰ－１は、すい島細胞増殖を増やすことによって血漿グルコース濃度を低下させ、食物摂取後のインスリン産生を増やす。ＧＬＰ－１は、たとえば、リラグルチドにおけるように、脂質複合によって化学的に修飾されそのインビボ半減期を延ばしてもよい。さらに他のインスリン分泌促進物質として、エキセンジン－４およびエキセンジン－４類縁体（すなわち、エキセンジン－４とは、１～１０個のアミノ酸置換、付加または欠失および／または化学的修飾で異なるエキセンジン－４様生物活性を持つペプチド）が挙げられる。アメリカ毒トカゲの毒液中で発見されたエキセンジン－４は、ＧＬＰ－１様生物活性を示す。それは、ＧＬＰ－１より非常に長い半減期を有し、およびＧＬＰ－１とは異なり、生物活性を失うことなく、そのＮ－末端で８個のアミノ酸残基によりトランケートされ得る。ＧＬＰ－１のＮ－末端領域およびエキセンジン－４は、ほぼ同一であり、有意な違いは、ＧＬＰ－１における第二アミノ酸残基、アラニンおよび、エキセンジン－４にインビボ消化に対する耐性を付与する、エキセンジン－４におけるグリシンである。また、エキセンジン－４は、ＧＬＰ－１と比べると、そのＣ－末端に余分な９個のアミノ酸残基を有する。Ｍａｎｎら．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．３５：７１３－７１６，２００７およびＲｕｎｇｅら，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４６：５８３０－５８４０，２００７には、本開示の複合体において使用してもよい種々のＧＬＰ－１およびエキセンジン－４類縁体が記載されている。ＧＬＰ－１の短半減期は、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰ－ＩＶ）による酵素的消化に起因する。ある実施形態では、内因性ＧＬＰ－１の効果は、ＤＰＰ－ＩＶ抑制剤（たとえば、ビルダグリプチン、シタグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチンまたはアログリプチン）の投与によって、増強され得る。

【０１５９】

種々の実施形態で、複合体は、アミリンまたはアミリン類縁体（すなわち、アミリンとは、１～１０個のアミノ酸置換、付加または欠失および／または化学的修飾で異なるアミリン様生物活性を持つペプチド）を含んでもよい。アミリンは、グルコース調節において重要な役割を果たす（たとえば、ＥｄｅｌｍａｎおよびＷｅｙｅｒ，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｔｅｃｈｎｏｌ．Ｔｈｅｒ．４：１７５－１８９，２００２）。アミリンは、食物摂取に応答して、膵臓のβ細胞によりインスリンとともに共分泌される神経内分泌ホルモンである。インスリンは、血流からのグルコース消滅を調節するように働くが、アミリンは、血流において胃および肝臓からのグルコース出現の調節を助けるように働く。酢酸プラムリンチド（ＳＹＭＬＩＮ（登録商標））は、例示的なアミリン類縁体である。天然ヒトアミリンはアミロイド形成的であるので、プラムリンチドを設計する研究方法は、ある残基を、ラットアミリンからの残基で置換することを含み、これは、アミロイド形成的ではない。特に、プロリン残基は構造を破壊する残基として知られているので、これらは、ラット配列からヒト配列に直接グラフトされた。また、Ｇｌｕ－１０は、アスパラギンで置換された。

【０１６０】

種々の実施形態で、プレ複合体化薬物は、１個以上の反応性部分（たとえば、カルボキ

シル、または反応性エステル、アミン、ヒドロキシル、アルデヒド、スルフヒドリル、マレイミジル、アルキニル、アジドなどの部分）を含有してもよい。以下で検討するように、ある実施形態では、これらの反応性部分は、複合体化プロセスを容易にし得る。具体例として、α－末端アミンおよび／またはε－アミンリシン基を有するペプチド性薬物が挙げられる。これらの反応性部分はどれも、先に存在しない場合は、公知の薬物に人工的に付加してもよいことは理解される。たとえば、ペプチド性薬物の場合、適切なアミノ酸（たとえば、リシン）を、アミノ酸配列に付加または置換してもよい。さらに、以下により詳しく検討するように、複合体化プロセスを、複合体化前に、ある反応性部分を選択的にブロックすることによってコントロールしてもよいことは理解される。

【０１６１】

種々の実施形態で、本開示の複合体は、グルコースとインスリンとの間の天然のフィードバックメカニズム（グルコースの濃度が増えるにつれインスリンの濃度が増え、インスリンの濃度が増すにつれグルコースの濃度が減る）を操作するように開発してもよい。あるいは、種々の実施形態で、薬物は、（ａ）インスリンと同じ機能を有する分子（たとえば、グルコース濃度を減らす）、（ｂ）インスリンの産生を刺激するおよび／または（ｃ）インスリンの効果を増強する分子である可能性がある。たとえば、先に検討したように、薬物として、インスリンの代わりに、インスリン分泌促進物質またはインスリン感受性改善薬を使用することができる。

【０１６２】

種々の実施形態で、グルコースに直接関連しない機能を持つ薬物を含む複合体を使用することができる。限定ではないが、グルコースに応答する複合体を使用して、薬物の長期、食事時間投薬を提供してもよい。定期的におよび／または食事とともに投薬する必要がある任意の薬物は、そのような送達システムから利益を受ける。当分野で周知のように、多くの従来の薬物は、食物とともにまたは食事時間に投与する必要がある。たとえば、脂肪の吸収を抑制する薬物（たとえば、オーリスタット）は、食事時間中有利に存在する。同様に、脂質濃度を下げる薬物、たとえば、ロバスタチン、アトルバスタチンまたはシンバスタチン、またはトリグリセリド濃度を下げる薬物、たとえば、ゲムフィブロジルも、食事時間に有利に関与し得る。

【０１６３】

例示的なインスリン複合体：

種々の実施形態で、本開示の複合体は、アミノエチルグルコース（ＡＥＧ）、アミノエチルマンノース（ＡＥＭ）、アミノエチルビマンノース（ＡＥＢＭ）、アミノエチルトリマンノース（ＡＥＴＭ）、β－アミノエチル－Ｎ－アセチルグルコサミン（ＡＥＧＡ）およびアミノエチルフコース（ＡＥＦ）からなる群から独立して選択される１種以上のリガンドに複合体化するインスリン分子を含む。ある実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１アミノ酸残基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。

【０１６４】

ある実施形態では、本開示の複合体は、１個以上のアミノエチルグルコース（ＡＥＧ）リガンドに複合体化するインスリン分子を含む。ある実施形態では、本開示の複合体は、１個以上のアミノエチルマンノース（ＡＥＭ）リガンドに複合体化するインスリン分子を含む。ある実施形態では、本開示の複合体は、１個以上のアミノエチルビマンノース（ＡＥＢＭ）リガンドに複合体化するインスリン分子を含む。ある実施形態では、本開示の複合体は、１個以上のアミノエチルトリマンノース（ＡＥＴＭ）リガンドに複合体化するインスリン分子を含む。ある実施形態では、本開示の複合体は、１個以上のβ－アミノエチル－Ｎ－アセチルグルコサミン（ＡＥＧＡ）リガンドに複合体化するインスリン分子を含む。ある実施形態では、本開示の複合体は、１個以上のアミノエチルフコース（ＡＥＦ）リガンドに複合体化するインスリン分子を含む。

【０１６５】
種々の実施形態で、本開示の複合体は、２個以上の異なるリガンドに複合体化するインスリン分子を含む。いくつかの実施形態では、本開示の複合体は、２個の異なるリガンドに複合体化するインスリン分子を含む。他の実施形態では、本開示の複合体は、３個の異なるリガンドに複合体化するインスリン分子を含む。ある実施形態では、本開示の複合体は、４個の別のリガンドに複合体化するインスリン分子を含む。ある実施形態では、そのような複合体の２個以上の異なるリガンドは、アミノエチルグルコース（ＡＥＧ）である。ある実施形態では、そのような複合体の２個以上の異なるリガンドは、アミノエチルマンノース（ＡＥＭ）である。ある実施形態では、そのような複合体の２個以上の異なるリガンドは、アミノエチルビマンノース（ＡＥＢＭ）である。ある実施形態では、そのような複合体の２個以上の異なるリガンドは、アミノエチルトリマンノース（ＡＥＴＭ）である。ある実施形態では、そのような複合体の２個以上の異なるリガンドは、β－アミノエチル－Ｎ－アセチルグルコサミン（ＡＥＧＡ）である。ある実施形態では、そのような複合体の２個以上の異なるリガンドは、アミノエチルフコース（ＡＥＦ）である。
【０１６６】
種々の実施形態で、本開示の複合体は、これもインスリン分子に複合体化する単一複合体骨格に複合体化する２個以上の異なるリガンドを含む。いくつかの実施形態では、そのような複合体の２個以上の異なるリガンドおよびインスリン分子は、それぞれ、単一分岐複合体骨格の異なる分岐部上に位置する。いくつかの実施形態では、そのような複合体の２個以上の異なるリガンドおよびインスリン分子は、それぞれ、単一分岐複合体骨格の異なる分岐部の末端に位置する。いくつかの実施形態では、そのような複合体の２個以上の別のリガンドは、２個以上の異なる複合点を介してインスリン分子に複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基およびLys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、それぞれ１個以上の別のリガンドに複合体化する、２個の別の複合体骨格に複合体化する。他のそのような実施形態では、インスリン分子はそれぞれ１つのリガンドに複合体化している２つの別の複合体骨格に複合体化する。そのような実施形態のさらに他のものでは、インスリン分子は、それぞれ２つのリガンドに複合体化している、２つの別の分岐状複合体骨格に複合体化している。あるそのような実施形態では、リガンドは、分岐複合体骨格の別の分岐部に位置する。他のそのような実施形態では、リガンドは、分岐複合体骨格の別の分岐部の末端に位置する。
【０１６７】
種々の実施形態で、本開示の複合体は、アミノエチルグルコース（ＡＥＧ）に複合体化するインスリン分子を含む。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１アミノ酸残基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基およびLys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。
【０１６８】
種々の実施形態で，本開示の複合体は、アミノエチルマンノース（ＡＥＭ）に複合体化するインスリン分子を含む。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１アミノ酸残基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化するインスリングルリジンである。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基およびLys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。
【０１６９】

種々の実施形態で、本開示の複合体は、アミノエチルビマンノース（ＡＥＢＭ）に複合体化するインスリン分子を含む。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１アミノ酸残基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化するインスリングルリジンである。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基およびLys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。

【０１７０】

種々の実施形態で、本開示の複合体は、アミノエチルトリマンノース（ＡＥＴＭ）に複合体化するインスリン分子を含む。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１アミノ酸残基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化するインスリングルリジンである。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基およびLys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。

【０１７１】

種々の実施形態で、本開示の複合体は、β－アミノエチル－Ｎ－アセチルグルコサミン（ＡＥＧＡ）に複合体化するインスリン分子を含む。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１アミノ酸残基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B3}のε－アミノ基を介して複合体化するインスリングルリジンである。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基およびLys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。

【０１７２】

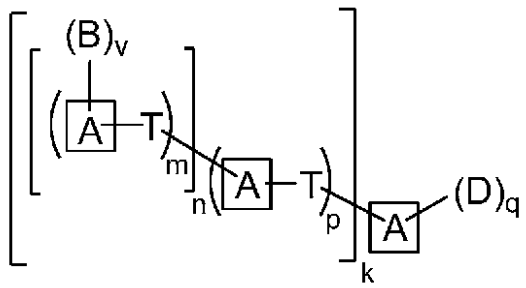
種々の実施形態で、本開示の複合体は、アミノエチルフコース（ＡＥＦ）に複合体化するインスリン分子を含む。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基を介して複合体化する。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ｂ１アミノ酸残基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。ある実施形態では、インスリン分子は、Lys^{B3}のε－アミノ基を介して複合体化するインスリングルリジンである。あるそのような実施形態では、インスリン分子は、Ａ１アミノ酸残基およびLys^{B29}のε－アミノ基を介して複合体化する。

【０１７３】

複合体骨格：

この項では、いくつかの例示的な複合体骨格を記載する。種々の実施形態で、本開示の複合体は、一般式（Ｉ）：

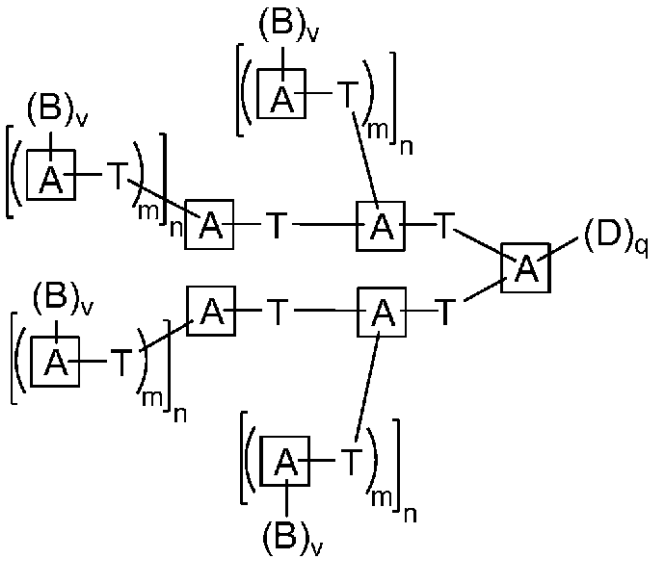
【化６】



Ｉ

【０１７４】
を有し得る。
【０１７５】
（式中、［（Ａ－Ｔ）］は、それぞれ、複合体内のポテンシャル分岐部を示し；
（Ａ－Ｔ）は、それぞれ、複合体の分岐部内のポテンシャル繰返部を示し；
－Ａ－は、それぞれ独立して、共有結合、炭素原子、ヘテロ原子、または場合によっては置換された基であって、アシル、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリールおよび複素環からなる群から選択される基であり；
Ｔは、それぞれ独立して、共有結合、または２価の、直鎖または分岐状、飽和または不飽和の、場合によっては置換されたC_{1-30}炭化水素鎖であり、ここで、Ｔの１個以上のメチレン単位は、場合によってはおよび独立して、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｎ（Ｒ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、－Ｎ（Ｒ）SO_2－、－SO_2Ｎ（Ｒ）－、複素環基、アリール基またはヘテロアリール基で置き換えられ；
Ｒは、それぞれ独立して、水素、適切な保護基、またはアシル部分、アリールアルキル部分、脂肪族部分、アリール部分、ヘテロアリール部分、またはヘテロ脂肪族部分であり；
－Ｂは－Ｔ－L^B－Ｘであり；
Ｘは、それぞれ独立して、リガンドであり；
L^Bは、それぞれ独立して、共有結合またはＴとＸとの共有結合型複合に由来する基であり；
－Ｄは－Ｔ－L^D－Ｗであり；
Ｗは、それぞれ独立して、薬物であり；
L^Dは、それぞれ独立して、共有結合、またはＴとＷとの共有結合型複合に由来する基であり；
ｋは、１～１２の整数であり；
ｑは、１～４の整数であり；
ｐは、それぞれ独立して、１～５の整数であり；
ｎは、それぞれ独立して、０～５の整数であり；
ｍは、それぞれ独立して、１～５の整数であり；および
ｖは、それぞれ独立して、０～５の整数であり、
ただし、各ｋ－分岐部内で、ｎの少なくとも１つは≧１であり、およびｖの少なくとも１つは≧１である。）
一般式（Ｉ）（および本明細書中の他の式）は、全ての水素を明記していないことは理解すべきである。たとえば、中央の－Ａ－がC_6アリール基であり、ｋ＋ｑ＜６の場合、C_6アリール環上のオープンポジションには水素が含まれていることは理解されることである。
【０１７６】
一般的に、各－Ａ－は、ポテンシャル分岐ノードを示し、各ノードでの分岐の数は、中央の－Ａ－のｋの値および中央にない－Ａ－のｎの値で決まることは理解されることである。ｎは０～５の整数であり得るから、本開示は、これらの複合体の直鎖、分岐状、および多分岐状（たとえば、デンドリマー様）実施形態も考慮していることを当業者であれば理解する。各ｋ－分岐部内で、ｎの少なくとも１つは≧１であり、およびｖの少なくとも１つは≧１であるという但し書きは、全ての複合体は、少なくとも１つのＢ（すなわち、リガンド）を含むことを明確にしている。
【０１７７】
ある実施形態では、ｐの括弧でくくられた部分における－Ａ－は、それぞれ、≧１の数に対応する数のｎの括弧でくくられた部分によって置換されてもよい。たとえば、ｋ＝２および両ｋの分岐部分でｐ＝２の場合、複合体は、式（Ｉａ）：

【化７】



Ia

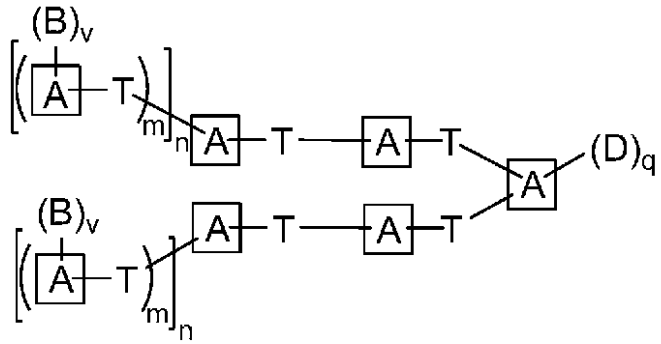
【０１７８】

の複合体である場合がある。

【０１７９】

他の実施形態では、ｐの括弧でくくられた部分における－Ａ－の末端部のみが、≧１の数に対応する数のｎの括弧でくくられた部分によって置換されている。たとえば、ｋ＝２および両ｋの分岐部分でｐ＝２（および、両ｋ－分岐部における最初のｐの括弧でくくられた部分に関しｎ＝０）の場合、複合体は、式（Ｉｂ）：

【化８】



Ib

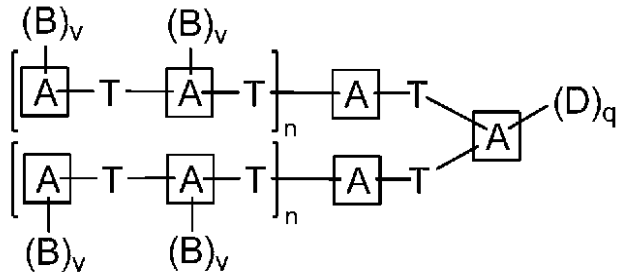
【０１８０】

の複合体である場合がある。

【０１８１】

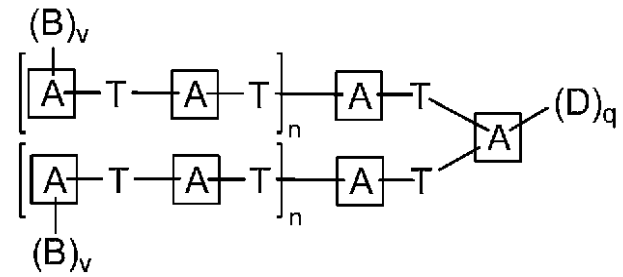
ある実施形態では、ｍの括弧でくくられた部分における－Ａ－は、それぞれ、≧１の数に対応する数のＢ部分によって置換されている。たとえば、ｋ＝２、各場合のｐ＝１、および各場合のｍ＝２の場合、複合体は、式（Ｉｃ）：

【化９】



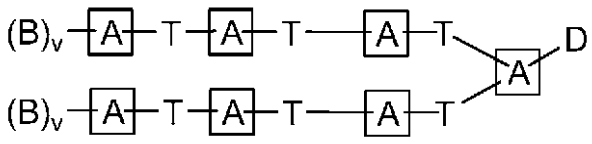
Ic

【０１８２】
の複合体である場合がある。
【０１８３】
他の実施形態では、ｍの括弧でくくられた部分における－Ａ－の末端部のみが、≧１の数に対応する数のＢ部分によって置換されている。たとえば、ｋ＝２、各場合のｐ＝１、および各場合のｍ＝２（および各ｎ－分岐部における最初のｍの括弧でくくられた部分に関しｖ＝０）である場合、複合体は、式（Ｉｄ）：
【化１０】



Id

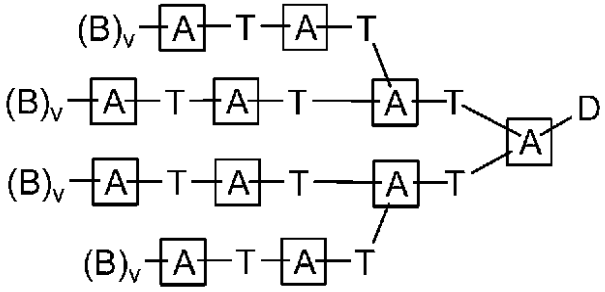
【０１８４】
の複合体である場合がある。
【０１８５】
さらなる例示として、先の式の両ｋ－分岐部において、ｑ＝１およびｎ＝１の場合、複合体は、式（Ｉｅ）：
【化１１】



Ie

【０１８６】
の複合体である場合がある。
【０１８７】
あるいは、先の式の両ｋ－分岐部において、ｑ＝１およびｎ＝２の場合、複合体は式（Ｉｆ）：

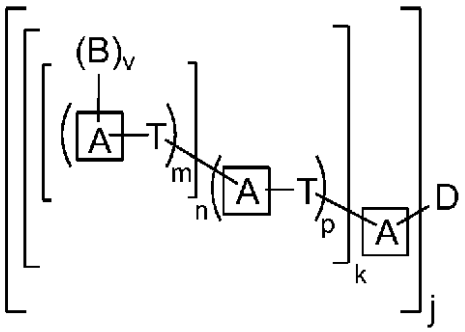
【化１２】



If

【０１８８】
の複合体である場合がある。
【０１８９】
種々の実施形態で、本開示は、リガンドおよび／または複合体骨格に非共有結合で結合している薬物を含む複合体も提供する。
【０１９０】
たとえば、いくつかの実施形態では、本開示は、先の式
（式中、－Ａ－、Ｔ、Ｄ、ｋ、ｑ、ｐ、ｎ、ｍおよびｖは、それぞれ、本明細書で定義し、記載した通りであり；
－Ｂは－Ｔ－ＬＲＰ^{B}－Ｘであり；
Ｘは、それぞれ独立して、リガンドであり；および
ＬＲＰ^{B}は、それぞれ独立して、ＴとＸとの間に、ヒト血清における解離定数が１ｐｍｏｌ／Ｌ未満である非共有結合を形成するリガンド－受容体ペアである。）
のいずれかの複合体を提供する。
【０１９１】
さらに他の実施形態では、本開示は、先の式
（式中、－Ａ－、Ｔ、Ｂ、ｋ、ｑ、ｐ、ｎ、ｍおよびｖは、それぞれ、本明細書で定義し、記載した通りであり；
－Ｄは、－Ｔ－ＬＲＰ^{D}－Ｗであり；
Ｗは、それぞれ独立して、薬物であり；および
ＬＲＰ^{D}は、それぞれ独立して、ＴとＷとの間に、ヒト血清における解離定数が１ｐｍｏｌ／Ｌ未満である非共有結合を形成するリガンド－受容体ペアである）
のいずれかの複合体を提供する。
【０１９２】
他の実施形態では、本開示は、先の式（式中、－Ａ－、Ｔ、ｋ、ｑ、ｐ、ｎ、ｍおよびｖは、それぞれ、本明細書で定義し、記載した通りであり；
－Ｂは、－Ｔ－ＬＲＰ^{B}－Ｘであり；
Ｘは、それぞれ独立して、リガンドであり；
ＬＲＰ^{B}は、それぞれ独立して、ＴとＸとの間に、ヒト血清における解離定数が１ｐｍｏｌ／Ｌ未満である非共有結合を形成するリガンド－受容体ペアであり；
－Ｄは、－Ｔ－ＬＲＰ^{D}－Ｗであり；
Ｗは、それぞれ独立して、薬物であり；および
ＬＲＰ^{D}は、それぞれ独立して、ＴとＷとの間に、ヒト血清における解離定数が１ｐｍｏｌ／Ｌ未満である非共有結合を形成するリガンド－受容体ペアである）
のいずれかの複合体を提供する。
【０１９３】
他の態様で、本開示の複合体は、一般式（Ｉ）：

【化１３】



II

【０１９４】

（式中、－Ａ－、Ｂ、Ｔ、Ｄ、ｖ、ｍ、ｎ、ｐおよびｋは、それぞれ、本明細書で定義し、記載した通りであり；ｊは、１～４の整数である）を有し得る。式（ＩＩ）の複合体は、薬物に対し、リガンドの複合体の複数の部位を有してもよい（すなわち、２個以上のリガンドが、薬物上の異なる部位、たとえば、生体分子薬物中の異なるアミノ酸を介して、単一の薬物分子に複合体化している場合）。ｑが１の場合、上記の亜属（すなわち、式（Ｉａ）～（Ｉｆ））は、式（ＩＩ）（式中、ｊは１）の複合体に適用されることは理解される。同じように、当業者は、複合体（式中、ｊが２、３または４）に関し、類似する亜属を想定することができる。

【０１９５】

例示の目的でおよび混乱を避けるため、式（ＩＩ）の複合体（すなわち、ｊが２の場合）における－Ａ－Ｄ－Ａ－は、－Ａ－Ｔ－L^{D}－Ｗ－L^{D}－Ｔ－Ａ－（薬物が共有結合で複合体骨格に結合している場合）、または、－Ａ－Ｔ－ＬＲＰ^{D}－Ｗ－ＬＲＰ^{D}－Ｔ－Ａ－（薬物が非共有結合で複合体骨格に結合している場合）と表すことができることは理解される。

【０１９６】

例示的な基の説明：

－Ａ－（ノード）：

ある実施形態では、－Ａ－は、それぞれ独立して、アシル、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリールおよび複素環からなる群から選択される、場合によっては置換された基である。実施形態では、－Ａ－は同じである。いくつかの実施形態では、中央の－Ａ－は、他の全ての－Ａ－と異なる。ある実施形態では、中央の－Ａ－を除いて－Ａ－は全て同じである。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、－Ａ－は、場合によっては置換された、アリールまたはヘテロアリール基である。いくつかの実施形態では、－Ａ－は、６－員環アリールである。ある実施形態では、－Ａ－はフェニルである。

【０１９８】

ある実施形態では、－Ａ－は、Ｎ、ＯまたはＳから選択されるヘテロ原子である。いくつかの実施形態では、－Ａ－は、窒素原子である。いくつかの実施形態では、－Ａ－は酸素原子である。いくつかの実施形態では、－Ａ－はイオウ原子である。いくつかの実施形態では、－Ａ－は炭素原子である。

【０１９９】

Ｔ（スペーサー）：

ある実施形態では、Ｔは、それぞれ独立して、２価の、直鎖または分岐状、飽和または不飽和、場合によっては置換された、C_{1-20}炭化水素鎖であって、Ｔの１個以上のメチレン単位は、場合によっておよび独立して、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｎ（Ｒ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）－

、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、－Ｎ（Ｒ）ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$Ｎ（Ｒ）－、複素環基、アリール基またはヘテロアリール基で置き換えられた炭化水素鎖である。ある実施形態では、Ｔの１、２、３、４または５個のメチレン単位が、場合によっておよび独立して、置き換えられる。ある実施形態では、Ｔは、Ｃ$_{1-10}$、Ｃ$_{1-8}$、Ｃ$_{1-6}$、Ｃ$_{1-4}$、Ｃ$_{2-12}$、Ｃ$_{4-12}$、Ｃ$_{6-12}$、Ｃ$_{8-12}$またはＣ$_{10-12}$炭化水素鎖であって、Ｔの１個以上のメチレン単位は、場合によっておよび独立して、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｎ（Ｒ）－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（Ｏ）－、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、－Ｎ（Ｒ）ＳＯ$_2$－、－ＳＯ$_2$Ｎ（Ｒ）－、複素環基、アリール基またはヘテロアリール基で置き換えられた炭化水素鎖で構成される。いくつかの実施形態では、Ｔの１個以上のメチレン単位は、複素環基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、Ｔの１個以上のメチレン単位は、トリアゾール部分によって置き換えられる。ある実施形態では、Ｔの１個以上のメチレン単位は、－Ｃ（Ｏ）－によって置き換えられる。ある実施形態では、Ｔの１個以上のメチレン単位は、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｒ）－によって置き換えられる。ある実施形態では、Ｔの１個以上のメチレン単位は、－Ｏ－によって置き換えられる。

【０２００】

いくつかの実施形態では、Ｔは

【化１４】



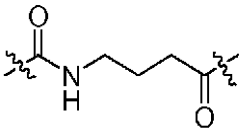
【０２０１】

である。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、Ｔは

【化１５】



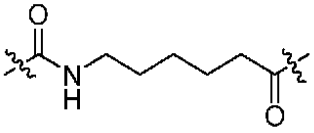
【０２０３】

である。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、Ｔは

【化１６】



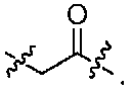
【０２０５】

である。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、Ｔは

【化１７】



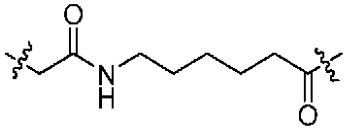
【０２０７】

である。

【０２０８】

いくつかの実施形態では、Ｔは

【化１８】



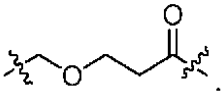
【０２０９】

である。

【０２１０】

いくつかの実施形態では、Ｔは

【化１９】



【０２１１】

である。

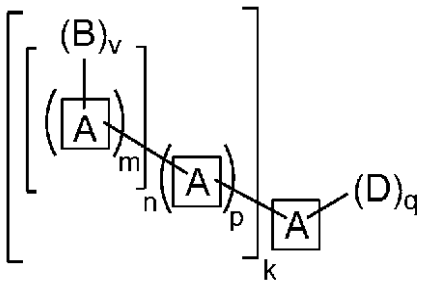
【０２１２】

ある実施形態では、Ｔはそれぞれ同じである。

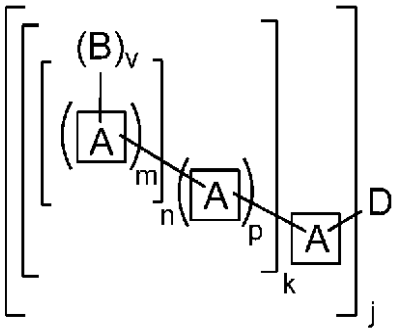
【０２１３】

ある実施形態では、各Ｔ（外側の基ＢおよびＤ）は、共有結合であり、複合体は、一般式（ＩＶ）または（Ｖ）：

【化２０】



または



IV **V**

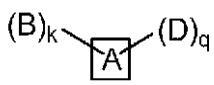
【０２１４】

（式中、－Ａ－、Ｂ、Ｄ、ｖ、ｍ、ｎ、ｐ、ｋおよびｊは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体である。

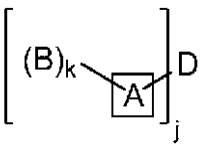
【０２１５】

一般式（ＩＶ）および（Ｖ）のある実施形態では、中央の－Ａ－を除いて各－Ａ－は、共有結合であり、それぞれの場合、ｖ＝１であり、複合体は、式（ＶＩ）または（ＶＩＩ）：

【化２１】



または

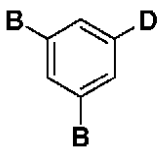


【０２１６】

（式中、－Ａ－、Ｂ、Ｄ、ｑ、ｋおよびｊは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体である。

【０２１７】

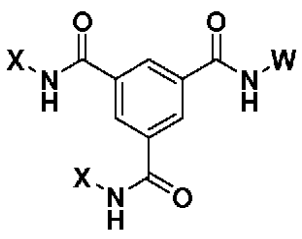
式（ＶＩ）のあるそのような実施形態では、ｋ＝１およびｑ＝１である。
【０２１８】
他の実施形態では、ｋ＝２およびｑ＝１である。
【０２１９】
他の実施形態では、ｋ＝３およびｑ＝１である。
【０２２０】
他の実施形態では、ｋ＝１およびｑ＝２である。
【０２２１】
他の実施形態では、ｋ＝２およびｑ＝２である。
【０２２２】
式（ＶＩＩ）のあるそのような実施形態では、ｋ＝１およびｊ＝２である。
【０２２３】
他の実施形態では、ｋ＝２およびｊ＝２である。
【０２２４】
他の実施形態では、ｋ＝３およびｊ＝２である。
【０２２５】
他の実施形態では、ｋ＝１およびｊ＝１である。
【０２２６】
他の実施形態では、ｋ＝２およびｊ＝１である。
【０２２７】
他の実施形態では、ｋ＝３およびｊ＝１である。
【０２２８】
他の実施形態では、ｋ＝１およびｊ＝３である。
【０２２９】
他の実施形態では、ｋ＝２およびｊ＝３である。
【０２３０】
他の実施形態では、ｋ＝３およびｊ＝３である。
【０２３１】
いくつかの実施形態で、本開示は、一般式（ＶＩａ）を：
【化２２】



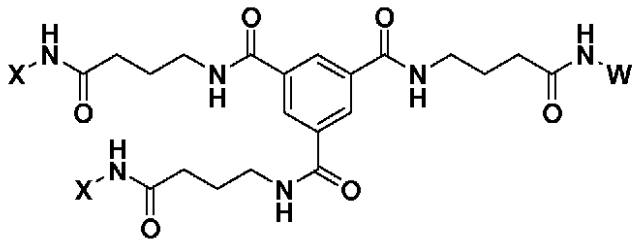
,

VIa

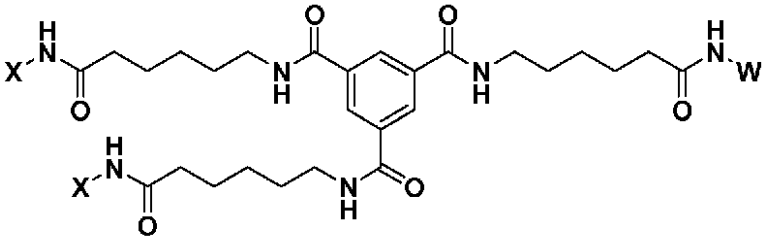
【０２３２】
（式中、ＢおよびＤは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。
【０２３３】
たとえば、いくつかの実施形態で、本開示は、式：
【化２３】



;

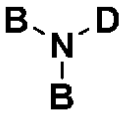


;または



.

【０２３４】
（式中、ＷおよびＸは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。
【０２３５】
いくつかの実施形態で、本開示は、一般式（ＶＩｂ）：
【化２４】

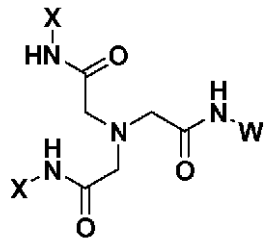


,

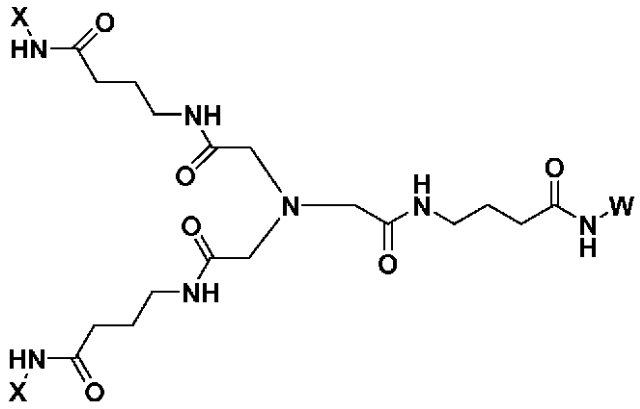
VIb

【０２３６】
（式中、ＢおよびＤは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。
【０２３７】
たとえば、いくつかの実施形態で、本開示は、式：

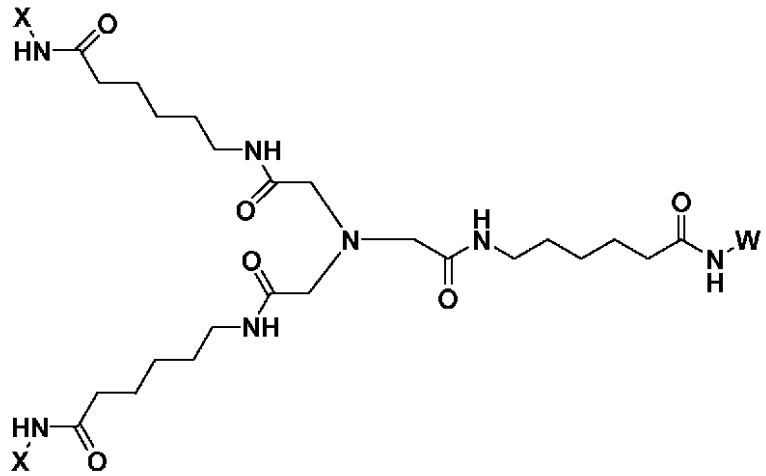
【化２５】



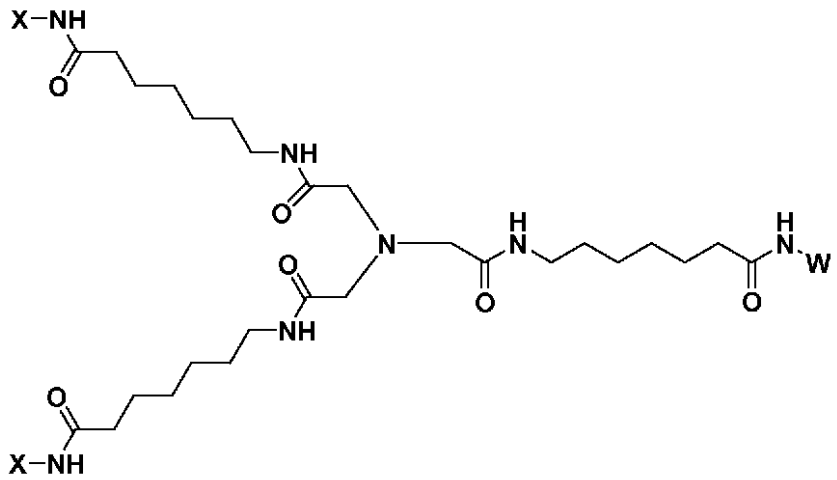
;



;



;または



,

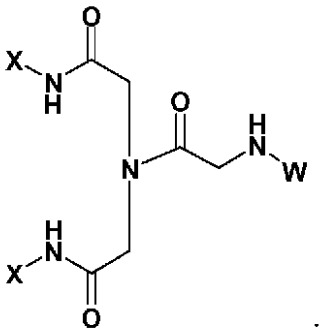
【０２３８】

（式中、ＷおよびＸは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。

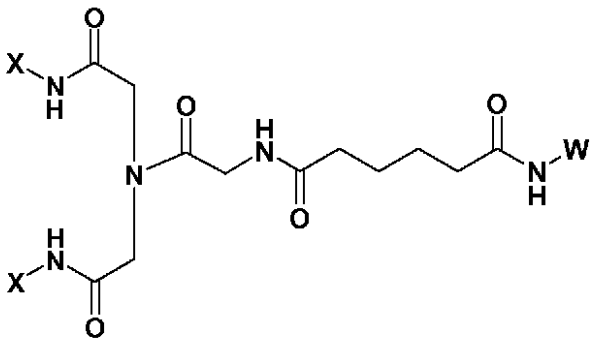
【０２３９】

たとえば、いくつかの実施形態で、本開示は、式：

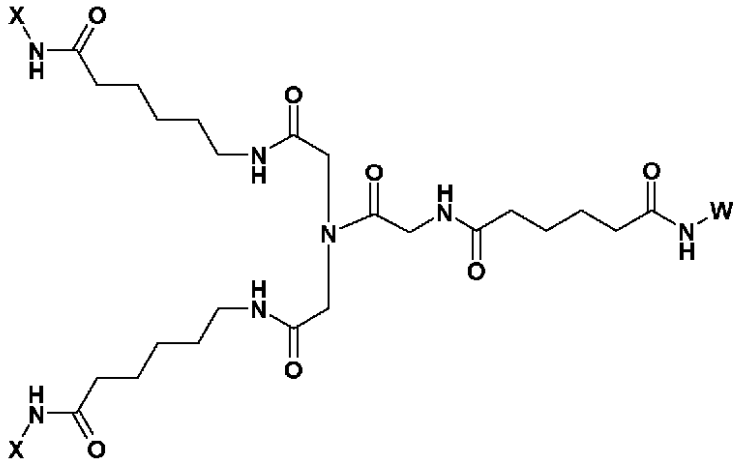
【化２６】



;



;または



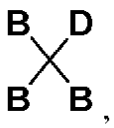
,

【０２４０】

（式中、ＷおよびＸは、本明細書で定義し、記載した通りである）

いくつかの実施形態で、本開示は、一般式（ＶＩｃ）：

【化２７】



,

VIc

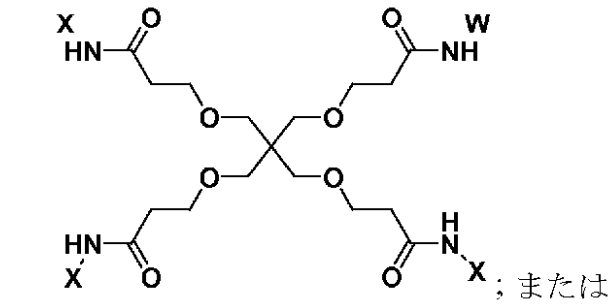
【０２４１】

（式中、ＢおよびＤは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。

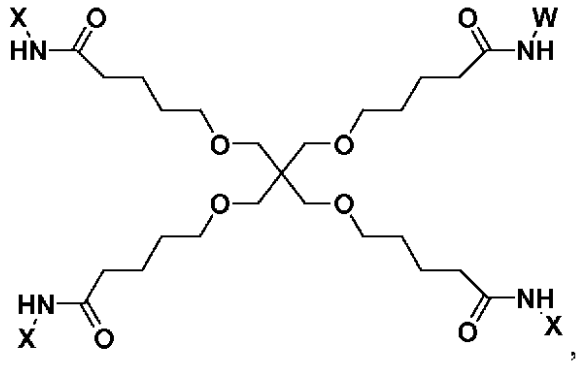
【０２４２】

たとえば、いくつかの実施形態で、本開示は、式：

【化２８】



；または



，

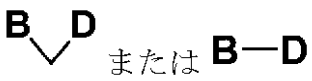
【０２４３】

（式中、ＷおよびＸは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。

【０２４４】

いくつかの実施形態で、本開示は、一般式（ＶＩｄ）および（ＶＩｅ）：

【化２９】



または B—D

VId VIe

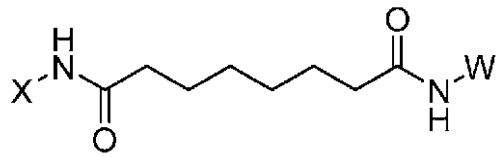
【０２４５】

（式中、ＢおよびＤは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。

【０２４６】

たとえば、いくつかの実施形態で、本開示は、式：

【化３０】



，

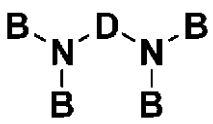
【０２４７】

（式中、ＷおよびＸは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。

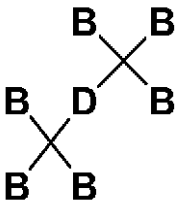
【０２４８】

式（ＶＩａ）、（ＶＩｂ）、（ＶＩｃ）、（ＶＩｄ）および（ＶＩｅ）の亜属およびその種は、式（ＶＩＩ）（式中、ｊは１）の複合体に適用されることは理解される。同じように、当業者は、式（ＶＩＩ）（式中、ｊは２、３または４）の複合体に関し、類似する亜属および種を想定することができる。たとえば、ｊが２の場合、本開示は、式：

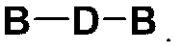
【化３１】



VIIb-*i*



VIIc-*i*



VIIe-*i*

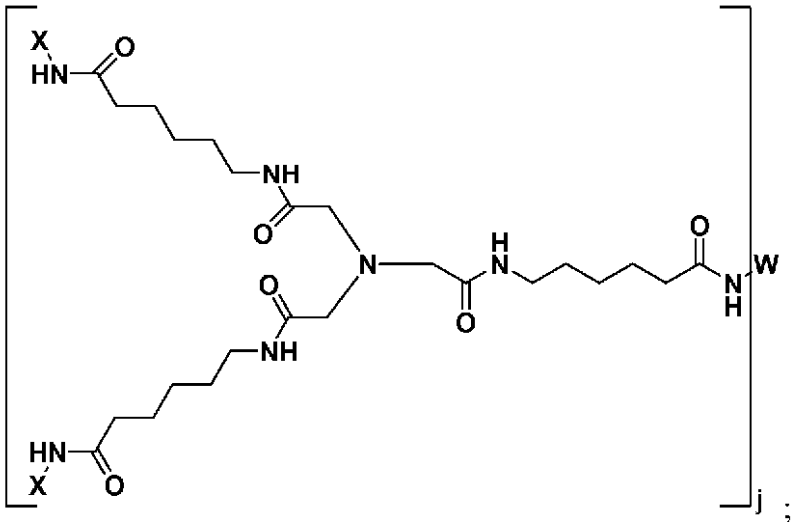
【０２４９】

（式中、ＢおよびＤは、本明細書で定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。

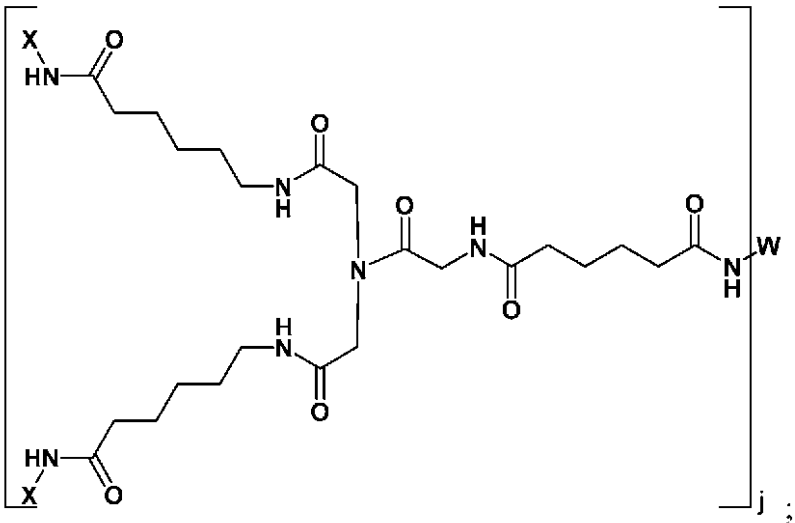
【０２５０】

いくつかの実施形態で、本開示は、一般式：

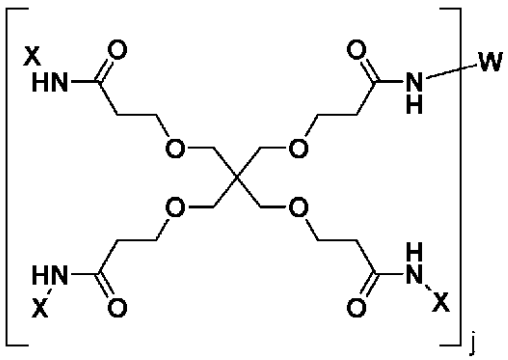
【化３２】



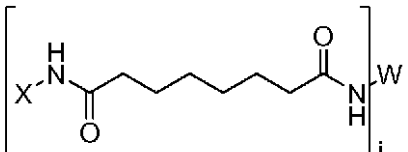
;



;



;または



,

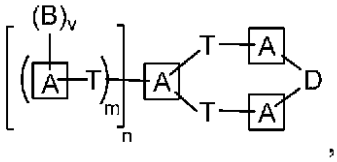
【０２５１】

（式中、Ｗ、Ｘおよびｊは、本明細書に定義および記載した通りである）を提供する。

【０２５２】

別の態様では、本開示の複合体は、一般式（ＶＩＩＩ）：

【化３３】



,

VIII

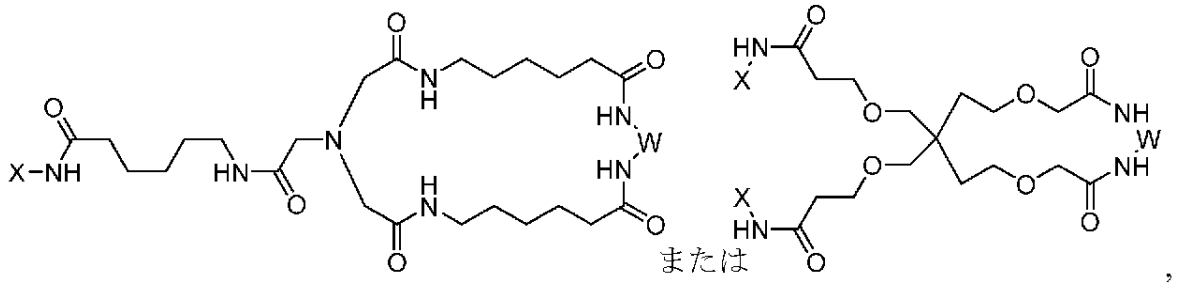
【０２５３】

（式中、－Ａ－、Ｔ、Ｄ、ｖ、ｍおよびｎは、式（Ｉ）の複合体に関し定義し、記載した通りであり、Ｂは、－Ｔ－Ｌ^{B}－Ｘ（式中、Ｘは、それぞれ独立して、糖を含むリガンドである）である）を有し得る。

【０２５４】

たとえば、いくつかの実施形態で、本開示は、式：

【化３４】



,

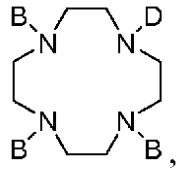
【０２５５】

（式中、ＷおよびＸは、式（Ｉ）の複合体に関し定義し、記載した通りである）の複合体を提供する。

【０２５６】

さらに別の態様では、複合体スカフォールドは、式（Ｉ）または（ＩＩ）ではなく、代わりに、大環状分子である。いくつかの実施形態では、大環状分子は、ポリアミンの大環状分子である。たとえば、種々の実施形態で、本開示の複合体は、一般式（ＩＸ）：

【化３５】



,

IX

【０２５７】

（式中、Ｄは、式（Ｉ）の複合体に関し定義し、記載した通りであり、Ｂは、－Ｔ－Ｌ^{B}－Ｘ（式中、Ｘは、それぞれ独立して、糖を含むリガンドである）を有し得る。

【０２５８】

Ｂ（リガンド）

ある実施形態では、－Ｂは、－Ｔ－Ｌ^{B}－Ｘ（式中、Ｘはリガンドであり、Ｌ^{B}は、共有結合、またはＸとＴとの共有結合型複合に由来する基である）である。例示的なリガンドおよびそれらの糖成分は、先に記載した。

【０２５９】

Ｄ（薬物）

ある実施形態では、－Ｄは、－Ｔ－Ｌ^{D}－Ｗ（式中、Ｗは薬物であり、Ｌ^{D}は、共有結合、またはＷとＴとの共有結合型複合に由来する基である）である。例示的な薬物は、先

に記載した。

【０２６０】

L^BおよびL^D（共有結合型複合体）：

当業者であれば、種々の複合化学が、ＸとＴと、および／またはＷとＴと（一般的に「成分」）を共有結合で複合体化するために使用されることを理解する。そのような技術は、当分野で広く知られており、例示的な技術を以下に検討する。成分は、直接的に結合（すなわち、介在する化学基なしで）またはスペーサー（たとえば、複合体化された構成成分と複合体骨格の残部との間にある物理的な分離を提供する架橋剤または共役鎖）を介して間接的に結合し得る。成分は、アミド、アミン、エステル、エーテル、チオエーテル、イソ尿素、イミンなど（これらに限定されない）の結合を始めとする任意の数の化学結合を介して、共有結合で複合体骨格に結合してもよい。ある実施形態では、L^Bおよび／またはL^D（この項の目的では、一般的に、「Ｌ」）は、共有結合である。いくつかの実施形態では、Ｌは、場合によっては置換されたＴのカルボニル反応性、チオール反応性、アミン反応性またはヒドロキシル反応性部分と、ＸまたはＷのカルボキシル、チオール、アミンまたはヒドロキシル基の複合に由来する、場合によっては置換された部分である。いくつかの実施形態では、Ｌは、ＸまたはＷの場合によっては置換されたカルボキシル反応性、チオール反応性、アミン反応性またはヒドロキシル反応性部分と、Ｔのカルボキシル、チオール、アミンまたはヒドロキシル基の複合に由来する、場合によっては置換された部分である。いくつかの実施形態では、Ｌは、

【化３６】



【０２６１】

である。いくつかの実施形態では、Ｌは、スクシンイミド部分である。

【０２６２】

種々の実施形態で、当分野で公知の「クリックケミストリー」反応を使用して、成分を共有結合で複合体骨格に結合してもよい。これらの方法として、たとえば、シクロ付加反応、求核開環反応、および炭素・炭素多重結合に対する付加（たとえば、Ｋｏｌｂおよび Ｓｈａｒｐｌｅｓｓ，Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｏｄａｙ ８：１１２８－１１３７，２００３およびそこに挙げられた参考文献、ならびにＤｏｎｄｏｎｉ，Ｃｈｅｍ．Ａｓｉａｎ Ｊ．２：７００－７０８，２００７およびこれに列挙されている参考文献参照）が挙げられる。先に検討したように、種々の実施形態で、自然のまたは化学的に付加された側鎖基を介して、複合体骨格に結合してもよい。一般的に、一組の反応性基（たとえば、反応してアミド結合を生成するカルボキシル基とアミン基）の第一と第二メンバーは、成分および骨格のいずれか１つに存在し得る（すなわち、２つのメンバーの相対的な位置は、それらが反応して複合体を生成する限り、あまり重要な意味を持たない）ことが理解される。例示的な架橋を、以下にさらに詳しく検討する。

【０２６３】

種々の実施形態で、成分を有するカルボキシル（または反応性エステル）を、Ｋｉｍら，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２４：４８４３－４８５１（２００３）により略述された手順を使用して、－ＯＨ含有骨格（ＯＢＦ）に複合体化することができる。手短に言えば、ＯＢＦをカルボキシル含有成分とともにＤＭＳＯに溶解し、Ｎ’，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）および４－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）を触媒として使用して、乾燥雰囲気下で反応させる。カルボキシル含有成分は、カルボジイミド（ＥＤＡＣ）架橋法を使用して、$-NH_2$含有骨格（ＮＢＦ）に複合体化することができる。この方法を使用して、ｐＨ５の緩衝液中でＥＤＡＣと反応させ、次いでＮＢＦを付加することによって、カルボキシル含有成分に官能性を持たせる。これらのどちらの場合も（および以下のいかなる場合も）、得られた生成物は、サイズ排除クロマトフグフィー、逆相クロマトフグフィー、シリカゲルクロマトフグフィー、イオン交換クロマトフグフィー

、限外ろ過、および選択的沈殿（これらに限定されない）を始めとする、当業者に公知の方法の様々な方法によって精製してもよい。

【０２６４】

種々の実施形態で、アミン含有成分は、－ＣＯＯＨ含有骨格（ＣＢＦ）にカップリングすることができる。活性化エステル部分を使用するＣＢＦ（たとえば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，第２編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００８およびこれに挙げられた参考文献参照）。簡単に言えば、－ＮＨＳ、－ＳＳＣ、－ＮＰＣなどのような末端活性化カルボン酸エステルを有するＣＢＦを、ＤＭＳＯまたはＤＭＦのような無水有機溶剤に溶解する。次いで、所望の当量数のアミン含有成分を加え、室温で数時間混合する。アミン含有成分を、Ｂａｕｄｙｓら，Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．９：１７６－１８３，１９９８に記載されるように、ＣＢＦに複合体化し、安定なアミド結合を生成することもできる。この反応は、トリブチルアミン（ＴＢＡ）およびイソブチルクロロホルメートを、ＣＢＦおよびアミン含有成分のジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）溶液に、無水条件下で加えることによって達成することができる。あるいは、アミン含有成分を、臭化シアン（ＣＮＢｒ）、Ｎ－シアノトリエチルアンモニウムテトラフルオロボレート（ＣＴＥＡ）、１－シアノ－４－（ジメチルアミノ）－ピリジニウムテトラフルオロボレート（ＣＤＡＰ）、およびｐ－ニトロフェニルシアネート（ｐＮＰＣ）（これらに限定されない）を始めとする試薬を使用するシアン化により、ＯＢＦにカップリングすることもできる。ＣＮＢｒ反応は、水溶液中、弱塩基性ｐＨで行うことができる。ＣＤＡＰ反応は、ＤＭＳＯおよび水の混合物中、弱塩基性ｐＨで、触媒としてトリエチルアミン（ＴＥＡ）を使用して行うことができる。ある実施形態では、たとえば、ピリジンを含有する水性緩衝溶液中でグルタルアルデヒドカップリングを行い、次いでグリシンでクエンチすることによって、アミン含有成分をＮＢＦに複合体化するすることができる。ある実施形態では、シッフ塩基架橋法、次いで還元することによって、アミン含有成分を、アルデヒドを有する骨格に複合体化することができる（たとえば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，第２編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００８およびこれに挙げられた参考文献、ならびにＭｅｉら．Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１６：１６８０－１６８６，１９９９およびこれに挙げられた参考文献参照）。簡単に言えば、末端活性化アルデヒド（たとえば、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒドなど）を有する骨格を、中性またはそれ以下のｐＨの水性緩衝液に溶解し、望ましくないアルデヒド加水分解を防止する。次いで、所望の当量数のアミン含有成分を加え、室温で混合し、次いで過剰の適切な還元剤（たとえば、ナトリウムボロハイドライド、ナトリウムシアノボロハイドライド、ナトリウムトリアセトキシボロハイドライドピリジンボラン、トリエチルアミンボランなど）を添加する。

【０２６５】

種々の実施形態で、ジビニルスルホン（ＤＶＳ）手法に従って、ヒドロキシル含有成分をＯＢＦに複合体化することができる。この手法を使用して、ＯＢＦをｐＨ１１．４の重炭酸塩緩衝液に加え、ＤＶＳで活性化し、次いでヒドロキシル含有成分を添加し、その後グリシンを加え中性とし、反応をクエンチする。先に記載したように、活性化エステル部分を使用して、ヒドロキシル含有成分をＯＢＦに複合体化して、エステル結合を生成してもよい。

【０２６６】

種々の実施形態で、比較的温和な手法を使用して、スルフヒドリル含有成分をマレイミド含有骨格（ＭＢＦ）に架橋し、チオエーテル結合を生成することができる（たとえば、Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，第２編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，２００８およびこれに挙げられた参考文献参照）。マレイミド基は、活性化エステルより加水分解に対して殆ど影響を受けにくいので、反応は、水性条件下で行うことができる。簡単に言えば、ＭＢＦをｐＨ６．５～７．５で緩衝水溶液に溶解し、次いで所望の当量数のスルフヒドリル含有成分に溶解する。室温で数時間混合した後、チオエーテルが架橋した複合体を精製してもよいスルフヒドリル含有成分は、Ｔｈ

ｏｍａら，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２１：５９１９－５９２９，１９９９によって記載された方法に従って、ＮＢＦに複合体化することもできる。この方法は、ＮＢＦを無水ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）に懸濁し、次いで２，６－ルチジンおよび酸無水物を添加し、引き続き反応性中間体を精製することを含む。次いで、スルフヒドリル含有成分を、該中間体のトリエチルアミンを含むＤＭＦ溶液に加える。

【０２６７】

種々の実施形態で、ヒュスゲン型アジド－アルキンシクロ添加の銅（Ｉ）－触媒現代版を使用して、アジド含有成分をアルキン含有骨格（ＡＢＦ）にカップリングし、１，４－ジ置換１，２，３－トリアゾールを得ることができる（たとえば、Ｄｏｎｄｏｎｉ，Ｃｈｅｍ．Ａｓｉａｎ　Ｊ．２：７００－７０８，２００７およびこれに挙げられた参考文献、ならびにＤｅｄｏｌａら，Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．５：１００６－１０１７，２００７参照）。通常「クリック」反応と称される、この反応は、たとえば、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミンおよびＣｕ（ＰＰｈＳ）$_3$Ｂｒを触媒系として使用して、純粋なＴＨＦ中で行ってもよい（たとえば、Ｗｕら，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．５７７５－５７７７，２００５参照）。反応は、アスコルビン酸ナトリウムおよびＣｕＳＯ$_4$・ＳＨ$_2$Ｏを触媒系として使用し、３：１（ＴＨＦ：水）の混合物中で行ってもよい（たとえば、前出、Ｗｕら参照）。どちらの場合も、アジド含有成分を所望の当量数でＡＢＦに加え、次いで室温で１２～４８時間混合する。あるいは、アルキン含有成分を、先に記載した条件と正確に同じ条件を使用して、アジド含有骨格に複合体化してもよい。

【０２６８】

ある成分は、複数の同じ化学反応性部分を自然に有し得る。いくつかの例では、該成分をこれらの部位の１つだけに選択的に反応させるため、化学的反応タイプおよび条件を選択することが可能である。たとえば、インスリンを、反応性アミンを介して複合体化する場合、ある実施形態では、インスリン生物活性を保存するためには、Ｎ末端α－Ｐｈｅ－Ｂ１が、Ｎ末端α－Ｇｌｙ－Ａ１およびε－Ｌｙｓ－Ｂ２９より結合の好ましい部位である（たとえば、Ｍｅｉら、Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１６：１６８０－１６８６，１９９９およびこれに挙げられた参考文献、ならびにＴｓａｉら，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．８６：１２６４－１２６８，１９９７参照）。インスリンとヘキサデセナール（アルデヒド末端分子）との間の例示的な反応において、研究者らは、ナトリウムシアノボロハイドライドの存在下、２つの成分を、５４％イソプロパノールを含有する、１．５Ｍのｐ６．８のサリチル酸ナトリウム水溶液中で、１：６の比（インスリン：アルデヒド、モル／モル）で、一晩混合することによって、単一置換Ｐｈｅ－Ｂ１第二アミン複合体化生成物に対し、８０％を超える変化率となることを発見した（Ｍｅｉら、Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１６：１６８０－１６８６，１９９９）。彼らの研究は、溶剤、ｐＨおよびインスリン：アルデヒドの比の選択は、全て、反応の選択性および収率に影響を及ぼすことを示した。しかし、殆どの場合、化学反応条件の選択により選択率を達成することは困難である。従って、ある実施形態では、反応のための１つの所望の成分以外の全ての部位での成分（たとえば、インスリン）を選択的に保護し、その後、物質を反応させ、精製した後、脱保護ステップを行うのが有利であり得る。たとえば、酸性（ＢＯＣ）、弱酸性（シトラコン酸無水物）および塩基性（ＭＳＣ）条件下で脱保護され得るものを始めとする、文献で知られているインスリンアミン基の選択的保護の数多くの例がある（たとえば、Ｔｓａｉら，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．８６：１２６４－１２６８，１９９７；Ｄｉｘｏｎら，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．１０９：３１２－３１４，１９６８；およびＳｃｈｕｅｔｔｌｅｒら，Ｄ．Ｂｒａｎｄｅｎｂｕｒｇ　Ｈｏｐｐｅ　Ｓｅｙｌｅｒ’ｓ　Ｚ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．３６０：１７２１，１９７９参照）。一例では、Ｇｌｙ－ＡｌおよびＬｙｓ－Ｂ２９アミンは、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル（ＢＯＣ）基で選択的に保護され、これは次いで、９０％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）／１０％アニソール溶液中１時間４℃のインキュベーションによる複合の後、除去される。一実施形態では、インスリンの乾燥粉末を、無水ＤＭＳＯに溶解し、次いで過剰のトリエチルアミンを溶解する。この溶液に、約２当量のジ－ｔｅｒｔ－ブチルジカーボネートのＴＨＦ溶液をゆっくり加え、該溶液を３０～６０分

混合する。反応後、粗溶液を過剰量のアセトンに注ぎ込み、次いで希ＨＣｌを滴下し、反応インスリンを析出させる。析出した物質を遠心分離し、アセトンで洗浄し、完全に真空乾燥する。目的の保護されたジ－ＢＯＣ生成物を、分取逆相ＨＰＬＣまたはイオン交換クロマトグラフィーを使用して、未反応のインスリン、望ましくないジ－ＢＯＣ異性体およびモノ－ＢＯＣおよびトリ－ＢＯＣ副生物から分離する（たとえば、Ｔｓａｉら，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．８６：１２６４－１２６８，１９９７参照）。逆相ＨＰＬＣの場合、租生成物の０．１％ＴＦＡを含有する７０％水／３０％アセトニトリル溶液を、Ｃ８カラムに負荷し、アセトニトリル勾配の増加によって溶出する。目的とするジ－ＢＯＣピークを収集し、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な生成物を得る。

【０２６９】

ＬＲＰ^{B}およびＬＲＰ^{D}（非共有結合型複合）：

当業者であれば、種々の複合化学が、ＸとＴと、および／またはＷとＴと（一般的に「成分」）を共有結合で複合体化するために使用されることを理解する。そのような技術は、当分野で広く知られており、例示的な技術を以下に検討する。ある実施形態では、ヒト血清における非共有結合の解離定数（K_d）は、１ｐｍｏｌ／Ｌ未満である。たとえば、当分野で周知のように、成分は、非共有結合性リガンド受容体ペアを介して、非共有結合で複合体骨格に結合してもよい（たとえば、ビオチン－アビジン系ペア、これに限定されない）。そのような実施形態では、リガンド受容体ペアの１つが共有結合で成分に結合し、ペアのもう一方が共有結合で複合体骨格に結合する。成分および複合体骨格を組合わせる場合、リガンドとその受容体の間の強い非共有結合性相互反応により、成分は、非共有結合で複合体骨格に結合される。例示的なリガンド／受容体ペアとして、タンパク質／コファクターおよび酵素／基質ペアが挙げられる。通常使用されるビオチン／アビジンペアの他に、ビオチン／ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン／抗ジゴキシゲニン、ＦＫ５０６／ＦＫ５０６結合タンパク質（ＦＫＢＰ）、ラパマイシン／ＦＫＢＰ、シクロフィリン／シクロスポリンおよびグルタチオン／グルタチオントランスファーゼペアが挙げられるが、これらに限定されない。他の適切なリガンド／受容体ペアは、当業者に認識され、たとえば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ｃ－ｍｙｃ、ＦＬＡＧ（登録商標）（これらに限定されない）のようなエピトープタグとペアになったモノクロナール抗体があり、さらに、Ｋｅｓｓｌｅｒ「Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ」の１０５－１５２頁，Ｋｅｓｓｌｅｒ編，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，１９９０；「Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）」，Ｐａｓｃａｌ Ｂａｉｌｌｏｎ編，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，２０００；および「Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｌｉｇａｎｄ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」，Ｈｅｒｍａｎｓｏｎら，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９９２に記載されている。

【０２７０】

ｋおよびｑ：

ｋは、１～１２の整数である。ある実施形態では、ｋ＝１～６、たとえば、１、２または３である。ｑは１～４の整数であり、中央の－Ａ－に結合するＤ基の数を定義する。ある実施形態では、ｑ＝１である。いくつかの実施形態では、ｑ＝２である。ある実施形態では、ｋ＋ｑは、２～６の整数である。ある実施形態では、ｋ＋ｑ＝２、３または４である。

【０２７１】

ｐおよびｍ：

ｐは、それぞれ独立して、１～５の整数である。ある実施形態では、各ｐは同じである。ある実施形態では、ｐ＝１、２または３である。ある実施形態では、ｐ＝１である。

【０２７２】

ｍは、それぞれ独立して、１～５の整数である。ある実施形態では、各ｍは同じである。ある実施形態では、ｍ＝１、２または３である。ある実施形態では、ｍ＝１である。

【０２７３】
ｎおよびｖ：
ｎは、それぞれ独立して、０～５の整数であり、ただし、各ｋ－分岐部内で、少なくとも１つのｎは、≧１である。あるｋ－分岐部内の分岐部を、本明細書では、ｎ－分岐部という。
【０２７４】
ある実施形態では、ｐの括弧でくくられた部分における各－Ａ－は、≧１の値に対応する数のｎの括弧でくくられた部分によって置換される。たとえば、前記式（Ｉａ）参照。そのような実施形態のいくつかでは、複合体中の各ｎは同じである。これらの実施形態のいくつかでは、ｎ＝１または２である。
【０２７５】
他の実施形態では、ｐの括弧でくくられた部分における－Ａ－の末端のみが、ｎ≧１の値に対応する数のｎの括弧でくくられた部分によって置換されている。たとえば、上記式（Ｉｂ）参照。ある実施形態では、各ｋ－分岐部は、ｎ≧１の場合を１つしか含まない（すなわち、他の全ては、ｎ＝０である）。そのような実施形態のいくつかでは、複合体中の各ｎは同じである。これらの実施形態のいくつかでは、ｎ＝１または２である。
【０２７６】
ｖは、それぞれ独立して、０～５の整数であり、ただし、各ｋ－分岐部内で、少なくとも１つのｖは、≧１である。
【０２７７】
ある実施形態では、ｍの括弧でくくられた部分における各－Ａ－は、ｖ≧１の値に対応する数のＢ部分によって置換されている。たとえば、前記式（Ｉｃ）参照。そのような実施形態のいくつかでは、複合体内の各ｖは同じである。これらの実施形態のいくつかでは、ｖ＝１または２である。
【０２７８】
他の実施形態では、ｍの括弧でくくられた部分における－Ａ－の末端のみが、ｖ≧１の値に対応する数のＢ部分によって置換されている。たとえば、前記式（Ｉｄ）参照。ある実施形態では、各ｋ－分岐部は、ｖ≧１の場合を１つしか含まない（すなわち、他の全ては、ｖ＝０である）。そのような実施形態のいくつかでは、複合体内の各ｖは同じである。これらの実施形態のいくつかでは、ｖ＝１または２である。ある実施形態では、各ｎ－分岐部は、ｖ≧１の場合を少なくとも１つ含む。ある実施形態では、各ｎ－分岐部は、ｖ≧１の場合を１つしか含まない（すなわち、他の全ては、ｖ＝０である）。そのような実施形態のいくつかでは、複合体内の各ｖは同じである。これらの実施形態のいくつかでは、ｖ＝１または２である。
【０２７９】
ｊ：
式（ＩＩ）のｊは、１～４の整数であり、Ｄ基への複合の数を定義する。ある実施形態では、ｊ＝１である。ある実施形態では、ｊ＝２である。いくつかの実施形態では、ｊ＝３である。他の実施形態では、ｊ＝４である。
【０２８０】
薬物負荷：
一般的に、複合体に負荷される薬物の量は、複合体骨格の分子量および／または化学的活性化のレベル（すなわち、側鎖基が骨格に付加される場合）を調整することによって、コントロールすることができる。種々の実施形態で、薬物負荷濃度は、複合体に対し５～９９％ｗ／ｗの薬物の範囲であり得る。種々の実施形態で、５０～９９％の狭い範囲内の負荷濃度が使用され得、たとえば、８０～９９％の範囲で使用され得る。
【０２８１】
その他：
先の項目では、異なる見出しで複合体の成分（たとえば、リガンド、薬物、骨格）を記載したが、本開示は、開示したリガンド、薬物および骨格のいずれかおよび全てを含む複

合体を包含するものであることは理解されるべきである。

【０２８２】

複合体を調製するための中間体：

一態様では、本開示は、複合体を調製するための試薬を提供する。したがって、種々の実施形態では、一般式（Ｉ）

（式中、－Ａ－、Ｔ、Ｄ、ｋ、ｑ、ｋ＋ｑ、ｐ、ｎ、ｍおよびｖは、上記および本明細書に記載したように定義され；

－Ｂは－Ｔ－Ｌ$^{B'}$であり；および

Ｌ$^{B'}$は、それぞれ独立して、水素、アルキン含有部分、アジド含有部分、または場合によっては置換されている、カルボニル反応性、チオール反応性、アミン反応性またはヒドロキシル反応性部分である）の化合物が提供される。

【０２８３】

他の実施形態では、一般式（Ｉ）

（式中、－Ａ－、Ｔ、Ｂ、ｋ、ｑ、ｋ＋ｑ、ｐ、ｎ、ｍおよびｖは、上記および本明細書に記載したように定義され；

－Ｄは、－Ｔ－Ｌ$^{D'}$であり；および

Ｌ^{D}は、それぞれ独立して、水素、アルキン含有部分、アジド含有部分、または場合によっては置換されている、カルボニル反応性、チオール反応性、アミン反応性またはヒドロキシル反応性部分である）の化合物が提供される。

【０２８４】

複合体を調製する方法：

実施例で記載するように、本発明者らは、例示的な薬物として、インスリンを、および例示的なリガンドとして、アミノエチルグルコース（ＡＥＧ）、アミノエチルマンノース（ＡＥＭ）、アミノエチルビマンノース（ＡＥＢＭ）、アミノエチルトリマンノース（ＡＥＴＭ）、および／またはアミノエチルフコース（ＡＥＦ）、β－アミノエチル－Ｎ－アセチルグルコサミン（ＡＥＧＡ）を使用して、先に記載した複合体を調製する方法を例示する。限定ではないが、複合体骨格として、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス）、トリス－スクシンイミジルアミノトリアセテート（ＴＳＡＴ）、トリス－スクシンイミジル－１，３，５－ベンゼントリカルボキシレート（ＴＳＢ）およびベンゼン－１，３，５－トリカルボキシ－（Ｎ－４－酪酸－ＮＨＳ－エステル）アミド（ＴＳＢ－Ｃ４）を使用して、複合部位１つ当たり２個のリガンドを有し、全骨格成分の間が短い複合体を調製してもよい。より広い骨格成分間空間が望ましい場合は、スクシンイミジル（６－アミノカプロイル）アミノトリアセテート（ＴＳＡＴ－Ｃ６）、スクシンイミジル（６－アミノ（ＰＥＯ－６））アミノトリアセテート（ＴＳＡＴ－ＰＥＯ－６）、ベンゼン－１，３，５－トリカルボキシ－（Ｎ－６－アミノカプロン酸－ＮＨＳエステル）アミド（ＴＳＢ－Ｃ６）、およびベンゼン－１，３，５－トリカルボキシ－（Ｎ－１０－アミノデカン酸－ＮＨＳエステル）アミド（ＴＳＢ－Ｃ１０）を使用してもよい。ＴＳＡＴ－Ｃ６スペーサー・アーム化学は、ＴＳＡＴ－ＰＥＯ－６と比較して、複合体により疎水性特性を付与する。

【０２８５】

たとえば、説明の目的のため、一実施形態では、リガンド（たとえば、ＡＥＧ、ＡＥＭ、ＡＥＭＢおよびＡＥＴＭ）およびインスリンの両方を、末端活性化エステルを介して、ＴＳＡＴ－Ｃ６骨格に反応させ、インスリン－ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＧ－２、インスリン－ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２、インスリン－ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭＢ－２およびインスリン－ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体を生成してもよい。実施例で検討するように、種々のリガンドを前もって合成する。いくつかの実施形態では、実施例で記載するように、各インスリンがＰｈｅ－Ｂ１α－アミノ基でのみ反応できるように、インスリンのＡ１およびＢ２９アミノ基をＢＯＣで保護する。いくつかの実施形態では、実施例で記載するように、各インスリンがＧｌｙ－Ａ１α－アミノ基でのみ反応できるように、インスリンのＢ１およびＢ２９アミノ基をＢＯＣで保護する。約１当量のＢＯＣ－インスリンを

４０～５０ｍｇ／ｍｌのＤＭＳＯ溶液として、過剰のトリエチルアミンを含有する５０ｍｇ／ｍｌのＴＳＡＴ－Ｃ６のＤＭＳＯ溶液に室温で加え、約１時間反応させる。次に、過剰のＡＥＧ、ＡＥＭ、ＡＥＢＭおよび／またはＡＥＴＭ（２～１０当量）を、１００ｍｇ／ｍｌのＤＭＳＯ溶液として加え、さらに２時間反応させる。反応後、ＤＭＳＯ溶液をｐＨ５の生理食塩水緩衝液へ入れ、１０倍希釈を行い、そのｐＨを８．０に調整し、溶液をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、低分子量反応物および塩を除去する。ボイド率で溶出された物質を、３Ｋ限外ろ過装置を使用して濃縮し、その後、分取スケール逆相ＨＰＬＣカラム（Ｃ８、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリル／水移動相）に注入し、目的生成物を未反応ＢＯＣ２－インスリンから精製する。目的の溶出ピークを収集し、プールし、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、次いで凍結乾燥し、乾燥粉末を得る。最後に、凍結乾燥した粉末を、９０％ＴＦＡ／１０％アニソールに４℃で１時間で溶解し、次いで、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．２の緩衝液で１０倍希釈して、ＢＯＣ保護基を除去する。ＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを７．０および８．０の間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび任意の他の混入塩類を除去する。次いで、脱保護され、精製された複合体の水溶液を所望の濃度に濃縮し、必要になるまで、４℃で保存する。

【０２８６】

別の態様では、これらの条件下では、Ｂ２９アミノ基は、野生型インスリンに存在する３つのアミノ基の中で最も反応性が高いので、炭酸塩緩衝液中の保護されていないインスリンを使用して、Ｂ２９ε－アミノ基で反応を行ってもよい。例示的な合成では、Ｎ末端活性化エステルを含有する骨格を、６０ｍＭで無水ＤＭＳＯに溶解し、次いでトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。平行して、４４８ｍＭのリガンド溶液を、適切な容量の無水ＤＭＳＯで調製する。溶解した時点で、十分な量のリガンド溶液を１０分にわたって滴下し、骨格上の活性化エステル基の数Ｎの１．５倍－１に等しい数の反応性等価物を得る。たとえば、１つの骨格当たりＮ＝３の初期活性化エステル基があれば、（３×（３－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝０．９７３ｍｌのリガンド溶液を加える。１つの骨格当たりＮ＝４の初期活性化エステル基があれば、（３×（４－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝１．４６ｍｌのリガンド溶液を加える、など。リガンド溶液を加えた後、該溶液を室温で１時間攪拌する。

【０２８７】

次いで、アミン含有薬物を、別々に、１７．２ｍＭで、炭酸ナトリウム緩衝液（０．１Ｍ，ｐＨ１１）に別々に溶解し、続けて、ｐＨを１．０Ｎの水酸化ナトリウムで１０．８に調整する。一度溶解すれば、全骨格／ＤＭＳＯ／リガンド／ＴＥＡ溶液を、７５分にわたって薬物／炭酸塩緩衝液溶液に滴下する。添加の間、必要であれば、希ＨＣｌまたはＮａＯＨを使用して、得られる混合物のｐＨを５分毎に１０．８に調整する。滴下添加の後、溶液をさらに１５分攪拌し、反応の完了を確実にする。

【０２８８】

次いで、得られた溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのｐＨ５．０のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液で１０倍希釈し、希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約４０ｍｌに濃縮する。この溶液を、分取逆相ＨＰＬＣを使用してさらに精製し、所望の生成物を得る。収集した時点で、該溶液をロートバップしアセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。

【０２８９】

さらに、炭酸塩緩衝液条件下で、Ａ１アミノ基は、野生型インスリンの２番目に反応性の高いアミノ基である。したがって、ある実施形態では、Ａ１，Ｂ２９－ジ置換インスリン複合体を、先に記載した条件を使用して合成し、Ｂ２９－一置換インスリン複合体合成に比べ、１インスリン分子当たり、約１０倍量の多価反応性エステル骨格およびリガンドを得る。

【０２９０】
別の態様では、Ｂ２９－一置換インスリン複合体を、米国特許第７，４０２，５６５号で報告されている方法に類似の方法を使用する、Ｎ－末端保護アミノ酸配列を使用して合成する。具体的には、Ｎ－末端ペプチド配列をインスリンＡ鎖およびＢ鎖に、保護アミノ酸配列がArg^{A0}およびArg^{B0}を含有するように設計し、インスリン中間体を得る。複合は、インスリン中間体のLys^{B29}で起こり、一方Ｎ末端は、複合副生物から保護されている。複合体化されたインスリン中間体を、トリプシンで処理してＮ末端保護アミノ酸配列を切断し、Lys^{B29}だけが複合体化されているインスリン複合体を得る。いくつかの実施形態では、インスリン中間体は、米国特許第７，４０２，５６５号に記載されているように、単鎖インスリン前駆体から誘導される。いくつかの実施形態では、インスリン中間体は、Lys^{B29}以外の複合部位を含有する変異体であり、Lys^{B29}に関して記載した合成法と類似の合成法が行われる。

【０２９１】
これらの代表的な手法を使用して、異なるリガンドおよび薬物、異なる複合化学、骨格成分間の異なる分離および／またはＴＳＡＴ－Ｃ６骨格を以下に記載する異なる骨格で置換することにより得られる異なる原子価を有する他の複合体を生成するために使用してもよいことは理解されることである。

【０２９２】
たとえば、骨格成分の間がさらにあいたものおよび／または複合の部位で保存電荷が必要な場合、適切なサイズのアミンを有するジエチルアセタール（たとえば、アミノプロピオンアルデヒドジエチルアセタール（ＡＰＤＡ）またはアミノブチルアルデヒドジエチルアセタール（ＡＢＤＡ））を、本明細書で挙げた骨格上の反応性基の１つに複合化させ、次いで、対象のリガンド（たとえば、ＡＥＭ、ＡＥＢＭまたはＡＥＴＭ）を有する残存する反応性基と完全に反応させてもよい。次いで、反応性アルデヒド基を、酸性条件下でジエチルアセタールから現すことができ、次いで、薬物との還元性アミノ化を行い、薬物複合化ステップを完了し、次いで、ＡＢＤＡ－ＴＳＡＴ、ＡＢＤＡ－ＬＣＴＳＡＴなどを使用してもよい。

【０２９３】
さらに別の例では、多原子価を増やすために、テトラキス－（Ｎ－スクシンイミジルカルボキシプロピル）ペンタエリスリトール（ＴＳＰＥ）を使用して、１つの複合部位当たり３個のリガンドを結合してもよい。幾分より高いオーダーの原子価を持つ多分岐（たとえば、デンドリマー様）複合体を生成するために、上記技術のどれを使用してもよいことも、当業者には理解されることである。たとえば、ＲｏｃｋｅｎｄｏｒｆおよびＬｉｎｄｈｏｒｓｔは、Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．２１７：２０２－２３８，２００１で、多分岐構造を作るための現在のアプローチの包括的な見解を提供している。２１７：２０２－２３８，２００１．
さらに、所定の多原子価度をすでに含有するリガンドを、先に記載された手法に従って、再び反応させ、幾分高いオーダーのリガンド多様性を作り出してもよい。たとえば、各リガンドの２つを反応性アミンも複合体化している適切な骨格に複合体化することによって、末端反応性アミンを含有する２価のＡＥＭ－２、ＡＥＢＭ－２またはＡＥＴＭ－２分子を調製してもよい。各リガンドの３つを反応性アミンも複合体化している適切な骨格に複合体化することによって、末端反応性アミンを含有する３価のＡＥＭ－３、ＡＥＢＭ－３またはＡＥＴＭ－３分子を調製してもよい。NH_2－２価の糖を先に記載した骨格と同じ骨格と反応させ、薬物分子１個当たり４個および６個のリガンドを有する薬物複合体を生成してもよい。NH_2－３価の糖を先に記載した骨格と同じ骨格と反応させ、薬物分子１個当たり６個および９個のリガンドを有する薬物複合体を生成してもよい。

【０２９４】
いかなる場合でも、異なるリガンドの混合物を、骨格化学、原子価、およびリガンド：骨格化学量論を調整することによって、多価骨格を介して同じ薬物に複合体化してもよいことは理解すべきである。たとえば、インスリン－ＡＥＭ－１－ＡＥＢＭ－１、インスリ

ン－ＡＥＢＭ－１－ＡＥＴＭ－１、インスリン－ＡＥＭ－２－ＡＥＴＭ－２およびインスリン－ＡＥＭ－１－ＡＥＴＭ－２は、全て、この混合リガンド方法に従って合成してもよい。

【０２９５】

場合によっては、薬物とは異なる方法によってリガンドを骨格に複合体化するのが望ましいこともある。たとえば、２価のマレイミド／１価の活性化エステル官能化骨格（たとえば、スクシンイミジル－３，５－ジマレイミドフェニルベンゾエート（ＳＤＭＢ））を使用して、分離ステップで、２個のスルフヒドリル官能化リガンドおよび１個のアミン官能化薬物を複合体化してもよい。たとえば、本明細書に記載された方法を使用して、インスリンまたは他のアミン含有薬物を骨格の活性化エステル部分に複合体化してもよい。分離ステップでは、アミノエチル糖（ＡＥＭ、ＡＥＢＭ、ＡＥＴＭ）を、４－イミノチオランとの反応により、末端スルフヒドリル含有リガンドに変換してもよい。最後に、骨格－ジ－マレイミド－インスリン複合体を、過剰のスルフヒドリル多官能化糖と混合して、２価のリガンド－インスリン複合体を生成してもよい。

【０２９６】

徐放性製剤：

実施例で検討するように、ある実施形態では、持続した形式（すなわち、溶解型組換えヒトインスリンより持続する吸収プロフィールを示す形態）で複合体を投与するのが、有利であり得る。これは、典型的なグルコース変動タイムスケール（すなわち分というより時間）により近い関係のタイムスケールでのグルコースにおける変動に応答することができる複合体の持続性レベルを提供する。ある実施形態では、非高血糖条件（すなわち、絶食させた状態）で哺乳類に投与した場合、徐放性製剤は、複合体のゼロ次放出を示し得る。

【０２９７】

持続した吸収プロフィールを提供する任意の製剤を使用してもよいことは理解されることである。ある実施形態では、持続した吸収は、複合体と、その全身循環への放出特性の速度を落とす他の成分とを組合わせることによって達成され得る。

【０２９８】

たとえば、ＰＺＩ（プロタミン亜鉛インスリン）製剤は、この目的のために使用され得る。実施例で記載するように、発明者らは、ある実施形態で、本開示の複合体で調製したＰＺＩ製剤の吸収プロフィールおよび安定性は、製剤に含まれるプロタミンおよび亜鉛の絶対および相対量に対して感受性を示すことを発見した。たとえば、効果的な持続性吸収プロフィールを得るために、市販のＰＺＩおよびＮＰＨ（中性プロタミン・ハーゲドルン）インスリン製剤は、約０．０５～約０．２ｍｇのプロタミン／ｍｇインスリンしか必要でないのに対し、ＰＺＩ－複合体製剤の中には、約１～約５ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体を必要とするものもある。さらに、市販のプロタミンインスリン製剤は、約０．００６ｍｇの亜鉛／ｍｇインスリンを含有するものの、発明者らは、プロタミン濃度とともに亜鉛濃度が増加すると、ある実施形態では、より安定で、容易に分散し得る製剤を得ることができることを発見した。場合によっては、亜鉛含量は、約０．０５～約０．５ｍｇの亜鉛／ｍｇ複合体の範囲である。さらに、予期し得ぬことに、発明者らは、ある実施形態では、Ｂ１－アミン基で置換されたインスリン複合体は、Ｂ２９－アミン基で置換されたインスリン複合体に対して効果的に放出プロフィールを持続するためには、より多くのプロタミンおよび亜鉛が必要であることを発見した。本開示は、これらのＰＺＩ製剤の無定形形態および結晶性形態を包含する。

【０２９９】

したがって、ある実施形態では、本開示の製剤は、約０．０５～約１０ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体を含む。たとえば、約０．２～約１０ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体、たとえば、約１～約５ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体。

【０３００】

ある実施形態では、本開示の製剤は、約０．００６～約０．５ｍｇ亜鉛／ｍｇ複合体を

含む。
【０３０１】
たとえば、約０．０５～約０．５ｍｇ亜鉛／ｍｇ複合体、たとえば、約０．１～約０．２５ｍｇ亜鉛／ｍｇ複合体。
【０３０２】
ある実施形態では、本開示の製剤は、プロタミンと亜鉛とを、約１００：１～約５：１の範囲、たとえば約５０：１～約５：１、たとえば約４０：１～約１０：１の比（ｗ／ｗ）で含む。ある実施形態では、本開示のＰＺＩ製剤は、プロタミンと亜鉛とを、約２０：１～約５：１の範囲、たとえば、約２０：１～約１０：１、約２０：１～約１５：１、約１５：１～約５：１、約１０：１～約５：１、約１０：１～約１５：１比（ｗ／ｗ）で含む。
【０３０３】
また、以下の１種以上の成分をＰＺＩ製剤に含むことの利点の例も記載される。抗菌性防腐剤、等張剤および／または複合体化されていないインスリン分子。
【０３０４】
ある実施形態では、本開示の製剤は、抗菌性防腐剤（たとえば、ｍ－クレゾール、フェノール、メチルパラベンまたはプロピルパラベン）を含む。ある実施形態では、抗菌性防腐剤は、ｍ－クレゾールである。たとえば、ある実施形態では、製剤は、約０．１～約１．０％ｖ／ｖのｍ－クレゾールを含んでもよい。たとえば、約０．１～約０．５％のｖ／ｖｍ－クレゾール、たとえば、約０．１５～約０．３５％ｖ／ｖのｍ－クレゾール。
【０３０５】
ある実施形態では、本開示の製剤は、ポリオールを等張剤（たとえば、マンニトール、プロピレングリコールまたはグリセロール）として含む。ある実施形態では、等張剤はグリセロールである。ある実施形態では、等張剤は塩、たとえば、ＮａＣｌである。たとえば、製剤は、約０．０５～約０．５ＭのＮａＣｌ、たとえば、約０．０５～約０．２５ＭのＮａＣｌまたは約０．１～約０．２ＭのＮａＣｌを含んでもよい。
【０３０６】
ある実施形態では、本開示の製剤は、ある量の複合体化されていないインスリン分子を含む。ある実施形態では、製剤は、複合体化インスリン分子の複合体化されていないインスリン分子に対するモル比が、約１００：１～１：１、たとえば、約５０：１～２：１または約２５：１～２：１で含む。
【０３０７】
また、本開示は、小分子製剤として当分野で周知の標準的な徐放性（持続性されたともいう）放出製剤の用途も包含する（たとえば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第１９編，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ社，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，１９９５参照）。また、本開示は、ポンプまたは束縛拡散に依存して、複合体を漸次的に送達するデバイスの用途も包含する。ある実施形態では、持続型製剤は、（追加的にまたは代わりに）修飾インスリン分子を使用することによって提供されてもよい。たとえば、複合体の調製において、野生型ヒトインスリンの代わりに、インスリングラルギン（ＬＡＮＴＵＳ（登録商標））またはインスリンデテミル（ＬＥＶＥＭＩＲ（登録商標））を使用することができる。インスリングラルギンは、Ａｓｐ－Ａ２１がグリシンで置き換えられ、２個のアルギニンがＢ鎖のＣ－末端に付加されている例示的な持続型インスリン類縁体である。これらの変更の効果は、等電点をシフトし、ｐＨ４で完全に溶解する溶液を製造することである。インスリンデテミルは、Ｔｈｒ－Ｂ３０が欠失され、Ｃ１４脂肪酸鎖がＬｙｓ－Ｂ２９に付加されている別の持続型インスリン類縁体である。
【０３０８】
複合体の使用：
別の態様では、本開示は、複合体を使用する方法を提供する。一般的に、複合体は、糖（たとえば、グルコース、または本明細書で記載した、マンノース、α－メチルマンノー

ス、Ｌ－フコースなどのような外因性糖）に応答する生理活性薬物をコントロール可能に提供するために使用することができる。本開示は、本開示の複合体の投与による、疾患または状態を治療することを包含する。複合体は、いかなる患者（たとえば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、マウスなど）を治療するために使用することができるが、最も好ましくは、ヒトの治療に使用される。複合体は、いかなる経路によっても患者に投与することができる。投与の最も適切な経路は、治療される疾患または状態の性質、薬物の性質、患者の状態などを始めとする様々な要因に依存する。一般的に、本開示は、経口、静脈、筋肉内、動脈内、皮下、心室内、経皮、直腸、経膣、腹腔内、局所（粉末、軟膏剤または滴剤によるように）、バッカル、または経口または経鼻スプレーまたは噴霧剤としての投与を包含する。これらの異なる経路に関する医薬組成物の製剤および製造における概論は、たとえば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第１９編，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ社，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，１９９５に見出せる。種々の実施形態で、複合は、皮下、たとえば注射により投与してもよい。複合体は、送達を容易にするために、担体に溶解することができる。たとえば、担体として、無菌水、生理食塩水または緩衝生理食塩水（これらに限定されない）を始めとする水溶液があり得る。

【０３０９】

一般的に、治療的に効果的な量の薬物が、複合体の形態で投与される。「治療に効果的な量」は、薬物の効力と毒性のバランスを含む、合理的な利益／リスク比で疾患または状態を治療するために十分な、薬物の量を意味する。一般的に、治療効力および毒性は、細胞培養においてまたは実験動物を使用して、標準的な薬理学的手法、たとえば、ED_{50}（５０％の治療対象に対し治療的に効果のある用量）およびLD_{50}（５０％の治療対象が致死する用量）を計算することによって、測定され得る。ED_{50}／LD_{50}は、薬物の治療指数を表す。一般的に、当分野で周知のように、大きな治療指数を有する薬物が好ましいが、重篤な疾患または状態、特に代替の治療選択がない場合は、より小さな治療指数も許容され得る。ヒトへの投与のための適切な用量範囲の最終的な選択は、臨床試験の過程で決定される。

【０３１０】

種々の実施形態で、薬物の平均一日量は、１０～２００Ｕ、たとえば、２５～１００Ｕ（１単位の薬物は、約０．０４ｍｇの場合）の範囲である。ある実施形態では、これらのインスリン用量を含むある量の複合体を、日単位で投与する。ある実施形態では、これらのインスリン用量の５～１０倍を含むある量の複合体を週単位で投与する。ある実施形態では、これらのインスリン用量の１０～２０倍を含むある量の複合体を２週単位で投与する。ある実施形態では、これらのインスリン用量の２０～４０倍を含むある量の複合体を月単位で投与する。当業者であれば、これと同じ取組みで、公知の用量範囲を持つ他の承認された薬物、たとえば、本明細書で記載した任意の承認されたインスリン感受性改善薬およびインスリン分泌促進物質の量を推定することを理解する。通常、複合体化薬物の用量は、複合体化されていない薬物の正常用量より高い。

【０３１１】

ある実施形態では、本開示の複合体は、患者（たとえば、哺乳類患者）における高血糖症の治療に使用され得る。ある実施形態では、患者は、糖尿病である。しかし、本方法は、糖尿病患者の治療に限定されない。たとえば、ある実施形態では、複合体を、血糖管理不良を伴う感染症を患う患者の高血糖症を治療するのに使用してもよい。ある実施形態では、複合体を、糖尿病の治療に使用してもよい。

【０３１２】

ある実施形態では、本開示の複合体またはその製剤（薬物としてのインスリン分子を有する）を、患者（たとえば、哺乳類患者）に投与した場合、インスリン分子が複合体化されていないものより低い低血糖症状を誘発する。ある実施形態では、本開示の製剤（インスリン分子を薬物として含む複合体に関し）は、患者（たとえば、哺乳類患者）に、インスリン分子が複合体化されていないものを含む製剤より低いＨｂＡ１ｃ値を誘発する。あ

る実施形態では、該製剤は、インスリン分子が複合体化されていないものを含む製剤より少なくとも１０％低い（たとえば、少なくとも２０％低い、少なくとも３０％低い、少なくとも４０％低い、少なくとも５０％低い）ＨｂＡ１ｃ値をもたらす。ある実施形態で、該製剤は、７％未満、たとえば約４～約６％の範囲のＨｂＡ１ｃ値をもたらす。ある実施形態では、インスリン分子が複合体化されていないものを含む製剤は、７％を超える、たとえば、約８～約１２％のＨｂＡ１ｃ値をもたらす。

【０３１３】

任意のある患者に与えられる薬物の合計日使用量は、妥当な医学的判断の範囲内で担当の医師によって決定されることが理解される。任意の特定の患者のための具体的な治療に効果的な量は、治療されている疾患または状態、使用される特定の薬物の活性、使用される特定の組成、患者の年齢、体重、一般的健康状態、性別および食事状態、投与時間、使用した特定の薬物の投与経路および排泄速度、治療の期間、使用される特定の薬物と組合わせてまたは同時に使用される薬物、およびこのような医術の分野で周知の要因を始めとする種々の要因による。種々の実施形態で、本開示の複合体は、１回以上で投与してもよい。たとえば、本開示は、具体的に、複合体を、連続したスケジュール（たとえば、１日１回、２日毎に１回、１週間に１回、２週間毎に１回、１ヶ月に１回など）で皮下注射により患者に投与する方法を包含する。

【０３１４】

種々の実施形態で、本開示の複合体は、少なくとも１種の追加の治療を受けている患者に投与してもよい。種々の実施形態で、該少なくとも１種の追加の治療は、投与された複合体と同じ疾患または障害を治療することを意図している。種々の実施形態で、該少なくとも１種の追加の治療は、一次薬物の副作用を処置することを意図している。該２種以上の治療は、患者が両治療から利益を受けている期間がある限り、同じ、重なるまたは重ならない時間枠内で行ってもよい。該２種以上の治療は、患者が両治療から利益を受けている期間がある限り、同じまたは異なる計画で行ってもよい。該２種以上の治療は、患者が両治療から利益を受けている期間がある限り、同じまたは異なる製剤を投与してもよい。ある実施形態では、単一の本開示の複合体は、同じ疾患または障害を治療するための複数の薬物を含んでもよい。ある実施形態では、同じ疾患または障害を治療するための異なる薬物を含む２種以上の別の本開示の複合体を投与してもよい（混合物としてまたは別々に）。ある実施形態では、複合体化されていない二次薬物を、本開示の複合体と混合してもよい（すなわち、複合体製剤と単純に混合されたもので、複合体に共有結合で結合していない薬物）。たとえば、ある実施形態では、複数の抗糖尿病薬物を対象に投与するために、これらの取組みの任意のものを使用してよい。この取組みのある例示的な実施形態を、インスリン関連治療に照らして、以下により詳細に記載するが、他の治療もそのような組合せ取組みから利益を得ることは先の記載から理解される。

【０３１５】

インスリン感受性改善薬（たとえば、メトホルミン、グリタゾンのようなビグアナイド類）は、与えられた量のインスリンに対する患者の応答を増すことによって作用する。従って、インスリン感受性改善薬を受けた患者は、本開示のインスリン複合体を、他の方法で同じ患者が必要とする用量より低い用量しか必要としない。従って、ある実施形態では、インスリン複合体を、インスリン感受性改善薬による治療も受けている患者に投与してもよい。種々の実施形態では、本開示の複合体を、７５％までのインスリン感受性改善薬の不存在下で必要とされる通常用量で投与してもよい。種々の実施形態では、５０、４０、３０または２０％までの通常用量で投与してもよい。

【０３１６】

インスリン抵抗性は、通常量のインスリンでは、正常なインスリン応答を作り出すには不十分である障害である。たとえば、インスリン抵抗性患者は、抵抗性を克服し、十分なグルコース降下作用を得るために、高い用量のインスリンを必要とし得る。この場合、抵抗性の少ない患者で低血糖症状を正常に誘発するインスリン用量では、高い抵抗性の患者には、グルコース降下作用が発揮されない。同様に、本開示の複合体が、適切な時間枠で

高いレベルの生理活性インスリンを提供した場合にのみ、これらはこのサブクラスの患者に効果的である。ある実施形態では、このサブクラスの患者の治療は、２つの取組みを組合わせることによって容易になり得る。従って、ある実施形態では、従来型のインスリンを基本とする治療を使用してベースラインレベルのインスリンを提供し、本発明の複合体を投与して、患者に必要とされる場合、生理活性インスリンのコントロールされた補充を提供する。従って、ある実施形態では、インスリン複合体を、インスリンによる治療も受けている患者に投与してもよい。種々の実施形態で、インスリンを、７５％までの本開示の複合体の不存在下で必要とされる通常用量で投与してもよい。種々の実施形態では、５０、４０、３０または２０％までの通常用量で投与してもよい。この組合せの取組みは、インスリン分泌促進薬（たとえば、スルホニル尿素、ＧＬＰ－１、エキセンディン－４など）および／またはインスリン感受性改善薬（たとえば、メトホルミン、グリタゾンのようなビグアナイド類）を受けているインスリン抵抗性患者にも使用してもよいことは理解されることである。

【０３１７】

外因性誘因：

先に記載したように、本明細書で記載される方法、複合体および組成物は、グルコース応答性複合体に限定されない。実施例で示すように、数種の例示的なグルコース－応答性複合体は、α－メチルマンノースおよびＬ－フコースのような外因性糖に対しても応答性があった。従って、ある実施形態では、複合体は、α－メチルマンノースおよびＬ－フコースのようなグルコース以外の糖、または複合体のＰＫまたはＰＤ特性を変更し得る任意の他の糖の外因性投与により、誘引され得ることは理解されることである。

【０３１８】

先に記載したように複合体を投与したとき（たとえば、徐放性製剤として）、該複合体は、適切な外因性糖の投与によって、誘引され得る。ある実施形態では、トリガー量の外因性糖を投与する。本明細書で使用される、外因性糖の「トリガー量」は、複合体のＰＫおよび／またはＰＤ特性（たとえば、先に記載したように、C_{max}、ＡＵＣ、半減期など）の少なくとも１つの変化を起こすのに十分な量である。複合体に関し先に記載した任意の投与方法が、外因性糖に同じように適用されることは理解される。複合体および外因性糖の投与方法は、同じでも異なってもよいことも理解される。種々の実施形態で、投与方法は異なる（たとえば、説明の目的で、複合体は週単位で皮下注射により投与し、一方外因性糖は、日々経口投与してもよい）。患者のコンプライアンスを促進するので、外因性糖の経口投与は、特に価値がある。一般的に、複合体のＰＫおよびＰＤ特性は、外因性糖のＰＫプロフィールに関連することは理解されることである。従って、複合体ＰＫおよびＰＤ特性は、外因性糖のＰＫプロフィールをコントロールすることにより調節することができる。当分野で周知のように、外因性糖のＰＫプロフィールは、用量、経路、頻度および使用される製剤に基づいて調節することができる。たとえば、複合体の短く、著しい活性化を望む場合は、即放性経口製剤が使用され得る。対照的に、複合体のより長く、それほど激しくない活性化を望む場合は、代わりに、徐放性経口製剤が使用される。即放性および徐放性製剤の製剤および製造における概論は、たとえば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第１９編，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ社，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，１９９５に見出され得る。

【０３１９】

本開示の複合体および外因性糖の投与の相対頻度は、同じまたは異なってもよいことも理解されることである。ある実施形態では、外因性糖を複合体より頻繁に投与する。たとえば、ある実施形態では、複合体を毎日投与し、一方外因性糖を１日に複数回投与する。ある実施形態では、複合体を、１週間に２回、１週間毎、２週間毎または１ヶ月毎に投与してもよく、外因性糖は毎日投与する。ある実施形態では、複合体を１ヶ月毎に投与し、外因性糖を、１週間に２回、１週間毎、または２週間毎に投与する。これらのスキームにおける他の変法も当業者には認識され、複合体の性質および使用される製剤によって、変更する。

【実施例】
【０３２０】
実施例で記載され使用される例示的な複合体Ｉ－１～Ｉ－１７およびＩＩ－Ｉ～ＩＩ－７の構造を、図４５に示す。
【０３２１】
Ｉ．例示的な複合体の製造方法
最初の実施例の組は、例示的な複合体を製造する種々の方法を記載する。該実施例は、出発成分および最終生成物を精製し、アッセイするアッセイも含む。これらの方法は、本発明の範囲内に入る他の複合体を生成するために、修正することができることは、理解すべきである。
【０３２２】
実施例１－アジドエチルグルコース（ＡｚＥＧ）の合成
ａ．ブロモエチルグルコースの合成
ＤＯＷＥＸ５０Ｗ×４樹脂（Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ（アルファー・エイサー社），Ｗａｒｄ　Ｈｉｌｌ、ＭＡ）を脱イオン水で洗浄し、色を落とした。２２５ｇのＤ－グルコース（１．２５ｍｏｌ；1当量．，Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ）および１４０ｇのＤＯＷＥＸ５０Ｗ×４の混合物を、２．２Ｌの２－ブロモエタノール（３０．５ｍｏｌ、２５当量．；１２４．９７ｇ／ｍｏｌ；１．７６２ｇ／ｍＬ；ＢＰ＝１５０Ｃ；Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ）で処理し、混合物を攪拌しながら、８０℃に４時間加熱した。反応を、ＴＬＣ（２０％メタノール／ジクロロメタン（ＤＣＭ））によりモニターした。約４時間後反応が終了し、室温まで放冷した。溶液をろ過して樹脂を取出し、該樹脂を酢酸エチルおよびＤＣＭで洗浄した。得られたろ液を回転蒸発器で琥珀色の油状物とした。油状物とした後の総量は、４００ｇであった。
【０３２３】
琥珀色の油状物を、シリカゲル（ＤＣＭに充填された４ｋｇのシリカ）を使用し、以下の方法で精製した。粗生成物を、ＤＣＭに溶解し、カラムに負荷し、次いで２×４Ｌの１０％メタノール／ＤＣＭ；２×４Ｌの１５％メタノール／ＤＣＭ；および３×４Ｌの２０％メタノール／ＤＣＭで溶出した。画分（ＴＬＣに基づく）を含有する生成物をプールし、乾燥し、１５２ｇの１－α－ブロモエチル－グルコース（４２％）を得た。
【０３２４】
ｂ．ブロモエチルグルコースのアジドエチルグルコース（ＡｚＥＭ）への変換
加熱用マントル、オーバーヘッド攪拌器および温度計を備える、５Ｌの丸底三ツ口フラスコに、１５０ｇのブロモエチルグルコース（５２５ｍｍｏｌ）を充填した。前記油状物を、２Ｌの水に溶解し、６８．３ｇのアジ化ナトリウム（１．０５ｍｏｌ、２当量；６５ｇ／ｍｏｌ；Ａｌｆａ－Ａｅｓａｒ）、次いで７．９ｇのヨウ化ナトリウム（５２．５ｍｍｏｌ、０．０８当量；１４９．８９ｇ／ｍｏｌ；Ａｌｆａ－Ａｅｓａｒ）で処理し、溶液を５０℃に温め、一晩攪拌した。溶液を室温まで冷却し、ロートバップで濃縮乾燥した。固体残基を３×５００ｍＬの５：１体積の$CHCl_3$：ＭｅＯＨを用い４０℃で温浸した。合わせた有機部分をろ過し、蒸発乾固し、アジドエチルグルコース（８６ｇ）をオフホワイトの固体として得た。ＴＬＣ（２０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ；H_2SO_4を有するチャコール）：単一スポット、出発物質から識別不能。
【０３２５】
ｃ．アジドエチルグルコースの再精製
３２ｇのアジドエチルグルコースを１００ｍＬの水に取った。混濁した溶液を、ガラス・マイクロファイバー・フィルター（Ｗｈａｔｍａｎ　ＧＦ／Ｂ）によってろ過した。黄金色のろ液をロトベーパーで蒸発させ、固体とした。該固体をメタノール（１００ｍＬ）に採り、混濁した溶液を再び、ガラス・マイクロファイバー・フィルターでろ過した。得られた淡黄色ろ液を真空下、固体とした。
【０３２６】
該固体を最小量のメタノール（５０ｍＬ）に取り、攪拌しながら、酢酸エチル（１５０

ｍＬ）をゆっくり加えた。重質のスラリーを冷却し、ろ過した。固体を空気乾燥（吸湿性）し、６０℃のオーブンに一晩置いた。ＴＬＣは、ほんの少ししか元の物質を有しない。収量：１５．４ｇ。母液を真空蒸発させ、黄色のガム状物質を得た。この時点で、さらにこの物質を精製しなかった。

【０３２７】

実施例２－アジドエチルマンノース（ＡｚＥＭ）の合成

ａ．ブロモエチルマンノースの合成

ＤＯＷＥＸ５０Ｗ×４樹脂（Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ，Ｗａｒｄ　Ｈｉｌｌ、ＭＡ）を脱イオン水で洗浄し、色を落とす。２２５ｇのＤ－マンノース（１．２５ｍｏｌ；１当量、Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ）と、１４０ｇのＤＯＷＥＸ５０Ｗ×４の混合物を、２．２Ｌの２－ブロモエタノール（３０．５ｍｏｌ、２５当量；１２４．９７ｇ／ｍｏｌ；１．７６２ｇ／ｍＬ；ＢＰ＝１５０℃；Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ）で処理し、該混合物を攪拌しながら、８０℃で４時間加熱する。反応を、ＴＬＣ（２０％メタノール／ジクロロメタン（ＤＣＭ））によりモニターする。約４時間後反応が終了し、次いで室温まで放冷する。溶液をろ過して樹脂を取出し、該樹脂を酢酸エチルおよびＤＣＭで洗浄する。得られたろ液を回転蒸発器で琥珀色の油状物とする。

【０３２８】

琥珀色の油状物を、シリカゲル（ＤＣＭに充填された４ｋｇのシリカ）を使用し、以下の様式で精製する。粗生成物を、ＤＣＭに溶解し、カラムに負荷し、次いで２×４Ｌの１０％メタノール／ＤＣＭ；２×４Ｌの１５％メタノール／ＤＣＭ；および３×４Ｌの２０％メタノール／ＤＣＭで溶出する。画分（ＴＬＣに基づく）を含有する生成物をプールし、乾燥し、１５２ｇの１－α－ブロモエチルマンノース（４２％）を得る。

【０３２９】

ｂ．ブロモエチルマンノースのアジドエチルマンノース（ＡｚＥＭ）への変換

加熱用マントル、オーバーヘッド攪拌器および温度計を備える、５Ｌの丸底三ツ口フラスコに、１５０ｇのブロモエチルマンノース（５２５ｍｍｏｌ）を充填する。油状物を、２Ｌの水に溶解し、６８．３ｇのアジ化ナトリウム（１．０５ｍｏｌ、２当量；６５ｇ／ｍｏｌ；Ａｌｆａ－Ａｅｓａｒ）、次いで７．９ｇのヨウ化ナトリウム（５２．５ｍｍｏｌ、０．０８当量；１４９．８９ｇ／ｍｏｌ；Ａｌｆａ－Ａｅｓａｒ）で処理し、溶液を５０℃に温め、一晩攪拌する。溶液を室温まで冷却し、ロートバップで濃縮乾燥する。固体残基を、３×５００ｍＬの５：１体積$CHCl_3$：ＭｅＯＨを用い４０℃で温浸する。合わせた有機部分をろ過し、蒸発乾固し、アジドエチルマンノースをオフホワイトの固体として得る。

【０３３０】

ｃ．アジドエチルマンノースの再精製

３２ｇのアジドエチルマンノースを１００ｍＬの水に取る。混濁した溶液を、ガラス・マイクロファイバー・フィルター（Ｗｈａｔｍａｎ　ＧＦ／Ｂ）によってろ過する。ろ液をロトベーパーで蒸発させ、固体とする。該固体をメタノール（１００ｍＬ）に取り、混濁した溶液を再び、ガラス・マイクロファイバー・フィルターでろ過する。得られた淡黄色ろ液を真空下、固体とする。

【０３３１】

該固体を最小量のメタノール（５０ｍＬ）に取り、攪拌しながら、酢酸エチル（１５０ｍＬ）をゆっくり加える。重質のスラリーを冷却し、ろ過する。固体を空気乾燥（吸湿性）し、６０℃のオーブンに一晩置く。母液を真空蒸発させ、黄色のガム状物質を得る。

【０３３２】

実施例３－アジドエチルマンノビオース（ＡｚＥＢＭ）の合成

実施例２のＡｚＥＭ化合物を、ベンゼンジメチルエーテルを使用して選択的に保護し、カラムクロマトグラフィーで精製し、続いて臭化ベンジルと反応させ、１－α－（２－アジドエチル）－４，６－ベンズアルデヒドジアセタール－３－ベンジル－マンノピラノシドを得る。続いて、生成物を、厳密に無水条件下で、銀トリフレート化学を使用して、１

－α－ブロモ－２，３，４，６－テトラベンゾイルマンノピラノシドでグリコシル化し、保護されたアジドエチルマンノビオース生成物を得る。中間体生成物を脱保護し、ベンゾイル基を除去し、ＡｚＥＢＭを得る。

【０３３３】

実施例４－アジドエチルマンノトリオース（ＡｚＥＴＭ）の合成

ａ．１－α－ブロモ－２，３，４，６－テトラベンゾイル－マンノース

攪拌棒および窒素流入口を含む５００ｍＬの三口フラスコに、４０ｇ（６０．９ｍｍｏｌｅ）のペンタベンゾイルマンノースおよび８０ｍＬの塩化メチレンを加えた。得られた溶液を氷浴で＜５℃に冷却し、８０ｍＬの３３％ＨＢｒ－酢酸溶液を、添加ロートによって、反応温度を＜１０℃に保つような速度で加えた。添加が完了し（約３０分）、氷浴を外し、攪拌を３時間続けた。

【０３３４】

反応溶液を同じ容積（１６０ｍＬ）のＤＣＭで希釈し、続いて水（２×５００ｍＬ）、飽和炭酸水素塩（２×５０ｍＬ）およびブライン（１×５０ｍＬ）で順番に抽出し、硫酸マグネシウムで乾燥し、溶剤を蒸発させ、４１ｇの固体泡状物を得（理論収量４０．１ｇ）、N_2下、冷凍庫に保存した。この物質は、さらに精製することなく使用した。反応は、ＴＬＣ：シリカゲル（ヘキサン／酢酸エチル、７／３）出発物質R_f０．６５、生成物R_f０．８ＵＶ視覚化によりモニターした。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（$CDCl_3$）δ８．１１（ｄ，２Ｈ）、８．０１（ｍ，４Ｈ）、７．８４（ｄ，２Ｈ）、７．５８（ｍ，４Ｈ）、７．４１（ｍ，６Ｈ）、７．２８（ｔ，２Ｈ）、６．５８（ｓ，１Ｈ）、６．２８（ｍ，２Ｈ）、５．８（ｍ，１Ｈ）、４．７５（ｄｄ，１Ｈ）４．６８（ｄｄ，１Ｈ）４．５（ｄｄ，１Ｈ）。

【０３３５】

ｂ．１－アジドエチル－２，４－ジベンゾイルマンノース

攪拌棒、窒素流入口および３００ｍＬの無水アセトニトリルを含む１．０Ｌの三口フラスコに、２５ｇの１－アジドエチルマンノース（１００．４ｍｍｏｌｅ）および５０ｍＬのトリエチルオルソベンゾエート（２２０ｍｍｏｌｅ、２．２当量）を加えた。得られたスラリーを室温で攪拌し、０．８ｍＬ（１０ｍｍｏｌｅ）のトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）をそのまま加えた。溶液は、１０分以内に透明になり、攪拌をさらに２時間続け、次いで２５ｍＬの１０％ＴＦＡ水溶液を加え、攪拌をさらに２時間続け、中間体をエステル異性体に加水分解した。溶剤を真空蒸発させ、粘稠な油状物とし、これを５０ｍＬのＤＣＭで完全に粉砕し、再び蒸発させ、粘稠な油状物を得た。トルエン（７０ｍＬ）を該残基に加え、粘稠な溶液に２，４－ジベンゾイルアジドエチルマンノースで種添加を行った。微細析出物が１５分以内に形成し、攪拌を室温で一晩続けた。得られた重質の懸濁液を、冷凍庫に２～４時間置き、次いでろ過し、固体を氷冷したトルエン（２×１０ｍＬ）で洗浄した。固体を重さが一定になるまで風乾し、２１ｇ（ＴＹ：５０％異性体純度で２２．８５ｇ）の約９５％異性体純度を得た。生成物を４０ｍＬのトルエンに取り、１時間攪拌し、次いで冷凍庫にさらに２時間置いた。固体をろ過し、氷冷トルエンで洗浄（２×１０ｍＬ）し、重さが一定になるまで風乾し、１８．５ｇの単一異性体生成物、２，４－ジベンゾイルアジドエチルマンノースを８３％の収率で得た。母液には、望ましくない異性体および少量の目的異性体が含有されていた。反応を、ＴＬＣ：ＳＧ（ヘキサン／酢酸エチル：７／３）出発物質R_f０．０、オルソエステル中間体R_f０．９（ヘキサン／酢酸エチル：８／２）ＳＭ　R_f０．８、目的異性体R_f０．４、望ましくない異性体R_f０．２で、モニターした。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　３００ＭＨｚ（$CDCl_3$）δ８．１２（ｔ，４Ｈ）、７．６６（ｔ，２Ｈ）、７．５（ｍ，４Ｈ）、５．５６（ｔ，１Ｈ）、５．４８（ｍ，１Ｈ）、５．１４（ｍ，１Ｈ）、４．５（ｄｄ，１Ｈ）、４．０（ｍ，２Ｈ）、３．８（ｍ，３Ｈ）、３．５６（ｍ，１Ｈ）、３．４４（ｍ，１Ｈ）。

【０３３６】

ｃ．過ベンゾイル化－マン（α－１，３）－マン（α－１．６）－α－１－アジドエチルマンノピラノシド

撹拌棒、窒素流入口を供える１．０Ｌの三口フラスコに、１８５ｍＬのＤＣＭ中の４１ｇの粗１－ブロモ－テトラベンゾイルマンノース（６０．９ｍｍｏｌｅ、約２．５当量）を加えた。これに、１１．２ｇの２，４－ジベンゾイルアジドエチルマンノース（２４．５ｍｍｏｌｅ）、次いで１１．２ｇの４Ａシーブを加えた。スラリーを室温で１０分間撹拌し、メタノール／氷浴で－１５℃に冷却した。

【０３３７】

別の暗い容器に、１９０ｍＬのトルエン、続いて１５．１ｇの銀－トリフルオロメタンスルホネート（ＡｇＯＴｆ）（５８．８ｍｍｏｌｅ、２．４当量）を加え、暗所で溶液になるまで撹拌した。この溶液を大きな添加ロートに移し、反応物を光から保護しながら、撹拌している懸濁液に滴下した。ＡｇＯＴｆ添加速度を調整することにより、反応温度を＜－１０℃に維持した。添加が終了したとき（約３０分）、冷浴を取り外し、ＴＬＣ（ＳＧ、ヘキサン／酢酸エチル：７／３、ブロモR_f０．９、アジドR_f０．４、ｔｒｉｏｓ生成物R_f０．５、ｕｖ視覚化）によって測定し、単一生成物が残るまで反応物をさらに２時間撹拌した。

【０３３８】

トリエチルアミン（７ｍＬ、５．０当量）、次いで２００ｍＬのＤＣＭを加えた。得られたスラリーを、シリカゲルおよびセライトのパッドによりろ過し、２×７５ｍＬのＤＣＭで洗浄した。溶剤を真空蒸発させ、残基を酢酸エチルに取り、水（２×１００ｍＬ）、重炭酸塩（２×５０ｍＬ）、ブライン（１×７５ｍＬ）で順番に洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶剤を真空蒸発させ、３９ｇの固体泡状物（ＴＹ３９．５ｇ）を得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　３００ＭＨｚ（$CDCl_3$）δ８．３（ｄ，２Ｈ）、８．２（ｍ，８Ｈ）、７．８５（ｄ，４Ｈ）、７．７５（ｄｄ，４Ｈ）、７．３－７．６５（ｍ，３０Ｈ）、７．２（ｔ，２Ｈ）、６．０５（ｍ，４Ｈ）、５．９（ｔ，２Ｈ）、５．６３（ｍ，２Ｈ）、５．３８（ｓ，２Ｈ）、５．１８（ｄ，１Ｈ）、４．６５（ｍ，４Ｈ）、４．５（ｍ，２Ｈ）、４．３５（ｍ，４Ｈ）、３，８（ｍ，２Ｈ）、３．５４（ｍ，２Ｈ）。

【０３３９】

ｄ．マン（α－１，３）－マン（α－１．６）－α－１－アジドエチルマンノピラノシド

３．０ｇの過酸化ベンゾイル化マン（α－１，３）－マン（α－１．６）－α－１－アジドエチルマンノピラノシド（１．８６ｍｍｏｌｅ）の４０ｍＬのメタノールの懸濁液を撹拌しながら、メタノール中の０．２ｍＬの４．２８Ｍのナトリウムメトキシドを加えた。得られた懸濁液を室温で２０時間撹拌し、透明溶液を得た。反応の終了を、ＴＬＣ（ＳＧ、ヘキサン／酢酸エチル：８／２　ＳＭ　R_f０．４、生成物R_f０．０）でモニターした。

【０３４０】

メタノールを真空蒸発させ、油状半固体を得た。残基を酢酸エチル（５０ｍＬ）に取り、３時間撹拌した。固体をろ過し、新しい酢酸エチル（２×２０ｍＬ）で洗浄し、重さが一定になるまで風乾し、１．０９ｇ（ＴＹ１．０７ｇ）の生成物を得た。母液には、残余の安息香酸メチル、脱保護副生物が含有されていた。

【０３４１】

実施例５－アジドエチル－糖（ＡｚＥＧ、ＡｚＥＭ、ＡｚＥＢＭ、ＡｚＥＴＭ）からアミノエチル－糖（ＡＥＧ、ＡＥＭ、ＡＥＢＭ、ＡＥＴＭ）を合成

パラジウム／炭素触媒、少量の酢酸、および溶剤としてエタノールを使用することによって、実施例１～４の末端アジド化合物を、室温で直ちに水素化し、対応する末端アミン化合物を得る。図１０に、ＡＥＧ、ＡＥＭ、ＡＥＢＭ、ＡＥＴＭの化学構造式を示す。試薬、溶剤などの量を水素化すべき糖－リガンドのモル数にあわせるべきであると当業者が理解すること以外は、プロセスは、ＡＥＴＭに関して以下に記載するものと同じである。

【０３４２】

ａ．マン（α－１，３）－マン（α－１．６）－α－１－アミノエチルマンノピラノシド（「アミノエチルトリマンノース」、ＡＥＴＭ）

５．３ｇ（９．２５ｍｍｏｌｅ）のマン（α－１，３）－マン（α－１．６）－α－１

－アジドエチルマンノピラノシドの１００ｍＬの水および５０ｍＬのエタノール溶液に、０．８ｇの５％Ｐｄ／Ｃを加えた。懸濁液を激しく攪拌しながら、３０～４０ｐｓｉで４８時間、または出発物質がＴＬＣ（ＳＧ，メタノール，ＳＭ　R_f０．７５，Ｐｄｔ　R_f０．０，ＰＭＡ　ｖｉｓ．）に現れなくなるまで水素化した。懸濁液をセライトでろ過し、これをエタノール（２×５０ｍＬ）で濯ぎ、ろ液を真空で濃縮した。

【０３４３】

この物質のＨＰＬＣ（Ｃ１８、３％アセトニトリル／９７％の０．１％H_3PO_4、２２０ｎｍ、２ｍｌ／分）により、Ｒｔ２．５分でインジェクション・カラム・ボイド物質のＵＶ吸着を得、ベンゾエートエステルを示していた。ろ液を、７０ｍＬの水および１２ｍＬの１ＮのＮａＯＨで希釈し、該溶液を室温で一晩攪拌した（ＨＰＬＣ：カラムボイドＲｔ２．５分でＵＶ物質なし、Ｒｔ１０．５分、安息香酸と共溶出でＵＶ物質）。２ｇの脱色木炭を加え、懸濁液を攪拌しながら８０℃に加熱し、室温に冷却し、セライトでろ過した。ろ液のｐＨを２ＮのＨＣｌで８．０に調整し、無色の溶液を真空下濃縮し、約５０％の体積とした。

【０３４４】

該溶液を樹脂カラム（Ｄｏｗｅｘ５０Ｗ、５０ｇ）に負荷し、残っているいかなる酸副生物も除去され、溶出画分のｐＨが中性になるまで（６×７５ｍＬ）水洗した。アミン生成物を、０．２５Ｎの水酸化アンモニウム（６×７５ｍＬ）でカラムから洗い落とし、アミン生成物－ニンヒドリン検出を含有する画分を合わせ、真空下濃縮し、２５～３０ｍＬとした。この濃縮溶液を、攪拌されている３００ｍＬのエタノールに滴下し、さらに2時間攪拌を続けた。生成物をろ過し、新しいエタノール（２×５０ｍＬ）で洗浄し、重さが一定になるまで風乾した。得られた白色無定形固体を、さらに、真空オーブン中、８０℃で5時間乾燥し、４．１ｇの白色顆粒固体（ＴＹ５．１ｇ）を得た。ＮＭＲには、いかなる芳香族プロトンもなかった。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　３００ＭＨｚ（D_2O）δ５．０８（ｓ，１Ｈ）、４．８７（ｓ，１Ｈ）、４．８１（ｓ，１Ｈ）、４．８－３．６（ｍ，１８Ｈ）、２．９（ｍ，２Ｈ）。

【０３４５】

実施例６－ジプロパルギル糖合成およびＡＥ－リガンドの生成

ａ．ジエチルジプロパルギルマロネートの合成

ジエチルマロネート（１２２．５ｇ、０．７６４８ｍｏｌ）を、ナトリウムエトキシド（ナトリウム金属から調製、３８．５ｇ、１．６７ｍｏｌ）を含有する無水エタノール（８００ｍｌ）に加えた。３０分後、プロパルギルブロミド（２００ｇ、１．６８ｍｏｌ）を攪拌している懸濁液にゆっくり加え、温度を６０度未満に保った。混合物を一晩（１５時間）還流した。析出した塩をろ過で除去し、エタノールで洗浄した。溶剤を真空除去し、残基を水で希釈し、エタノール（２×２００ｍｌ）で抽出した。合わせた抽出物を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、Et_2Oで洗浄し、溶剤を真空除去し、金色の油状物を得た。該油状物を高真空（４０℃）に3時間置き、放置した。固体は結晶化し始め、油状固体を形成した。一晩（１６時間）放置した。シクロヘキサンをフラスコに充填し、固体を崩壊し、ろ過し、シクロヘキサンで洗浄し、白色結晶性生成物（８１ｇ、４４．８％収率）を得た。反応は、ＧＣによって追跡した。

【０３４６】

ｂ．ジプロパルギルマロン酸の合成

ジエチルジプロパルギルマロネート（８０ｇ、０．３３９ｍｏｌ）を、６００ｍｌの１０％アルコール性水酸化カリウム中で一晩（１５時間）還流した。溶剤を真空除去し、残基を3ＮのＨＣｌで酸性とした。残基をEt_2O（２×３００ｍｌ）で抽出した。合わせた抽出物を$MgSO_4$で乾燥し、ろ過し、Et_2Oで洗浄し、油状物に真空濃縮した。高真空（４０℃）に2時間置き、放置し、ジプロパルギルマロン酸を油状物（４６ｇ、７５．４％収率）を得た。反応は、ＧＣで追跡した。

【０３４７】

ｃ．ジプロパルギル酢酸の合成

ジプロパルギルマロン酸（２６ｇ、０．４４３ｍｏｌ）を、CO_2の発生が止まるまで、１３５℃でそのまま加熱した。次いで放冷し、油状物とした。該油状物を０．５ｐｓｉで蒸留した。蒸留フラスコ中に残った油状物残基および固体を合わせ（１５．７ｇ、７９．９％収率）、次のステップでそのまま使用した。

【０３４８】

ｄ．［２－（３－プロプ－２－イニル－ヘキシ－５－イノイルアミノ）－エチル］－カルバミン酸ｔ－ブチルエステルの合成

５０ｍｌのCH_3CN中のＮ－ｂｏｃ－エチレンジアミン（１８．３ｇ、０．１１４３ｍｏｌ）を、添加ロートを使ってゆっくり、ジプロパルギル酢酸（１５．５６ｇ、０．１１４３ｍｏｌ）、ＴＢＴＵ（３６．７４ｇ、０．１１４ｍｏｌ）およびＤＩＰＥＡ（２９．６ｇ、０．２２９ｍｏｌ）を含有する、攪拌している３００ｍｌのCH_3CN溶液に０℃で加えた。析出が起こった。氷浴を外し、生成物を周辺温度で一晩（１６時間）攪拌した。ここで反応物は全体的に均質になった。溶液を真空濃縮し、残基を８００ｍｌの水で希釈した。得られた固体をろ過し、十分水洗し、真空乾燥し、１４．３ｇの粗生成物を得た。ＤＣＭから再結晶（２×）し、ろ過し、ヘキサンで洗浄し、生成物（９．８５ｇ、３１％収率、９８％ＨＰＬＣ（２１４ｎｍ）による純度）を得た。

【０３４９】

ｅ．アジド糖の［２－（３－プロプ－２－イニル－ヘキシ－５－イノイルアミノ）－エチル］－カルバミン酸ｔ－ブチルエステルへのクリック反応

ＤＣＭ（２０ｍＬ）中の１，１ジプロパルギル－アセチル－（－１Ｎ，２Ｎ－ＢＯＣ－１，２－ジアミノエチル）アミド（ＤＰ、４１８ｍｇ、１．５ｍｍｏｌｅ）に、０℃で５分間にわたりＴＦＡ（４ｍＬ）を滴下した。暗転した溶液を室温で一晩攪拌した。揮発性物質を減圧蒸発させた。トルエン（２０ｍＬ）を残基に加え、減圧下で２回揮発分を取り除いた。得られた暗色油状物をさらに精製することなく使用した。

【０３５０】

この残基にＴＨＦ（２０ｍＬ）および水（２０ｍＬ）を攪拌しながら１５分で加えた。硫酸銅（２２５ｍｇ、０．９ｍｍｏｌｅ）、次いでアスコルビン酸ナトリウム（１８０ｍｇ、０．９ｍｍｏｌｅ）を加えた。得られた混合物を５５～６０℃に６時間で加熱し、次いで室温で１８時間攪拌した。溶液を半分の体積まで減圧蒸発させ、マイクロファイバー・ガラス・フィルターでろ過した。得られた透明な溶液を、樹脂カラム（Ｄｏｗｅｘ５０Ｘ－２）に置き、これをｐＨが中性になるまで水洗（６×７５ｍＬ）し、次いで１０％NH_4OH（８×７５ｍＬ）で洗浄した。ニンヒドリンで陽性染色とする画分を合わせ、減圧蒸発させ、ガラス状固体を得た。ガラス残基を水（２５０ｍＬ）に取り、０．５ｇのチャコールで処理し、還流温度に加熱した。冷却したスラリーをセライトおよびマイクロファイバー・フィルターでろ過した。得られた淡黄色溶液を減圧蒸発させ、ガラス状固体とし、メタノールを加え、蒸発（２×）させ、オフ白色泡状物（０．９ｇ、ＴＹ１．０ｇ）を得た。

【０３５１】

実施例７－トリプロパルギル糖合成およびＡＥ－リガンドの生成

ａ．２－（２－ＢＯＣ－アミノエチル）チオアセトアミド－トリス［（プロパルギルオキシ）メチル］アミノメタン

ｔ－ブチルＮ－（２－メルカプトエチル）カルバメート（Ｆｒｏｎｔｒｕｎ Ｏｒｇａｎｉｘ，Ｉｐｓｗｉｃｈ、ＭＡ；１７７．２６ｍｇ、１ｍｍｏｌｅ）のエタノール（５ｍＬ）溶液に、ＮａＯＨ（１．１ｍｍｏｌｅ）を攪拌しながら室温で加えた。この溶液に、２－ブロモアセトアミド－トリス［（プロパルギルオキシ）メチル］アミノメタン（３５６ｍｇ、１．０ｍｍｏｌｅ、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．７３，５６０２，２００８参照）を加え、攪拌を２０時間続けた（ＴＬＣ ＳＧ ８／２ヘキサン／酢酸エチル、ｐｄｔ Ｒｆ０．４）。溶剤を真空蒸発させ、残基を酢酸エチル（４０ｍＬ）に取り、水（２５ｍＬ）、０．５ＮのＮａＯＨ（２５ｍＬ）およびブライン（２５ｍＬ）で順番に洗浄し、Na_2SO_4で乾燥し、ろ過し、油状物に濃縮した（３６０ｍｇ、ＴＹ４５２．３ｍｇ）。Ｎ

ＭＲ　ＣＤＣｌ$_3$、（ｐｐｍ）：７．０５（ｓ，１Ｈ，Ｎ－Ｈ）；５．２５（（ｓ，１Ｈ，Ｎ－Ｈ）；４．８５（ｓ，６Ｈ）；３．８５（ｓ，６Ｈ）；３．３（ｍ，２Ｈ）；３．１５（ｓ，２Ｈ）；２．７（ｍ，２Ｈ）；２．４２（ｓ，３Ｈ）；１．２２（ｓ，９Ｈ）。

【０３５２】

ｂ．２－（２－アミノエチル）チオアセトアミドートリス［（トリアゾロ－１－（２－エチルマンノース）４－メトキシ）メチル］アミノメタン

２－（２－ＢＯＣ－アミノエチル）チオアセトアミドートリス［（プロパルギルオキシ）メチル］アミノメタン（１ｇ、２．２１ｍｍｏｌｅ）のＤＣＭ（４０ｍＬ）溶液を室温で攪拌しながら、これにＴＦＡ（４ｍＬ）を滴下した。得られた溶液を一晩攪拌した。溶剤を真空除去し、残基をトルエン（１５ｍＬ）に取り、蒸発乾固した。残基をＴＨＦ（４０ｍＬ）、水（４０ｍＬ）に取り、攪拌し溶液とした。アジドエチルマンノース（３．７５当量、２．０ｇ、８．３ｍｍｏｌｅ）、次いで硫酸銅（５００ｍｇ、２．０ｍｍｏｌｅ）およびアスコルビン酸ナトリウム（４００ｍｇ、２．０ｍｍｏｌｅ）を加え、得られた混合物を５５～６０℃（油浴）で６時間攪拌し、室温に冷却し、一晩攪拌した。得られた混合物を半分の体積まで真空濃縮し、マイクロガラス・フィルターでろ過した。ろ液を樹脂カラム（Ｄｏｗｅｘ５０ｗ５０×４－１００）に負荷し、中性になるまで水（６×７５ｍＬ）で溶出した。次いで、カラムを１５％水酸化アンモニウム（１０×７５ｍＬ）で溶出し、ニンヒドリンに陽性の画分をプールし、濃縮し、ガラス状泡状物（１．２９ｇ、ＴＹ（ＭＷ１０９９ｇ／ｍｏｌ）、２ステップで５３％）とした。

【０３５３】

実施例８－ＮＨ$_2$－Ｂｌ－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンの合成

典型的な合成では、４ｇの粉末インスリン（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を、室温で、１００ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、次いで４ｍｌのトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で３０分攪拌する。次に、１．７９ｍｌ（２．６当量）のジ－ｔｅｒｔ－ブチル－ジカーボネート／ＴＨＦ溶液（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）をインスリン－ＴＥＡ溶液にゆっくり加え、約１時間混合する。５ｍｌのＤＭＳＯ中に２５０ｕｌのエタノールアミンを含有する原液４ｍｌを加えることにより、反応をクエンチし、次いで５分間混合する。クエンチ後、全溶液を１６００ｍｌのアセトンに注ぎ入れ、スパチュラで簡単に混合する。次に、１８．９％のＨＣｌ：水溶液のアリコートを８×４００μｌで混合物の表面に滴下し、反応インスリンを析出させる。次いで、析出した物質を遠心分離し、析出したケーキは取っておき、上澄みを第２ビーカーにデカントする。上澄み溶液に対し、別の１８．９％のＨＣｌ：水溶液のアリコートを８×４００μｌで混合物の表面に滴下し、反応インスリンの第２の析出物を得る。この第２の析出物を遠心分離し、上澄みは廃棄する。２つの析出ステップの遠心分離した合わせたケーキを、アセトンで１回洗浄し、室温で真空乾燥し、粗粉末を得る。該粉末は、通常６０％の所望のＢＯＣ２生成物と４０％のＢＯＣ３物質を含有する。

【０３５４】

分取逆相ＨＰＬＣ方法を使用して、純粋な所望のＢＯＣ２－インスリンを粗粉末から単離する。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。粗粉末を２５ｍｇ／ｍｌで７０％Ａ／３０％Ｂ混合物に溶解し、カラムに注入する前にシリンジろ過する。精製前に、カラム（Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ１８、７ｕｍ、１９×１５０ｍｍ）を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、７０％Ａ／３０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗粉末の溶液を、５分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、７０％Ａ／３０％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂまでの線形勾配を次の３．５分間にわたって使用し、さらに２．５分間そこで維持する。この方法を使用して、目的のＢＯＣ２ピークを約１０．６分で溶出し、その後すぐにＢＯＣ３ピークを溶出する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋なＢＯＣ２－インスリン粉末を得る。識別を、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒ

ａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）で確認し、および複合部位を、Ｎ末端シークエンス解析（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）により測定する。

【０３５５】

実施例９－ベンゼン－１，３，５－トリカルボキシ－（Ｎ－ω－アミノ酸－ＮＨＳエステル）アミド骨格の合成

１，３，５－ベンゼントリカルボニルクロリド（１ｇ、３．８ｍｍｏｌｅ）のジクロロメタン（ＤＣＭ）（５ｍＬ）溶液を、氷浴中でω－アミノ酸（３．１当量）の１ＮのＮａＯＨ（２５ｍＬ）の溶液を激しく撹拌しながらそこへ滴下する。氷浴を外し、撹拌を室温で４時間続ける。２ＮのＨＣｌ（約１５ｍＬ）を約ｐＨ２になるまで滴下し、得られたスラリーを、さらに２時間撹拌する。析出物をろ過し、冷水（２×２０ｍＬ）で洗浄し、真空下風乾し、次いで６０℃のオーブンで一晩乾燥した。得られた白色固体をさらに精製することなく使用する。各ω－アミノ酸の収量（４－アミノ酪酸：収量１．６ｇ、９１％；６－アミノカプロン酸：収量１．９ｇ、９２％）。

【０３５６】

上記物質をＮ－ヒドロキシスクシンイミド（３．１ｍｍｏｌｅ、３．１当量）を含有するＤＭＳＯ（５ｍＬ）に取り、Ｎ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’－エチルカルボジイミド（ＥＤＣＩ、３．６ｍｍｏｌｅ、３．６当量）を室温で加える。得られた溶液を２４時間撹拌し、水（１２５ｍＬ）で希釈し、酢酸エチル（３×５０ｍＬ）で抽出する。合わせた有機相を水（２×５０ｍＬ）、ブライン（１×５０ｍＬ）で洗浄し、$MgSO_4$で乾燥する。溶剤を蒸発させ、半固体残基をアセトニトリル（１０ｍＬ）で粉砕する。固体をろ過し、冷溶剤で洗浄し、真空下風乾し、次いで６０℃のオーブンで一晩乾燥する。生成物は、尿素ビ生成物を含まない。ベンゼン－１，３，５－トリカルボキシ－（Ｎ－６－アミノカプロン酸－ＮＨＳエステル）アミド（ＴＳＢ－Ｃ６）：３０４ｍｇ、３６％、融点１４０－１４２℃。ベンゼン－１，３，５－トリカルボキシ（Ｎ－４－酪酸－ＮＨＳ－エステル）アミド（ＴＳＢ－Ｃ４）：２４５ｍｇ、４５％、融点１８２－１８４℃。

【０３５７】

実施例１０－樹枝状骨格合成

ａ．ニトロ基含有アルキン末端官能化デンドロンの水素化

ｎ＝２、４または８末端アルキンおよびニトロプロピオン酸コアを含有するデンドロンを得（たとえば、Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｆａｃｔｏｒｙ，Ｓｗｅｄｅｎから）、さらに精製することなく使用する。デンドロンをＤＣＭおよびエタノールの５０：５０体積混合物、１００ｍＬに溶解し、０．８ｇの５％Ｐｄ／Ｃを加える。激しく撹拌しながら懸濁液を、３０～４０ｐｓｉで４８時間、またはＴＬＣで測定して出発物質が表れなくなるまで水素化する。懸濁液をセライトでろ過し、これをエタノール（２×５０ｍＬ）で濯ぎ、ろ液を真空で濃縮する。

【０３５８】

ろ液を７０ｍＬの水および１２ｍＬの１ＮのＮａＯＨで希釈し、溶液を室温で一晩撹拌する。２ｇの脱色木炭を加え、懸濁液を撹拌しながら８０℃に加熱し、室温に冷却し、セライトでろ過する。ろ液のｐＨを２ＮのＨＣｌで８．０に調整し、無色の溶液を真空下濃縮し、約５０％の体積とする。

【０３５９】

該溶液を樹脂カラム（Ｄｏｗｅｘ５０Ｗ、５０ｇ）に負荷し、残っているいかなる酸副生物も除去され、溶出画分のｐＨが中性になるまで（６×７５ｍＬ）水洗する。アミン生成物を、カラムから０．２５Ｎの水酸化アンモニウム（６×７５ｍＬ）で洗い落とし、アミン生成物（ニンヒドリン検出）を含有する画分を合わせ、回転蒸発器を使用して真空蒸発させる。

【０３６０】

ｂ．デンドロン（アミン、アルキン－４）のアジドエチルマンノースとの反応

水素化後に得た、アミノコアおよび４個の末端アルキン基を含有するデンドロン生成物

（８．３ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（４０ｍＬ）および水（４０ｍＬ）に入れ、攪拌して溶液とする。アジドエチルマンノース（４．７５当量、２．５３ｇ、１０．５１ｍｍｏｌｅ）、続いて硫酸銅（５００ｍｇ、２．０ｍｍｏｌｅ）およびアスコルビン酸ナトリウム（４００ｍｇ、２．０ｍｍｏｌｅ）を加え、得られた混合物を５５～６０℃（油浴）で６時間攪拌し、室温に冷却し、一晩攪拌する。得られた混合物を半分の体積まで真空濃縮し、マイクロガラス・フィルターでろ過する。ろ液を樹脂カラム（Ｄｏｗｅｘ５０ｗ５０×４－１００）に負荷し、水（６×７５ｍＬ）で中性になるまで溶出する。次いで、カラムを水酸化アンモニウム（１０×７５ｍＬ）で溶出し、ニンヒドリンに陽性の画分をプールし、濃縮し、ガラス状泡状物とする。

【０３６１】

実施例１１－有機溶剤中での多価活性化エステルとのアミン官能化薬物複合（最初に加えられる薬物）

Ｎ末端活性化エステルを含有する骨格を、６０ｍＭで、１．０ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、４００ｕｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。次いでアミン含有薬物を７．９ｍｌのＤＭＳＯに７．４ｍＭの濃度で、別々に溶解する。溶解したら、全薬物溶液を、１０分かけて骨格／ＤＭ　ＳＯ／ＴＥＡ溶液に滴下し、次いで室温で２時間混合する。次いで、残っている活性化エステルを以下の様式でアミン官能化リガンドと反応させる。３７０ｍＭのリガンドの溶液を適切な容積の乾燥ＤＭＳＯ中で調製する。溶解したら、十分な量の溶液を加え、最初の活性化エステル基の数Ｎ－１の３倍の数の反応性等価物を得る。

【０３６２】

たとえば、１つの骨格当たりＮ＝３の初期活性化エステル基があれば、（３×（３－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝０．９７３ｍｌのリガンド溶液を加える。１つの骨格当たりＮ＝４の初期活性化エステル基があれば、（３×（４－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝１．４６ｍｌのリガンド溶液を加える、など。リガンド溶液を加えた後、該溶液を室温で１時間以上攪拌し、反応の完了を確実にする。

【０３６３】

次いで、得られた溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのｐＨ５．０のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液で１０倍希釈し、希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｃ８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相ＨＰＬＣを使用して、さらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用される薬物、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。その識別は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）によって確認する。

【０３６４】

実施例１２－Ｂ１－多価糖－均質リガンドを持つインスリン複合体

実施例１１に記載された方法および実施例８のアミン含有薬物、NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン（ＭＷ＝６，００８ｇ／ｍｏｌ）を使用して、以下の骨格およびリガンドを持つインスリン複合体を調製した。トリス－スクシンイミジル－１，３，５－ベンゼントリカルボキシレート（ＴＳＢ）、トリス－スクシンイミジルアミノトリアセテート（ＴＳＡＴ）、トリス－スクシンイミジル（６－アミノカプロイル）アミノ

トリアセテート（ＴＳＡＴ－Ｃ６）およびテトラキス－（Ｎ－スクシンイミジルカルボキシプロピル）ペンタエリスリトールＴＳＰＥ活性化エステル骨格を、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）から購入し、さらに精製することなく使用した。ＴＳＢ－Ｃ４およびＴＳＢ－Ｃ６骨格を、実施例９に従って合成した。ＡＥＭ、ＡＥＢＭおよびＡＥＴＭリガンドを、実施例１～５に従って合成した。適切にサイズ調整したサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切にサイズ調整した限外ろ過膜の分子量カットオフは、３ｋＤであった。

【０３６５】

全ての場合、実施例１１に従って得た凍結乾燥した粉末を、９０％ＴＦＡ／１０％アニソールに４℃で１時間溶解することによって、ＢＯＣ保護基を除去し、次いで０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２５ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ８．２緩衝液で１０倍希釈した。ＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを７．０および８．０の間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ副生物、ならびに他の混入塩を除去した。次いで、脱保護され、精製された複合体水溶液を、Ａｍｉｃｏｎ　３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して約５８Ｕのインスリン／ｍｌ（Ａ２８０測定に基づく）に濃縮し、必要になるまで４℃で保存した。出発物質NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン物質は、Ｐｈｅ－Ｂ１末端に１つの遊離アミン基しか持っていないので、Ｎ－末端シークエンス解析により各脱保護最終生成物において確認されたように、Ｐｈｅ－Ｂ１は、骨格へのインスリン複合化は、１つの部位のみである。

【０３６６】

以下の表（および実施例におけるこれと同じの他のもの）において、骨格ＭＷ値は、骨格の活性化エステルに関するものである。したがって、これは、反応混合物に加えて、活性化エステル骨格の質量を直ちに計算することができる。反応すれば、骨格は活性化エステルを失い、したがって最終生成物におけるＭＷの影響はかなり低い。

【表２】

複合体	骨格	骨格MW	リガンド	AE-糖MW	純度(HPLC)	MW(LC-MS)	糖/インスリン
TSB-AEM-2(B1)	TSB	501	AEM	223	97%	6410	2.0
TSB-AEBM-2(B1)	TSB	501	AEBM	385	94%	6734	2.0
TSB-AETM-2(B1)	TSB	501	AETM	547	96%	7057	2.0
TSB-C4-AEM-2(B1)	TSB-C4	755	AEM	223	95%	6665	2.0
TSB-C4-AEBM-2(B1)	TSB-C4	755	AEBM	385	97%	6989	2.0
TSB-C4-AETM-2(B1)	TSB-C4	755	AETM	547	95%	7313	2.0
TSB-C6-AEM-2(B1)	TSB-C6	882	AEM	223	99%	6791	2.0
TSB-C6-AEBM-2(B1)	TSB-C6	882	AEBM	385	99%	7114	2.0
TSB-C6-AETM-2(B1)	TSB-C6	882	AETM	547	95%	7438	2.0
TSAT-AEM-2(B1)	TSAT	482	AEM	223	98%	6390	2.0
TSAT-AEBM-2(B1)	TSAT	482	AEBM	385	95%	6714	2.0
TSAT-AETM-2(B1)	TSAT	482	AETM	547	94%	7038	2.0
I-1:TSAT-C6-AEM-2(B1)	TSAT-C6	822	AEM	223	97%	6730	2.0
I-3:TSAT-C6-AEBM-2(B1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	99%	7054	2.0
I-2:TSAT-C6-AETM-2(B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	7378	2.0
I-16:TSPE-AEM-3(B1)	TSPE	813	AEM	223	98%	6829	3.0
TSPE-AEBM-3(B1)	TSPE	813	AEBM	385	97%	7314	3.0
TSPE-AETM-3(B1)	TSPE	813	AETM	547	94%	7802	3.0

【０３６７】

実施例１３－多価糖－混合リガンドを持つＢ１－インスリン複合体

実施例１１で記載した方法およびアミン含有薬物、実施例８のNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン（ＭＷ＝６，００８ｇ／ｍｏｌ）を使用して、骨格に結合する糖リガンドの混合物を持つインスリン複合体を調製した。

【０３６８】

ＴＳＡＴ－Ｃ６およびＴＳＰＥ活性化エステル骨格はＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）から購入し、さらに精製することなく使用した。ＡＥＭ、ＡＥＢＭおよびＡＥＴＭは、実施例１～５に従って合成した。適切にサイズ調整したサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切にサイズ調整した限外ろ過膜の分子量カットオフは、３ｋＤである。

【０３６９】

全ての場合、実施例１１に従って得た凍結乾燥した粉末を、９０％ＴＦＡ／１０％アニソールに４℃で１時間溶解することによって、ＢＯＣ保護基を除去し、次いで０．１５０

ＭのＮａＣｌを含有する２５ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ８．２緩衝液で１０倍希釈した。ＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを７．０および８．０の間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ副生物、ならびに他の混入塩を除去した。次いで、脱保護され、精製された複合体水溶液を、Ａｍｉｃｏｎ　３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して目的の濃度に濃縮し、必要になるまで４℃で保存した。出発物質NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン物質は、Ｐｈｅ－Ｂ１末端に１個の遊離アミン基しか持っていないので、Ｎ－末端シークエンス解析により各脱保護最終生成物において確認されたように、Ｐｈｅ－Ｂ１は、骨格へのインスリン複合化の唯一の部位である。

【表３】

複合体識別	骨格	骨格MW	混合リガンド	AE-糖MW	純度(HPLC)	MW(LC-MS)	糖/インスリン
TSPE-AEM-1-AETM-2 (B1)	TSPE	813	AEM/AETM(33/67 mol/mol)	223/547	94%	7478	1.0 AEM, 2.0 AETM
TSPE-AEM-2-AETM-1 (B1)	TSPE	813	AEM/AETM(67/33 mol/mol)	223/547	94%	7152	2.0 AEM, 1.0 AETM
TSAT-C6-AEM-1-AEBM-1 (B1)	TSAT-C6	822	AEM/AEBM(50/50 mol/mol)	223/385	96%	6892	1.0 AEM, 1.0 AEBM
I-4:TSAT-C6-AEBM-1-AETM-1 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM/AETM(50/50 mol/mol)	385/547	95%	7216	1.0 AEBM, 1.0 AETM

【０３７０】

実施例１４－予め製造した多価糖を使用する、多価糖を持つＢ１－インスリン複合体

実施例１１で記載した方法およびアミン含有薬物、実施例８のNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン（ＭＷ＝６，００８ｇ／ｍｏｌ）を使用して、以下のインスリン複合体を、予め合成した多価アミン含有リガンドから調製する。ジスクシンイミジルスベレート（ＤＳＳ）およびＴＳＡＴ－Ｃ６活性化エステル骨格は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）から購入し、さらに精製することなく使用する。末端反応性アミンを含有する二価のＡＥＭ－２、ＡＥＢＭ－２およびＡＥＴＭ－２分子は、各リガンドの２つを、これも反応性アミンを複合体化している適切な骨格に複合体化することによって調製する。各リガンドの３つを反応性アミンも複合体化している適切な骨格に複合体化することによって、末端反応性アミンを含有する３価のＡＥＭ－３、ＡＥＢＭ－３またはＡＥＴＭ－３分子を調製をする。適切なサイズのサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切なサイズの限外ろ過膜の分子量カットオフは、３ｋＤである。

【０３７１】

全ての場合において、凍結乾燥した粉末を、実施例１１によれば９０％ＴＦＡ／１０％アニソールに４℃で１時間で溶解し、次いで、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．２の緩衝液で１０倍希釈して、ＢＯＣ保護基を除去する。ＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを７．０および８．０の間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ副生物、ならびに他の混入

塩を除去する。次いで、脱保護され、精製された複合体水溶液を、Ａｍｉｃｏｎ　３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して目的の濃度に濃縮し、必要になるまで４℃で保存した。出発物質NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン物質は、Ｐｈｅ－Ｂ１末端に１個の遊離アミン基しか持っていないので、Ｎ－末端シークエンス解析により各脱保護最終生成物において確認されたように、Ｐｈｅ－Ｂ１は、骨格へのインスリン複合化の唯一の部位である。

【表４】

複合体	合成条件				予測される複合体特徴	
識別	骨格	骨格 MW	リガンド	AE-糖 MW	MW (LC-MS)	糖/インスリン
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AEM-2	676	6621	2.0AEM
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AEBM-2	1000	6945	2.0AEBM
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AETM-2	1324	7269	2.0AETM
DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AEM-3	1085	7031	3.0AEM
DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AEBM-3	1571	7517	3.0AEBM
DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AETM-3	2057	8003	3.0AETM
TSAT-C6-(AEM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEM-2	676	7637	4.0AEM
TSAT-C6-(AEBM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM-2	1000	8285	4.0AEBM
TSAT-C6-(AEM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM-2	1324	8933	4.0AETM
TSAT-C6-(AEM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM-3	1085	8046	6.0AEM
TSAT-C6-(AEBM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM-3	1571	9018	6.0AEBM
TSAT-C6-(AEM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM-3	2057	9990	6.0AETM

【０３７２】

実施例１５－樹枝状骨格－均質リガンドを使用する、多価糖を持つＢ１－インスリン複合体

実施例１０ｂで調製した１個のアミノコアおよび４個の末端アルキン基を含有するデンドロン０．１ｇ（０．０９８ｍｍｏｌ）を、１００ｍｇ／ｍｌで、無水ＤＭＳＯに溶解する。ジスクシンイミジルスベレート（ＤＳＳ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、０．０９８ｍｍｏｌ）およびトリエチルアミン（４００ｕＬ）を含有する溶液に滴下し、室温で１時間反応させる。次いで、この混合物を、実施例８のNH_2－Ｂ１－ＢＯ

Ｃ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン（ＭＷ＝６，００８ｇ／ｍｏｌ）、（０．５８８ｇ、０．０９８ｍｍｏｌ）を含有する５０ｍｇ／ｍｌの溶液に滴下し、２時間反応させる。

【０３７３】

得られた複合体を、水で過希釈し、ｐＨを８．０に調整する。溶液を、ＢｉｏＧｅｌ Ｐ２を使用して脱塩し、次いでＡｍｉｃｏｎ ３Ｋ限外ろ過装置を使用して濃縮する。得られた溶液を、逆相クロマトグラフで精製し、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥する。凍結乾燥した粉末を、９０％ＴＦＡ／１０％アニソールに４℃で１時間で溶解し、次いで、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．２の緩衝液で１０倍希釈して、ＢＯＣ保護基を除去する。ＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを７．０および８．０の間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ副生物、ならびに他の混入塩を除去する。次いで、脱保護され、精製された複合体水溶液を、Ａｍｉｃｏｎ ３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して目的の濃度に濃縮し、必要になるまで４℃で保存した。出発物質NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン物質は、Ｐｈｅ－Ｂ１末端に１個の遊離アミン基しか持っていないので、Ｎ－末端シークエンス解析により各脱保護最終生成物において確認されたように、Ｐｈｅ－Ｂ１は、骨格へのインスリン複合化の唯一の部位である。

【０３７４】

実施例１６－NH_2－Ｂ２９－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－インスリンの合成

ａ．Ｆｍｏｃ－１－（Ｂ２９）－インスリン

典型的な合成では、４ｇの粉末インスリン（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を、室温で、１００ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、次いで４ｍｌのトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で３０分攪拌する。次に、１．２当量の９－フルオレニルメチルＮ－スクシンイミジルカルボネート（Ｆｍｏｃ－ＮＨＳ）（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を、Ｆｍｏｃ－ＮＨＳのＴＨＦ１．０Ｍ溶液としてインスリン－ＴＥＡ溶液にゆっくり加える。

【０３７５】

反応物を約１時間混合する。５ｍｌのＤＭＳＯ中に２５０ｕｌのエタノールアミンを含有する原液４ｍｌを加えることにより、反応をクエンチし、次いで５分間混合する。クエンチ後、全溶液を１６００ｍｌのアセトンに注ぎ入れ、スパチュラで簡単に混合する。次に、１８．９％のＨＣｌ：水溶液のアリコートを８×４００μｌで混合物の表面に滴下し、反応インスリンを析出させる。次いで、析出した物質を遠心分離し、析出したケーキは取っておき、上澄みを第２ビーカーにデカントする。上澄み溶液に対し、別の１８．９％のＨＣｌ：水溶液のアリコートを８×４００μｌで混合物の表面に滴下し、反応インスリンの第２の析出物を得る。この第２の析出物を遠心分離し、上澄みは廃棄する。２つの析出ステップの遠心分離し、合わせたケーキを、アセトンで１回洗浄し、室温で真空乾燥し、粗粉末を得る。該粉末は、通常、２０％のＦｍｏｃ１生成物、６５％のＦｍｏｃ２生成物、および１５％の未反応インスリンを含有する。

【０３７６】

分取逆相ＨＰＬＣ方法を使用して、純粋な所望のＦｍｏｃ１－インスリンを粗粉末から単離する。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。粗粉末を２５ｍｇ／ｍｌで７０％Ａ／３０％Ｂ混合物に溶解し、カラムに注入する前にシリンジろ過する。精製前に、カラム（Ｗａｔｅｒｓ Ｓｙｍｍｅｔｒｙ Ｐｒｅｐ Ｃ８、７um，１９×１５０ｍｍ）を、Ｗａｔｅｒｓ Ｄｅｌｔｒａ Ｐｒｅｐ ６００システムで、７０％Ａ／３０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗粉末の溶液を、５分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、７０％Ａ／３０％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂまでの線形勾配を次の３．５分間にわたって使用し、さらに２．５分間そこで維持する。この方法を使用して、未反応ＲＨ１ピーク、その後すぐのＦｍｏｃ２－インスリンピークの後、所望のＦｍｏｃ１ピークを約３分で溶出する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセ

トニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋なＦｍｏｃ１－インスリン粉末を得る。識別を、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）で確認し、および複合部位を、Ｎ末端シークエンス解析（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）により測定する。

【０３７７】

ｂ．ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－Ｆｍｏｃ－（Ｂ２９）－インスリン

典型的な合成では、１ｇのＦｍｏｃ１－（Ｂ２９）－インスリンを室温で２５ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、次いで１ｍｌのトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で３０分攪拌する。次に、０．３７９ｍｌ（２．２当量）のジ－ｔｅｒｔ－ブチル－ジカーボネート／ＴＨＦ溶液（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）をインスリン－ＴＥＡ溶液にゆっくり加え、約１時間混合する。反応を５ｍｌのＤＭＳＯ中で、２５０ｕｌのエタノールアミンを含有する原液１ｍｌを添加してクエンチし、５分間混合する。クエンチ後、全溶液を４００ｍｌのアセトンに注ぎ入れ、スパチュラで簡単に混合する。次に、１８．９％のＨＣｌ：水溶液のアリコートを８×１００μｌで混合物の表面に滴下し、反応インスリンを析出させる。次いで、析出した物質を遠心分離し、析出したケーキは取っておき、上澄みを第２ビーカーにデカントする。上澄み溶液に対し、別の１８．９％のＨＣｌ：水溶液のアリコートを８×１００μｌで混合物の表面に滴下し、反応インスリンの第２の析出物を得る。この第２の析出物を遠心分離し、上澄みは廃棄する。２つの析出ステップの遠心分離した合わせたケーキを、アセトンで１回洗浄し、室温で真空乾燥し、粗粉末を得る。該粉末は、９０％を超える所望のＢＯＣ２－Ｆｍｏｃ－１生成物を含有する。

【０３７８】

分取逆相ＨＰＬＣ方法を使用して、純粋なＢＯＣ２－Ｆｍｏｃ－１－インスリンを粗粉末から単離する。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。粗粉末を２５ｍｇ／ｍｌで７０％Ａ／３０％Ｂ混合物に溶解し、カラムに注入する前にシリンジろ過する。精製前に、カラム（Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ８、７ｕｍ，１９×１５０ｍｍ）を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、７０％Ａ／３０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗粉末の溶液を、５分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、７０％Ａ／３０％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂまでの線形勾配を次の３．５分間にわたって使用し、さらに２．５分間そこで維持する。この方法を使用して、Ｆｍｏｃ１－インスリン出発物質の後、所望のＢＯＣ２－Ｆｍｏｃ－１ピークを約５分で溶出する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋なＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－Ｆｍｏｃ（Ｂ２９）－インスリン粉末を得る。識別を、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）で確認し、および複合部位を、Ｎ末端シークエンス解析（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）により測定する。

【０３７９】

ｃ．NH_2－（Ｂ２９）－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－インスリン

先のステップによって得られた凍結乾燥した粉末を、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の２０％ピペリジンに、４℃で３０分で溶解し、次いで、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．２緩衝液で１０倍希釈することによって、ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－Ｆｍｏｃ（Ｂ２９）のＦｍｏｃ保護基を除去する。ＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを７．０と８．０との間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、Ｆｍｏｃ、ＤＭＦおよび他の任意の混入塩を除去する。NH_2－（Ｂ２９）－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－インスリンを、必要であれば、凍結乾燥して粉末とし、または望ましい場合は、水溶液で直接使用する。

【０３８０】

実施例１７－NH_2－Ｂ２９－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－インスリン複合体の合成

実施例１６のNH_2－Ｂ２９－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－インスリンを使用する代わり

に、実施例８のNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを使用して、先の実施例に記載した全多価リガンド－薬物複合体を調製してもよい。得られた複合体は全て、同じＭＷおよび置換度を有するが、インスリン分子の複合部位は、Ｎ－末端Ｐｈｅ－Ｂ１ではなく、ε－Ｂ２９アミノ基である。これは、Ｎ－末端シークエンス解析により確認することができる。

【０３８１】

実施例１８－有機溶剤中の多価活性化エステルを持つアミン官能化薬物複合体（最後に薬物を付加）

この実施例は、リガンドの前に薬物を骨格に付加する実施例１１で記載した方法の代替法を記載する。この実施例では、薬物の前にリガンドを骨格に付加する。

【０３８２】

Ｎ末端活性化エステルを含有する骨格を、６０ｍＭで、１ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、４００ｕｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。平行して、１２２ｍＭのリガンド溶液を、適切な容量の無水ＤＭＳＯで調製する。溶解した時点で、十分な量のリガンド溶液を１０分にわたって滴下し、骨格上の活性化エステル基の数Ｎ－１に正確に等しい数の反応性等価物を得る。たとえば、骨格上にＮ＝３の活性化エステル基があれば、（１×（３－１）×６０ｍＭ／１２２ｍＭ）＝０．９８ｍｌのリガンド溶液を加える。骨格上にＮ＝４の活性化エステル基があれば、（１×（４－１）×６０ｍＭ／１２２ｍＭ）＝１．５ｍｌのリガンドを加える、など。リガンド溶液を加えた後、該溶液を室温で２時間攪拌する。

【０３８３】

次いで、アミン含有薬物を別々に７．５ｍｌの無水ＤＭＳＯに８．１ｍＭの濃度で溶解する。溶解したら、全薬物溶液を骨格／ＤＭＳＯ／リガンド／ＴＥＡ溶液に１分で加え、次いで室温でさらに２時間混合し、反応の完了を確実にする。

【０３８４】

次いで、得られた溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのｐＨ５．０のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液で１０倍希釈し、希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ１８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相ＨＰＬＣを使用して、さらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用される薬物、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。その識別は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）によって確認する。

【０３８５】

実施例１９－保護されていないインスリンから有機溶剤で生成された多価糖を有するＢ２９－インスリン複合体

この実施例は、保護されていないインスリンにおいて、Ｌｙｓ－Ｂ２９ε－アミノ部分が最も活性のあるアミンであり、次いでＡ１、次いでＢ１であるという事実を利用する。従って、保護されていないインスリンを使用する場合、得られた複合体は、Ｌｙｓ－Ｂ２９位が主に置換されているはずである。実施例１８で記載した方法および組換えヒトインスリン（ＭＷ＝５８０８Ｄａ、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）

を使用して、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）から購入したＴＳＡＴ－Ｃ６活性化エステル骨格から、以下のインスリン複合体を調製した。ＡＥＭおよびＡＥＴＭは、先に記載したように合成した。適切なサイズのサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切なサイズの限外ろ過膜の分子量カットオフは、３ｋＤａであった。

【表５】

複合体	骨格	骨格MW	リガンド	AE-糖MW	純度(HPLC)	MW(LC-MS)	糖/インスリン
I-7:TSAT-C6-AEM-2(B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	93%	6729	2.0
I-6:TSAT-C6-AETM-2(B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	95%	7378	2.0

【０３８６】

Ｎ末端シークエンス解析に従って、約８５％のＡＥＭ含有骨格を、Ｌｙｓ－Ｂ２９を介してインスリンに複合体化し、約８７％のＡＥＴＭ含有骨格を、Ｌｙｓ－Ｂ２９を介してインスリンに複合体化した。

【０３８７】

実施例２０－水性溶剤中の多価活性化エステルを持つアミン官能化薬物複合体（最後に薬物を付加）

この実施例では、実施例１８で記載した方法の変法であって、反応を有機溶剤の代わりに水性溶剤中で行う方法を記載する。

【０３８８】

Ｎ末端活性化エステルを含有する骨格を、６０ｍＭで６．２５ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、次いで２ｍｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。平行して、４４８ｍＭのリガンド溶液を、適切な容量の無水ＤＭＳＯで調製する。溶解した時点で、十分な量のリガンド溶液を１０分にわたって滴下し、骨格上の活性化エステル基の数Ｎの１．５倍－１に等しい数の反応性等価物を得る。たとえば、１つの骨格上にＮ＝３の活性化エステル基があれば、（１．５×（３－１）×６０ｍＭ／４４８ｍＭ）×６．２５ｍｌ＝２．５ｍｌのリガンド溶液を加える。１つの骨格上にＮ＝４の活性化エステル基があれば、（１．５×（４－ｌ）×６０ｍＭ／４４８ｍＭ）×６．２５ｍｌ＝３．８ｍｌのリガンド溶液を加える、など。リガンド溶液を加えた後、該溶液を室温で１時間攪拌する。

【０３８９】

次いで、アミン含有薬物を別に１７．２ｍＭで、２．６７ｍｌの０．１ＭのｐＨ１１の炭酸ナトリウム緩衝液に溶解し、続いて１．０Ｎの水酸化ナトリウムでｐＨを１０．８に調整する。一度溶解すれば、全骨格／ＤＭＳＯ／リガンド／ＴＥＡ溶液を、７５分にわたってインスリン／炭酸塩緩衝液溶液に滴下する。添加の間、必要であれば、希ＨＣｌまたはＮａＯＨを使用して、得られる混合物のｐＨを５分毎に１０．８に調整する。滴下添加の後、溶液をさらに１５分攪拌し、反応の完了を確実にする。

【０３９０】

次いで、得られた溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのｐＨ５．０のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液で１０倍希釈し、希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約４０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ Ｓｙｍｍｅｔｒｙ Ｐｒｅｐ Ｃ１８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相

ＨＰＬＣを使用して、さらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用される薬物、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。その識別は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）によって確認する。

【０３９１】

実施例２１－保護されていないインスリンから水性溶剤中で合成されたＢ２９－ＡＥＭ－２－インスリン複合体

この実施例は、保護されていないインスリンにおいて、Ｌｙｓ－Ｂ２９ε－アミノ部分が最も活性のあるアミンであり、次いでＡ１、次いでＢ１であるという事実を利用する。従って、保護されていないインスリンを使用する場合、得られた複合体は、Ｌｙｓ－Ｂ２９位が主に置換されているはずである。実施例２０で記載した方法および組換えヒトインスリン（ＭＷ＝５８０８、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）をアミン含有薬物として使用して、ＡＥＭ－２インスリン複合体を、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）から購入した、ＴＳＡＴ－Ｃ６活性化エステル骨格を使用して調製した。インスリン類縁体として使用されるＡＥＭは、先に記載したように合成した。適切なサイズのサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切なサイズの限外ろ過膜の分子量カットオフは、３ｋＤであった。最終生成物（ＨＰＬＣによる純度９５％）は、６７２９ｇ／ｍｏｌ（ＬＣ－ＭＳ）の所望のＭＷを有し、１インスリン当たり計２．０個のＡＥＭ分子の複合体化が示され、Ｌｙｓ－Ｂ２９部位で複合体化する複合体分子が８５％を超える（Ｎ末端シークエンス解析）ことがわかった。

【０３９２】

実施例２２－アルデヒド含有骨格を持つアミン官能化薬物の一般的複合化

ａ．複数のリガンドと１個の末端アルデヒドで官能化された骨格

最初に、Ｎ末端活性化エステルを含有する骨格を、２７．０ｍｌの無水ＤＭＳＯに６０ｍＭで溶解し、次いで８００ｕｌ（過剰）のトリアミン（ＴＥＡ）を加える。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。アミン含有ジエチルアセタールの母液を、５８０ｍＭで、５ｍｌの無水ＤＭＳＯ中で調製する。溶解したら、２．９ｍｌのジエチルアセタール溶液を、骨格／ＤＭＳＯ／ＴＥＡ溶液に５分で滴下し、次いで室温でさらに１５分混合する。次いで、残っている活性化エステルをアミン官能化リガンドを以下の様式で反応させる。リガンドの３７０ｍＭ溶液を、適切な容量の乾燥ＤＭＳＯ中で調製する。溶解したら、最初の活性化エステル基、Ｎ、－１の数の１．５倍と同じ数になる反応性等価物を得るのに十分な量の溶液を加える。たとえば、１つの骨格当たりＮ＝３の初期活性化エステル基があれば、（１．５×（３－１）×６０ｍＭ×２７／３７０ｍＭ）＝１．３ｍｌのリガンド溶液を加える。１つの骨格当たりＮ＝４の初期活性化エステル基があれば、（１．５×（４－１）×６０ｍＭ×２７／３７０ｍＭ）＝２０ｍｌのリガンド溶液を加える、など。リガンド溶液を加えた後、溶液を室温でさらに１時間４５分攪拌し、反応の完了を確実にする。反応後、全溶液を、１０倍のジエチルエーテルで希釈し、激しく混合し、遠心分離し、目的物質を含有する高密度の底相を上澄みから分離する。上澄みを廃棄した後、同容積のエタノールを加え、固体状の析出した塊を生成する。遠心分離し、上澄みを廃棄した後、物質をエタノールおよびエーテルで十分洗浄し、次いで真空下乾燥し、複数のリガンドと１個のジエチルアセタール基を含有する粗骨格を得る。

【０３９３】

ｂ．末端アルデヒドを持つアミン官能化薬物の複合化
乾燥させたら、集めた物質を溶液のｐＨを１．０に調整したＤＩ水６０ｍｌに溶解することによって、アルデヒド基をジエチルアセタールから生成する。該溶液を３０分混合し、その後、１．５ＭのＮａＣｌを含有する２００ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ８．２緩衝液６ｍｌを加え、希ＮａＯＨ溶液を使用して、溶液のｐＨを６．５に調整する。薬物を含有するアミン４８ｍｍｏｌを溶液に加え、必要ならｐＨを６．５に調整する。別に、１．５ｇのナトリウムシアノボロハイドライド（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．０緩衝液１５ｍｌに溶解し、還元剤の母液を調製し、ｐＨを希ＨＣｌ溶液で６．５に注意深く調整する。１３ｍｌのシアノボロハイドライド母液を、薬物／骨格／アルデヒド溶液に加え、室温で一晩反応させる。

【０３９４】
得られた水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の目的の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ１８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相ＨＰＬＣを使用してさらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。

【０３９５】
約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用される薬物、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。その識別は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）によって確認する。

【０３９６】
実施例２３－末端反応性アルデヒド基を含有するＡＥＭ－２－骨格、次いでＢ１でのインスリン複合体化
ａ．２ＡＥＭおよび１アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール（ＡＢＤＡ）で官能化されたＴＳＡＴ
この物質は、多価活性化エステル骨格としてＴＳＡＴ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）を、およびアミン含有ジエチルアセタールとして４－アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を使用して、実施例２２ａに記載の方法に従って合成した。先に記載したように合成した、ＡＥＭ（ＭＷ＝２２３ｇ／ｍｏｌ）を、リガンドとして使用した。

【０３９７】
ｂ．ＴＳＡＴ－ＡＥＭ－２－ＡＢＤＡとNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンとの複合体化
この物質は、実施例２２ｂに記載された方法、および上記（ａ）で生成したＴＳＡＴ－ＡＥＭ－２－ＡＢＤＡと、実施例８に従って合成したアミン含有薬物、NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン（ＭＷ＝６，００８ｇ／ｍｏｌ）とを使用して合成した。適切にサイズ調整されたサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切にサイズ調整された限外ろ過膜分子量カットオフは３ｋＤであった。出発物質NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン物質は、Ｐｈｅ－Ｂ１末端に１個の遊離アミン基しか持っていないので、Ｐｈｅ－Ｂ１は、骨格へのインスリン複合化の唯一の部位である。凍結乾燥し

た粉末を、９０％ＴＦＡ／１０％アニソールに４℃で１時間で溶解し、次いで、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．２の緩衝液で１０倍希釈して、ＢＯＣ保護基を除去した。ＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを７．０と８．０との間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ副生成物、ならびに他の混入塩を除去する。次いで、脱保護され、精製された複合体水溶液を濃縮し、Ａｍｉｃｏｎ　３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して、目的濃度に濃縮し、必要になるまで４℃で保存した。

【０３９８】

最終生成物（ＨＰＬＣによる純度９５％）は、６４６２ｇ／ｍｏｌ（ＬＣ－ＭＳ）の所望のＭＷを有し、１インスリン当たり計２．０個のＡＥＭ分子の複合体化が示され、Ｐｈｅ－Ｂ１部位で複合体化する複合体分子が９９％を超える（Ｎ末端シークエンス解析）ことがわかった。

【０３９９】

実施例２４－末端反応性アルデヒド基を含有するＡＥＭ－３－骨格、次いでＢ１でのインスリン複合体化

ａ．３ＡＥＭおよび１アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール（ＡＢＤＡ）で官能化されたＴＳＰＥ

この物質は、多価活性化エステル骨格としてＴＳＰＥ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）を、アミン含有ジエチルアセタールとして４－アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を使用して、実施例２２ａに記載された方法に従って合成した。先に記載したように合成されたＡＥＭ（ＭＷ＝２２３ｇ／ｍｏｌ）を、リガンドとして使用した。

【０４００】

ｂ．ＴＳＰＥ－ＡＥＭ－３－ＡＢＤＡとNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンとの複合体化

この物質は、実施例２２ｂに記載した方法、および上記（ａ）で生成したＴＳＰＥ－ＡＥＭ－３－ＡＢＤＡと、実施例８に従って合成されたアミン含有薬物、NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン（ＭＷ＝６，００８ｇ／ｍｏｌ）とを使用して合成した。適切にサイズ調整されたサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切にサイズ調整された限外ろ過膜分子量カットオフは３ｋＤであった。出発物質NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン物質は、Ｐｈｅ－Ｂ１末端に１個の遊離アミン基しか持っていないので、Ｐｈｅ－Ｂ１は、骨格へのインスリン複合化の唯一の部位である。凍結乾燥した粉末を、９０％ＴＦＡ／１０％アニソールに４℃で１時間で溶解し、次いで、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．２の緩衝液２５ｍＭで１０倍希釈して、ＢＯＣ保護基を除去する、ＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを７．０と８．０との間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ生成物、ならびに他の混入塩を除去する。次いで、脱保護され、精製された複合体水溶液を濃縮し、Ａｍｉｃｏｎ　３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して、目的濃度に濃縮し、必要になるまで４℃で保存した。

【０４０１】

最終生成物（ＨＰＬＣによる純度９５％）は、６８９７ｇ／ｍｏｌ（ＬＣ－ＭＳ）の所望のＭＷを有し、１インスリン当たり計３．０．０個のＡＥＭ分子の複合体化が示され、Ｐｈｅ－Ｂ１部位で複合体化する複合体分子が９９％を超える（Ｎ末端シークエンス解析）ことがわかった。

【０４０２】

実施例２５－末端反応性アルデヒド基を含有するＡＥＭ－３－スカフォールド、次いで保護されていないインスリンを使用するＢ１でのインスリン複合体化

ａ．３ＡＥＭおよび１アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール（ＡＢＤＡ）で官能化されたＴＳＰＥ

この物質は、多価活性化エステルスカフォールドとしてＴＳＰＥ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）を、アミン含有ジエチルアセタールとして４－アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を使用して、実施例２２ａに記載された方法に従って合成した。先に記載したように合成されたＡＥＭ（ＭＷ＝２２３ｇ／ｍｏｌ）を、リガンドとして使用した。

【０４０３】

ｂ．ＴＳＰＥ－ＡＥＭ－３－ＡＢＤＡとNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンとの複合体化

この物質は、実施例２２ｂに記載した方法、および上記（ａ）で生成したＴＳＰＥ－ＡＥＭ－３－ＡＢＤＡ、アミン含有薬物非修飾インスリン（ＭＷ＝５，８０８ｇ／ｍｏｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）とを使用して合成した。適切なサイズのサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切なサイズの限外ろ過膜の分子量カットオフは、３ｋＤであった。出発物質、非保護インスリン物質は３個の遊離アミン基を持っているが、Ｐｈｅ－Ｂ１（ｐＫａ約６．８）はｐＨ６．５で最も反応性が高いアミンであるという事実から、Ｐｈｅ－Ｂ１が、スカフォールドへのインスリン複合体化の優勢な部位である。凍結乾燥した粉末を０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２５ｍＭのＨＥＰＥＳ ｐＨ８．２緩衝液に溶解した。ＮａＯＨ溶液を使用してｐＨを７．０と８．０との間に調整し、その後、３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して物質を目的濃度まで濃縮し、必要になるまで４℃で保存した。

【０４０４】

最終生成物（ＨＰＬＣによる純度９５％）は、６８９７ｇ／ｍｏｌ（ＬＣ－ＭＳ）の所望のＭＷを有し、１インスリン当たり計３．０個のＡＥＭ分子の複合体化が示され、Ｐｈｅ－Ｂ１部位で複合体化する複合体分子が８５％を超える（Ｎ末端シークエンス解析）ことがわかった。

【０４０５】

実施例２６－混合骨格化学および薬物およびリガンドの対応する別の複合体化

スクシンイミジル－３，５－ジマレイミドフェニルベンゾエート（ＳＤＭＢ）を、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）から購入し、以下の実施例でさらに精製することなく使用することができる。ＳＤＭＢを６０ｍＭで１．０ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、次いで４００ｕｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を加える。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。次いで、別に、アミン含有薬物を７．５ｍｌの無水ＤＭＳＯに８．１ｍＭの濃度で溶解する。溶解したら、全ＳＤＭＢ溶液を、１０分かけてＤＭＳＯ－薬物溶液に滴下し、次いで室温でさらに２時間混合し、反応の完了を確実にする。

【０４０６】

次いで、得られた溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのｐＨ５．０のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液で１０倍希釈し、希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。

【０４０７】

別に、６．０ｍｍｏｌのアミン含有リガンドを、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのｐＨ８．２　ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液に、４５０ｍＭの濃度で溶解する。この溶液に、６．６ｍｍｏｌのイミノチオラン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を加え、室温、ｐＨ８．２で３０分反応させ、アミン末端基を末端スルフヒドリル基に変換する。得られた物質を先のステップで生成した薬物骨格－ジマレイミド複合体の１０ｍｌ溶液と混合する。マレイミド基をｐＨ８．２で指示薬－アナログスルフドリル基と２時間反応させ、反応の完了を確実にする。該水溶液を、先ず、複合体化物

質と複合体化されていない物質の目的の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。

【０４０８】

最後に、この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ１８、７ｕｍカラムの分取逆相ＨＰＬＣ、１９×１５０ｍｍを使用してさらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用される薬物、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。その識別は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）によって確認する。

【０４０９】

実施例２７－混合骨格化学を使用する、アミノエチル糖への複合体化したインスリン

実施例２６で記載された方法、および実施例８に従って合成されたアミン含有薬物、NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン（ＭＷ＝６，００８ｇ／ｍｏｌ）を使用して、以下の特定の薬物複合体を得る。ＡＥＭ（ＭＷ＝２２３ｇ／ｍｏｌ）、ＡＥＢＭ（ＭＷ＝３８５ｇ／ｍｏｌ）およびＡＥＴＭ（ＭＷ＝５４７ｇ／ｍｏｌ）は、先に記載されたように合成し、合成においてリガンドとして使用する。適切なサイズのサイズ排除溶媒は、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）であり、適切なサイズの限外ろ過膜の分子量カットオフは、３ｋＤであった。

【０４１０】

全ての場合において、凍結乾燥した粉末を、９０％ＴＦＡ／１０％アニソールに４℃で１時間で溶解し、次いで、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．２の緩衝液２５ｍＭで１０倍希釈して、ＢＯＣ保護基を除去する。ＮａＯＨ溶液を使用してＰＨを７．０と８．０との間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ生成物、ならびに他の混入塩を除去する。次いで、Ａｍｉｃｏｎ　３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して、脱保護され、精製された複合体水溶液を、約５８Ｕのインスリン／ｍｌ（Ａ２８０測定に基づく）に濃縮し、必要になるまで４℃で保存した。出発物質NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン物質は、Ｐｈｅ－Ｂ１末端に１個の遊離アミン基しか持っていないので、Ｐｈｅ－Ｂ１は、骨格へのインスリン複合化の唯一の部位である。これは、それぞれ、脱保護された最終生成物のＮ末端シークエンス解析により確認することができる。

【表６】

合成条件			予測される複合体の特徴	
リガンド	AE-糖 MW	AE-イミノチオラン中間体 MW	MW(LC-MS)	糖/インスリン
AEM	223	360	6822	2.0AEM
AEBM	385	522	7146	2.0AEBM
AETM	547	684	7470	2.0AETM

【０４１１】

実施例２８－補足的骨格での薬物の複合体化に関する一般的なクリックケミストリー

少なくとも１個のアミノ官能基と、１個以上の末端アルキン基を含有する骨格（８．３ｍｍｏｌ）を、ＴＨＦ（４０ｍＬ）、水（４０ｍＬ）に取り、攪拌して溶液とする。アジドエチル基含有薬物（１０．５１ｍｍｏｌｅ）、次いで硫酸銅（５００ｍｇ、２．０ｍｍｏｌｅ）およびアスコルビン酸ナトリウム（４００ｍｇ、２．０ｍｍｏｌｅ）を加える。得られた混合物を５５～６０℃（油浴）で６時間攪拌し、室温に冷却し、一晩攪拌し、半分の体積まで真空濃縮し、マイクロガラス・フィルターを通してろ過する。ろ液を樹脂カラム（Ｄｏｗｅｘ５０ｗ５０×４－１００）に負荷し、水（６×７５ｍＬ）で中性になるまで溶出する。次いでカラムを１５％水酸化アンモニウム（１０×７５ｍＬ）で溶出し、ニンヒドリンに陽性の画分をプールし、濃縮し、ガラス状泡状物とする。

【０４１２】

実施例２９－ウシおよびブタのような他の種からの天然のインスリンを使用して調製された複合体

他の種のインスリンであって、少なくとも１つの反応性アミン官能基を含有するインスリン（たとえば、ウシおよびブタインスリン）を、ヒトインスリンを複合体化するために使用される任意の方法を使用して結合してもよい。当業者は、ウシまたはブタインスリンから生成された複合体の分子量は、以下の表に挙げる量だけ、ヒトインスリンから生成したものとは異なることを理解する。

【表７】

インスリンの種類	分子量(g/mol)	ヒトインスリンとのMWの違い(g/mol)
ヒトインスリン	5808	–
ブタインスリン	5778	–30
ウシインスリン	5733	–75

【０４１３】

また当業者は、ウシまたはブタインスリンから生成された複合体は、インスリン間の構造における小さな相違により、ヒトインスリンから生成された複合体とわずかに異なるクロマトグラフピークの保持時間を有し得ることを理解する。

【０４１４】

実施例３０－リスプロ、アスパルト、グルリジン、グラルギンおよびデテミールのようなインスリン類縁体で調製した複合体

少なくとも１個の反応性アミン官能基を含有する公知の全てのインスリン類縁体（たとえば、リスプロ、アスパルト、グルリジン、グラルギンおよびデテミール）は、ヒトインスリンを複合体化するために使用される任意の方法を使用して結合してもよい。当業者は、インスリン類縁体から生成された複合体の分子量は、以下の表に挙げる量だけ、ヒトインスリンから生成したものとは異なることを理解する。

【表８】

インスリンの種類	分子量(g/mol)	ヒトインスリンとのMWの違い(g/mol)
ヒトインスリン	5808	–
インスリンリスプロ	5808	–
インスリンアスパルト	5832	+24
インスリングルリジン	5823	+15
インスリングラルギン	6063	+255
インスリンデテミール	5913	+105

【０４１５】
また当業者は、インスリン類縁体から生成された複合体は、インスリン間の構造における小さな相違により、ヒトインスリンから生成された複合体とわずかに異なるクロマトグラフピークの保持時間を有し得ることを理解する。
【０４１６】
インスリングルリジン（Ｂ２９リシンは含有せず、Ｂ３リシンを含有する）の使用により、保護されていないインスリングルリジンを使用した場合、Ｂ３複合体を主に与える。しかし、Ｂ１－インスリングルリジン複合体を望む場合は、実施例８で記載したＢＯＣ－（Ａ１，Ｂ２９）－ヒトインスリンと同じプロトコルを使用して、ＢＯＣ－（Ａ１，Ｂ３）－インスリングルリジンを最初に合成する。
【０４１７】
実施例３１－ペプチド性インスリン分泌促進物質複合体で調製された複合体
Ｎ－末端アミン官能基を含有するペプチド性インスリン分泌促進物質（たとえば、ＧＬＰ－１またはＧＬＰ－１類縁体エクザニチドが挙げられるがこれらに限定されない）を、インスリンを複合体化するために使用した任意の方法を使用して結合してよい。
【０４１８】
ＩＩ．例示的な複合体のインビトロアッセイ
この実施例の第二組は、いくつかの例示的な複合体のインビトロ特性を調べる種々の実験を記載する。
【０４１９】
実施例３２－インスリン－グリコーゲン複合体の合成
この比較例は、米国特許出願公開公報第２００７００９９８２０号に従ったインスリン－グリコーゲン複合体の合成を記載する。簡単に言えば、１ｇの市販の精製されていないカキグリコーゲン（ＩＩ型、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を、脱イオン水に、１０ｍｇ／ｍｌの濃度で溶解する。固体ＣＮＢｒを、グリコーゲンに対するＣＮＢｒの質量比０．６８で得られた溶液に加え、３Ｎの水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）溶液を使用して、ｐＨを１０．７＋／－０．２で一定に保つ。１５分間攪拌した後、別の同じ質量の固体ＣＮＢｒ等価物を加え、４５分間攪拌しながら、ｐＨを１０．７＋／－０．２で一定に保つ。次いで、インスリンをグリコーゲンに対するインスリンの質量比０．６０で溶液に加え、固体炭酸水素ナトリウムを使用して、ｐＨを９．１５に調整する。溶液を一晩攪拌し、５０ｋＤａのＭＷＣＯポリエステルスルホン円盤膜フィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）を使用して、脱イオン水に対して徹底的に限外ろ過し、凍結乾燥する。次いで、得られた粉末を、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）３０Ｈｉ Ｌｏａｄ１６／６０（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）充填カラムで１Ｍの酢酸移動相を使用するゲルろ過ＨＰＬＣ（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）によって、複合体化されていないインスリンから精製する。次いで、インスリングリコーゲン画分を凍結乾燥し、複合体を純粋な白色粉末として得る。ア

ミノ酸分析（ＵＣＬＡ　Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｌｏｓ　Ａｎｇｅｌｅｓ、ＣＡ）を使用して測定すると、得られた精製された物質は、１インスリン－グリコーゲン複合体当たり１．０ｗｔ％のインスリンを含有していた。

【０４２０】

実施例３３－液体クロマトグラフィー分析

この実施例は、実施例３２に従って合成されたインスリン－グリコーゲンと、本発明に従って合成された例示的な複合体との間のＲＰ－ＨＰＬＣプロフィールの違いを記載する。実施例３２に従って合成されたインスリン－グリコーゲンの５ｍｇ／ｍｌ溶液１００ｕｌと、例示的な複合体の１ｍｇ／ｍｌ溶液１００ｕｌとを、別々に、８０％水／２０％アセトニトリル（ＣＨ３ＣＮ）移動相（それぞれ、０．１％ＴＦＡを含有する）を備えるＷａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｃ８　５ｕｍカラム（４．６ｍｍ×２５０ｍｍ）に注入する。この試験で使用した例示的な複合体は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、NH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。

【０４２１】

以下の勾配法：０～５分－８０％水／２０％CH_3CN一定、５～３５分－５０％水／５０％CH_3CNへの線形勾配を使用して、サンプルを１．０ｍｌ／分で溶出した。図１の溶出プロフィールは、異なる化学および／または分子量の物質の広い分布を示す、インスリン－グリコーゲン複合体の広い均質な溶出プロフィールと比較して、単一の化学的に区別される種を示す例示的な複合体の単一スパイクを示す。

【０４２２】

実施例３４－分子量分布分析

この実施例は、実施例３２に従って合成したインスリン－グリコーゲンと、同じ例示的な複合体との間のMWおよびMW分布における違いを記載する。インスリン－グリコーゲン複合体のMWおよびMW分布は、ｐＨ７　ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水の２５ｍｇ／ｍｌ溶液１ｍｌを、ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水で平衡化されたＵｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌサイズ排除カラム（Ｗａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｍｉｌｌｆｏｒｄ、ＭＡ）上へ注入することによって測定した。カラムを、３０分かけて１分当たり０．５ｍｌで溶出し、次いで溶出プロフィールを２８０ｎｍでの吸光度として測定した。同じプロトコルを使用する別の実験で、１０００、５０００、１２０００、２５０００、５００００、８００００、１５００００、２７００００および４１０００００ｇ／ｍｏｌ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）のデキストランMW標準を注入し、MW対保持時間の検量線を作った。インスリン－グリコーゲン複合体の検量線および溶出プロフィールに基づいて、平均MWを測定し、５００，０００ｇ／ｍｏｌ、および２５０，０００～１，０００，０００ｇ／ｍｏｌ（データは図示せず）の広い範囲で溶出した６７％の分布を示した。対照的に、例示的な複合体を測定すると、ＬＣ／ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）（データ図示せず）により測定したように、正確に６，７３０ｇ／ｍｏｌの単一MWを有している。

【０４２３】

実施例３５－複合体の化学的および物理的安定性

この実施例では、３７℃および１５０ストローク／分の機械的攪拌速度で、Ｈｉｎｄｓら（Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．１１：１９５－２０１，２０００）に記載された方法に従う促進条件下での、例示的な複合体と、複合体化されていないインスリンとの安定性を比較する。医薬品等級組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）を、促進安定性試験に関するコントロールとして選択した。Ｈｏｌｃｏｍｂｅら（Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｃａｒｅ２７：１２４１－１２４２，２００４）は、非促進条件下、ＲＨＩ安定性は、少なくとも３０日の間室温（ＲＴ）で保持され、冷凍した場合より非常に長い。図２は、ＲＨＩおよび２つの例示的な複合体に関する、５０Ｕ／ｍｌでのｐＨ７．４リン酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中の凝集安定性アッセイの結果を示す。全ての場合、溶液に残る％は、溶液をある時点で遠心（４５００×ｇ、５分）し、Ａ２８０の上澄みを測定し、Ａ２８０の上澄みを最初の

出発溶液の上澄みで割ることによって求めた。複合体Ｉ－１（図４５参照）は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、およびＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。複合体Ｉ－１６（図４５参照）は、ＴＳＰＥを骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、およびＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。

【０４２４】

３７℃での攪拌を４８時間続けた後、溶液中に６％未満のＲＨＩが安定して残り、一方ＲＨＩの大部分は、不溶性凝集体として析出した。同じ時間の後、両複合体は、実質的により安定に残った。９６％～９９％の複合体が未変化で、ＰＢＳ溶液に溶解して残った。結論的に、データは、複合体は、これらの条件下、ＲＨＩより有意に安定であることを示す。

【０４２５】

ＲＰ－ＨＰＬＣを使用して、複合体の化学的安定性を評価する（図３ａ参照）。促進安定性の４８時間後、複合体溶液を、水－アセトニトリル溶出勾配を使用するＣ８－逆相カラムを使用して分析した。前および後安定性複合体サンプルの保持時間を、得られたＬＣトレースで見られる複合体化されていない（遊離）インスリンおよびデサミドインスリンの比率とともに示す。インスリンまたはデサミドでは検出可能な量は観察されず、これは、（ｉ）糖とインスリン分子との間の供給結合は安定であり、（ｉｉ）促進安定性試験（ＡＳＴ）中複合体の有意な化学分解は起こらないことを示している。ＡＳＴの前、およびそれと平行して、毎日４℃とＲＴとの間の熱サイクルを含む９０－日間の非促進安定性試験も複合体に対し行った。平行試験の最後に、ＲＰ－ＨＰＬＣで、複合体はまだ化学的および物理的に安定であること（データは示さず）が実証された。

【０４２６】

さらに、ＨＥＰＥＳ緩衝液における複合体の化学的安定性の確認を、複合体のＡＳＴ前および後で得られたＬＣ－ＭＳデータから得る。興味深いことには、ＰＢＳ中の４８時間ＡＳＴ複合体サンプルは、実質的な分解が起こったことを示し、一方ＨＥＰＥＳ緩衝液中の４８時間ＡＳＴ複合体サンプルは、完全に未変化で安定であった（図３ｂ参照）。ＨＥＰＥＳ中で保存した複合体Ｉ－７は、ＡＳＴの前後で６７３０ＤａのＭＷを有し、両マンノース残基、複合体骨格およびインスリンは全て、化学的に変化せず、極めて安定であることを実証する。複合体安定性を確実にするために、保存、インビトロ試験およびインビボ試験のために使用した全ての緩衝液は、緩衝剤としてＨＥＰＥＳを含有する。ある実施形態では、本開示は、ＨＥＰＥＳ緩衝液中に本発明の複合体を含む組成物を提供する。

【０４２７】

ＬＣ－ＭＳ試験は、複合体の化学的同定アッセイとして簡単に作用するので、ＬＣ－ＭＳデータは、ＦＤＡ製造規制コンプライアンスを大きく増強する。薬物（たとえば、インスリン）、複合体骨格および複合体は全て、孤立した分子量を有するので、得られたリガンド比は、複合体骨格ＭＷを複合体ＭＷから差し引くことによって簡単に計算し、糖基に由来する残っている質量を得ることができる。複合体Ｉ－７の場合、マンノース：インスリンモル比は、正確に２．０と計算される。

【０４２８】

実施例３６－複合体の官能的安定性

複合体が化学的および物理的に安定であることが実証された後、７２時間ＡＳＴ複合体を、５Ｕ／ｋｇでスプラーグ・ドーレイ・ラットを使用して、その皮下生物活性インビボ対新しい複合体の評価を行った（図４参照）。

【０４２９】

７２時間ＨＥＰＥＳ　ＡＳＴ複合体データの分析は、グルコース最下点（$T_{最下点}$）に到達する時間は６０分であり、７０％の絶食血糖値に戻る時間（$T_{70\%BG}$）は、１２８±１５分未満であることを示した。スチューデントのｔ検査（各群でｎ＝４）を使用した、各時点での新しい複合体対７２時間ＡＳＴ複合体の生物活性曲線の比較は、有意な差を示さなかった（全てのｐ－値＞０．２１）。これらの結果は、製剤に関して特定した標

的内であり、保存した複合体化学的安定性は、保存したインビボ官能性能に翻訳することを示していた。

【０４３０】

ＩＩＩ．例示的な複合体のインビボアッセイ

この実施例の第三の組は、いくつかの例示的な複合体のインビボ特性を調べる種々の実験を記載する。

【０４３１】

実施例３７－複合体生物活性対ＲＨＩおよびデキストランまたはグリコーゲン複合体

（ａ）インスリン－デキストラン生物活性

この比較例では、皮下投与したインスリン－デキストラン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ＭＷ約７０Ｋ）のインビボ薬力学的プロフィールを評価する。以下に示すように、米国特許公開公報第２００４０２０２７１９号に従って合成したインスリン－デキストラン複合体は、高ＭＷの複合体ポリマーは、体循環への吸収速度を有意に妨げるので、皮下注射後、比較的ゆっくり作用する。修飾臭化シアン（ＣＮＢｒ）カップリング反応を使用して、インスリン－デキストランを合成した。簡単に言えば、５００ｍｇのデキストラン（ＭＷ＝７０Ｋ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を、５０ｍｌの脱イオン水に溶解した。５６ｍｇの固体ＣＮＢｒを得られた溶液に加え、５ＮのＮａＯＨ溶液を使用して、ｐＨを１０．７±０．２に維持した。１５分間攪拌した後、さらに５６ｍｇの固体ＣＮＢｒを加え、４５分間攪拌しながら、ｐＨを１０．７±０．２に維持した。次いで、３００ｍｇの組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）を溶液に加え、固体炭酸水素ナトリウムを使用して、ｐＨを９．１５に調整した。溶液を一晩攪拌し、１０Ｋ ＭＷＣＯポリエステルスルホン円盤膜フィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）を使用してＤＩ水に対して徹底的に限外ろ過し、凍結乾燥した。次いで、得られた粉末を、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５充填カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）上の１Ｍの酢酸移動相を使用する高速液体クロマトグラフィー（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）によって、複合体化されたいないインスリンから精製した。次いで、インスリン－デキストラン画分を凍結乾燥し、複合体を純粋な粉末として得た。インスリン複合体化の度合いを、アミノ酸分析（ＵＣＬＡ Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｌｏｓ Ａｎｇｅｌｅｓ、ＣＡ）により測定し、１０％（ｗ／ｗ）であった。

【０４３２】

インスリン－デキストランの皮下注射を、０．２５ｍｌの滅菌１×ＰＢＳ溶液（２０Ｕの当量インスリン／ｍｌ）を使用して、絶食正常非糖尿病ラット（雄スプラーグードーレイ、２００～２５０ｇ、ｎ＝４）の首の後ろに投与した。血液サンプルを、注射前１５分および注射時０分、ならびに注射後、１５、３０、４５、６０、９０、１２０、１８０、２４０、３００および３６０分に尾静脈出血によって集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。図５に示すように、グルコース最下点（$T_{最下点}$）濃度に到達する時間は、注射から約３時間後であり、血清グルコース濃度は、注射後少なくとも５時間は、下がり続けた。

【０４３３】

（ｂ）インスリン－グリコーゲン生物活性

この実施例では、皮下投与されたインスリン－グリコーゲンのインビボ薬力学的プロフィールを評価する。インスリン－グリコーゲン複合体は、実施例３２に従って合成した。インスリン－グリコーゲン複合体の生物活性は、２．５当量Ｕのインスリン／ｋｇ用量を、絶食させた正常非糖尿病ラット（雄スプラーグードーレイ、２００～２５０ｇ、ｎ＝４）の首の後ろに注射することによって評価した。血液サンプルは、注射１５分前、注射時０分、および注射後、１５、３０、４５、６０、９０、１２０、１８０、２４０、３００および３６０分に尾静脈出血によって集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を

使用して、血糖値を測定した。上記インスリン－デキストラン複合体と比べると、高いＭＷインスリン－グリコーゲン複合体は、非常により速くおよびより大きくグルコース濃度を下げる（図６参照）。この素早い作用および排出プロフィールは、皮下注射後の高ＭＷグリコーゲンポリマー鎖の素早い酵素消化による。

【０４３４】

（ｃ）例示的な複合体およびＲＨＩ生物活性

この実施例では、皮下投与された例示的な複合体および組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）のインビボ薬力学的プロフィールを評価および比較する。図４５の例示的な複合体Ｉ－１は、ＴＳＡＴ－Ｃ６をスカフォールドとして、ＡＥＭを指示薬類縁体として、およびＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。この場合、３．５Ｕ／ｋｇの複合体を、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。図７に示すように、インビボで酵素的に温浸される例示的な複合体の不能性にもかかわらず、ＲＨＩおよび例示的な複合体のグルコース低下プロフィールは、ほぼ同じである。複合体の素早い作用および排出プロフィールは、おそらく、複合体は、薬力学的特性の観点からごくわずかなＭＷの増加の効果をもたらすＲＨＩより、１４％しか大きくないという事実によるものである。

【０４３５】

実施例３８－ＲＨＩとのＰＫ比較

この実施例では、皮下投与された例示的な複合体および組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）に関し得た血清インスリンプロフィールを記載し、比較する。図４５の例示的な複合体、Ｉ－１は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、およびＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として合成した。この場合、３．５Ｕ／ｋｇの複合体を、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。図８からわかるように、複合体の薬物動態プロフィールは、ＲＨＩのプロフィールから、統計的に識別不能であり、この複合体は、皮下注射の後、血清に素早く吸収され、そこから排出されることを実証している。

【０４３６】

実施例３９－ＡＥＭ－２－ＴＳＡＴ－Ｃ６－インスリン複合体のＢ２９－置換変種のＰＫおよび生物活性

この実施例では、代表的な複合体を皮下投与して得た、血清インスリンおよび血中グルコースの低下プロフィールを記載する。図４５の例示的な複合体、Ｉ－７は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、および組換えヒトインスリンを薬物として（実施例３７および３８におけるようにＢ１－置換複合体の代わりに、Ｂ２９－置換複合体を生成するために）を使用して合成した。この場合、５Ｕ／ｋｇの複合体を、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝３）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗ

ｅｄｅｎ）で測定した。図９からわかるように、Ｂ２９－置換複合体の薬物動態プロフィールは、ＲＨＩおよび実施例３８のＢ１－置換複合体から統計的に識別不能であり、この複合体も、皮下注射後、血清に素早く吸収され、そこから排出されることを実証している。

【０４３７】

実施例４０－リスプロとのＰＫおよび生物活性比較

この実施例では、皮下投与された例示的な複合体およびインスリンリスプロで得られた血清インスリンおよび血液グルコースプロフィールを比較する。インスリンリスプロ（ＨＵＭＡＬＯＧ（登録商標））は、最後から２番目のリシンおよびＢ鎖のＣ末端上のプロリン残基が逆転している速効型インスリン類縁体である。この修飾により、インスリン多量体の形成がブロックされる。溶解型組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）のデータは、比較のためにも提供される（実施例３８および図８参照）。

【０４３８】

図４５の例示的な複合体、Ｉ－１は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、ＡＥＭをリガンドとして、およびＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。この場合、３．５Ｕ／ｋｇの複合体またはインスリンリスプロを、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。図１２からわかるように、複合体の薬物動態プロフィールは、インスリンリスプロのプロフィールから統計的に識別不能である。

【０４３９】

実施例４１－生物活性におけるリガンドの効果

この実施例では、一連の皮下投与された例示的な複合体で得られた血液グルコースプロフィールを比較する。例示的な複合体は、ＴＳＡＴ－Ｃ６を骨格として、およびＮＨ$_2$－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリンを薬物として使用して合成した。リガンド組成は、様々な親和力をカバーする複合体ＡＥＭ－２、ＡＥＢＭ－２、ＡＥＴＭ－１、ＡＥＢＭ－１およびＡＥＴＭ－２（最も低い親和性から最も高い親和力）によって変化させた。インスリン複合体は、図４５に、Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３およびＩ－４として示す。各実験で、複合体を、５Ｕ／ｋｇ（３．５Ｕ／ｋｇのＡＥＭ－２）で、絶食させた正常非糖尿病ラット（雄スプラーグードーレイ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。血液サンプルを、尾血管出血によって、０分、および注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。

【０４４０】

図１３でわかるように、リガンドの親和力が増すにつれ、グルコース低下応答は減少した。このデータは、リガンドの性質は、複合体の生物活性に影響し得るという最初の兆候を与えた。図１４～１６は、試験した４種の複合体のそれぞれに関する血糖値および血清インスリン濃度を示す。これらの結果は、より高い親和力のリガンドを持つ複合体の減少したグルコース応答は、複合体の減少したＰＫプロフィールに起因することを非常に明らかに示す（図１４のＡＥＭ－２を図１７のＡＥＴＭ－２と比較）。

【０４４１】

実施例４２－ＰＫおよび生物活性における外因性抑制剤の効果

実施例４１に記載したデータを鑑み、本発明者らは、より高いリガンドを有する複合体で観察される減少したＰＫプロフィールおよび生物活性は、内因性糖結合分子により強く結合することに起因し得るという仮定した。たとえば、いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、本発明者らは、界面活性タンパク質ＡおよびＤ、またはセレクチンファミリーのメンバーのような内因性「レクチン様」タンパク質への結合が、これらの複合体を、低い親和力のリガンドを有する複合体より素早く排除されるようにし得ると仮定した。

【０４４２】

この仮説を試験するために、本発明者らは、外因性リガンドが、これらの提案されている内因性糖結合分子に結合するために競合することができ、これによって、投与後、複合体のＰＫプロフィールを増加しているのかどうかを測定する一組の実験を行った。高親和力のＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－２を全ての実験で使用した。各実験で、同じ用量の複合体を、絶食させた、正常な非糖尿病のラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００－５００ｇ、ｎ＝６）の首の後ろに注射した。１５分後、ある用量の外因性リガンドを腹腔内注射した。血液サンプルを、尾血管出血で、０分および最初の複合体注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ヒトインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。コントロールは、１５分後に、外因性リガンドの代わりに生理食塩水を注射することによって行った。

【０４４３】

図１８は、α－メチルマンノースを投与したときに得た結果を示す。α－メチルマンノースは、非常に高い親和力の糖であり、Ｃｏｎ　Ａのようなレクチンへの結合でＡＥＴＭと競合することができる。図示するように、α－メチルマンノースの注射に起因するＰＫ／ＰＤプロフィールにおける変化は、非常に有意であった（ｐ＜０．０５）。

【０４４４】

図１９は、溶解型組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）を、ＡＥＴＭ－２複合体の代わりに最初の注射として使用したコントロール実験である。図示するように、α－メチルマンノースを注射した場合、ＰＫ／ＰＤプロフィールにおいて変化はなかった（ｐ＞＞０．０５）。

【０４４５】

内因性哺乳類結合レクチン（ＭＢＬ）は、糖を以下の相対親和力：Ｄ－マンノース、Ｌ－フコース＞Ｄ－グルコース、Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミン＞＞Ｄ－ガラクトースと結合することが知られている。したがって、本発明者らは、ＡＥＴＭ－２複合体に関して、ＰＫ／ＰＤプロフィールにおけるＬ－フコース（高親和力リガンド）、Ｄ－グルコース（中間親和力リガンド）およびＤ－ガラクトース（低親和力リガンド）の効果を比較する２つの実験を行うことを決定した。図２０に、Ｌ－フコースの結果を、α－メチルマンノースで得られた結果と比較する。図示するように、α－メチルマンノースおよびＬ－フコースは、同じ種類の効果を発揮するようである。図２１に、Ｄ－グルコースとの結果を比較する。ガラクトースは、生理食塩水と比較して、効果を発揮していない。グルコースは、小さな効果を発揮するようであるが、これは、複合体からの外因性インスリンは、素早くグルコースを低下させるので、α－メチルマンノースおよびＬ－フコースで観察される持続効果は起こらないという事実によって複雑化される。

【０４４６】

実施例４３－局所注射部位での外因性抑制剤の効果

実施例４２に記載したデータに鑑み、本発明者らは、α－メチルマンノース（ａ－ＭＭ）が血清複合体濃度を誘発し、生物活性は皮下注射部位からの吸収速度の増加の結果であ

ったかどうかの測定を試みる。この実験では、高親和力ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－２を使用した。先ず、緩衝生理食塩水溶液または１Ｍのａ－ＭＭを含有する緩衝生理食塩水溶液のどちらかを使用して、複合体を５Ｕ／ｍｌ（０．２ｍｇ／ｍｌインスリン当量）の濃度に希釈した。各溶液を５Ｕ／ｋｇの用量で、３匹の非糖尿病雄ＳＤラットそれぞれの首の後ろに、０時でｓｕｂ－Ｑ注射し、注射後、０分、ならびに１５、３０、４５、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２４０および３００分で尾静脈出血により血液サンプルを集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ＩＳＯインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。この実験で、ａ－ＭＭ複合体溶液を受けたラットは、１５分で、別の後ろ四半部注射部位に、緩衝生理食塩水溶液のｓｕｂ－Ｑ注射も受けた。生理食塩水複合体溶液を受けたラットは、１５分で、別の後ろ四半部注射部位に、ａ－ＭＭ溶液のｓｕｂ－Ｑ注射も受けた。これら１５分遅れた注射は、複合体溶液のその量のａ－ＭＭ　ｓｕｂ－Ｑ注射は、図１８で表されるａ－ＭＭで誘発される効果に関与するほど高くａ－ＭＭの全身濃度を上昇しないことを確かめるために使用した。

【０４４７】

図２２に示された結果は、実験誤差の範囲内で、高濃度のａ－ＭＭ抑制剤を複合体とともに意図的に共に注射することによって、複合体ＰＫおよび生物活性プロフィールは全く増強されなかったことを示している。これらの結果は、吸収プロフィールが注射の部位から全身循環に変化することによって、外因性糖は、複合体に対し作用しないという仮定と一致している。

【０４４８】

実施例４４－最初の複合体注射後、外因性抑制剤注射の遅延の効果

図２２における結果に基づいて、ａ－ＭＭ増強ＰＫおよび生物活性結果は、注射部位での吸収の増加で説明することはできず、むしろ複合体が吸収された後に起こる全身効果の結果に違いない。以下の２つの仮定は、そのような挙動を説明できる。（ａ）複合体は、競合糖によって干渉され得るレクチン依存性機序によって体から排出される、または（ｂ）複合体は、体内のレクチンに結合され、競合糖の存在下にのみ循環に放出される。（ｂ）の場合、複合体がｓｕｂ－Ｑデポーから完全に吸収された後、ａ－ＭＭを動物に導入することにより、吸収された複合体が、体内のレクチン部位から放出され、これにより、その血清濃度および生物活性を増加させることが予測される。しかし、排出機序が（ａ）で記載したように作用するなら、複合体は体からすでに完全に排出されているので、複合体がｓｕｂ－Ｑデポーから十分に吸収された後のａ－ＭＭの注射は、血清濃度または生物活性の増加をもたらさない。

【０４４９】

見込みのある機序を決定するため、高親和力ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体Ｉ－２を、５Ｕ／ｋｇで、絶食させた正常非糖尿病ラット（雄スプラーグ－ドーレイ、４００～５００ｇ、１群当たりｎ＝３）の首の後ろに注射した。４つの異なる遅延時間後（１５分、６０分、１２０分および２４０分）、４ｇ／ｋｇ用量のａ－ＭＭ溶液を腹腔内注射した。血液サンプルを０分、および各実験で以下の間隔を置いて尾静脈出血により集めた；

■

［ａ－ＭＭ腹腔内注射遅延時間（分）］：　［サンプル時点（注射後の分）］

［１５］：　［１５，３０，４５，６０，９０，１２０，１５０，１８０，２４０，３００，３６０］

［６０］：　［１５，３０，４５，６０，７５，９０，１２０，１５０，１８０，２４０，３００，３６０］

［１２０］：　［１５，３０，４５，６０，９０，１２０，１３５，１５０，１８０，２４０，３００，３６０］

［２４０］：　［１５，３０，４５，６０，１２０，１８０，２４０，２５５，２７０

，３００，３６０］

■

血糖値を市販の試験片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ＩＳＯインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。

【０４５０】

図２３に示すように、ａ－ＭＭ腹腔内注射による血清複合体濃度および生物活性の増加は、複合体注射とａ－ＭＭ腹腔内注射との間の遅延時間が長くなるほど、少なくなっている。たとえば、２４０分後、血清複合体濃度の増加は観察されず、完全な複合体の吸収の後、体内に複合体のレクチンに結合されたデポーは存在しないことを示している。これらの結果は、提案した機序（ａ）と一致し、提案機序（ｂ）とは一致しない。本発明者らは、機序（ａ）が、本開示の複合体に関し観察されるＰＫ特性に関与し得ると仮定しているが、本出願の請求項は、どのような方法であっても、特定の作用機序に限定されないことは言うまでもない。

【０４５１】

実施例４５－リガンド親和力を関数とする、ＰＫおよび生物活性におけるａ－ＭＭの効果

実施例４２に記載したデータに鑑み、本発明者らは、実施例４２で使用したＡＥＴＭリガンドとは異なる糖リガンドを使用して合成した複合体の薬物動態および薬力学的挙動の測定を試みる。この実施例では、ＴＳＡＴ－Ｃ６骨格を使用し、以下の複合体を、実施例２０に記載された方法に従って合成した（注：グルコサミンＨＣｌまたはＧＡ－ＨＣｌは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から購入し、さらに精製することなく使用した）。

【表９】

複合体	骨格	骨格 MW	リガンド	AE-糖 MW	純度 (HPLC)	MW (LC-MS)	糖/インスリン
I-7:TSAT-C6-AEM-2(B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	95%	6729	2.0
I-5:TSAT-C6-GA-2(B29)	TSAT-C6	822	GA-HCL	216	95%	6641	2.0

【０４５２】

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

【０４５３】

前記表に記載された複合体に関して、実施例４２で記載したものと同じ種類の実験を繰返した。各実験で、同じ用量の複合体（５Ｕ／ｋｇ）を、絶食させた、正常な非糖尿病のラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００－５００ｇ、ｎ＝３）の首の後ろに注射した。１５分遅れて、４ｇ／ｋｇ用量のａ－ＭＭを腹腔内注射した。血液サンプルを、尾血管出血で、０分および最初の複合体注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ＩＳＯインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。コントロールは

、１５分後に、ａ－ＭＭの代わりに生理食塩水を注射することによって行った。

【０４５４】

図２４および図２５は、それぞれＩ－７およびＩ－５のｓｕｂ－Ｑ注射の１５分後にａ－ＭＭを腹腔内注射して得られた結果を示す。示されているように、ａ－ＭＭの注射により得られるＰＫ／ＰＤプロフィールの増加は、生理食塩水を注射されたコントロール群と比較して、複合体Ｉ－７は、非常に有意（ｐ＜０．０５）であった。しかし、ａ－ＭＭで誘発された血清複合体濃度の増加の程度は、実施例４２のＡＥＴＭ－２複合体で得られた増加より少なかった。Ｉ－５複合体プロフィールは、図１９におけるＲＨＩに関して得られた結果とちょうど同じように、ａ－ＭＭ注射により影響を受けなかった。まとめると、これらのデータは、両マンノース由来複合体（ＡＥＭ－２およびＡＥＴＭ－２）はａ－ＭＭで増強されたＰＫ／ＰＤプロフィールを発揮するが、より低い親和力のグルコサミンに由来する複合体は発揮しないことを示す。さらに、より低い親和力のＡＥＭ－２複合体に関するＰＫプロフィールの相対変化は、より高い親和力のＡＥＴＭ－２複合体で観察された変化より少ない。

【０４５５】

実施例４６－リガンドの原子価を関数とする、ＰＫおよび生物活性におけるａ－ＭＭの効果

この実施例では、数が増えている例示的な糖リガンドが、共有結合で結合している複合体の薬物動態および薬力学的挙動の測定を試みた。全ての複合体は、実施例２０に記載された方法に従って、以下に特定する骨格および糖リガンドを使用して合成した。

【表１０】

複合体	骨格	骨格MW	リガンド	AE-糖MW	純度(HPLC)	MW(LC-MS)	糖/インスリン
I-8:DSS-AEM-1(B29)	DSS	368	AEM	223	>95%	6168	1.0
I-9:TSPE-AEM-3(B29)	TSPE	813	AEM	223	>95%	6829	3.0
I-10:DSS-AETM-1(B29)	DSS	368	AETM	547	>95%	6491	1.0
I-11:TSPE-AETM-3(B29)	TSPE	813	AETM	547	>95%	7800	3.0

【０４５６】

Ｎ末端シークエンス解析によれば、糖含有骨格のそれぞれ約９０％が、Ｌｙｓ－Ｂ２９を介してインスリンに複合体化された。複合体を、Ｉ－８、Ｉ－９、Ｉ－１０およびＩ－１１として図４５に示す。

【０４５７】

前記表に記載された複合体に関して、実施例４５で記載したものと同じ種類の実験を繰返した。各実験で、同じ用量の複合体（５Ｕ／ｋｇ）を、絶食させた、正常な非糖尿病のラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００－５００ｇ、ｎ＝３）の首の後ろに注射した。１５分遅れて、４ｇ／ｋｇ用量のａ－ＭＭを腹腔内注射した。血液サンプルを、尾血管出血で、０分および最初の複合体注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（ＩＳＯインスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。コントロールは

、１５分後に、ａ－ＭＭの代わりに生理食塩水を注射することによって行った。

【０４５８】

図２６および図２７は、それぞれ、Ｉ－８およびＩ－９のｓｕｂ－Ｑ注射の１５分後にａ－ＭＭを腹腔内注射して得られた結果を示す。示されているように、ａ－ＭＭの注射により得られるＰＫ／ＰＤプロフィールの増加は、生理食塩水を注射されたコントロール群と比較してＩ－９は非常に有意（ｐ＜０．０５）で、Ｉ－８はこれより劣った。さらに、Ｉ－９複合体は、実施例４２のＩ－２複合体とほぼ同じａ－ＭＭ誘発ＰＫプロフィールを発揮し、両方ともＩ－８で得られたプロフィールより非常に顕著であった。

【０４５９】

図２８および２９は、Ｉ－１０およびＩ－１１をそれぞれ、ｓｕｂ－Ｑ注射してから１５分後、腹腔内注射によりａ－ＭＭを投与したときに得られた結果を示す。示されているように、ａ－ＭＭの注射により得られるＰＫ／ＰＤプロフィールの増加は、生理食塩水を注射されたコントロール群と比較して、Ｉ－１１は非常に有意（ｐ＜０．０５）で、Ｉ－１０はこれよりわずかに劣った。さらに、Ｉ－１１複合体は、実施例４２のＩ－２複合体とほぼ同じａ－ＭＭ誘発ＰＫプロフィールを発揮し、両方ともＩ－１０で得られたプロフィールよりわずかに顕著であった。

【０４６０】

実施例４７－インビボ半減期／排出速度比較

実施例４４で得られた結果は、競合糖の存在によって干渉され得るレクチン依存性機序を介して、体から排出される例示的な複合体と一致している。この機序をより詳しく探求するために、本発明者らは、例示的な複合体に関し、以下の実験を行い、複合体化されていないインスリンに対する血清インビボから排除される速度を測定した。この試験で使用した複合体は全て、実施例２０で記載した一般的な方法に従って合成した。

【０４６１】

各場合で、可溶性複合体は、０．４ｍｇの複合体／ｋｇ体重の用量で、頸静脈にデュアルカニューレを処置された雄スプラーグードーレイ・ラット（Ｔａｃｏｎｉｃ、ＪＶ／ＪＶ、３５０－４００ｇ、ｎ＝３）に投与した。無菌複合体溶液またはコントロールインスリンを、１つのＪＶカニューレを介して静脈に注射し、直後にヘパリン－生理食塩水のチェイス溶液を注射し、服用させた全ての複合体が動物に投与されることを確実にした。第二のカニューレは、ｔ＝０（投与前）、および投与後、１、２、４、８、１５、３０、６０、９０、１２０および１８０分で血液サンプルを集めるために使用した。

【０４６２】

市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。

【０４６３】

図３０は、ＲＨＩまたは図４５にＩ－６として示すＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体の血清濃度を、静脈注射後の時間の関数として示す。明らかに、Ｉ－６は、ＲＨＩより非常に素早く血清から排出されている。データは、以下の一般式：Ｃ（ｔ）＝Ａ$_{o}$ＥＸＰ（－ａｔ）＋Ｂ$_{o}$ＥＸＰ（－ｂｔ）（式中、ｔは時間であり、Ｃ（ｔ）は、時間を関数とする血清中の濃度であり、Ａ$_{o}$は、第一分画濃度定数であり、ａは、第一分画指数時間定数であり、Ｂ$_{o}$は、第二分画濃度定数であり、およびｂは、第二分画指数時間定数である）を持つ２分画２項分布モデルを使用した場合、最良適合を示す。各分画と関連する排出半減期（単位：分）は、ｔ１／２（ａ）＝０．６９３／ａおよびｔ１／２（ｂ）＝０．６９３／ｂである。図３０において、ＲＨＩに関し、ｔ１／２（ａ）＝０．７６およびｔ１／２（ｂ）＝１１．４６、およびＩ－６に関し、ｔ１／２（ａ）＝０．４７およびｔ１／２（ｂ）＝２．８７である。換言すれば、Ｉ－６のｔ１／２（ｂ）は、ＲＨＩのｔ１／２（ｂ）より約４倍短い。

【０４６４】
以下の表に、先に記載した手法と正確に同一の手法を使用して試験した数多くの複合体のｔｌ／２パラメータをまとめる。（構造は図４５に示されている）
【表１１】

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

【０４６５】
このデータは、代表的な複合体は、複合体化されていないインスリンより素早く血清から排出され、その程度は、内在性レクチンの特定の複合体の親和力と複合体当たりの置換されたリガンドの数とによって左右されるという仮説と一致する。さらに、実施例４２および４４～４６で実証されたａ－ＭＭで誘発されるＰＫ／ＰＤプロフィールの増加は、試験された複合体それぞれのフェーズｂ半減期の減少とよく相関している。
【０４６６】
実施例４８－グルコース注入下のインビボ半減期／排出速度
この実施例では、例示的な複合体の排出速度は、生理的濃度のグルコースの存在下で抑制され得るとさらに仮定した。高血糖状態下で、複合体がインビボで血清から排出される速度を測定するために、以下の実験を行った。各実験で、頸静脈にデュアルカニューレを処置された雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｔａｃｏｎｉｃ、ＪＶ／ＪＶ、３５０～４００ｇ、ｎ＝３）に、Ｉ－７を、０．４ｍｇの複合体／ｋｇ体重で投薬した。
【０４６７】
実験開始の１時間前に、１匹のラットのカニューレを、無菌５０％ｗ／ｖグルコース溶液を含有するシリンジ注入ポンプに接続した。ポンプ注入速度は、実験者によって調整され、実験中の全ての時間で、動物が、３００ｍｇ／ｄＬを超える血糖値を維持することを確実にした。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。典型的な実験では、動物が３００ｍｇ／ｄＬを上回る濃度を保持するために必要な注入ポンプ速度は、通常、８５ｕＬ／分を超えることがわかった。血液サンプルを、ｔ＝０分に取り、その後、無菌複合体溶液またはコントロールインスリンを、第二ラットカニューレを介し、静脈内に注射し、その直後にヘパリン－生理食塩水のチェイス溶液を注射し、全複合体用量が動物に投与されることを確実にした。ヘパリン－生理食塩水のカニューレラインによる追加の流し込みの後、第二カニューレを使用して、血液サンプルを、投与から、ｔ＝１、２、４、８、１５、３０、６０、９０、１２０および１８０分後に集めた。
【０４６８】
各時点の血液を４℃で遠心分離し血清を集め、続いて、血清インスリンおよび血清複合体濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。インスリンまたは複合体血清濃度対時間データは、２分画モデルに従う２つの独立した減衰指数の合計（Ｃ（ｔ）＝ａ　ｅｘｐ（－k_aｔ）＋ｂ　ｅｘｐ（－k_bｔ））（式中、ｔ１／２（ａ）＝（Ｉｎ２）／k_aおよ

びｔ１／２（ｂ）＝（Ｉｎ２）／ｋ$_{b}$）に、最良適合を示した。以下の表に、グルコース注入を伴うまたは伴わないＩ－７のｔ１／２パラメータを、実施例４７のＲＨＩで得られたものとともにまとめる。

【表１２】

注入	製剤	t1/2(a)	t1/2(b)	RHIに対する比t1/2(a)	RHIに対する比t1/2(b)
なし	RHI	0.76	11.46	1.00	1.00
生理食塩水	TSAT-C6-AEM-2(I-7)	0.45	2.77	0.60	0.24
グルコース(400m/dl)	TSAT-C6-AEM-2(I-7)	0.64	5.11	0.84	0.45

【０４６９】

本発明者らは、これらのデータから、グルコースは、この複合体の血清からの排出の加速を阻害し、それによりフェーズｂの排出半減期を２．７７分から５．１１分と２倍にできると結論付けることができる。

【０４７０】

実施例４９－ａ－ＭＭ注入下のインビボ半減期／排出速度

この実施例では、任意の高濃度のグルコース以外の抑制作用のある糖、たとえば、α－メチル－マンノース（ａ－ＭＭ）の存在により、インスリン糖複合体の排出速度が抑制され得るとさらに仮定した。ａ－ＭＭの存在下、例示的な複合体がインビボで血清から排出する速度を測定するために、以下の実験を行った。各実験で、頸静脈にデュアルカニューレを処置された雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｔａｃｏｎｉｃ、ＪＶ／ＪＶ、３５０～４００ｇ、ｎ＝３）に、溶解性複合体を、０．４ｍｇの複合体／ｋｇ体重で投薬した。

【０４７１】

実験開始の１時間前に、１匹のラットのカニューレを、無菌２５％ｗ／ｖ　ａ－ＭＭ溶液を含有するシリンジ注入ポンプに接続した。ポンプ注入速度は、実験者によって調整されたが、通常、８５ｕＬ／分に設定した。血液サンプルを、ｔ＝０分に取り、その後、無菌複合体溶液またはコントロールインスリンを、第二ラットカニューレを介し、静脈内に注射し、その直後にヘパリン－生理食塩水のチェイス溶液を注射し、全複合体用量が動物に投与されることを確実にした。ヘパリン－生理食塩水のカニューレラインによる追加の流し込みの後、第二カニューレを使用して、血液サンプルを、投与から、ｔ＝１、２、４、８、１５、３０、６０、９０、１２０および１８０分後に集めた。

【０４７２】

さらに、市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。各時点の血液を４℃で遠心分離し血清を集め、続いて、血清インスリンおよび血清複合体濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。インスリンまたは複合体血清濃度対時間データは、２分画モデルに従う２つの独立した減衰指数の合計（Ｃ（ｔ）＝ａ　ｅｘｐ（－ｋ$_{a}$ｔ）＋ｂ　ｅｘｐ（－ｋ$_{b}$ｔ））（式中、ｔ１／２（ａ）＝（Ｉｎ２）／ｋ$_{a}$およびｔ１／２（ｂ）＝（Ｉｎ２）／ｋ$_{b}$）に、最良適合を示した。以下の表に、ａ－ＭＭ注入を伴うまたは伴わないＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＭ－２複合体のｔ１／２パラメータを、実施例４８のグルコースを注入したものおよび実施例４７の糖注入のないＲＨＩのものとともにまとめる。

【表１３】

注入	製剤	t1/2(a)	t1/2(b)	RHIに対する比t1/2(a)	RHIに対する比t1/2(b)
なし	RHI	0.76	11.46	1.00	1.00
生理食塩水	TSAT-C6-AEM-2(I-7)	0.45	2.77	0.60	0.24
a-MM	TSAT-C6-AEM-2(I-7)	0.92	10.09	1.21	0.88
グルコース(400m/dl)	TSAT-C6-AEM-2(I-7)	0.64	5.11	0.84	0.45

【０４７３】
本発明者らはこれらのデータから、ａ－ＭＭの投与により、この複合体の血清排出の加速が阻害されるばかりではなく、グルコースの投与より幾分その度合いが広がると結論付けることができる。この場合、フェーズｂ排出半減期は、２．７７分から１０．０９分と、４倍近くなる。

【０４７４】
ＩＶ．他の実施例
この実施例の第四の組は、いくつかの例示的な複合体の合成、製剤および特性を調べる種々の実験を記載する。

【０４７５】
実施例５０－プロタミン、亜鉛および他の賦形剤を使用する持続型インスリン複合体
先の実施例のデータが糖依存性血清排出機序と一致するなら、本発明者らは、皮下注射部位からの吸収の一定の持続速度を提供する複合体の製剤を開発を試みる。一定の吸収速度で、任意の時点での血清複合体濃度は、主に、糖－依存性排出速度によって制御される。そのような方法で、本発明者らは、糖応答性ＰＫプロフィールを発揮する持続型徐放性インスリンを製剤化することができる。

【０４７６】
持続型複合体を生成するために、本発明者らは、複合体溶液からＰＺＩ（プロタミン亜鉛インスリン）製剤を調製した。Ｂ１－末端でインスリン置換された複合体は、容易には無定形または結晶性ＰＺＩ製剤を形成しないので、実施例２０の方法に基づいて調製したＢ２９－置換複合体を使用した。これらの製剤で使用した賦形剤は、プロタミン、亜鉛、ｍ－クレゾールおよび塩を含み、これらは全てＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から市販品を購入した。これらの成分の濃度は、最適な平坦な持続した吸収速度を得るために、変更してもよい。さらに、場合によっては、少量の無修飾インスリンの添加は、製剤の安定化の助けになることがわかった。これらの場合、サンプルにおいて含有される無修飾インスリンの濃度は、最適な平坦な持続した吸収速度を得るために、変更される。試験した全ての製剤において、以下の処方レシピを使用した。

【表１４】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/mlの複合体溶液	無修飾インスリン含量(%)(M/M)	1.000
250mMのHEPES緩衝生理食塩水	NaCl濃度(M)	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度(mg/ml)	0.124
クレゾール水溶液	v/v%	0.159
25mMのHEPES緩衝生理食塩水中のpH7.2のプロタミン溶液	プロタミン濃度(mg/ml)	4×0.194アリコート

【０４７７】

特に明記しない限り、先の表に記載した順番で成分を添加した後、製剤を調製すると、インビボ試験の前に、それらを、３０分十分混合した。

【０４７８】

特定の製剤の徐放性プロフィールおよびグルコース－応答性ＰＫプロフィールを試験するため、以下の実験を行った。製剤を、所定の用量で（特に明記しない限り、殆どの実験で、約１５Ｕ／ｋｇ）で、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝３）の首の後ろに注射した。２４０分遅れて、グルコース用量（４ｇ／ｋｇ）を腹腔内注射した。血液サンプルを、尾血管出血で、０分および最初の複合体注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。製造業者のアッセイ明細書によれば、Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡは、ラットインスリンに７１％の交差反応性を示す。各サンプルで検出される内在性ラットインスリンの量を最小限にするため、血清サンプルを１０倍希釈したが、ラットインスリン検出の可能性は、完全に除外することができなかった。従って、結果を、一般的に、「測定インスリン」として報告するが、これは、実験によっては、複合体またはＲＨＩの他に、ある量の内在性ラットインスリンを含む可能性がある。しかし、以下の各実施例で収集された全てのサンプルは、同じように処置され、特性の相違に関し、直接比較することができる。

【０４７９】

実施例５１－持続型インスリン複合体特性におけるプロタミン濃度の効果

この実施例の目的は、例示的な複合体の時間動作におけるプロタミン濃度の効果およびグルコース－応答性ＰＫプロフィールを示すことであった。この実施例では、実施例２０に記載の方法に従って合成したＩ－６を全身性製剤および実施例５０で記載したインビボプロトコルを使用して試験した。

【表１５】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/ml のTSAT-C6-AETM-2(I-6)溶液	無修飾インスリン=16.7%	1.000
250mM のHEPES緩衝生理食塩水	NaCl濃度=1.5M	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度(mg/ml)=以下参照	0.124
クレゾール水溶液	3%v/v	0.159
25mMのHEPES緩衝生理食塩水中のpH7.2のプロタミン溶液	プロタミン濃度(mg/ml)=以下参照	4×0.194アリコート

【表１６】

製剤	亜鉛濃度(mg/ml)	プロタミン濃度(mg/ml)
1×P−1×Z	1.15	1.25
4×P−4×Z	4.60	5.00
10×P−4×Z	4.60	12.50

【０４８０】
４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した３種の製剤のそれぞれを投与することにより行った。図３に示した結果は、製剤中のプロタミン濃度の増加に伴って、得られる製剤の遅延性は増加し、４時間後のグルコース注射での血清インスリンプロフィールにおける測定増加が顕著になることを示している。１×Ｐ－１×Ｚ製剤は、注射直後の短時間に、グルコース腹腔内注射後に微小シグナルしか検出しないように、大部分のインスリン複合体負荷量を放出した。一方、１０×Ｐ－４×Ｚ製剤は、低い基本量のインスリンを、低血糖症状を伴わずに、最初の４時間にわたって放出し、続いて、グルコース腹腔内注射の直後、測定インスリン濃度は、＞４倍の増加に達した。

【０４８１】
実施例５２－持続型インスリン複合体特性における亜鉛濃度の影響
この実施例の目的は、例示的な複合体の製剤安定性、時間動作およびグルコース－応答性ＰＫプロフィールにおける亜鉛濃度の効果を示すことであった。この実施例では、実施例２０に記載の方法に従って合成したＩ－６を全身性製剤および実施例５０で記載したインビボプロトコルを使用して試験した。

【表１７】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/ml のTSAT-C6-AETM-2(I-6)溶液	無修飾インスリン=0%	1.000
250mM のHEPES緩衝生理食塩水	NaCl濃度=1.5M	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度(mg/ml)=以下参照	0.124
クレゾール水溶液	3%v/v	0.159
25mM のHEPES緩衝生理食塩水中のpH7.2のプロタミン溶液	ﾌﾟﾛﾀﾐﾝ濃度(mg/ml)=以下参照	4×0.194

【表１８】

製剤	亜鉛濃度(mg/ml)	プロタミン濃度(mg/ml)
4×P-1×Z	1.15	5.00
4×P-2×Z	2.30	5.00
10×P-1×Z	1.15	12.5
10×P-2×Z	2.30	12.5

【０４８２】

４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した４種の製剤のそれぞれを、投与することにより行った。図３２ａ～ｂおよび３３ａ～ｂの結果は、実験誤差内で、亜鉛濃度は、製剤の全体徐放性またはグルコース－応答性プロフィールに関して有意な効果がなかったことを示す。全ての実験で、グルコースの腹腔内注射の後、測定インスリン濃度において統計学的に有意な増加が観察された。実施例５１で示したように、亜鉛濃度に関係なく、より高いプロタミン（１０×Ｐ）製剤はより低いプロタミン（４×Ｐ）製剤より少ない複合体を時間をかけて放出した。しかし、製剤を室温で２４時間を超える時間放置した場合、両１０×Ｐ製剤は、易分散性粒子溶液から粘着性のある、凝集した、２相溶液に変換された。これは、対応する１０×Ｐ－４×Ｚ製剤には起こらなかった。同様に、４×Ｐ－１×Ｚ製剤は、１０×Ｐ－１×Ｚ製剤と同じように変換され、一方４×Ｐ－２×Ｚは、数週間も室温で確実に安定であることがわかった。従って、あるプロタミン濃度に関する亜鉛濃度は、長時間安定な、易分散性製剤を調製するように、調整することができる。

【０４８３】

実施例５３－持続型インスリン複合体特性におけるｍ－クレゾール濃度の効果

この実施例の目的は、例示的な複合体の時間動作およびグルコース－応答性ＰＫプロフィールにおけるｍ－クレゾール濃度の効果を示すことであった。この実施例では、実施例２０に記載の方法に従って合成したＩ－６を全身性製剤および実施例５０で記載したインビボプロトコルを使用して試験した。

【表１９】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/ml の TSAT-C6-AETM-2(I-6)溶液	無修飾インスリン=0%	1.000
250mM の HEPES 緩衝生理食塩水	NaCl 濃度=1.5M	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度=4.6 mg/ml	0.124
クレゾール水溶液	v/v%=以下参照	0.159
25mM の HEPES 緩衝生理食塩水中の pH7.2 のプロタミン溶液	プロタミン濃度=12.5 mg/ml	4×0.194 アリコート

【表２０】

製剤	クレゾール濃度
クレゾールなし	0
4×クレゾール	12%v/v

【０４８４】

４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した２種の製剤のそれぞれを投与することにより行った。図３４ａ～ｂの結果は、ｍ－クレゾールの存在により、より遅延性のある製剤を維持することを示す。クレゾールを含まない製剤は、注射直後の短時間に、グルコース腹腔内注射を行った場合測定インスリン濃度の非常に少ない増加が観察されるように、大部分のインスリン複合体負荷量を放出する。一方、４×クレゾール製剤は、低い基本量のインスリンを、低血糖症状を伴わずに、最初の４時間にわたって放出し、続いて、グルコース腹腔内注射の直後、測定インスリン濃度は、３～４倍の増加に達する。

【０４８５】

実施例５４－持続型インスリン複合体特性における塩／等張剤濃度の効果

この実施例の目的は、例示的な複合体の時間動作およびグルコース－応答性ＰＫプロフィールにおける塩濃度および等張剤の選択を示すことであった。この実施例では、実施例２０に記載の方法に従って合成したＩ－６を全身性製剤および実施例５０で記載したインビボプロトコルを使用して試験した。

【表２１】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/ml の TSAT-C6-AETM-2(I-6)溶液	無修飾インスリン=16.7%	1.000
250mM の HEPES 緩衝生理食塩水	NaCl またはグリセロール濃度(M)=以下参照	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度=4.6 mg/ml	0.124
クレゾール水溶液	3%v/v	0.159
25mMのHEPES緩衝生理食塩水中のpH7.2のプロタミン溶液	プロタミン濃度=12.5 mg/ml	4×0.194 アリコート

【表２２】

製剤	Nacl 濃度
塩なし	0.0M
3.3×塩	5.0M
グリセロール	緩衝生理食塩水の代わりに純粋なグリセロール溶液

【０４８６】

４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した３種の製剤のそれぞれを投与することにより行った。図３５ａ～ｃの結果は、製剤中に塩が存在することにより、より遅延性のある製剤を維持することを示す。塩を含まない製剤は、実験の最初の４時間で、グルコース腹腔内注射を行った場合測定インスリン濃度の非常に少ない増加が観察されるように、大部分のインスリン複合体負荷量を放出する。一方、３．３×塩製剤は、低い基本量の複合体を、低血糖症状を伴わずに、最初の４時間にわたって放出し、続いて、グルコース腹腔内注射の直後、測定インスリン濃度は、約４倍の増加に達する。この特性は、実施例５１の１０×Ｐ－４×Ｚ製剤で得られたものと類似し、これは、３．３×塩製剤と全く同じであるが、約１／３の塩濃度（５．０Ｍに対して１．５Ｍ）しか含有していなかった。最後に、等張剤としてグリセロールをＮａＣｌの代わりとしても、製剤の遅延性に対して悪い影響は与えないようである。

【０４８７】

実施例５５－持続型インスリン複合体特性に対する無修飾インスリンの濃度の効果

この実施例の目的は、例示的な複合体の時間作用およびグルコース応答性ＰＫプロフィールに対する異なる濃度の無修飾インスリンの効果を実証することであった。この実施例では、実施例２０に記載の方法に従って合成したＩ－６を全身性製剤および実施例５０で記載したインビボプロトコルを使用して試験した。

【表２３】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/ml の TSAT-C6-AETM-2(I-6)溶液	無修飾インスリンの含量(%)=以下参照	1.000
250mM の HEPES 緩衝生理食塩水	NaCl 濃度=1.5M	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度=4.6 mg/ml	0.124
クレゾール水溶液	3%v/v	0.159
25mM の HEPES 緩衝生理食塩水中の pH7.2 のプロタミン溶液	プロタミン濃度=12.5 mg/ml	4×0.194 アリコート

【表２４】

製剤	無修飾インスリンの含量(%)
1/24	4.17
1/12	8.33
1/6	16.7

【０４８８】

４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した３種の製剤のそれぞれを投与することにより行った。図３６ａ～ｃの結果は、製剤中に無修飾インスリンが存在することにより、グルコース腹腔内注射後に測定インスリン濃度が実質的に増加する、より遅延性のある製剤が、有利に生成することを示す。さらに、無修飾インスリンの存在は、数週間室温での温置後でも製剤の特性を維持する助けにもなる（以下の実施例５７参照）。

【０４８９】

実施例５６－持続型インスリン複合体－用量応答効果

この実施例で、本発明者らは、例示的な持続型複合体の特定の製剤の用量応答効果を評価した。実施例２０に記載の方法に従って合成した複合体Ｉ－６を全身性製剤および実施例５０で記載したインビボプロトコルを使用して試験した。

【表２５】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/ml の TSAT-C6-AETM-2(I-6)溶液	無修飾インスリン=16.7%	1.000
250mM の HEPES 緩衝生理食塩水	NaCl 濃度=1.5M	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度=4.6 mg/ml	0.124
クレゾール水溶液	3%v/v	0.159
25mM の HEPES 緩衝生理食塩水中の pH7.2 のプロタミン溶液	プロタミン濃度=12.5 mg/ml	4×0.194 アリコート

【０４９０】
４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した製剤を、投与することにより行った。
【０４９１】
複合体は、図３７に示すように、グルコースが注射されるまで平坦なＰＫプロフィールを示した。グルコース腹腔内注射後の測定インスリン濃度の増加は劇的で、用量依存性であった（複合体用量５Ｕ／ｋｇ（左）および１５Ｕ／ｋｇ（右）で得たデータを比較）。早いまたは遅い時点で低血糖症状は観察されなかった。
【０４９２】
実施例５７－例示的な持続型グルコース応答性複合体の安定性
この実施例では、本発明者らは、実施例５６の持続型製剤と正確に同じ製剤を２倍スケールで合成した。物質の半分を２～８℃で、残りの半分を室温で１週間または２週間保存した。特定した保存時間後、物質を再分散し、実施例５６で記載したものと同じ４時間グルコース腹腔内注射プロトコルを使用して、１５Ｕ／ｋｇの用量で（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）試験した。図３８～３９に示すように、この製剤は、少なくとも２週間、冷凍保存後（図３８）または室温保存後（図３９）であっても、類似した性能を示した。
【０４９３】
実施例５８－様々なリガンド親和力および多原子価を持つ複合体から調製された持続型複合体の性能
この実施例では、本発明者らは、異なる種類および数のリガンドから作られた複合体の持続型製剤の時間動作およびグルコース－応答性ＰＫプロフィールの測定を試みた。この実施例の全ての複合体は、以下に明記する骨格および糖リガンドを使用して実施例２０に記載する方法に従って合成した。

【表２６】

複合体	骨格	骨格MW	リガンド	AE-糖MW	純度(HPLC)	MW(LC-MS)	糖/インスリン
I-8:DSS-AEM-1(B29)	DSS	368	AEM	223	>95%	6168	1.0
I-7:TSAT-C6-AEM-2(B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	95%	6729	2.0
I-9:TSPE-AEM-3(B29)	TSPE	813	AEM	223	>95%	6829	3.0
I-10:DSS-AETM-1(B29)	DSS	368	AETM	547	>95%	6491	1.0
I-11:TSPE-AETM-3(B29)	TSPE	813	AETM	547	>95%	7800	3.0
I-17:C6-アミド-AEM-2(B29)	C6-アミド	838	AEM	223	95%	6745	2.0

【０４９４】

以下の持続型製剤を各複合体として使用した。

【表２７】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/mlの複合体溶液	無修飾インスリン=16.7%	1.000
250mMのHEPES緩衝生理食塩水	NaCl濃度=1.5M	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度=4.6 mg/ml	0.124
クレゾール水溶液	3%v/v	0.159
25mMのHEPES緩衝生理食塩水中のpH7.2のプロタミン溶液	プロタミン濃度=12.5 mg/ml	4×0.194アリコート

【０４９５】

４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した複合体それぞれを投与することにより行った。図４０ａ～ｅで示すように、全ての複合体が、４時間グルコース注射後、測定血清インスリン濃度の何らかの増加を伴った、遅延性の吸収プロフィールを示した。持続型ＴＳＰＥ－ＡＥＴＭ－３複合体Ｉ－１１の注射後最初の４時間以内に、何らかの有意な複合体吸収が存在したようである。しかし、他の複合体は全て、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２複合体で観察されたような、平坦な吸収プロフィールを示した。これらの結果は、これらの複合体の半減期は、全て、実施例４７～４８で記載したような無修飾インスリンより短く、それらはそれぞれ、実施例４５～４６で記載したような、ａ－ＭＭで誘発されたＰＫ／ＰＤプロフィールの増加を示すという事実とよく相関している。

【０４９６】

実施例５９－ＩＰ　ａ－ＭＭ試験条件下での持続型複合体の性能

この実施例では、本発明者らは、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）およびＴＳＡＴ－Ｃ６－ＧＡ－２（Ｉ－５）複合体から造った複合体の持続型製剤のａ－ＭＭ－応答性プロフィールを試験した。両複合体とも、実施例２０に記載された一般的方法に従って

調製した。さらに、各複合体について、以下の持続型製剤を使用した。
【表２８】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/ml の複合体溶液	無修飾インスリン=16.7%	1.000
250mM の HEPES 緩衝生理食塩水	NaCl 濃度=1.5M	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度=4.6 mg/ml	0.124
クレゾール水溶液	3%v/v	0.159
25mM の HEPES 緩衝生理食塩水中のpH7.2 のプロタミン溶液	プロタミン濃度=12.5 mg/ml	4×0.194 アリコート

【０４９７】
製剤の徐放性およびａ－ＭＭ－応答性ＰＫプロフィールを試験するため、以下の実験を行った。製剤を１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：グラム）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）で、絶食させた、正常な非糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝３）の首の後ろに注射した。２４０分遅れてａ－ＭＭ容量（４ｇ／ｋｇ）を腹腔内注射した。血液サンプルを、尾血管出血で、０分および最初の複合体注射から３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２１０、２４０および３００分後に集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。さらに、各時点の血液を４℃で遠心分離し、血清を集めた。続いて、血清インスリン濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。
【０４９８】
図４１ａに示されるように、持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）製剤のａ－ＭＭ腹腔内注射後のピーク：ベースライン血清濃度比は、ａ－ＭＭの代わりにグルコースを用いた同じ製剤で観察される比より幾分高かった。さらに、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＧＡ－２（Ｉ－５）製剤（図４１ｂ）は、ａ－ＭＭ注射後、血清複合体濃度の増加を示さなかった。これらの結果は、ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＧＡ－２（Ｉ－５）複合体の排出半減期は無修飾インスリン（実施例４７）と殆ど同じであり、該複合体は、ＰＫにおけるａ－ＭＭ－誘発変化（実施例４５）を示さないという事実とよく相関していた。
【０４９９】
実施例６０－糖尿病および非糖尿病における持続型複合体
持続型ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－６）製剤のインビボでの有用性を確認するために、本発明者らは、これを（５、１０および２０Ｕ／ｋｇ）、正常およびＳＴＺ－誘発糖尿病ラット（雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ、４００～５００ｇ、ｎ＝６）に投与した。製剤は、以下の手法を使用して調製した。

【表２９】

成分	変化し得るもの	容量(ml)
2.7mg/ml のTSAT-C6-AETM-2(I-6)溶液	無修飾インスリン=0%	1.000
250mMのHEPES緩衝生理食塩水	NaCl濃度=1.5M	0.111
酢酸亜鉛溶液	亜鉛濃度=4.6 mg/ml	0.124
クレゾール水溶液	3%v/v	0.159
25mMのHEPES緩衝生理食塩水中のpH7.2のプロタミン溶液	プロタミン濃度=12.5 mg/ml	4×0.194アリコート

【０５００】

複合体の生物活性を誘引するために、グルコースの外部腹腔内注射は使用しなかった。代わりに、本発明者らは、複合体製剤のＰＫおよびＰＤプロフィールをコントロールするために、ラットの体内のグルコースの内在性レベルを当てにした。血液サンプルを、尾血管出血によって、最初の複合体注射後、種々の時点で集めた。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。図４２に示すように、正常または糖尿病ラットに、早いまたは遅い時点で、低血糖症状は観察されなかった。糖尿病ラットで観察されたグルコースプロフィールは劇的であり、複合体は、より高いグルコース濃度によって活性化され、長い時間にわたり（最高用量で８時間にわたる）用量比例的にグルコース降下作用を発揮したことを示す。

【０５０１】

実験を、異なる用量（７、１４および２８Ｕ／ｋｇ）を用い、より長い時間（２４時間）で繰返した。該実験で得られた結果を図４３に示す。

【０５０２】

実施例６１－持続型製剤を生成するための脂肪酸エステルとの複合

例示的な複合体の持続型形態を作るために、プロタミン亜鉛インスリンへの代替の取組みを使用することができることは理解される。この実施例で、本発明者らは、Ｂ２９－ε－アミン基を長鎖脂肪酸で共有結合により修飾することによる、Ｂ１－置換インスリン複合体の持続型製剤への変換の方法を実証する。米国特許第６，８６９，９３０号に記載されているように、Ｃ１４－ミリスチン酸でのインスリンアシル化により、たとえば、平坦な、遅延性時間作用プロフィールを有する溶解性物質が得られる。Ｂ１－置換ＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２（Ｉ－２）は、実施例１２に記載された方法に従って合成する。次いで、物質を凍結乾燥し、乾燥粉末とし、以下の手順で出発物質として使用する。

【０５０３】

ミリスチン酸－ＮＨＳエステルを、６０ｍＭで、１ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、次いで４００ｕｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を加える。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。次いで別に、複合体Ｉ－２を、７．５ｍｌの無水ＤＭＳＯに、８．１ｍＭの濃度で溶解する。溶解したら、全溶液を１分かけてミリスチン酸－ＮＨＳエステル溶液に加え、次いで室温でさらに２時間混合し、反応の完了を確実にする。

【０５０４】

次いで、得られた溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのｐＨ５．０のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液で１０倍希釈し、希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ１８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相

ＨＰＬＣを使用してさらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用されるインスリン分子、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。その識別は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）によって確認する。次いで、得られた複合体の遅延性および糖応答性ＰＫ／ＰＤプロフィールを、実施例５０および５９で記載した４時間ＩＰグルコースまたはａ－ＭＭ条件を使用して評価してもよい。

【０５０５】

実施例６２－中性等電点を有するインスリンを持つ持続型複合体

複合体の持続型形態を作るために、プロタミン亜鉛インスリンへのさらに他の代替の取組みを使用することができることは理解される。この実施例では、本発明者らは複合体の調製において、たとえば、野生型ヒトインスリンの代わりに、インスリングラルギン（ＬＡＮＴＵＳ（登録商標））に置換することによる、持続型複合体の合成の方法を実証する。インスリングラルギン－複合体を形成するために、先の実施例に記載されているあらゆる合成方法を使用してよい。インスリングラルギンは、Ａｓｐ－Ａ２１がグリシンで置き換えられ、および２個のアルギニンがＢ鎖のＣ－末端に付加された例示的な持続型インスリン類縁体である。これらの変化の効果は、等電点をシフトさせることであり、ｐＨ４で完全に溶解する溶液を作り出すが、生理的ｐＨでは溶解されない。合成し、精製したら、次いで、得られた複合体の遅延性および糖応答性ＰＫ／ＰＤプロフィールを、実施例５０および５９に記載の４時間ＩＰグルコースまたはａ－ＭＭ条件を使用して、評価してもよい。

【０５０６】

実施例６３－ポンプ送達システムにおける溶解性複合体の用途

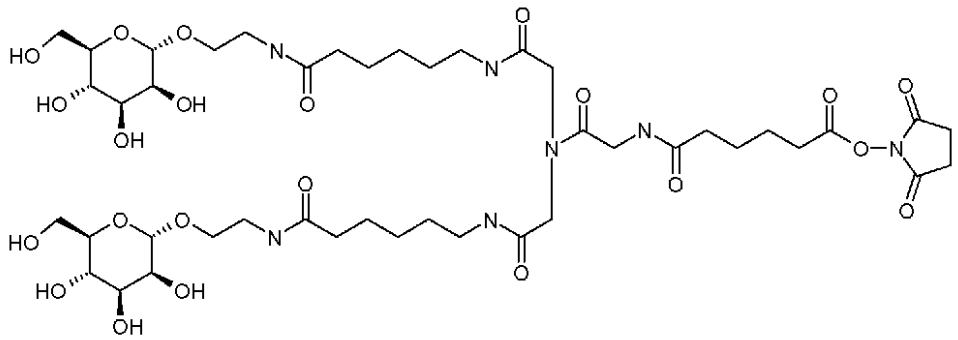
糖応答性複合体を持続型製剤に製剤化する代わりに、それぞれを、ポンプ送達システムを使用して、静脈、皮下、腹腔内に連続的に注入してもよい。公知の濃度（通常、２５～１００Ｕ／ｍｌ）の複合体の無菌溶液を、ポンプ貯蔵部に負荷し、一定の速度で、選ばれた分画に連続的に送達される。この速度は、対象に低血糖が観測されない最大レベルに調整される。次いで実施例５０および５９に記載される４時間ＩＰグルコースまたはａ－ＭＭ条件を使用して、グルコース応答性ＰＫ／ＰＤプロフィールを評価することができる。ポンプ方法は、複合体の一定の投与および吸収速度を得るのに、賦形剤を必要としない点で有利である。種々のインスリンポンプが、当分野において記載され、この目的のために使用されてもよい。たとえば、米国特許第４，４３５，１７３号、第４，４９８，８４３号、第４，９２３，３７５号、第５，０６２，８４１号、第６，６５０，９５１号、第６，７４４，３５０号、第６，８５２，１０４号、第７，３７７，９０７号および第７，５１５，０６０号、ならびに米国特許公開公報第２００８０１７２０２８号、第２００９０００５７２６号、第２００９０１１２１６５号、第２００９０１３７９５７号、第２００９０１７７１４２号、第２００９０１７７１５４号および第２０１０００００４５９８号に記載のポンプのいずれか１つを参照。これらはそれぞれ、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０５０７】

実施例６４－Ｃ６－アミド－ＡＥＭ－２中間体の合成

この実施例では、以下の化学構造式：

【化３７】



【０５０８】

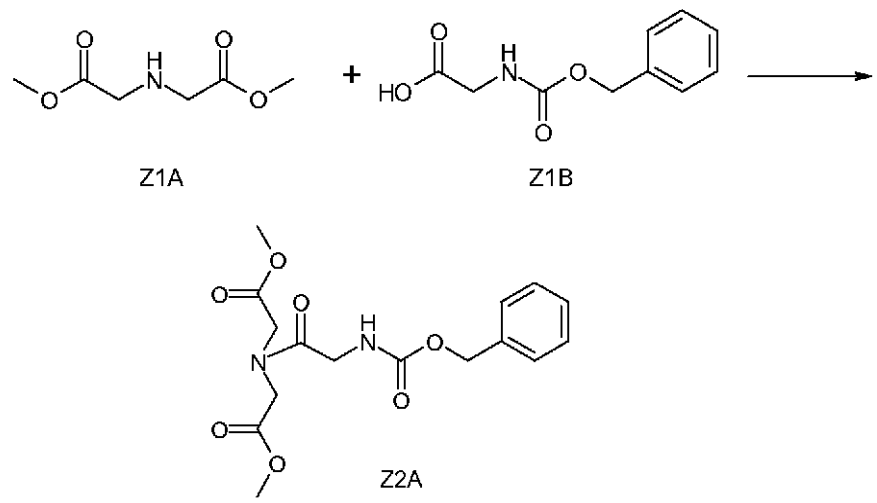
を有するＺＣ－ＡＥＭ－２中間体を製造する合成プロセスを記載する。

【０５０９】

ａ．中間体Ｚ２Ａ

該方法の第一段階は、以下の反応スキームで示すように、試薬Ｚ１ＡとＺ１Ｂとを合わせ、中間体Ｚ２Ａを製造することを含んだ。

【化３８】



【０５１０】

これは、以下のように達成した。２５０ｍＬの２ツ口フラスコに、化合物Ｚ１Ｂ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、１３．９ｇ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢＴ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、１１．０ｇ）およびジメチルホルムアミド（ＤＭＦ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を、室温で窒素下、加えた。混合物を０℃に冷却し、その後、化合物Ｚ１Ａ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、９．５ｍＬ）およびジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、９．８ｍｌ）を、窒素下、混合物に加えた。反応溶液を室温で一晩攪拌した。反応の３６時間後、（ジメチルアミノ）ピリジン（ＤＭＡＰ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、７．７１ｇ）を加え、４８時間後、反応混合物をブフナーロートでろ過した。ろ液を４℃で一晩保持し、次の日使用した。

【０５１１】

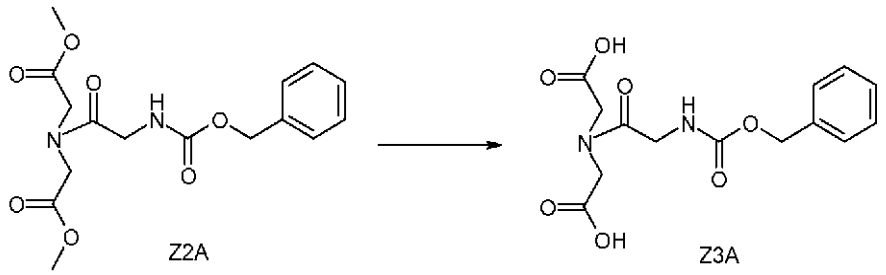
ろ液を蒸発させ、得られた残基を１２０ｍＬの酢酸エチルに取り、１０％ＨＣｌ水溶液（３×３０ｍＬ）、$NaHCO_3$飽和水溶液（３×３０ｍＬ）、ブライン（３×２０ｍＬ）で順番に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶液を真空で濃縮乾固し、生成物を得た。これは、さらに精製することなく使用することができた。

【０５１２】

ｂ．中間体Ｚ３Ａ

該方法の第二段階は、以下の反応スキームで示すように、中間体Ｚ２Ａを中間体Ｚ３Ａに変換することを含んだ。

【化３９】



【０５１３】

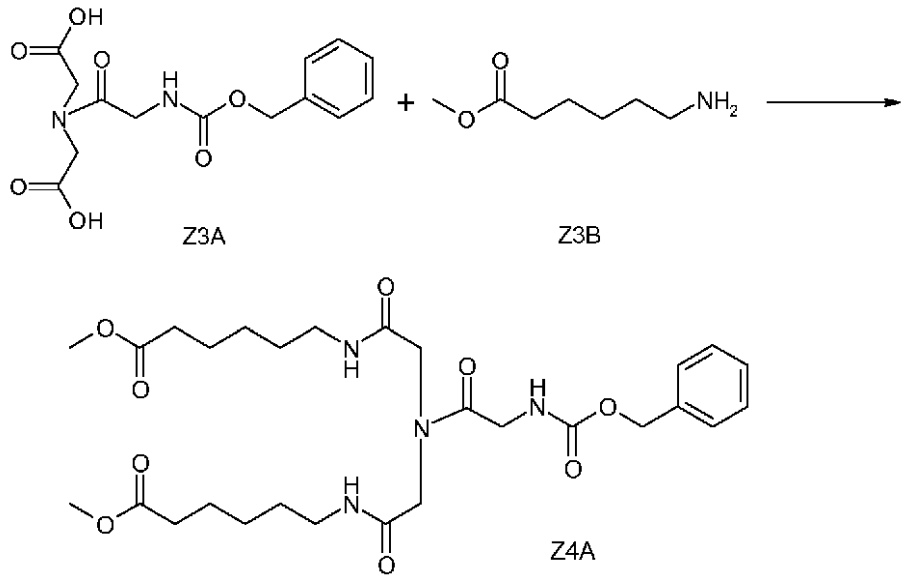
化合物Ｚ２Ａ（１６．０ｇ）をメタノール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、８５ｍＬ）に溶解し、溶液を０℃に冷却した。水酸化ナトリウムの１０％水溶液（１９ｍＬ）を、滴下し、反応物を０℃で３時間攪拌した。その後、懸濁液を、最小量の水（１５ｍＬ）に溶解した。この溶液に、０℃で、アンバーライトＩＲ－１２０（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、Ｈ＋形態）を、１５×２ｇのアリコートで加えた。ビーズ懸濁液を０．５時間攪拌すると、ｐＨ約５の溶液となった。得られた混合物をろ過し、アンバーライトビーズを除去し、ろ液を濃縮し、真空乾燥し、白色－赤色固体を得た。１３．０ｇの収量。

【０５１４】

ｃ．中間体Ｚ４Ａ

該方法の第三段階は、以下の反応スキームで示すように、中間体Ｚ３Ａを試薬Ｚ３Ｂと合わせ、中間体Ｚ４Ａを製造することを含んだ。

【化４０】



【０５１５】

化合物Ｚ３Ｂ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、１９．０ｇ）をＤＭＦ（５０ｍＬ）に溶解した。懸濁液を０℃に冷却し、その後、トリエチルアミン（１５．０ｍＬ）を溶液に加えた。溶液の温度を０℃で０．７５時間維持した。次に、溶液に、０℃で、ＤＭＦ（２４ｍＬ）に溶解させた化合物Ｚ３Ａ（１３．０ｇ）の溶液、次いで、ＨＯＢＴ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、１５．９ｇ）、ＤＭＦ（５０ｍＬ）およびＤＩＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、１５．０ｍＬ）を充填した。得られた溶液を０℃でさらに１時間攪拌し、次いで室温

に暖め、一晩さらに１８時間反応させた。

【０５１６】

次に、反応物を０℃に再び冷却し、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、１５ｍＬ）を加え、得られた溶液を、溶液のｐＨが約９．０になるまで、０．５時間攪拌した。無水メチレンクロリド（２５ｍＬ）およびＤＩＣ（３．５ｍＬ）を加え、攪拌をさらに１０時間続けた。さらに化合物Ｚ３Ｂを加え（遊離塩基、２．５ｇ）、窒素雰囲気下、室温でさらに５０時間、反応を進行させた。

【０５１７】

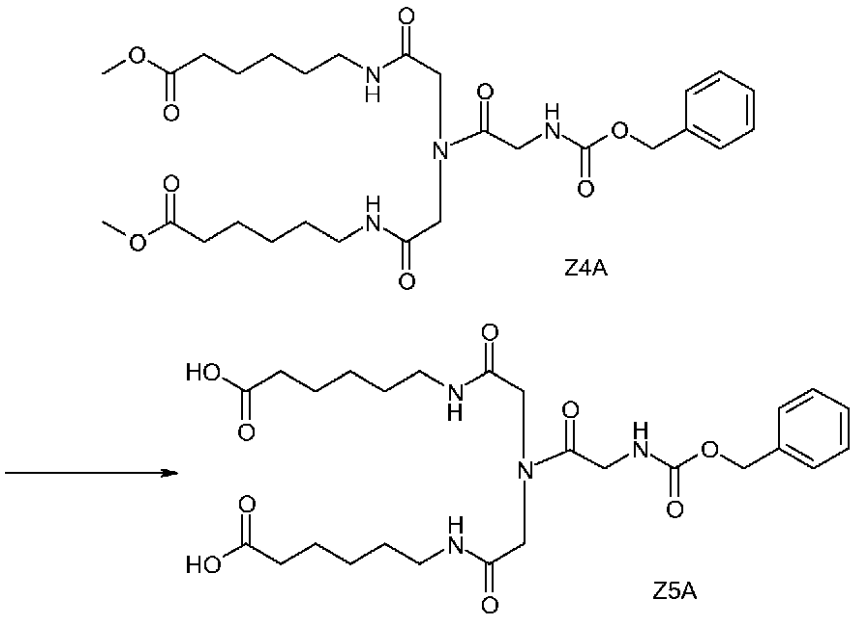
最後に、反応混合物をろ過し、ろ液を回転蒸発によって濃縮した。残基をメチレンクロリド（CH_2Cl_2、４００ｍＬ）に溶解し、有機相を５％ＨＣｌ溶液（３×２００ｍＬ）で洗浄した。有機層を０℃に冷却し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液（３×１００ｍＬ）およびブライン（２×２００ｍＬ）で中性とした。有機溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、次いでこれをろ過によって分離し、回転蒸発を使用して濃縮した。残基を、シリカゲル（溶出段階：メチレンクロリド／メタノール５０：１から５：１へ）のカラムクロマトグラフィーによって精製した。カラム画分を濃縮し、一晩真空乾燥した。Ｚ４Ａ（１８．９ｇ、収率：８１％）として白色固体を得た。

【０５１８】

ｄ．中間体Ｚ５Ａ

該方法の第四段階は、以下の反応スキームで示すように、中間体Ｚ４Ａの中間体Ｚ５Ａへの変換を含んでいた。

【化４１】



【０５１９】

エステルＺ４Ａ（２．２７ｇ）をメタノール（１０ｍＬ）に溶解し、この溶液に室温で５．０ｍＬの１．０Ｍ水酸化ナトリウム溶液を加えた。混合物を室温で３８時間攪拌した。この時間の最後に、追加の１．５ｍＬの２．０Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加え、混合物を室温でさらに１４時間攪拌した。

【０５２０】

次に、反応混合物を、０℃で、ＨＣｌの１０％水溶液を使用して酸性とした。生成物を酢酸エチル（３×２５ｍＬ）で抽出した。合わせた有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、次いで真空で一晩濃縮乾固し、Ｚ５Ａを白色固体（２．２ｇ）として得た。

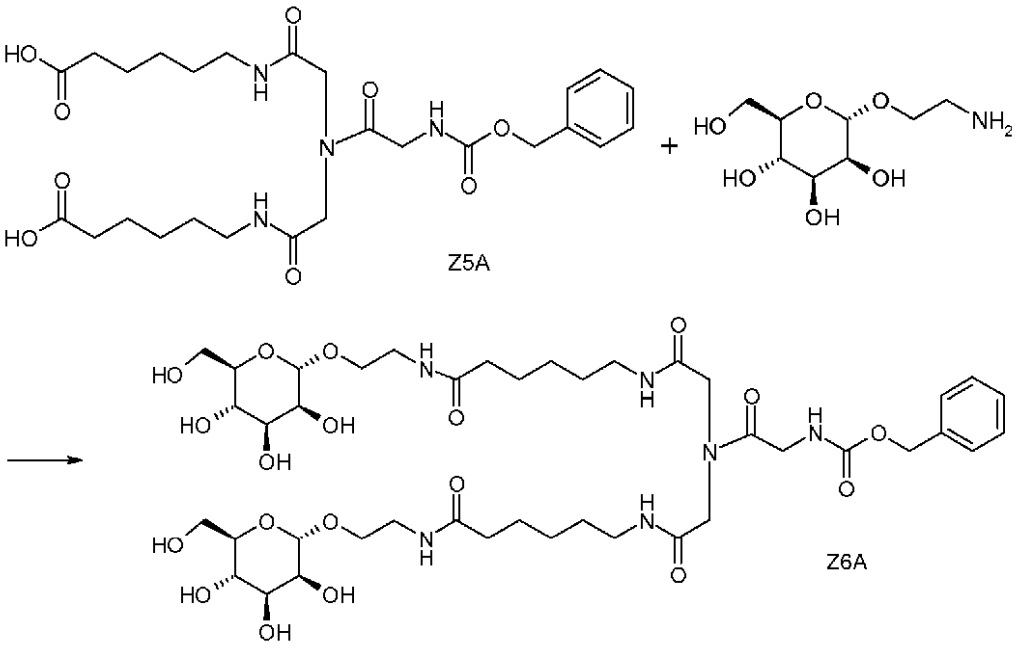
【０５２１】

ｅ．中間体Ｚ６Ａ

該方法の第五段階は、以下の反応スキームで示すように、中間体Ｚ５Ａをアミノエチル

マンノース（ＡＥＭ）と合わせて、中間体Ｚ６Ａを製造することを含んだ。

【化４２】



【０５２２】

二酸化合物Ｚ５Ａ（２．０ｇ）、アミノエチルマンノース（１．４６ｇ）、Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＡＴＵ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、２．７ｇ）を、窒素下、０℃で、乾燥ＤＭＦ（８０ｍＬ）に溶解した。ＤＩＰＥＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、３．０ｍＬ）を、窒素雰囲気下、０℃で、混合物に滴下した。混合物を、０℃で１時間攪拌し、次いでさらに室温で４時間攪拌した。この時点で、アミノエチルマンノース（０．５ｇ）およびＨＡＴＵ（０．５２ｇ）の別のアリコートを室温で反応溶液に加え、溶液をさらに３時間攪拌した。混合物を回転蒸発によって濃縮し、残基を、シリカゲル（メチレンクロリド／メタノール２０：１、次いで６：１から１：１に溶出）のカラムクロマトグラフィーによって精製した。画分を集め、真空蒸発させ、精製された生成物（ＴＬＣ：上部スポット、Ｒｆ０．６、メチレンクロリド：メタノール１：３）を得た。

【０５２３】

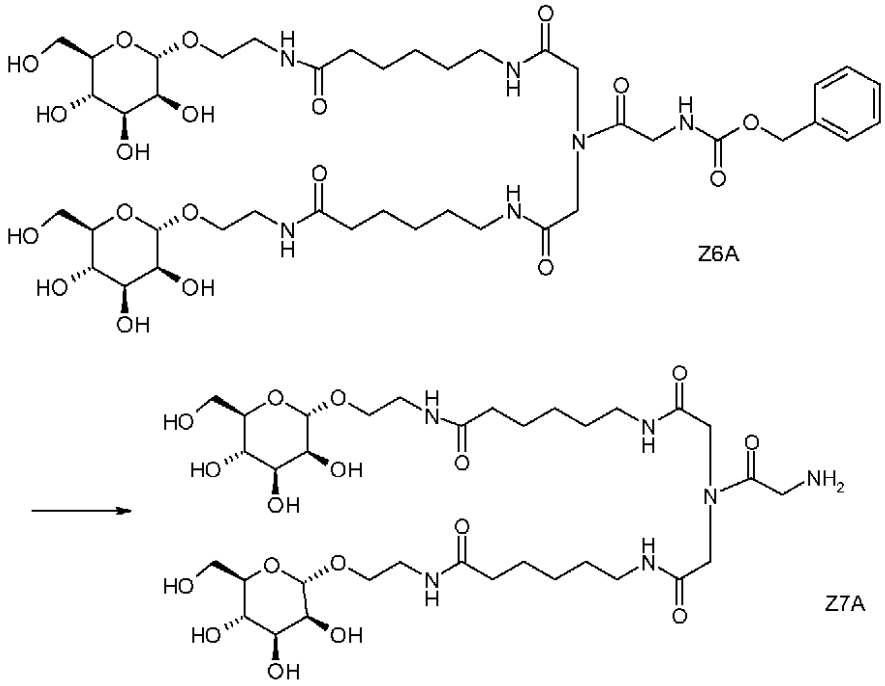
中間体Ｚ５Ａを中間体Ｚ６Ａに変換するとき、ＡＥＭを他のアミン含有試薬（たとえば、ＡＥＧ、ＡＥＢＭ、ＡＥＴＭなどが挙げられるが、これらに限定されない）に置き換えること以外、この全方法を繰返して、異なるリガンドを有する複合体を得ることができることは理解される。

【０５２４】

ｆ．中間体Ｚ７Ａ

該方法の第六段階は、以下の反応スキームで示すように、中間体Ｚ６Ａの中間体Ｚ７Ａへの変換を含んでいた。

【化４３】



【０５２５】

化合物Ｚ６Ａ（１．４３ｇ）を無水メタノール（１００ｍＬ）に溶解した。この溶液に（炭素上の１．００ｇパラジウム（Ｐｄ／Ｃ））を加え、水素ガスを溶液に泡入させ、保護基を還元し、対応するアミンを得た。反応の約９時間後に反応は完全に変換されたことがわかった。

【０５２６】

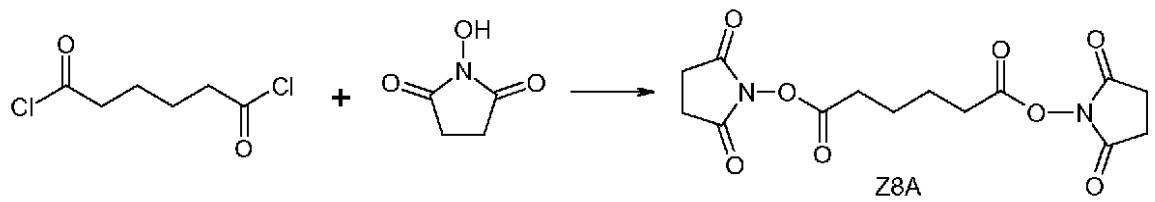
反応混合物をセライトのパッドを通してろ過し、ろ液を濃縮し、真空乾燥した。化合物Ｚ７Ａを褐色固体（１．１６ｇ、収率：９４％）として得た。

【０５２７】

ｇ．中間体Ｚ８Ａ

以下のスキームは、カップリング剤Ｚ８Ａの調製の方法を示す。

【化４４】



【０５２８】

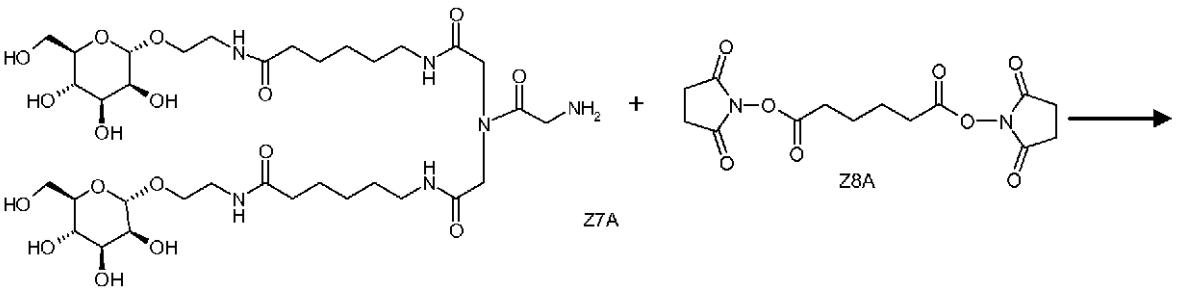
冷却したＮ－ヒドロキシスクシンイミド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、ＮＨＳ、７．０ｇ）の乾燥CH_2Cl_2（６５ｍＬ）溶液に、０℃で、トリエチルアミン（９．５ｍＬ）および塩化アジポイル（３．９７ｍＬ、５．０ｇ）を加えた。得られた混合物を０℃で２時間攪拌した。混合物をＮａＣｌ（３×３０ｍＬ）の飽和水溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶液をろ過し、真空濃縮し、次いで残基をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、生成物Ｚ８Ａとして白色固体（６．６ｇ）を得た。

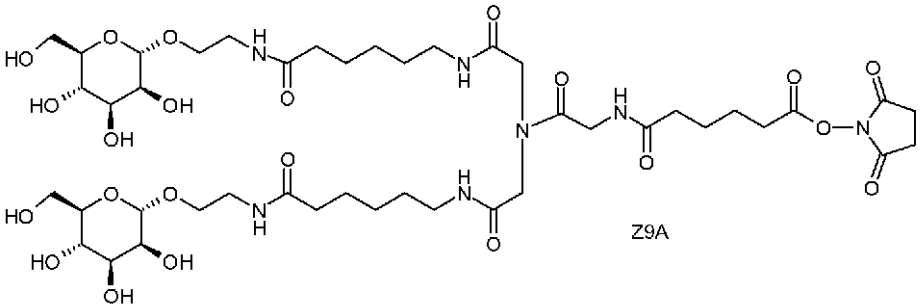
【０５２９】

ｈ．中間体Ｚ９Ａ

以下のスキームは、カップリング剤Ｚ８Ａを中間体Ｚ７Ａと合わせ、中間体Ｚ９Ａを製造する方法を示す。

【化４５】





【０５３０】

化合物Ｚ７Ａ（０．２５６ｇ）を乾燥ＤＭＦに溶解し、溶液を０℃に冷却した。この溶液に、窒素雰囲気下、Ｚ８Ａ（０．７１０ｇ）の無水ＤＭＦ（１５ｍＬ）溶液を加えた。混合物を０℃で２時間攪拌した。

【０５３１】

溶液の体積を１／３に濃縮し、過剰の未反応ＤＳＳをろ別した。ろ液をさらに約３ｍＬのカラムに濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィー（溶出液：メチレンクロリド／メタノール２０：１から４：１へ、次いで３：１から１：１へ）によって精製した。集めた画分を濃縮し、真空乾燥し、１５１ｍｇの精製した生成物を得た。^{1}ＨＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ）δ１．２８－１．６３（ｂａｎｄ，２０Ｈ）、２．０７－２．２２（ｂａｎｄ，６Ｈ）、２．８５（ｓ，４Ｈ）、３．０８－３．６４（ｂａｎｄ，２２Ｈ）、３．９１（ｓ，４Ｈ）、４．０８（ｓ，２Ｈ）、４．４９（ｓ，２Ｈ）、４．５７（ｄ，２Ｈ，Ｊ＝５．７０Ｈｚ）、４．６４（ｓ，２Ｈ）、４．７３（ｔ，４Ｈ，Ｊ＝５．１０Ｈｚ）、７．８５（ｓ，２Ｈ，アミドＮＨ）、８．６８、８．１９、７．９８（ｓ，３Ｈ，ａｍｉｄｅＮＨ）。ＬＣ－ＭＳ（測定値：１０７４．６７［$M^{+}Na^{+}$］，Ｍ＝１０５１．５７Ｄａ；計算値：１０５２．０８Ｄａ）。

【０５３２】

実施例６５－Ｃ６－アミド－ＡＥＭ－２（Ｂ１）複合体の合成

この実施例は、実施例６４の中間体Ｚ９ＡからＢ１－複合体化インスリンを調製する方法を記載する。以下のように、化合物Ｚ９Ａをインスリンに複合体化した。実施例８に従って合成されたNH_2－Ｂ１－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ２９）－インスリン（０．１６７ｇ）を、窒素下室温で、乾燥ＤＭＳＯ（３ｍＬ）に溶解し、室温で０．５時間攪拌した。この溶液に、窒素下室温で、無水トリエチルアミン（０．０１３ｍＬ）を加えた。乾燥ＤＭＳＯ（１．５ｍＬ）中の化合物Ｚ９Ａ（０．１７７ｇ）を、室温、８０ｒｐｍの攪拌速度で、（４．２ｕＬ／分）の速度のシリンジポンプを介して、インスリン－トリエチルアミン混合物に加えた。反応変換を分析ＨＰＬＣによってモニターした。４時間後、別の３当量のＴＥＡ（０．０１０ｍＬ）を反応混合物に加えた。室温で合計１０．５時間後、反応を停止させ、－２０℃の冷凍庫に一晩置いた。

【０５３３】

次の日、反応混合物を解凍し、イオン交換ビーズ小型充填カラム（ＳＰ　Ｓｅｐｈａｄｅｘ　ｂｅａｄｓ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、無勾配条件

）に置いた。カラムを１０００×ｇで４分簡単に遠心分離し、インスリン複合体を精製した（分析ＨＰＬＣにより評価）。イオン交換カラム（６ｍＬ）から集めた画分を、１４０ｒｐｍで１０分間攪拌しながら、乾燥アセトン（３０ｍＬ）に滴下した。得られた懸濁液を５０ｍＬの遠心管に注ぎ入れ、それを３５００×ｇで１０分間回転させた。透明な上澄みを管から取出し、ケーキを残しておいた。上澄みを別の３０ｍＬのアセトンに加え、析出物の第二生成物を得（５ＮのＨＣｌを数滴加えた後）、次いでこれを３５００×ｇで１０分間遠心分離し、第二遠心分離ケーキを得た。

【０５３４】

合わせたケーキを１時間真空乾燥し、白色固体（１９７ｍｇ、収率：９２％）を分析ＨＰＬＣによる純度が＞９８％で得た。インスリン複合体ＢＯＣ基を実施例１２で記載した手順によって除去し、生物学的に活性なインスリン複合体を得た。

【０５３５】

この実施例で記載した方法は、高い収率、高い純度のインスリン複合体を、逆相ＨＰＬＣを必要とすることなく製造するという利点がある。

【０５３６】

実施例６６－Ｉ－１７：Ｃ６－アミド－ＡＥＭ－２（Ｂ２９）複合体の合成

この実施例は、実施例６４の中間体Ｚ９ＡからＢ２９－複合体化インスリンを調製する方法を記載する。以下のように、化合物Ｚ９Ａをインスリンに複合体化する。実施例１６（０．１６７ｇ）に従って合成されたNH_2－Ｂ２９－ＢＯＣ２（Ａ１，Ｂ１）－インスリンを、窒素下室温で、乾燥ＤＭＳＯ（３ｍＬ）に溶解し、室温で０．５時間攪拌する。この溶液に、窒素下室温で、無水トリエチルアミン（０．０１３ｍＬ）を加える。乾燥ＤＭＳＯ（１．５ｍＬ）中の化合物Ｚ９Ａ（０．１７７ｇ）を、室温、８０ｒｐｍの攪拌速度で、（４．２ｕＬ／分）の速度のシリンジポンプを介して、インスリン－トリエチルアミン混合物に加える。反応変換を分析ＨＰＬＣによってモニターした。４時間後、別の３当量のＴＥＡ（０．０１０ｍＬ）を反応混合物に加えた。室温で合計１０．５時間後、反応を停止させ、－２０℃の冷凍庫に一晩置く。

【０５３７】

次の日、反応混合物を解凍し、イオン交換ビーズ小型充填カラム（ＳＰ　Ｓｅｐｈａｄｅｘ　ｂｅａｄｓ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、無勾配条件）に置く。カラムを１０００×ｇで４分簡単に遠心分離し、インスリン複合体を精製する（分析ＨＰＬＣにより評価）。イオン交換カラム（６ｍＬ）から集めた画分を、１４０ｒｐｍで１０分間攪拌しながら、乾燥アセトン（３０ｍＬ）に滴下する。得られた懸濁液を５０ｍＬの遠心管に注ぎ入れ、それを３５００×ｇで１０分間回転させる。透明な上澄みを管から取出し、ケーキを残しておく。上澄みを別の３０ｍＬのアセトンに加え、析出物の第二生成物を得（５ＮのＨＣｌを数滴加えた後）、次いでこれを３５００×ｇで１０分間遠心分離し、第二遠心分離ケーキを得た。

【０５３８】

合わせたケーキを１時間真空乾燥し、白色固体を得る。インスリン複合体ＢＯＣ基を実施例１２で記載した手順によって除去し、生物学的に活性なインスリン複合体を得る。

【０５３９】

実施例６７－Ｉ－１７：Ｃ６－アミド－ＡＥＭ－２（Ｂ２９）複合体の代替合成

この実施例では、実施例６４の中間体Ｚ９ＡからＢ２９－複合体化インスリンを調製する他の方法を記載する。具体的には、この代替方法は、化合物Ｚ９Ａを、Ｂ２９ε－アミノ基で保護されていないインスリンに直接カップリングすることを含む。化合物Ｚ９Ａを５３ｍＭで１．０ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、次いで０．４ｍｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加した。溶液を室温で５分間素早く攪拌する。次いで別途、組換えヒトインスリン（ＲＨＩ）粉末を、１７．２ｍＭで、０．１ＭのｐＨ１１炭酸ナトリウム緩衝液１ｍｌに溶解し、続いてｐＨを、１．０Ｎ水酸化ナトリウムで、１０．８に調整した。溶解したら、化合物Ｚ９Ａの全溶液を、１０分かけてインスリン／炭酸塩緩衝溶液に滴下した。滴下添加終了後、該溶液をさらに１５分攪拌し、反応の完了を確実にした。

【０５４０】
次いで、得られた溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有する２０ｍＭのｐＨ５．０のＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液に１０倍希釈し、次いで希ＨＣｌでｐＨを最終ｐＨ８．０に調整した。複合体化物質および複合体化されていない物質の目的の分離のために、水溶液を、先ず、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）を使用して、サイズ排除によって精製した。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、３ｋＤａの限外ろ過膜を使用して、約１５ｍｌに濃縮した。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ１８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相ＨＰＬＣを使用して、さらに精製し、目的生成物を得た。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルであった。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化した。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用した。所望の画分を収集した時点で、溶液を、ロートバップし、アセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得た。その識別は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）によって確認した。最終生成物（ＨＰＬＣによる純度９５％）は、６７４４ｇ／ｍｏｌ（ＬＣ－ＭＳ）の所望のＭＷを有し、１インスリン当たり計２．０個のＡＥＭ分子の複合体化が示され、Ｌｙｓ－Ｂ２９部位で複合体化する複合体分子が８５％を超える（Ｎ末端シークエンス解析によって測定）ことがわかった。

【０５４１】
実施例６８－持続型Ｉ－１７複合体
この実施例で、本発明者らは、実施例６４の化合物Ｚ９Ａから構成した複合体の持続型製剤の時間作用およびグルコース応答性ＰＫプロフィールの測定を試みる。この実施例用の複合体は、実施例６７に記載した方法に従って合成した。以下の持続型製剤を、この複合体のために使用した。

【表３０】

Component	Variable	Volume (ml)
I-17 conjugate solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 16.7%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration = 4.6 mg/ml	0.124
Cresol solution in water	3% v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration = 12.5 mg/ml	4 x 0.194 aliquots

【０５４２】
４時間グルコース腹腔内注射（４ｇ／ｋｇ）実験を、１５Ｕ／ｋｇ（体重（単位：ｇ）／１．８７＝マイクロリットル、注入量）の先に記載した製剤のそれぞれを投与することにより行った。図４４で示すように、該複合体が、４時間グルコース注射後、測定血清インスリン濃度の著しい増加を伴った、遅延性の吸収プロフィールを示した。

【０５４３】
実施例６９－２－アミノエチルα－Ｌ－フコピラノシドおよび２－アミノエチルＮ－アセチル－β－Ｄ－グルコサミンから調製された複合体および評価

実施例４２のデータは、例示的な複合体のＰＫプロフィールの増加に導く推定レクチン経路を抑制するＬ－フコースの能力を実証する。また、β－架橋Ｎ－アセチルグルコサミンも、マンノースおよびフコースが抑制剤である経路を抑制し得ることも知られている（たとえば、Ｈａｕｒｕｍら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２９３：８７３－８７８、１９９３）。この実施例では、先に記載したもののようなインスリン複合体を、２－アミノエチルα－Ｌ－フコピラノシドまたは２－アミノエチルＮ－アセチル－β－Ｄ－グルコサミンリガンドを使用して合成する方法を記載する。２－アミノエチルα－Ｌ－フコピラノシド（ＭＷ＝２０７ｇ／ｍｏｌ）は、Ｎｉら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１４：２３２－２３８，２００３の方法に従って調製する。２－アミノエチルＮ－アセチル－β－Ｄ－グルコサミン（ＭＷ＝２６４ｇ／ｍｏｌ）は、Ｃａｉら、Ｏｒｇａｎｉｃ Ｌｅｔｔｅｒｓ７：４０２１－４０２４，２００５の方法に従って合成する。これらのリガンドのいずれか１つは、上記実施例１１～１３、１５、１７～２７および２９～３１の複合体合成方法のいずれかで、容易に、アミノ－官能化糖リガンドの代わりとすることができる。

【０５４４】

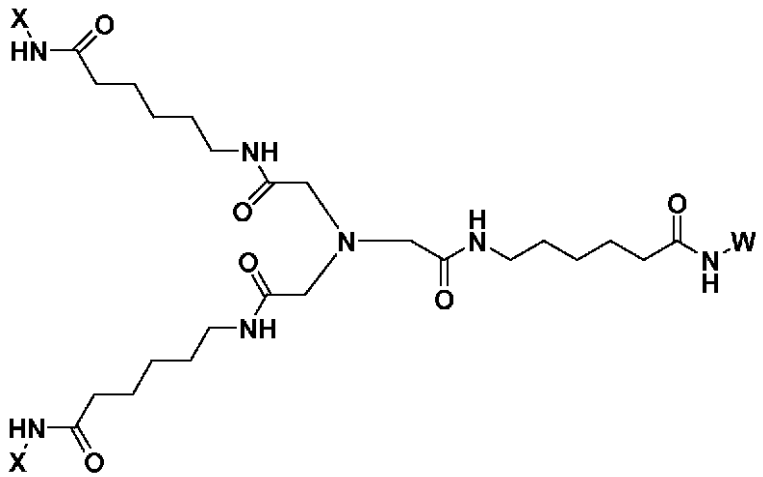
得られた複合体のＰＫを、ラットに皮下注射した後の、ＰＫ／ＰＤプロフィールのａ－ＭＭ、Ｌ－フコースまたはグルコース誘発増加に関し、実施例４２に記載の方法に従ってインビボ試験する。また、複合体を、実施例５０～５５の方法に従って徐放性製剤として製剤化することができ、続いてそれらの遅延性およびグルコース応答性薬物動態を、同じ実施例に略述されている４時間ＩＰグルコース注射プロトコルに従って評価することもできる。また、実施例６１～６３に記載の方法のような、これらの複合体放出を持続させる代替の方法を使用してもよい。

【０５４５】

実施例７０－式（ＶＩｂ－３）の例示的な複合体

ある実施形態で、本開示は、式（ＶＩｂ－３）の複合体を提供する。

【化４６】



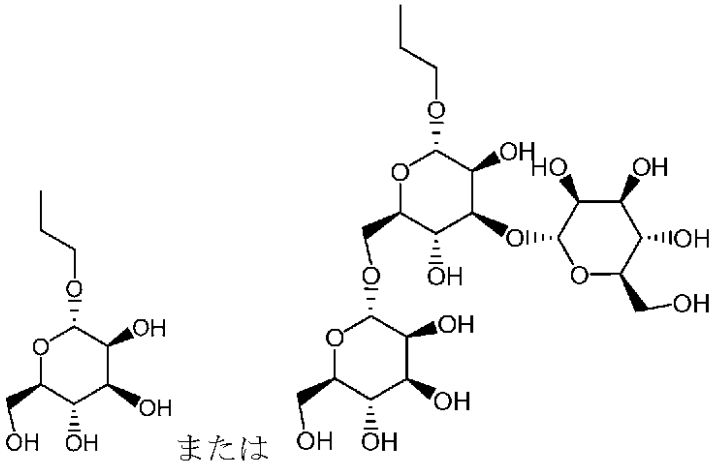
【０５４６】

（式中、

Ｗはインスリン分子であり；および

－Ｘは、それぞれ、

【化４７】



【０５４７】

である。）

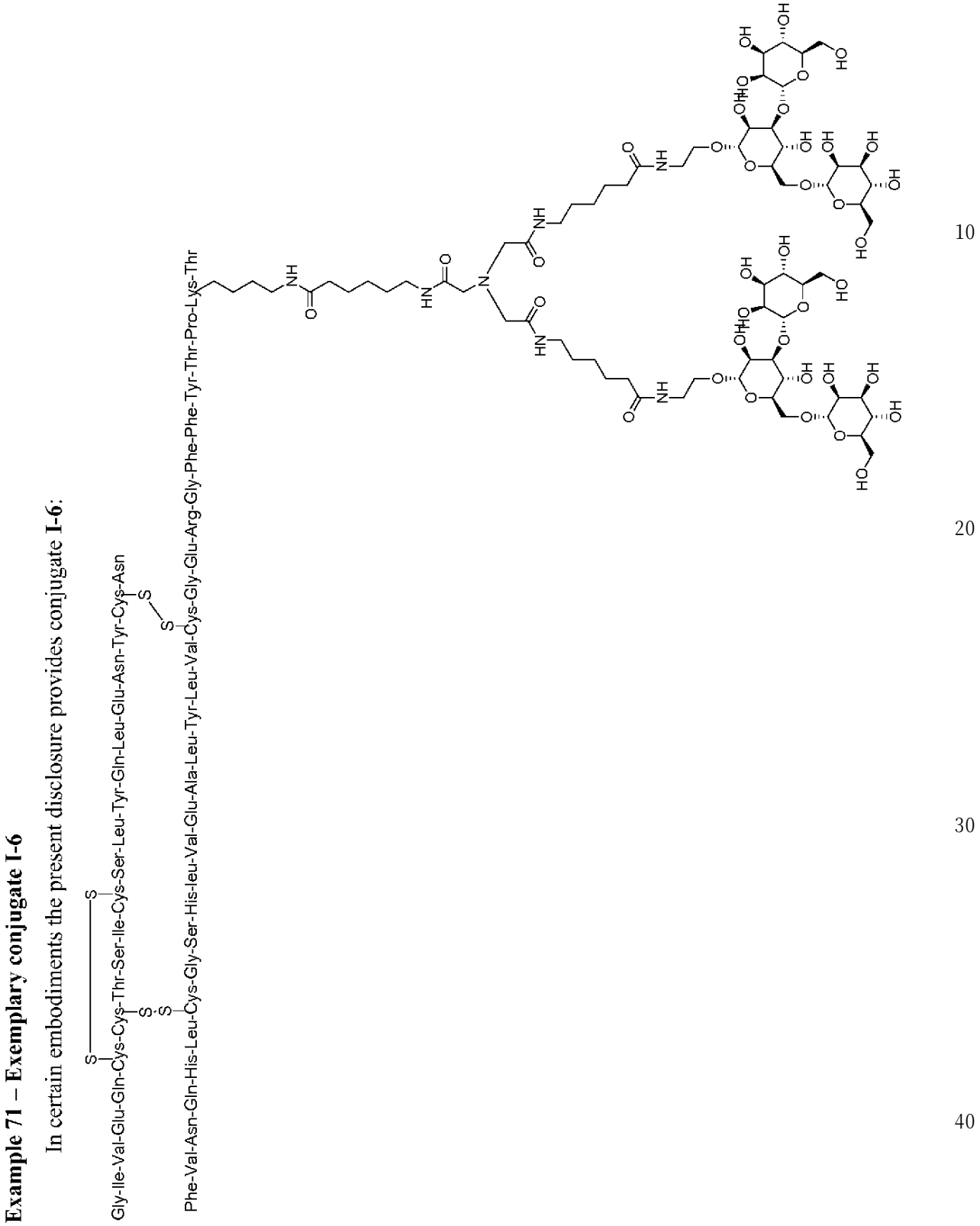
ある実施形態では、インスリン分子は、ヒトインスリン、ブタインスリンおよびウシインスリンからなる群から選択される。ある実施形態では、インスリン分子は、インスリングラルギンまたはインスリンデテミルである。ある実施形態では、インスリン分子は、３個のジスルフィド架橋を含む。

【０５４８】

実施例７１－例示的な複合体Ｉ－６

ある実施形態では、本開示は複合体Ｉ－６を提供する。

【化４８】

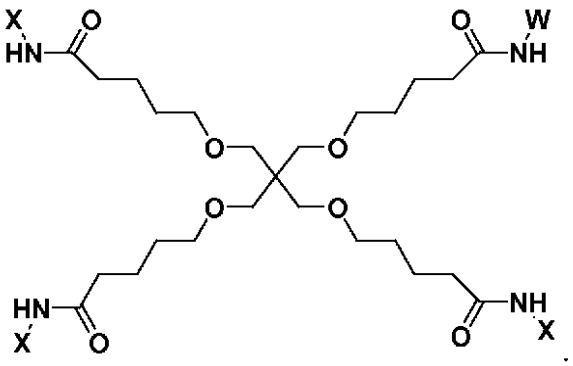


【０５４９】

実施例７２－例示的な式（ＶＩｃ－２）の複合体

ある実施形態で、本開示は、式（ＶＩｃ－２）の複合体を提供する。

【化４９】



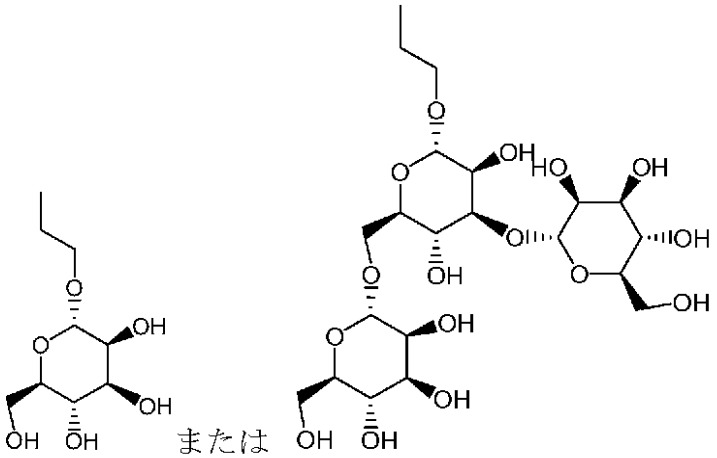
【０５５０】

（式中、

Ｗは、インスリン分子であり；および

－Ｘは、それぞれ、

【化５０】



【０５５１】

である。）

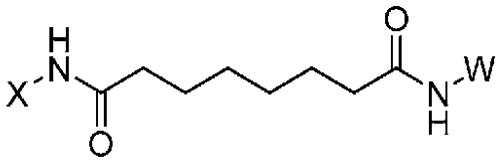
ある実施形態では、インスリン分子は、ヒトインスリン、ブタインスリンおよびウシインスリンからなる群から選択される。ある実施形態では、インスリン分子は、インスリングラルギンまたはインスリンデテミルである。ある実施形態では、インスリン分子は、３個のジスルフィド架橋を含む。

【０５５２】

実施例７３－例示的な式（ＶＩｄ－Ｉ）の複合体

ある実施形態で、本開示は、式（ＶＩｄ－Ｉ）の複合体を提供する。

【化５１】



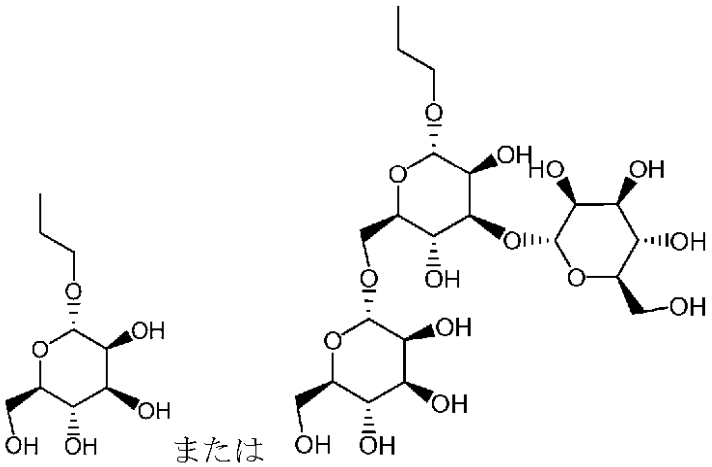
【０５５３】

（式中、

Ｗは、インスリン分子であり；および

－Ｘは、

【化５２】



【０５５４】
である。
【０５５５】
ある実施形態では、インスリン分子は、ヒトインスリン、ブタインスリンおよびウシインスリンからなる群から選択される。ある実施形態では、インスリン分子は、インスリングラルギンまたはインスリンデテミルである。ある実施形態では、インスリン分子は、３個のジスルフィド架橋を含む。.
実施例７４－例示的な製剤
ある実施形態で、本開示は、複合体を含む徐放性製剤であって、プロタミンおよび亜鉛を含む製剤を提供する。本開示は、本明細書で記載する複合体（たとえば、図４５、４９、５５、６０、６１または６２の複合体のいずれか１つが挙げられるが、これらに限定されない）のいずれか１つを有する徐放性製剤を包含することは、理解される。
【０５５６】
ある実施形態では、製剤は、約１～約５ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体と、約０．１～約０．２５ｍｇの亜鉛／ｍｇ複合体とを含む。
【０５５７】
ある実施形態では、製剤は、プロタミンと亜鉛とを、約４０：１～約１０：１の範囲の比（ｗ／ｗ）で含む。
【０５５８】
ある実施形態では、製剤は、さらに、ある量の複合体化されていないインスリン分子を含む。ある実施形態では、製剤は、約２５：１～約２：１の範囲の複合体化インスリン分子の複合体化されていないインスリン分子に対するモル比を含む。
【０５５９】
ある実施形態では、製剤は、さらに抗菌性防腐剤を含む。ある実施形態では、抗菌性防腐剤は、ｍ－クレゾールである。ある実施形態では、製剤は、約０．１５～約０．３５％ｖ／ｖのｍ－クレゾールを含む。
【０５６０】
ある実施形態では、製剤は、さらに、等張剤を含む。ある実施形態では、等張剤はグリセロールである。ある実施形態では、等張剤はＮａＣｌである。ある実施形態では、製剤は、約０．１～約０．２MのＮａＣｌを含む。
【０５６１】
ある実施形態では、製剤は、プロタミンと亜鉛とを、約４０：１～約１０：１の範囲の比（ｗ／ｗ）で含む。
【０５６２】
複合体化インスリン分子の複合体化されていないインスリン分子に対するモル比を約２５：１～約２：１の範囲で；

約０．１５～約０．３５％ｖ／ｖのｍ－クレゾールと；
グリセロールまたは約０．１～約０．２ＭのＮａＣｌとを含む。
【０５６３】
ある実施形態では、製剤は、
約３．６ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体と；
約０．２ｍｇの亜鉛／ｍｇ複合体とを含む。
【０５６４】
ある実施形態では、製剤は、
約３．６ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体と；
約０．２ｍｇの亜鉛／ｍｇ複合体と；
複合体化インスリン分子の複合体化されていないインスリン分子に対するモル比を約５：１で含む。
【０５６５】
ある実施形態では、製剤は、
約３．６ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体と；
約０．２ｍｇの亜鉛／ｍｇ複合体と；
複合体化インスリン分子の複合体化されていないインスリン分子に対するモル比を約５：１で；および
約０．２％ｖ／ｖのｍ－クレゾールとを含む。
【０５６６】
ある実施形態では、製剤は、
約３．６ｍｇのプロタミン／ｍｇ複合体と；
約０．２ｍｇの亜鉛／ｍｇ複合体と；
複合体化インスリン分子の複合体化されていないインスリン分子に対するモル比を約５：１で；および
約０．２％ｖ／ｖのｍ－クレゾールと；
グリセロールまたは約０．１５ＭのＮａＣｌとを含む。
【０５６７】
実施例７５－有機溶剤中での多価活性化エステルによるインスリン複合（最初に薬物を付加）により、Ａ１－置換インスリン複合体を得る－一般的手順
ステップ１
インスリンを、１４．７ｍＭの濃度で、１００ｍＭ炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ１１）およびアセトニトリルの６６：３７の体積：体積混合物に溶解する。別に、単官能性保護基－活性化エステル（たとえば、ＢＯＣ－ＮＨＳ）を４６７ｍＭで、アセトニトリルに溶解する。インスリンが溶解したら、単官能性保護基－活性化エステル（たとえば、ＢＯＣ－ＮＨＳ）の小量のアリコートを、インスリン溶液に加える。ｐＨをプロセス全体にわたってモニターし、０．１Ｍの水酸化ナトリウムを加えることによって、１０．２～１１．０の間に維持する。反応を逆相ＨＰＬＣによりモニターする。ＨＰＬＣクロマトグラムが、無修飾インスリンの全てが反応し、反応混合物の相当部分がＢ２９－保護インスリンに変換されたことを示すまで、単官能性保護基－活性化エステルのアリコートを加える。通常、保護基は実際より疎水性であり、インスリンに反応すると、無修飾インスリンより長いＨＰＬＣ保持時間で溶出する。
【０５６８】
ステップ２
別々に、Ｎ末端活性化エステルを含有する骨格を、１７４ｍＭで、１．２６７ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、１００ｕｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。他のバイアルで、リガンドの３７０ｍＭ溶液を、適切な容量の乾燥ＤＭＳＯ中で調製する。溶解したら、最初の活性化エステル基の数Ｎ－１の３倍に等しい数の反応性等価物を与えるのに十分な量の溶液を加える。たとえば、１つの骨格当たりＮ＝３の初期活性化エステル基があれば、（３×（３－１）×６０ｍＭ／３７

０ｍＭ）＝０．９７３ｍｌのリガンド溶液を加える。１つの骨格当たりＮ＝４の初期活性化エステル基があれば、（３×（４－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝１．４６ｍｌのリガンド溶液を加える、など。リガンド溶液を加えた後、該溶液を室温で１時間攪拌し、反応の完了を確実にする。

【０５６９】

ステップ３

ステップ１で記載したように、インスリンが保護基と十分反応し、およびステップ２で、骨格とリガンドとの間で十分反応が起こった後、ステップ２の骨格－リガンド溶液を、インスリン溶液に、一定量に分割して、滴下する。得られた反応物をＨＰＬＣでモニターする。アリコートをＢ２９－保護インスリンが十分反応するまで加え、目的のＢ２９－保護、Ａ１－骨格／リガンド、インスリン複合体を得る。リガンド－骨格は、しばしば、インスリンより親水性なので、目的生成物の出現時間は、Ｂ２９－インスリン（ステップ１から）と比べてより短いＨＰＬＣ保持時間の明らかなシフトによって合図される。目的レベルの反応を達成したら、反応溶液を０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するｐＨ５．０ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液２０ｍＭで１０倍まで希釈し、ｐＨを希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ１８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相ＨＰＬＣを使用して、さらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用されるインスリン、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、該溶液をロートバップしアセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な単一保護インスリン複合体を得る。

【０５７０】

ステップ４

次いで、全ての場合において、保護基をインスリン複合体から除去する。ステップ１でＢＯＣ保護基を使用する場合、ＢＯＣ基は、ステップ３に従って得た凍結乾燥した粉末を、４℃で１時間、９０％ＴＦＡ／１０％アニソール中に溶解して除去し、次いで０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ　ｐＨ８．２緩衝液２５ｍＭで１０倍希釈する。（ＢＯＣ以外の保護基がアミン含有薬物に存在する場合、適切な脱保護条件をＴＦＡ／アニソールの代わりに使用する。保護剤のリストおよび脱保護条件は、定義の項で記載したように、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｔ．Ｗ．ＧｒｅｅｎｅおよびＰ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ，第３編，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，１９９９に見出せる。）ＮａＯＨ溶液を使用し、ｐＨを７．０と８．０との間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ副生成物、ならびに他の混入塩を除去する。次いで、Ａｍｉｃｏｎ　３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して、脱保護され、精製された複合体水溶液を、約６６Ｕのインスリン／ｍｌ（Ａ２８０測定に基づく）に濃縮し、必要になるまで４℃で保存する。最終複合体の同定は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）により検証する。複合のＡ１部位を、Ｎ末端シークエンス解析（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）によって確認し、Gly^{A1}をリガンド含有骨格で置換したことにより、＞９５％のＰｈｅ－Ｂ１－鎖末端が存在し、＜５％のGly^{A1}－鎖末端が存在することが明らかになる。

【０５７１】

当業者であれば、実施例７５に記載の手順に類似する手順を使用して、他のアミン官能化薬物を、リガンド含有骨格に複合体化することができることを理解する。また、当業者であれば、実施例７５は、野生型インスリン変異体ばかりでなく、本明細書で記載したインスリン変異体にも関連性があることも理解する。

【０５７２】

以下のインスリン複合体を、ＢＯＣ－ＮＨＳを保護試薬として使用し、実施例７５の手順に従って調製した。

【表３１】

Conjugate	Frame-work	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
I-13: TSAT-C6-AEM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AEM	223	97%	6730	2.0
I-12: TSAT-C6-AETM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	7378	2.0
I-15: TSPE-AEM-3 (A1)	TSPE	813	AEM	223	98%	6829	3.0
I-14: TSPE-AETM-3 (A1)	TSPE	813	AETM	547	94%	7802	3.0

【０５７３】

以下のインスリン複合体は、実施例７５の手順に従って調製することができる。いくつかの実施形態では、インスリン複合体は、ＢＯＣ－ＮＨＳを保護試薬として使用して調製する。

【表３２】

Conjugate	Frame-work	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS) (expected)	Sugar/ Insulin (expected)
DSS-AEM-1 (A1)	DSS	368	AEM	223	6169	1.0
DSS-AEBM-1 (A1)	DSS	368	AEBM	385	6331	1.0
DSS-AETM-1 (A1)	DSS	368	AETM	547	6493	1.0
TSAT-C6-AEBM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	7054	2.0
TSPE-AEBM-3 (A1)	TSPE	813	AEBM	385	7314	3.0

【０５７４】

実施例７６－有機溶剤中での多価活性化エステルによるインスリン複合（最初に薬物を付加）により、Ａ１，Ｂ２９－置換インスリン複合体を得る－一般的手順

ステップ１

Ｎ末端活性化エステルを含有する骨格を、１４７ｍＭで、２．５ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、１．０ｍｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。別のバイアルで、リガンドの２７２ｍＭ溶液を、適切な容積の乾燥ＤＭＳＯ中で調製する。溶解すれば、最初の活性化エステル基の数Ｎ－１の３倍に等しい数の反応性等価物を与えるのに十分な溶液を加える。たとえば、１つの骨格当たりＮ＝３の初期活性化エステル基があれば、（３×（３－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝０．９７３ｍｌのリガンド溶液を加える。１つの骨格当たりＮ＝４の初期活性化エステル基があれば、（３×（４－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝１．４６ｍｌのリガンド溶液を加える、など。リガンド溶液を加えた後、該溶液を室温で１時間攪拌し、反応の完了を確実にする。

【０５７５】

ステップ２

インスリンを、１．５ｍＬの１００ｍＭ炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ１１）に、１７．２ｍＭの濃度で溶解する。溶液のｐＨを、必要であれば、０．１ＭのＮａＯＨを加えることによって、約１１に維持する。インスリンが溶解したら、骨格－リガンド溶液の少量の

アリコートをインスリン溶液に加える。ｐＨをプロセス全体にわたってモニターし、０．１Ｍ水酸化ナトリウムを加えることによって、１０．２～１１．０の間に維持する。反応を逆相ＨＰＬＣでモニターする。ＨＰＬＣクロマトグラムが、実質的に全ての無修飾インスリンが反応し、反応混合物の相当部分がごく一部の一反応インスリン／骨格／リガンド複合体に変換され、および大部分の生成物が二反応インスリン／骨格／リガンド複合体であることを示すまで、骨格－リガンド溶液のアリコートを加える。通常、骨格－リガンド構造は無修飾インスリンより親水性であり、一および二反応アミン含有薬物生成物は、無修飾インスリンより短いＨＰＬＣ保持時間で溶出される。同様に、目的生成物、二置換インスリン複合体のＨＰＬＣピークは、一置換インスリン複合体の保持時間より短い保持時間で現れる。

【０５７６】

ステップ３

ステップ２で記載するように、インスリンが十分に骨格リガンドと反応すれば、溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するｐＨ５．０ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液２０ｍＭで１０倍まで希釈し、次いで希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相ＨＰＬＣを使用して、さらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用されるインスリン、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、該溶液をロートバップしアセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。最終複合体の同定は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）により検証する。複合のＡ１，Ｂ２９部位を、Ｎ末端シークエンス解析（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）によって確認し、Gly^{A1}をリガンド含有骨格で置換したため、＞９５％のＰｈｅ－Ｂ１－鎖末端が存在し、＜５％のGly^{A1}－鎖末端が存在することが明らかになる。

【０５７７】

当業者であれば、実施例７６に記載の手順に類似する手順を使用して、他のアミン官能化薬物を、リガンド含有骨格に複合体化することができることを理解する。また、当業者であれば、実施例７６は、野生型インスリン変異体ばかりでなく、本明細書で記載したインスリン変異体にも関連性があることも理解する。

【０５７８】

以下のインスリン複合体は、実施例７６の手順に従って調製することができる。

【表３３】

Conjugate	Framework	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/Insulin
II-4: DSS-Di-sub-AEM-1 (A1, B29)	DSS	368	AEM	223	92%	6531	2.0
II-3: DSS-Di-sub-AETM-1 (A1, B29)	DSS	368	AETM	547	94%	7179	2.0
II-1: TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1, B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	97%	7653	4.0
II-2: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	8949	4.0

【０５７９】
以下のインスリン複合体は、実施例７６の手順に従って調製することができる。
【表３４】

Conjugate	Frame-work	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
DSS-Di-sub-AEBM-1 (A1, B29)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2 (A1, B29)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4.0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

【０５８０】
実施例７７－有機溶剤中での多価活性化エステルによるインスリン複合（最初に薬物を付加）により、Ａ１，Ｂ１－置換インスリン複合体を得る
ステップ１
Ｎ末端活性化エステルを含有する骨格を、１４７ｍＭで、２．５ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解し、１．０ｍｌ（過剰）のトリエチルアミン（ＴＥＡ）を添加する。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。別のバイアルで、リガンドの２７２ｍＭ溶液を、適切な容積の乾燥ＤＭＳＯ中で調製する。溶解すれば、最初の活性化エステル基の数Ｎ－１の３倍に等しい数の反応性等価物を与えるのに十分な溶液を加える。たとえば、１つの骨格当たりＮ＝３の初期活性化エステル基があれば、（３×（３－ｌ）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝０．９７３ｍｌのリガンド溶液を加える。１つの骨格当たりＮ＝４の初期活性化エステル基があれば、（３×（４－ｌ）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝１．４６ｍｌのリガンド溶液を加える、など。リガンド溶液を加えた後、該溶液を室温で１時間攪拌し、反応の完了を確実にする。
【０５８１】
ステップ２
３個の反応性アミン基を含有するインスリンであって、ここで、それぞれの反応性アミン基は、識別可能なｐＫａ（たとえば、野生型インスリンの場合、ｐＫａ　Gly^{A1}＝８．０、Phe^{B1}＝６．７、$Lys^{\varepsilon B29}$＝１１．２；Ｍｅｉら，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１６：１６８０－１６８６，１９９９参照）を有し、最も高いｐＫａアミン基（たとえば、Lys^{B29}）は、単官能性保護基－活性化エステル（たとえば、ＢＯＣ－ＮＨＳ）で先に一保護されている、３個の反応性アミン基を含有するインスリンを、１７．２ｍＭの濃度で、１．５ｍＬのＤＭＳＯに溶解する。Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリンが溶解したら、骨格－リガンド溶液の少量のアリコートを、Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリン溶液に加える。反応を逆相ＨＰＬＣでモニターする。ＨＰＬＣクロマトグラムが、実質的に全てのＢ２９－ＢＯＣ－インスリンが反応し、反応混合物の相当部分がごく一部の一反応Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリン／骨格／リガンド複合体に変換され、および大部分の生成物が二反応Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリン／骨格／リガンド複合体であることを示すまで、骨格－リガンド溶液のアリコートを加える。通常、骨格－リガンド構造は、Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリンより親水性であり、一複合体化および二複合体Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリン複合体は、無修飾Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリンより短いＨＰＬＣ保持時間で溶出される。同様に、目的生成物、二置換Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリン－複合体のＨＰＬＣピークは、一置換Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリン－複合体の保持時間より短い保持時間で現れる。
【０５８２】
ステップ３
ステップ２で、Ｂ２９－ＢＯＣ－インスリンがリガンド含有骨格と十分反応したら、次いで、溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するｐＨ５．０　ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩

水溶液２０ｍＭで１０倍希釈し、次いでｐＨを希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ Ｓｙｍｍｅｔｒｙ Ｐｒｅｐ Ｃ８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相ＨＰＬＣを使用して、さらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ Ｄｅｌｔｒａ Ｐｒｅｐ ６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用されるインスリン、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、該溶液をロートバップしアセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。

【０５８３】

ステップ４

次いで、全ての場合において、保護基を複合体から除去する。ステップ１でＢＯＣ保護基を使用する場合、ＢＯＣ基は、ステップ３に従って得た凍結乾燥した粉末を、４℃で１時間、９０％ＴＦＡ／１０％アニソール中に溶解して除去し、次いで０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ ｐＨ８．２緩衝液２５ｍＭで１０倍希釈する。（ＢＯＣ以外の保護基がアミン含有薬物に存在する場合、適切な脱保護条件をＴＦＡ／アニソールの代わりに使用する。保護剤のリストおよび脱保護条件は、定義の項で記載したように、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｔ．Ｗ．ＧｒｅｅｎｅおよびＰ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ，第３編，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，１９９９に見出せる。）ＮａＯＨ溶液を使用し、ｐＨを７．０と８．０との間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ生成物、ならびに任意の他の混入塩を除去する。次いで、Ａｍｉｃｏｎ ３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して、脱保護され、精製された複合体水溶液を、約６６Ｕのインスリン／ｍｌ（Ａ２８０測定に基づく）に濃縮し、必要になるまで４℃で保存する。最終複合体の同定は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）により検証する。複合のＡ１，Ｂ１部位を、Ｎ末端シークエンス解析（Ｗｅｓｔｅｒｎ Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）によって確認し、両末端ともリガンド含有骨格で置換したため、基本的に、Ｐｈｅ－Ｂ１－鎖末端は存在せず、ＧＩｙ－Ａ１－鎖末端も存在しないことが明らかになる。

【０５８４】

当業者であれば、実施例７７に記載の手順に類似する手順を使用して、他のアミン官能化薬物を、リガンド含有骨格に複合体化することができることを理解する。また、当業者であれば、実施例７７は、野生型インスリン変異体ばかりでなく、本明細書で記載したインスリン変異体にも関連性があることも理解する。

【０５８５】

複合体ＩＩ－５を、ＢＯＣ－ＮＨＳを保護試薬として使用し、実施例７７の手順に従って調製した。

【表３５】

Conjugate	Frame-work	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
II-5: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	8949	4.0

【０５８６】

以下のインスリン複合体は、実施例７７の手順に従って調製することができる。

【表３６】

Identity	Frame-work	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS) (expected)	Sugar/ Insulin (expected)
DSS-Di-sub-AEM-1 (A1, B1)	DSS	368	AEM	223	6531	2.0
DSS-Di-sub-AEBM-1 (A1, B1)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
DSS-Di-sub-AETM-1 (A1, B1)	DSS	368	AETM	547	7179	2.0
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AEM	223	7653	4.0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4.0
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	8949	4.0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

【０５８７】

実施例７８－有機溶剤中での多価活性化エステルによるインスリン複合（最初に薬物を付加）により、Ｂ１，Ｂ２９－置換インスリン複合体を得る

ステップ１

Ｎ－末端活性化エステルを含有する骨格を、１４７ｍＭで、２．５ｍｌの無水ＤＭＳＯに溶解する。先の実施例とは違い、塩基は加えない。溶液を室温で１０分素早く攪拌する。別のバイアルで、リガンドの２７２ｍＭ溶液を、適切な容積の乾燥ＤＭＳＯ中で調製する。溶解すれば、最初の活性化エステル基の数Ｎ－１の３倍に等しい数の反応性等価物を与えるのに十分な溶液を加える。たとえば、１つの骨格当たりＮ＝３の初期活性化エステル基があれば、（３×（３－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝０．９７３ｍｌのリガンド溶液を加える。１つの骨格当たりＮ＝４の初期活性化エステル基があれば、（３×（４－１）×６０ｍＭ／３７０ｍＭ）＝１．４６ｍｌのリガンド溶液を加える、など。リガンド溶液を加えた後、該溶液を室温で１時間攪拌し、反応の完了を確実にする。

【０５８８】

ステップ２

３個の反応性アミン基を含有するインスリンであって、ここで、それぞれの反応性アミン基は、識別可能なｐＫａ（たとえば、野生型インスリンの場合、ｐＫａ Gly^{A1}＝８．０、Phe^{B1}＝６．７、$Lys^{\varepsilon B29}$＝１１．２；Ｍｅｉら，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１６：１６８０－１６８６，１９９９参照）を有し、中間のｐＫａを持つアミノ基（たとえば、野生型インスリンについてはGly^{A1}）は、単官能性保護基－活性化エステル（たとえば、ＢＯＣ－ＮＨＳ）で先に一保護されている、３個の反応性アミン基を含有するインスリンを、１７．２ｍＭの濃度で、１．５ｍＬのＤＭＳＯに溶解する。（Ａ１－ＢＯＣ－インスリンは、Ａ１，Ｂ２９－ジＢＯＣ－インスリン、Ａ１－ＢＯＣ－インスリンおよびＢ２９－ＢＯＣ－インスリン生成物の分布を得るために、数当量のＢＯＣ試薬と反応させる以外、実施例８の手順を使用して調製することができる。Ａ１－ＢＯＣ－インスリンは、ＲＰ－ＨＰＬＣで単離することができ、Ｎ末端シークエンス解析で確認することができる）Ａ１－ＢＯＣ－インスリンが溶解したら、骨格－リガンド溶液の少量のアリコートを、Ａ１－ＢＯＣ－インスリン溶液に加える。反応を逆相ＨＰＬＣでモニターする。ＨＰＬＣクロマトグラムが、実質的に全ての無修飾Ａ１－ＢＯＣ－インスリンが反応し、反応混合物の相当部分がごく一部の一複合体化Ａ１－ＢＯＣ－インスリン／骨格／リガンド複合体に変換され、大部分の生成物が二複合体化Ａ１－ＢＯＣ－インスリン／骨格／

リガンド複合体であることを示すまで、骨格－リガンド溶液のアリコートを加える。通常、骨格－リガンド構造は、Ａ１－ＢＯＣ－インスリンよりより親水性であり、一および二置換Ａ１－ＢＯＣ－インスリン複合体は、無修飾Ａ１－ＢＯＣ－インスリンより短いＨＰＬＣ保持時間で溶出される。同様に、目的生成物、二置換Ａ１－ＢＯＣ－インスリン－複合体のＨＰＬＣピークは、一置換Ａ１－ＢＯＣ－インスリン－複合体の保持時間より短い保持時間で現れる。

【０５８９】

ステップ３

ステップ２で、Ａ１－ＢＯＣ－インスリンが骨格リガンドと十分反応したら、次いで、溶液を、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するｐＨ５．０ＨＥＰＥＳ緩衝生理食塩水溶液２０ｍＭで１０倍希釈し、次いでｐＨを希ＨＣｌで最終ｐＨ８．０に調整する。該水溶液を、先ず、複合体化物質と複合体化されていない物質の所望の分離に適切な固相を使用する、サイズ排除によって精製する。次いでカラムボイド体積を通過した溶液を、適切なサイズの限外ろ過膜を使用して、約１０ｍｌに濃縮する。この溶液を、Ｗａｔｅｒｓ　Ｓｙｍｍｅｔｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｃ８、７ｕｍカラム、１９×１５０ｍｍの分取逆相ＨＰＬＣを使用して、さらに精製し、目的生成物を得る。緩衝液Ａは、０．１％ＴＦＡを含有する脱イオン水であり、緩衝液Ｂは、０．１％ＴＦＡを含有するアセトニトリルである。精製前に、カラムを、Ｗａｔｅｒｓ　Ｄｅｌｔｒａ　Ｐｒｅｐ　６００システムで、８０％Ａ／２０％Ｂ移動相を用い１５ｍｌ／分で平衡化する。約５ｍｌの粗溶液を、２分間かけて１５ｍｌ／分の流速でカラムに注入し、その後、８０％Ａ／２０％Ｂから７５％Ａ／２５％Ｂまでの線形勾配を次の５分間にわたって、次いで７５％Ａ／２５％Ｂから６２％Ａ／３８％Ｂのよりゆるやかな線形勾配を次の２２分間にわたって使用する。目的ピークの保持時間は、使用される薬物、骨格およびリガンドによって変化する。収集した時点で、該溶液をロートバップしアセトニトリルを除去し、凍結乾燥し、純粋な複合体を得る。

【０５９０】

ステップ４

次いで、全ての場合において、保護基を複合体から除去する。ステップ１でＢＯＣ保護基を使用する場合、ＢＯＣ基は、ステップ３に従って得た凍結乾燥した粉末を、４℃で１時間、９０％ＴＦＡ／１０％アニソール中に溶解して除去する。ＢＯＣ以外の保護基がアミン含有薬物に存在する場合、適切な脱保護条件をＴＦＡ／アニソールの代わりに使用する。保護剤のリストおよび脱保護条件は、定義の項で記載したように、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｔ．Ｗ．ＧｒｅｅｎｅおよびＰ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ，第３編，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，１９９９に見出せる。脱保護ステップ後、０．１５０ＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ　ｐＨ８．２緩衝液２５ｍＭで１０倍希釈する。ＮａＯＨ溶液を使用し、ｐＨを７．０と８．０との間に調整し、その後、物質をＢｉｏｇｅｌ　Ｐ２カラムに通し、アニソール、ＢＯＣおよび脱保護の他の低ＭＷ生成物、ならびに他の混入塩を除去する。次いで、Ａｍｉｃｏｎ　３Ｋ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）を使用して、脱保護され、精製された複合体水溶液を、約６６Ｕのインスリン／ｍｌ（Ａ２８０測定に基づく）に濃縮し、必要になるまで４℃で保存する。最終複合体の同定は、ＬＣ－ＭＳ（ＨＴ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）により検証する。複合のＢ１部位を、Ｎ末端シークエンス解析（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）によって確認し、Ｐｈｅ－Ｂ１をリガンド含有骨格で置換したため、＞９５％のＧＩｙ－Ａ１－鎖末端が存在し、＜５％のＰｈｅ－Ｂ１－鎖末端が存在することが明らかになる。

【０５９１】

当業者であれば、実施例７８に記載の手順に類似する手順を使用して、他のアミン官能化薬物を、リガンド含有骨格に複合体化することができることを理解する。また、当業者であれば、実施例７８は、野生型インスリン変異体ばかりでなく、本明細書で記載したインスリン変異体にも関連性があることも理解するだろう。

【０５９２】
以下のインスリン複合体は、実施例７８の手順に従って調製することができる。
【表３７】

Conjugate	Framework	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS) (expected)	Sugar/ Insulin (expected)
II-7: DSS-Di-sub-AETM-1 (B1, B29)	DSS	368	AETM	547	7179	2.0
II-6: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	8949	4.0
DSS-Di-sub-AEM-1 (B1, B29)	DSS	368	AEM	223	6531	2.0
DSS-Di-sub-AEBM-1 (B1, B29)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	7653	4.0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4.0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

【０５９３】
実施例７９－インビボ半減期／排出速度比較
Ｉ－６複合体がグルコースまたはａ－ＭＭのような抑制糖質の存在化または不存在下で、血清からインビボで排出される速度を測定するために、以下の実験を行った。各実験で、頸静脈にデュアルカニューレを処置された雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｔａｃｏｎｉｃ、ＪＶ／ＪＶ、３５０～４００ｇ、ｎ＝３）に、溶解性複合体（またはコントロールとしてＲＨＩ）を、０．４ｍｇ複合体／ｋｇ体重で投薬した。
【０５９４】
上昇するグルコース濃度の存在下での排出速度を測定するため、実験開始の１時間前に、１匹のラットのカニューレを、無菌５０％ｗ／ｖグルコース溶液を含有するシリンジ注入ポンプに接続した。ポンプ注入速度は、実験者によって調整され、実験中の全ての時間で、動物が、３００ｍｇ／ｄＬを超える血糖値を維持することを確実にした。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。典型的な実験では、動物が３００ｍｇ／ｄＬを上回る濃度を保持するために必要な注入ポンプ速度は、通常、８５ｕＬ／分を超えることがわかった。血液サンプルを、ｔ＝０分に取り、その後、無菌複合体溶液またはコントロールインスリンを、第二ラットカニューレを介し、静脈内に注射し、その直後にヘパリン－生理食塩水のチェイス溶液を注射し、全ての複合体用量が動物に投与されることを確実にした。ヘパリン－生理食塩水のカニューレラインによる追加の流し込みの後、第二カニューレを使用して、血液サンプルを、投与から、ｔ＝１、２、４、８、１５、３０、６０、９０、１２０および１８０分後に集めた。
【０５９５】
ａ－ＭＭ存在下での排出速度を測定するため、実験開始の１時間前に、１匹のラットのカニューレを、無菌２５％ｗ／ｖ　ａ－ＭＭ溶液を含有するシリンジ注入ポンプに接続した。ポンプ注入速度は、実験者によって調整されたが、通常、８５ｕＬ／分に設定した。血液サンプルを、ｔ＝０分に取り、その後、無菌複合体溶液またはコントロールインスリンを、第二ラットカニューレを介し、静脈内に注射し、その直後にヘパリン－生理食塩水のチェイス溶液を注射し、全ての複合体用量が動物に投与されることを確実にした。ヘパリン－生理食塩水のカニューレラインによる追加の流し込みの後、第二カニューレを使用して、血液サンプルを、投与から、ｔ＝１、２、４、８、１５、３０、６０、９０、１２

０および１８０分後に集めた。

【０５９６】

実験全体を通して、血糖値は、市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して測定した。各時点の血液を４℃で遠心分離し血清を集め、続いて、血清インスリンおよび血清複合体濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。インスリンまたは複合体血清濃度対時間データは、２分画モデルに従う２つの独立した減衰指数の合計（Ｃ（ｔ）＝ａ　ｅｘｐ（－k_aｔ）＋ｂ　ｅｘｐ（－k_bｔ））（式中、ｔ１／２（ａ）＝（Ｉｎ２）／k_aおよびｔ１／２（ｂ）＝（Ｉｎ２）／k_b）に、最良適合を示した。結果は図４６に示される。左の図は、ａ－ＭＭまたはグルコース不存在下でのＩ－６複合体対ＲＨＩに関する有意に高い（＞５×）排出速度を示す。右の図は、グルコースの存在下（Ｇ４００注入）で、排出速度がいくらか（約５０％）減少し、ａ－ＭＭ存在下（ａ－ＭＭ注入）でかなり実質的に（約４００％）減少することを示す。

【０５９７】

実施例８０－Ｉ－６の静脈内注入でのグルコース応答性ＰＫ

実施例７９に記載した静注排出速度実験を、０．４ｍｇ複合体／ｋｇ体重の単一静注ボーラスから連続静脈内注入に変えた。該実験の目的は、４時間目にグルコース腹腔内注射を投与し、複合体（またはコントロールとしてＲＨＩ）の投与量速度を６時間一定に保ち、血清複合体（またはＲＨＩ）濃度において得られた効果を測定することであった。各実験で、１つの頸動脈ラインを複合体またはＲＨＩの注入のために、もう１つは血液収集のために用いるように、頸静脈にデュアルカニューレを処置された雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｔａｃｏｎｉｃ、ＪＶ／ＪＶ、３５０～４００ｇ、ｎ＝３）を使用した。

【０５９８】

ＲＨＩに関して、５０ｍＵ／ｍｌ溶液を、０．２ｕｍろ過膜を通して無菌ろ過し、０．０７ｍｌ／分で注入し、６時間試験全体について、３．５ｍＵ／分の一定投与量速度で投与を行った。血液サンプルをｔ＝０分で取り、その後、一定量静脈内注入を始めた。第二カニューレを使用して、ｔ＝３０、６０、１２０、１８０および２４０分で血液サンプルを集めた。ｔ＝２４０分で、４ｇ／ｋｇ用量のグルコースを、腹腔内注射によって投与し、次いでｔ＝２５５、２７０、３００、３３０および３６０分で血液を集めた。

【０５９９】

Ｉ－６複合体に関し、１５０ｍＵ／ｍｌ溶液を、０．２μｍろ過膜を通して無菌ろ過し、０．１０ｍｌ／分で注入し、６時間試験全体について、１５ｍＵ／分の投与量速度で投与を行った。血液サンプルをｔ＝０分で取り、その後、一定量静脈内注入を始めた。第二カニューレを使用して、ｔ＝３０、６０、１２０、１８０および２４０分で血液サンプルを集めた。ｔ＝２４０分で、１、２または４ｇ／ｋｇ用量のグルコースを、腹腔内注射によって投与し、次いでｔ＝２５５、２７０、３００、３３０および３６０分で血液を集めた。

【０６００】

実験全体を通して、血糖値は、市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して測定した。各時点の血液を４℃で遠心分離し血清を集め、続いて、血清インスリンおよび血清複合体濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。

【０６０１】

図４７の最初の２つの図は、４ｇ／ｋｇのグルコース腹腔内注射前後の血糖値および血清インスリン複合体濃度プロフィールを、３．５ｍＵ／分注入のＲＨＩと１５ｍＵ／分注入のＩ－６とで比較している。ＲＨＩ注入は、Ｉ－６注入と比べ、グルコース注射前に有意な低血糖症状を起こす。グルコース腹腔内注射の直後に、Ｉ－６の測定血清インスリン

濃度は、血糖濃度増加として、３００％を超える増加を示し、次いでグルコース濃度が減少するにつれ、素早くベースライン濃度に戻る。一方、同じ実験条件下でも、グルコース腹腔内注射後、ＲＨＩは、測定血清インスリン濃度において有意な変化はない。図４７の次の３つの図は、測定インスリン濃度がグルコース腹腔内注射中に増える度合いは、投与されたグルコース用量および結果として得られる血糖値に直接関連することを示す。たとえば、血清インスリン濃度において、１ｇ／ｋｇグルコース注射については、ベースラインに対して５０％ピークの変化しか観察されないのに対し、４ｇ／ｋｇ用量では、ベースラインに対して３００％ピークの変化が観察される。

【０６０２】

実施例８１－糖質を含むまたは含まないインスリン複合体のインビボ排出速度

Ｉ－９複合体がグルコースまたはａ－ＭＭのような抑制糖質の存在下または不存在下で、血清からインビボで排出する速度を測定するため、以下の実験を行った。各実験で、頸静脈にデュアルカニューレを処置された雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｔａｃｏｎｉｃ、ＪＶ／ＪＶ、３５０～４００ｇ、ｎ＝３）に、溶解性複合体（またはコントロールとしてＲＨＩ）を、０．４ｍｇ複合体／ｋｇ体重で投薬した。

【０６０３】

上昇するグルコース濃度の存在下での排出速度を測定するため、実験開始の１時間前に、１匹のラットのカニューレを、無菌５０％ｗ／ｖグルコース溶液を含有するシリンジ注入ポンプに接続した。ポンプ注入速度は、実験者によって調整され、実験中の全ての時間で、動物が、３００ｍｇ／ｄＬを超える血糖値を維持することを確実にした。市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して、血糖値を測定した。典型的な実験では、動物が３００ｍｇ／ｄＬを上回る濃度を保持するために必要な注入ポンプ速度は、通常、８５ｕＬ／分を超えることがわかった。血液サンプルを、ｔ＝０分に取り、その後、無菌複合体溶液またはコントロールインスリンを、第二ラットカニューレを介し、静脈内に注射し、その直後にヘパリン－生理食塩水のチェイス溶液を注射し、全ての複合体用量が動物に投与されることを確実にした。ヘパリン－生理食塩水のカニューレラインによる追加の流し込みの後、第二カニューレを使用して、血液サンプルを、投与から、ｔ＝１、２、４、８、１５、３０、６０、９０、１２０および１８０分後に集めた。

【０６０４】

ａ－ＭＭ存在下での排出速度を測定するため、実験開始の１時間前に、１匹のラットのカニューレを、無菌２５％ｗ／ｖ　ａ－ＭＭ溶液を含有するシリンジ注入ポンプに接続した。ポンプ注入速度は、実験者によって調整されたが、通常、８５ｕＬ／分に設定した。血液サンプルを、ｔ＝０分に取り、その後、無菌複合体溶液またはコントロールインスリンを、第二ラットカニューレを介し、静脈内に注射し、その直後にヘパリン－生理食塩水のチェイス溶液を注射し、全ての複合体用量が動物に投与されることを確実にした。ヘパリン－生理食塩水のカニューレラインによる追加の流し込みの後、第二カニューレを使用して、血液サンプルを、投与から、ｔ＝１、２、４、８、１５、３０、６０、９０、１２０および１８０分後に集めた。

【０６０５】

実験全体を通して、血糖値は、市販の検査片（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｘｔｒａ、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）を使用して測定した。各時点の血液を４℃で遠心分離し血清を集め、続いて、血清インスリンおよび血清複合体濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ｉｓｏ－インスリンＥＬＩＳＡ、Ｍｅｒｃｏｄｉａ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）で測定した。インスリンまたは複合体血清濃度対時間データは、２分画モデルに従う２つの独立した減衰指数の合計（Ｃ（ｔ）＝ａ　ｅｘｐ（－k_aｔ）＋ｂ　ｅｘｐ（－k_bｔ））（式中、ｔ１／２（ａ）＝（Ｉｎ２）／k_aおよびｔ１／２（ｂ）＝（Ｉｎ２）／k_b）に、最良適合を示した。図４８の最初の図は、無修飾インスリンの排出は、糖（グルコースＧ４００またはａ－ＭＭ）の存在下で影響されないことを示す。糖質注入を伴う複合体Ｉ－６を示す図４８の最後の図は、比較のため

に、実施例７９の結果を再プロットしたものである。糖質注入を伴う複合体Ｉ－９を示す図４８の真ん中の図は、グルコース（Ｇ４００の注入）対Ｉ－６複合体との存在で、排出速度がさらにいっそうはっきりと減少（約３５０％対約５０％）することを示す。また、複合体Ｉ－９は、ａ－ＭＭ（ａ－ＭＭ注入）対Ｉ－６複合体の存在で、排出速度がより大きく減少（約７００％対約４００％）することも示す。

【０６０６】

実施例８２－ミニブタにおける機序検証およびグルコース応答性特性

先に記載したグルコース応答性インスリン複合体結果が、ラットを超えて他の種に及ぶことができるかを判断するため、本発明者らは、ヒトの代わりになる、本明細書では「小型ブタ」とも言う非糖尿病雄ミニブタ（Ｙｕｃａｔａｎ　ｓｔｒａｉｎ）における糖依存性インビボ排出速度を探ることに目を向けた。図４９にまとめられたインスリン複合体のサブセットに関し、糖依存性排出速度における糖親和力および多価の状態の効果を最初に測定する試験を行った。複合体は、図４５でＩ－７、Ｉ－６、Ｉ－１１およびＩＩ－２として示す。この試験で使用した全ての複合体は、実施例２０で記載した一般的方法に従って合成した。Ａ１，Ｂ２９－二置換ＡＥＴＭ－２インスリン－複合体ＩＩ－２を製造するため、Ｂ２９－一置換ＡＥＴＭ－２インスリン－複合体（Ｉ－６）合成と比べて、１インスリン分子当たり多価活性エステル骨格およびＡＥＴＭリガンドの約１０倍量を使用した。

【０６０７】

各実験で、インスリン複合体を、０．１Ｕ／ｋｇで、非糖尿病、デュアル血管アクセスポートされた小型ブタに静注投与し、注射後、血液を頻繁に集めた。グルコース存在下での血清排出速度を測定するため、インスリン複合体投与の１時間前に、シリンジポンプを使用して１ポートに、無菌５０％ｗ／ｖグルコース溶液を静脈注入し、実験全体を通して動物の血糖値が、４００ｍｇ／ｄｌ（通常、８０～１５０ｍｌ／時間）付近に保つことを確実にするように、速度を調整した。ａ－ＭＭ存在下での血清排出速度を測定するために、グルコース溶液を、無菌２５％ｗ／ｖ　ａ－ＭＭ溶液と置き換え、ポンプ注入速度を、実験を通して８０ｍｌ／時間の一定に保った。各場合で、得られたインスリン複合体濃度対時間データを、２分画モデルに従って、２つの独立した減衰指数（Ｃ（ｔ）＝α　ｅｘｐ（－k_{α}ｔ）＋β　ｅｘｐ（－k_{β}ｔ））の合計に適合させた。

【０６０８】

４００ｍｇ／ｄｌで、内因性グルコース誘発ブタインスリンの高濃度が、本発明者らのインスリン複合体免疫アッセイと交差反応した。そのため、グルコース注入実験のＰＫ結果は、ブタインスリンだけのアッセイから得た値を差し引く必要があったが、それでもかなりの「ノイズ」のあるデータとなった。ａ－ＭＭは、内因性ブタインスリン分泌を誘発しないので、ａ－ＭＭ注入実験のデータを、インスリン複合体半減期における糖応答性変化の第一指示薬として使用した。興味深いことに、ブタにおいて、ＡＥＴＭ－２インスリン複合体（Ｉ－６）は、ａ－ＭＭの存在下での$t_{1/2}$において、ラットの４．０倍増加に比べて、ゆるやかな１．７倍増加しか示さなかった（図５６）。しかし、ブタにおいて、Ａ１，Ｂ２９－二置換ＡＥＴＭ－２インスリン－複合体（ＩＩ－２）は、ａ－ＭＭの存在下での$t_{1/2}$における増加がほぼ１０倍を示した（図５０および５１）。他の複合体の結果を図５７で表に示す。

【０６０９】

ａ－ＭＭ存在下での二置換ＡＥＴＭ－２インスリン－複合体（ＩＩ－２）の静注用量のグルコース低下曲線を超える面積は、糖が存在しない場合より約２．６倍高かった（図５２）。図５９では、ＲＨＩ、Ｉ－６、およびＩＩ－２（二置換ＡＥＴＭ－２インスリン複合体）およびＩＩ－３の間での生物活性における違いを比べる。３種のインスリン複合体は全て、高い親和力ＡＥＴＭ糖リガンドを含有する。この選択されたインスリン複合体の組では、糖依存性半減期と生物活性との間に相関関係はない。

【０６１０】

非糖尿病動物においては低血糖を起こすことなく、糖尿病動物で、グルコースを減少さ

せる能力を判定するために、複合体ＩＩ－２を、溶解性溶液として、０．２５、０．５０および１．００Ｕ／ｋｇの用量で、非糖尿病正常血糖小型ブタと、アロキサン糖尿病、高血糖小型ブタの両方にｓｕｂ－Ｑ注射した。インスリン複合体は、糖尿病動物で血糖値における有意な用量依存性減少を示し、一方、非糖尿病動物では全く低血糖またはグルコース低下の兆候がなかった（図５３）。それにひきかえ、０．０６３および０．１２５Ｕ／ｋｇでＲＨＩを注射した場合、糖尿病動物で有意なグルコース低下を起こし、非糖尿病動物では、顕著な低血糖、ならびに有意なグルコース低下および低血糖を起こした（図５４）。これらの予備的な結果に基づいて、約０．５Ｕ／ｋｇの溶解性インスリン複合体ＩＩ－２の単一注射は、糖尿病小型ブタにおいて、６～８時間、低血糖のないグルコースコントロールを提供した。ＩＩ－２のｓｕｂ－Ｑ注射の血清排出速度は、糖尿病小型ブタおよび正常小型ブタにおいて測定した（図５８）。全ての用量に関して、類似のＰＫプロフィールが、糖尿病のブタ患者と正常なブタとの間に観察された。

【０６１１】

まとめると、これらの初期結果は、内因性レクチンに基づく機序が、糖親和力および多価であることの選択によって活用することができる小型ブタに存在することを示している。より高い親和力を持ち、多価であるインスリン複合体は、ラットと比べて、小型ブタにおいて、低血糖のない血糖コントロールの改善を提供することは明らかである。

【０６１２】

実施例８３－ミニブタにおける最適化実験

図４９におけるＩＩ－２対他の複合体の性能における明白な違いに基づいて、糖親和力および多価であることの効果から、インスリン複合部位（Ａ１対Ｂ２９）の効果を切り離し、定量するのが望ましい。したがって、図４９でのインスリン複合体の製造で使用した方法に類似する複合方法を使用して、図５５に列挙したインスリン複合体（図４５にＩ－１２、Ｉ－１３、Ｉ－１４、Ｉ－１５、ＩＩ－１、ＩＩ－３およびＩＩ－４として示す）、ならびに図６０に示すコントロール化合物を合成した。この試験で使用した二置換複合体は全て、実施例２０で記載した一般的方法に従って合成した。Ａ１，Ｂ２９－二置換インスリン複合体を製造するために、Ｂ２９一置換インスリン－複合体合成と比べて、１インスリン分子当たり、１０倍量の多価活性エステル骨格および糖親和力リガンドを使用した。Ａ１だけが置換された物質も、実施例２０に記載された一般的方法に従って調製した。しかし、この場合、ジ－ｔｅｒｔ－ブチルジカルボネートの半分の当量を使用して、実施例８に記載のＢＯＣ保護合成から単離した、Ｂ２９一ＢＯＣ保護インスリンを使用した。精製したら、実施例１２に記載のＴＦＡ／アニソール方法を使用して、ＢＯＣ基を複合体から除去した。

【０６１３】

これらのインスリン－複合体のそれぞれの糖応答性半減期およびグルコース低下効果を、一般的に、以下のように測定した。先に記載したように、インスリン複合体をそれぞれ、０．１Ｕ／ｋｇで、非糖尿病、デュアル血管アクセスポートされた小型ブタに静注投与し、注射後、血液を頻繁に集めた。ａ－ＭＭ存在下での血清排出速度を測定するため、インスリン複合体投与の１時間前に、シリンジポンプ（８０ｍｌ／時間）を使用して１ポートに、無菌２５％ｗ／ｖのａ－ＭＭ溶液を静脈注入し、実験全体を通して動物の血糖値を一定に保った。各場合で、得られたインスリン複合体濃度対時間データを、２分画モデルに従って、２つの独立した減衰指数（Ｃ（ｔ）＝α　ｅｘｐ（－k_{α}ｔ）＋β　ｅｘｐ（－k_{β}ｔ））の合計に適合させた。ａ－ＭＭ注入をした場合としない場合のβ段階排出速度の比較を使用して、適切な複合体を同定した。

【０６１４】

図６１は、種々のインスリン複合体を小型ブタに静注した場合のグルコース濃度の比較を示す。複合体Ｉ－１２（ＡＥＴＭ－２でのＡ１置換）は、グルコースの低下において、複合体Ｉ－６（ＡＥＴＭ－２でのＢ２９置換）よりわずかに効果的であった。複合体Ｃ３を得るための、Ａ１位でのポリエチレンオキシドを用いる複合体１－６の置換では、生物活性全体が減少したが、ａ－ＭＭ誘発生物活性は増加しなかった。複合体ＩＩ－２を得る

ための、Ａ１位での他のＴＳＡＴ－Ｃ６－ＡＥＴＭ－２スカフォールドを用いる複合体Ｉ－６の置換では、生物活性全体は減少したが、ａ－ＭＭ誘発生物活性は増加した。

【０６１５】

図６２は、種々のＡ１，Ｂ２９二置換インスリン－複合体を小型ブタに静脈注射した場合のグルコース濃度の比較を示す。アセチル（複合体Ｃ７）またはＰＥＯ（複合体Ｃ４）基を用いるインスリンのＡ１，Ｂ２９二置換では、生物活性全体は、実質的に減少しなかった。さらに、Ｃ７およびＣ４複合体は、識別可能なａ－ＭＭ誘発生物活性効果を示さなかった。複合体ＩＩ－３は、複合体Ｃ７およびＣ４に対して、生物活性を実質的に減少させたが、ａ－ＭＭの存在下で、その生物活性は、事実上保存された。

【０６１６】

他の実施形態：

本発明の他の実施形態も、本発明の考察および本明細書に記載された本発明の実施から、当業者には明らかになる。本明細書および実施例は例示としてのみ考えられるもので、本発明の真の範囲および精神は、以下に続く特許請求の範囲によって示されているものである。

【図１】

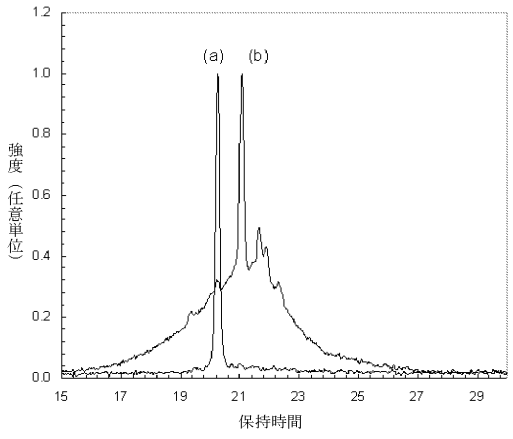


Figure 1

【図２】

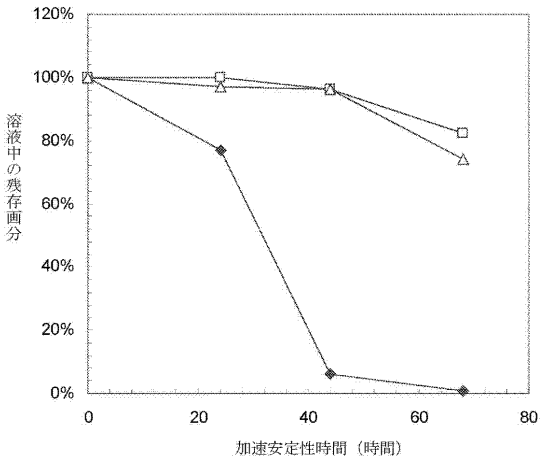


Figure 2

【図３】

(a) ＩＰＣピーク保持時間、遊離インスリン%およびデサミドインスリン%

サンプル	ピーク１ RT[1]（分）	ピーク２ RT（分）	ピーク３ RT（分）	純度% IPC	遊離インスリン%	デサミドインスリン%
HS-1-60-1（新鮮な）	20.62	-	-	>99	<0.1	<0.1
HS-1-60-1 (AST, PBS)	20.61	19.19	-	85	<0.1	<0.1
HS-1-60-1 (AST, HEPES)	20.65	-	-	>99	<0.1	<0.1
TL-13-85（新鮮な）	20.46	-	-	>99	<0.1	<0.1
TL-13-85 (AST, PBS)	20.40	19.84	18.91	30	<0.1	<0.1
TL-13-85 (AST, HEPES)	20.46	-	-	>99	<0.1	<0.1

[1]Ｃ８逆相カラム、水：アセトニトリル（０．１％ＴＦＡ）溶出勾配、ＲＴ＝保持時間

(b) ＩＰＣおよびＩＰＣ分解生成物における質量分光データ

サンプル	ピーク１ MW (Da)	ピーク２ MW (Da)	ピーク３ MW (Da)
HS-1-60-1（新鮮な）	6730[2]	-	-
HS-1-60-1 (AST, PBS)	6730	5947	-
HS-1-60-1 (AST, HEPES)	6730	-	-
TL-13-85（新鮮な）	6829[2]	-	-
TL-13-85 (AST, PBS)	6829	5944	7928
TL-13-85 (AST, HEPES)	6829	-	-

[2]ここで示す１つのＩＰＣは、異なる構造を有し、したがって異なるMWを有する。

Figure 3

【図４】

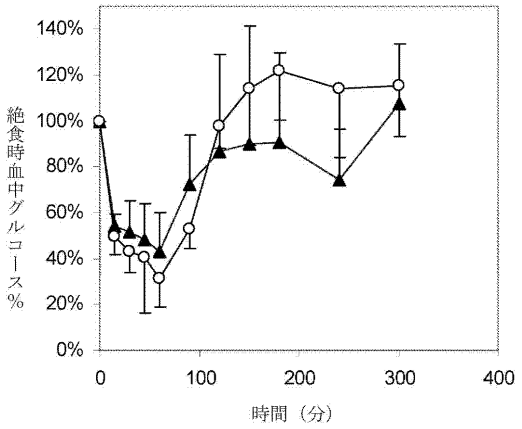


Figure 4

【図５】

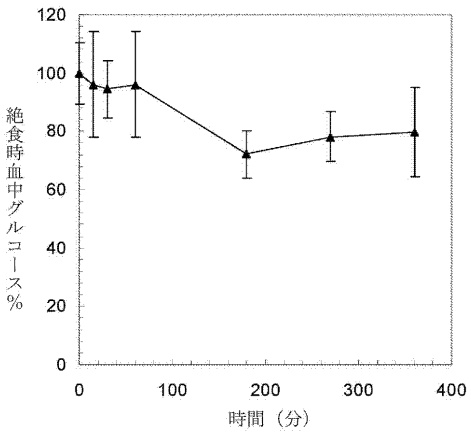


Figure 5

【図６】

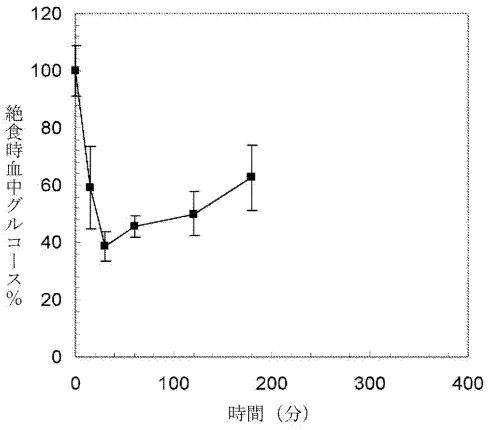


Figure 6

【図７】

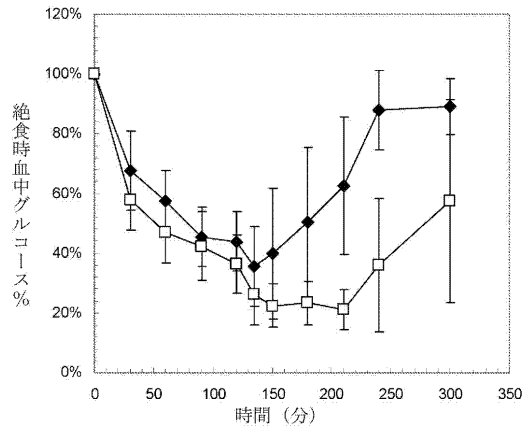


Figure 7

【図８】

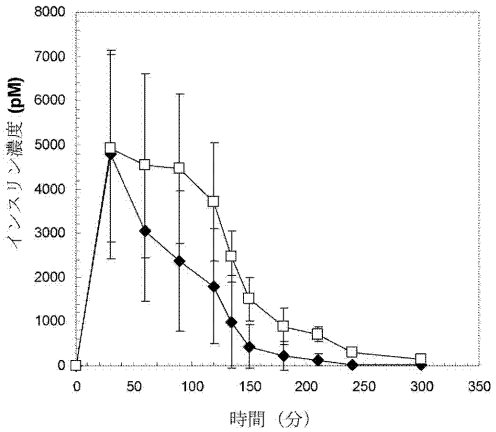


Figure 8

【図９】

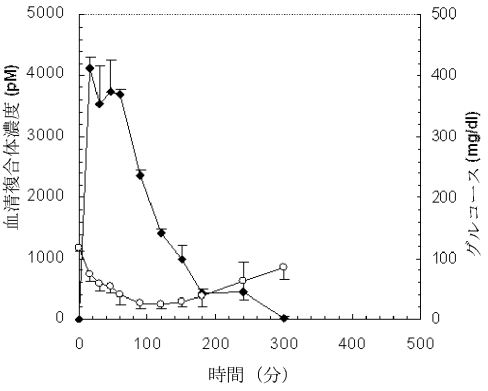


Figure 9

【図１０】

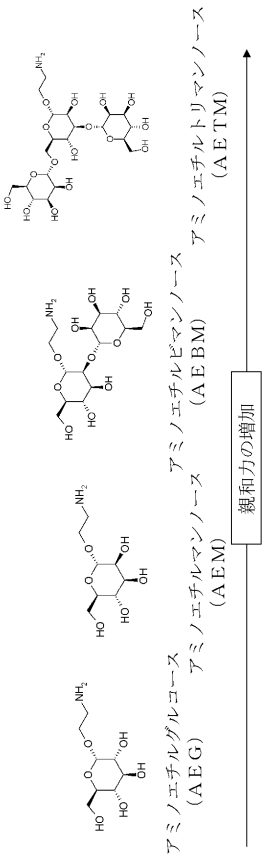


Figure 10

【図１１】

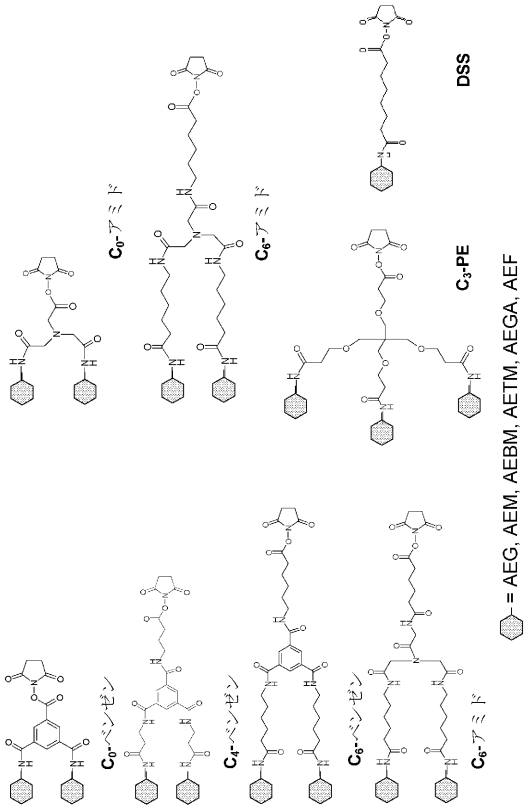


Figure 11

【図１２】

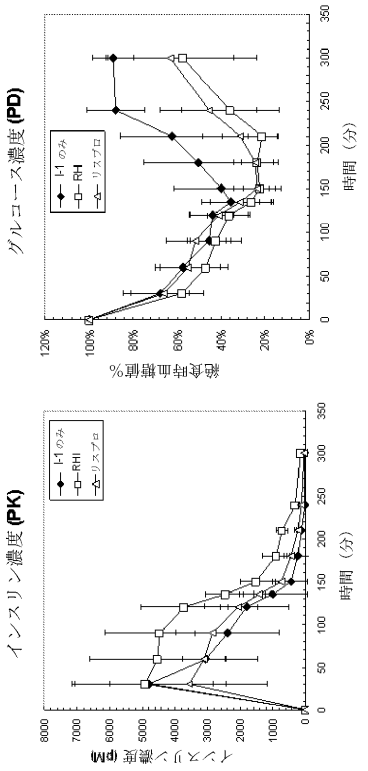


Figure 12

【図１３】

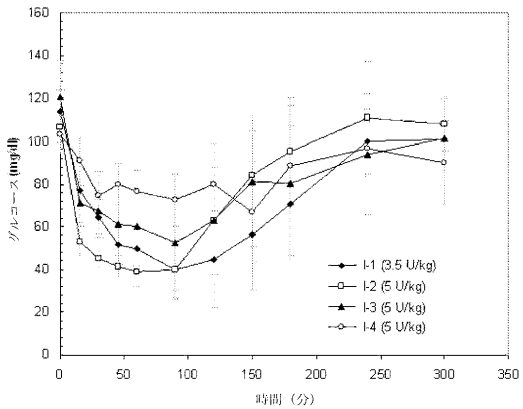


Figure 13

【図１４】

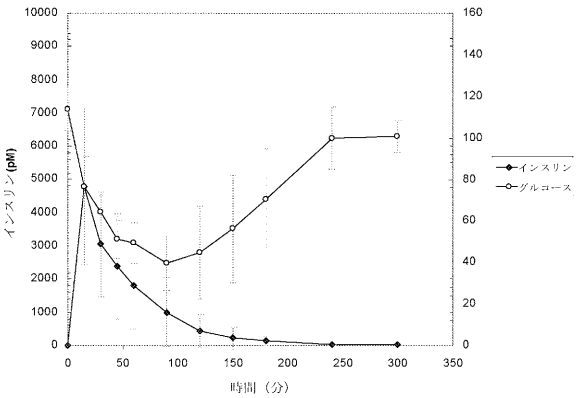


Figure 14

【図１５】

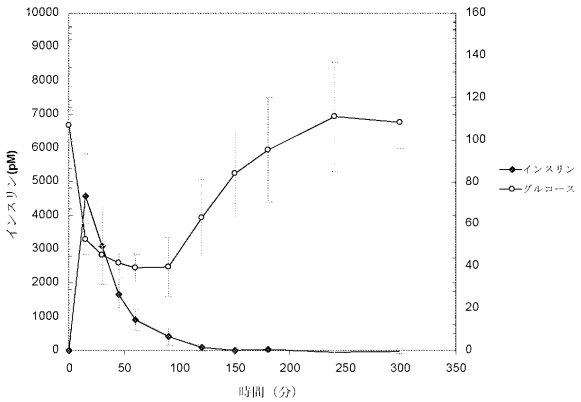


Figure 15

【図１６】

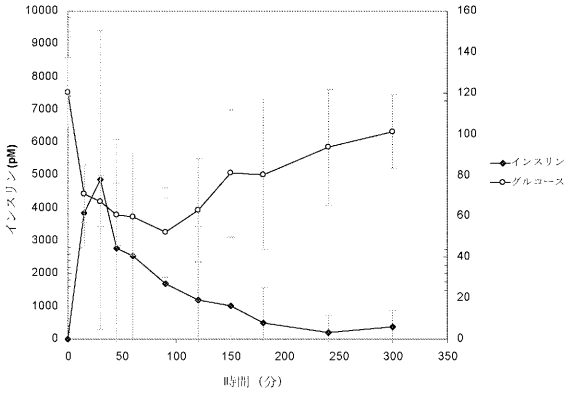


Figure 16

【図１７】

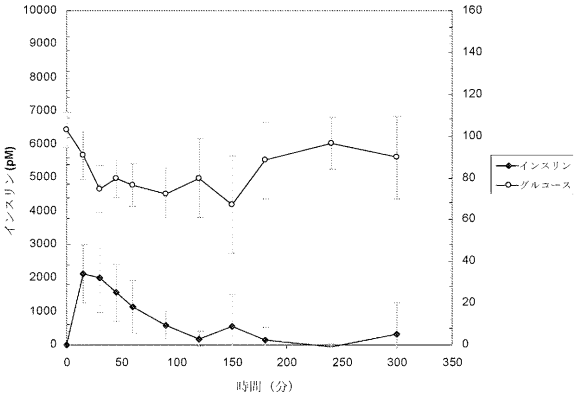


Figure 17

【図１８】

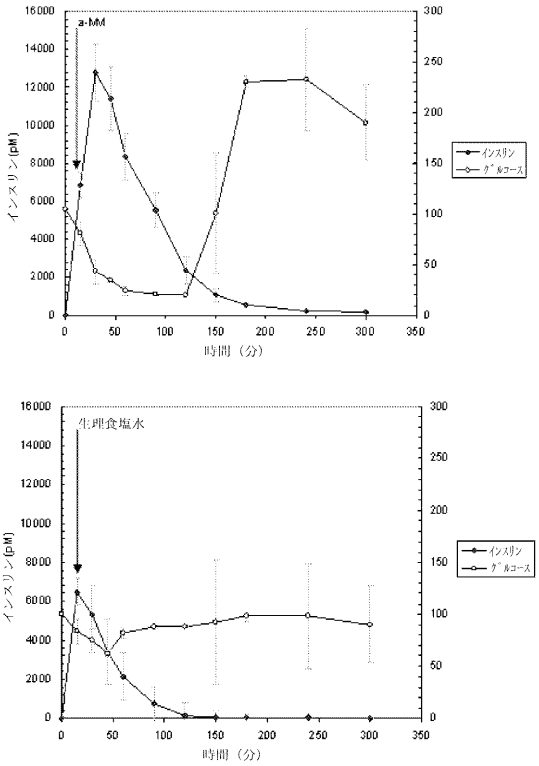


Figure 18

【図１９】

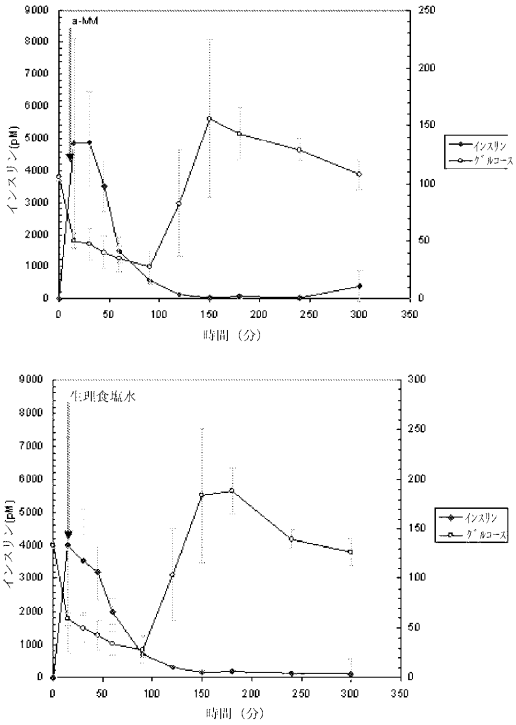


Figure 19

【図２０】

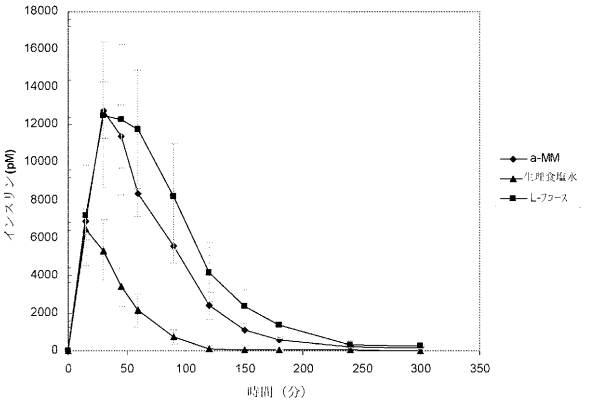


Figure 20

【図２１】

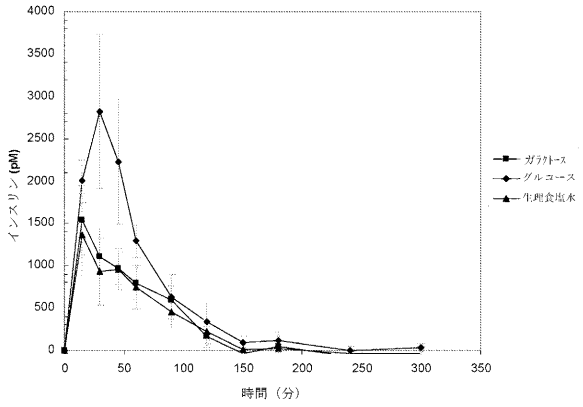


Figure 21

【図２２】

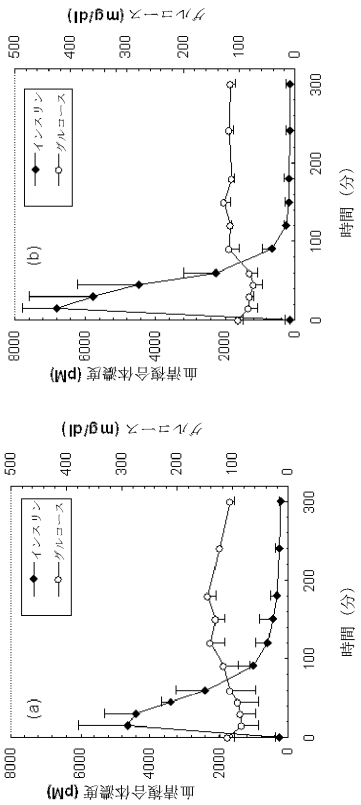


Figure 22

【図２３】

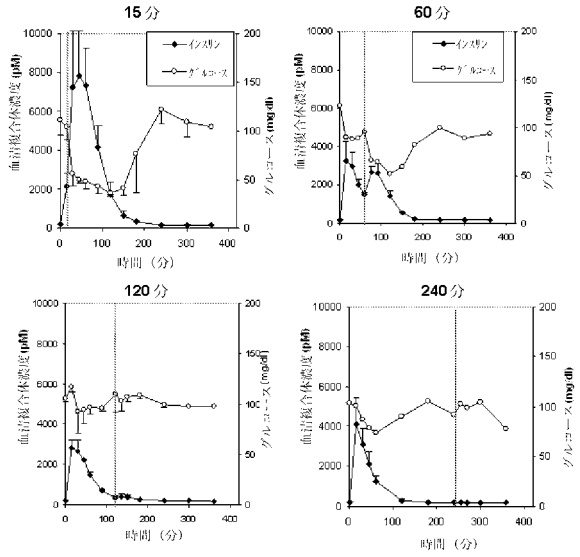


Figure 23

【図２４】

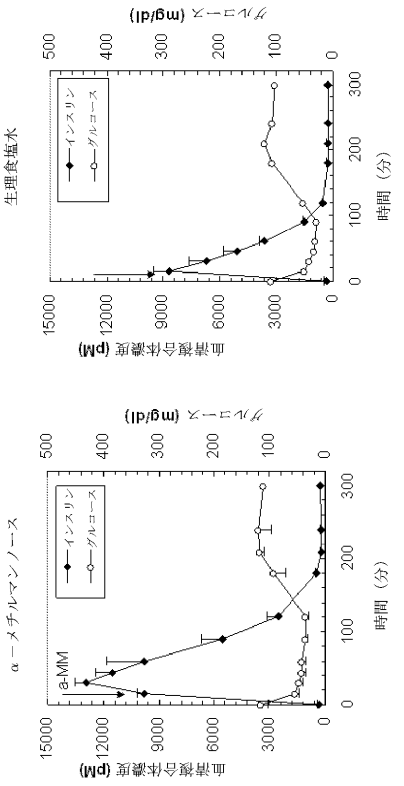


Figure 24

【図２５】

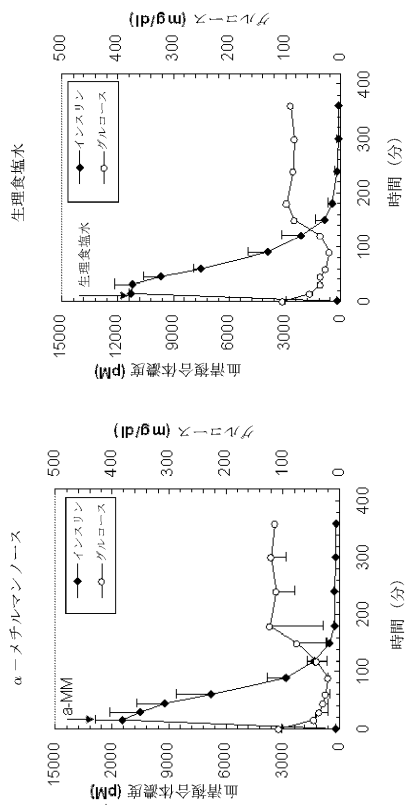


Figure 25

【図２６】

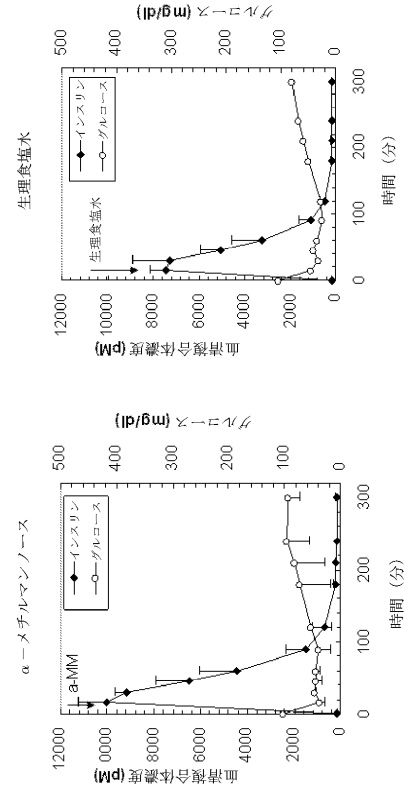


Figure 26

【図２７】

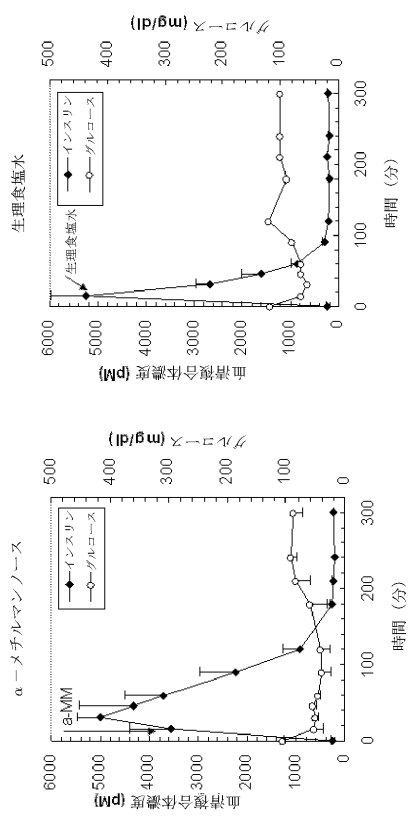


Figure 27

【図２８】

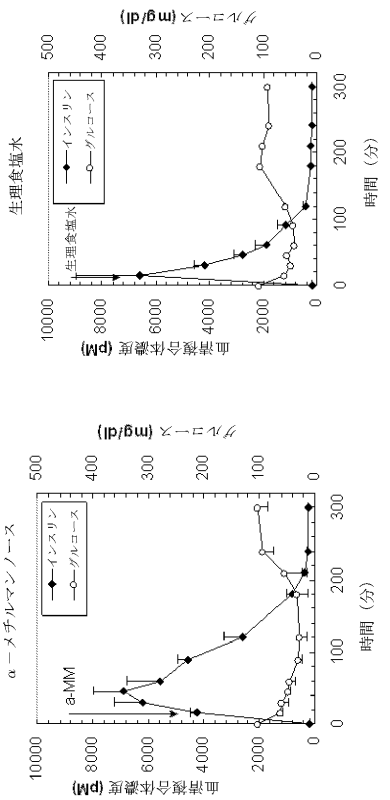


Figure 28

【図２９】

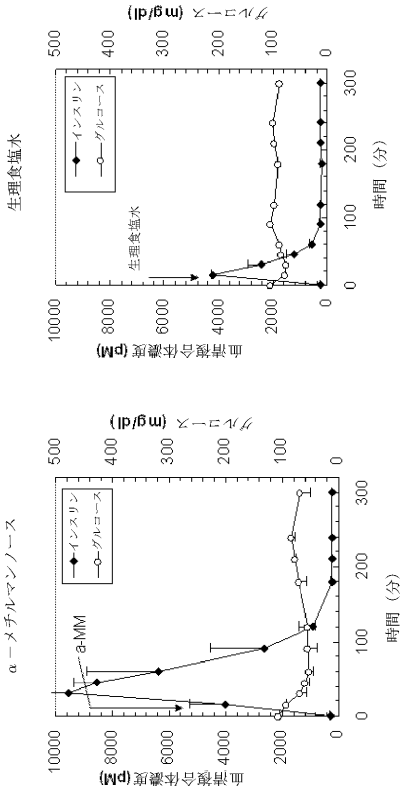


Figure 29

【図３０】

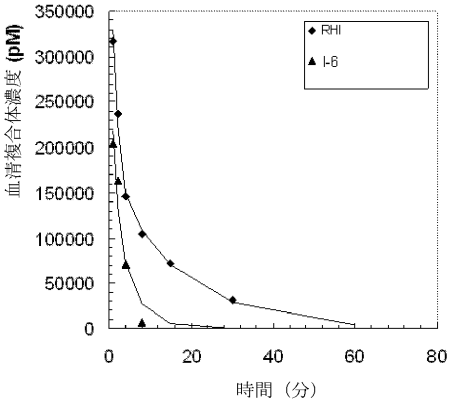


Figure 30

【図３１－１】

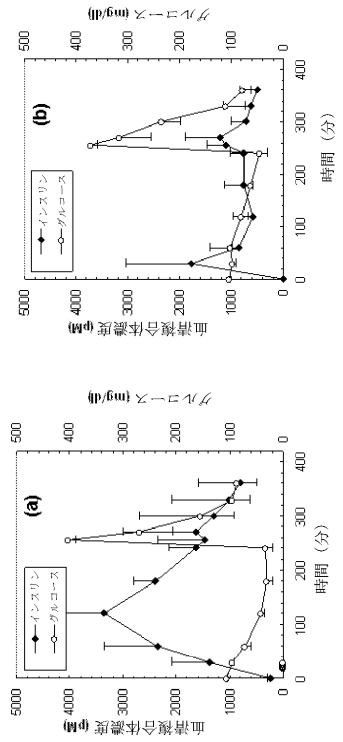


Figure ３１－１

【図３１－２】

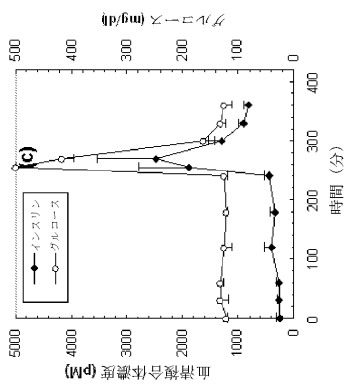


Figure ３１－２

【図３２】

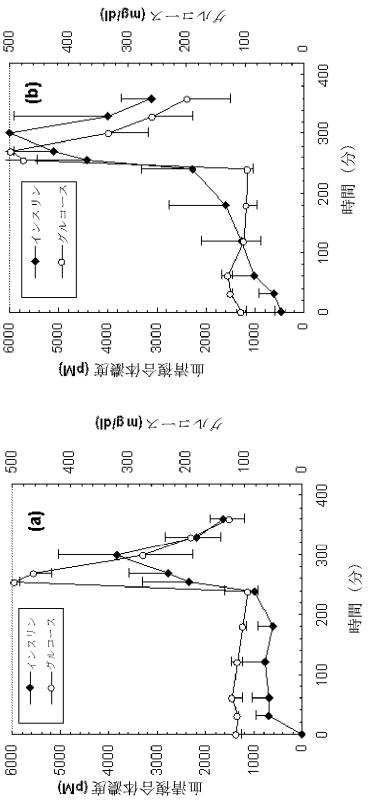


Figure 32

【図３３】

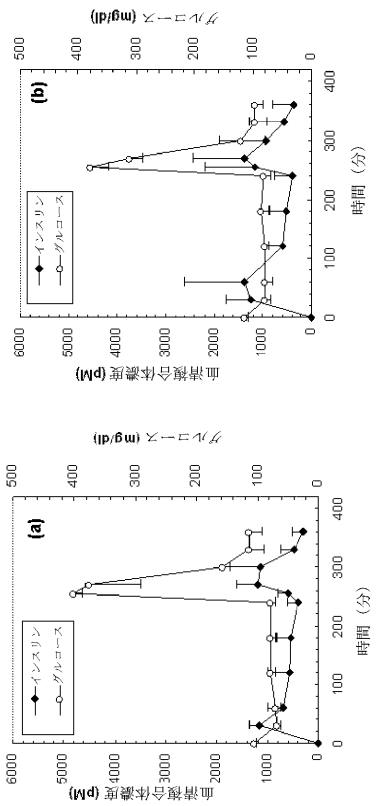


Figure 33

【図３４】

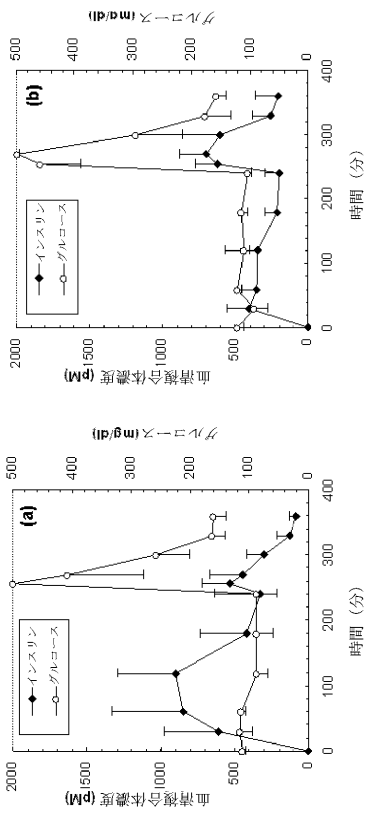


Figure 34

【図３５－１】

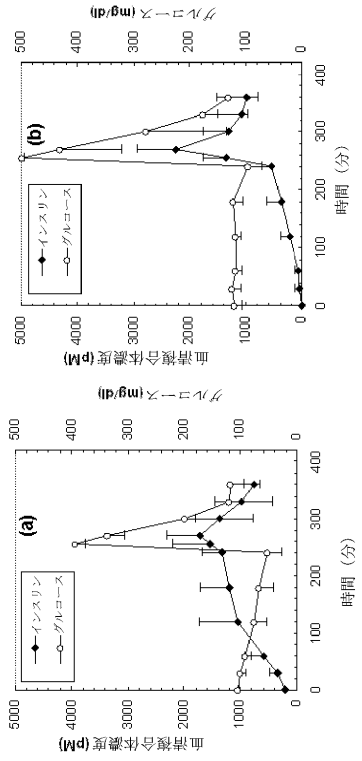


Figure ３５－１

【図３５－２】

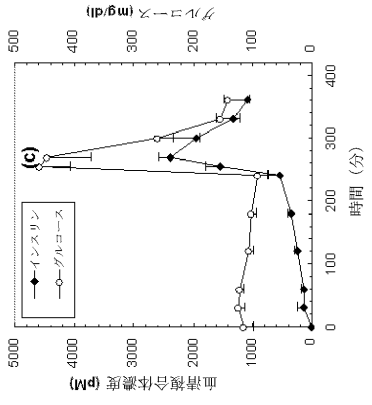


Figure ３５－２

【図３６－１】

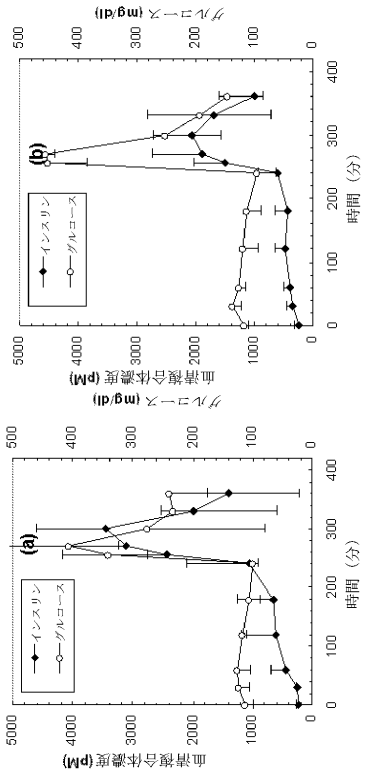


Figure ３６－１

【図３６－２】

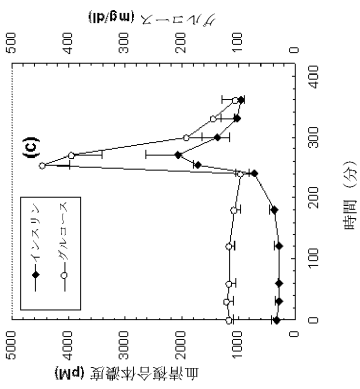


Figure ３６－２

【図３７】

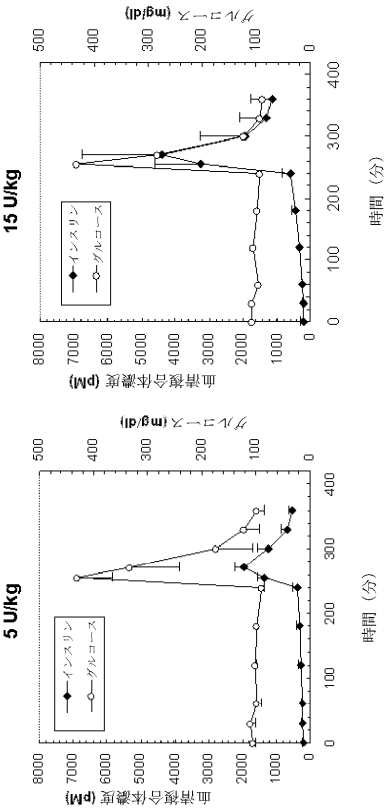


Figure 37

【図３８】

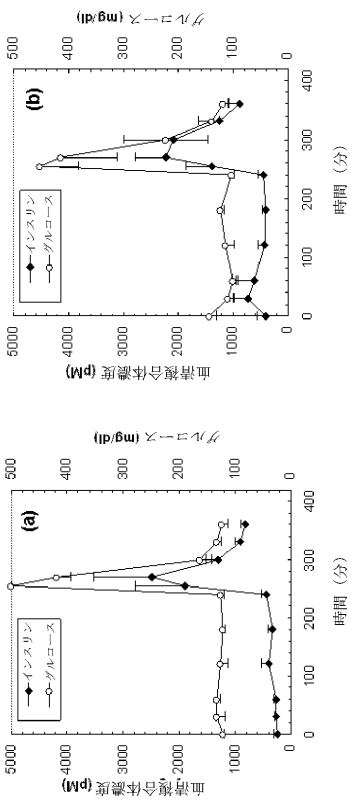


Figure 38

【図３９】

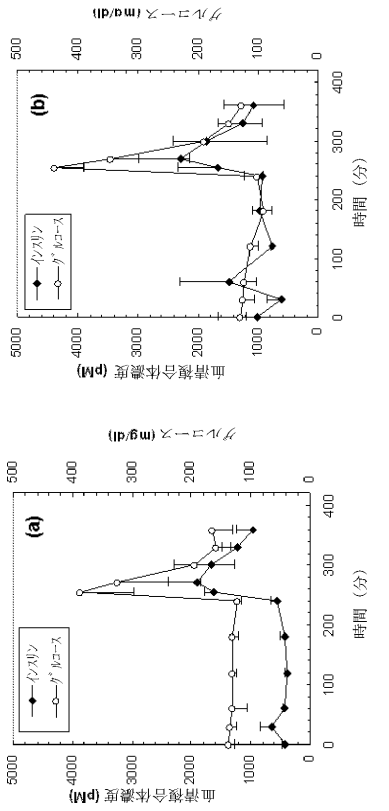


Figure 39

【図４０－１】

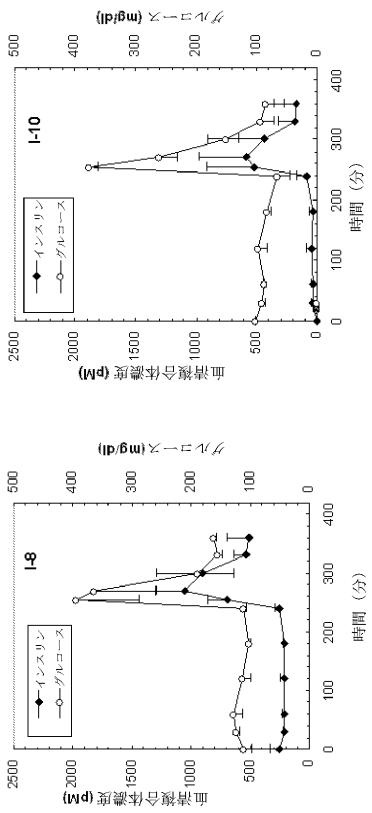


Figure ４０－１

【図４０－２】

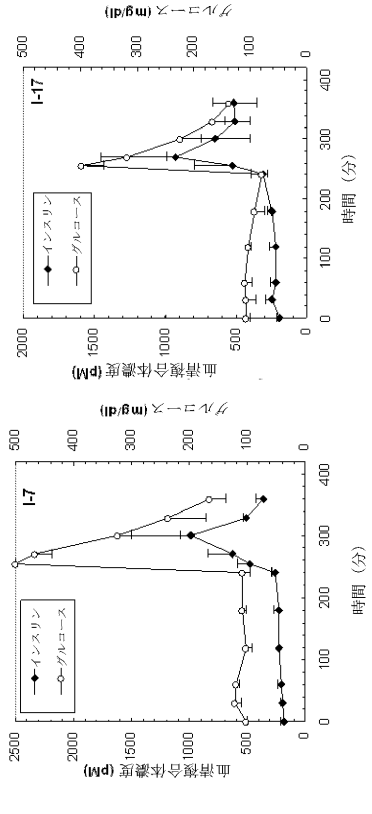


Figure ４０－２

【図４０－３】

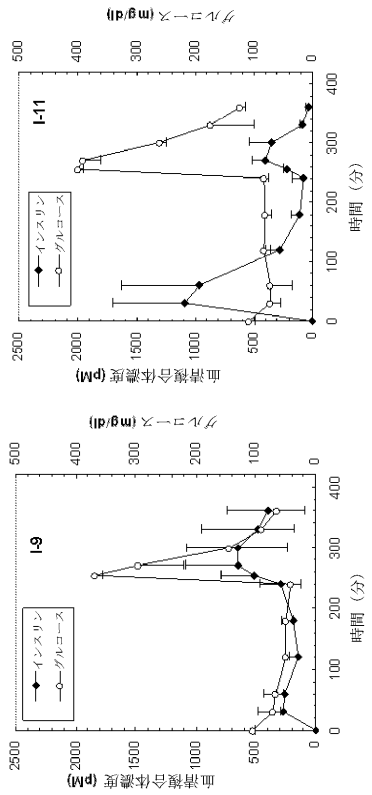


Figure ４０－３

【図４１】

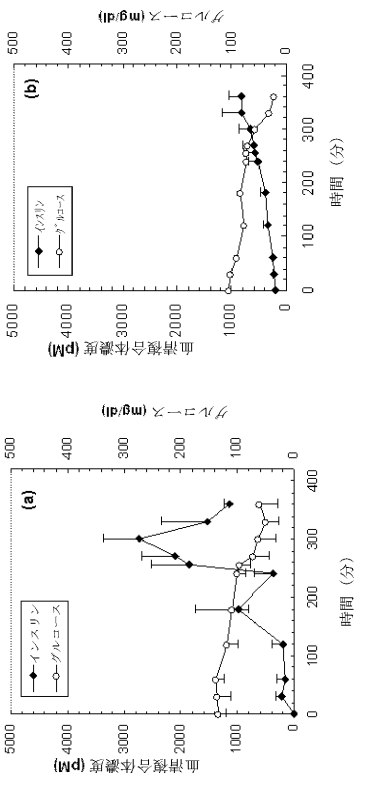


Figure 41

【図４２－１】

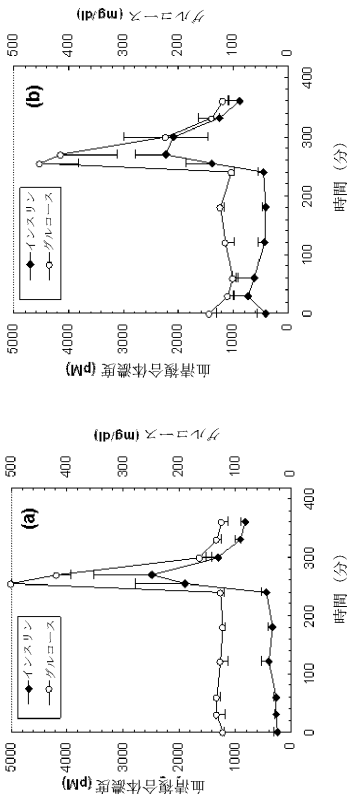


Figure 38

【図４２－２】

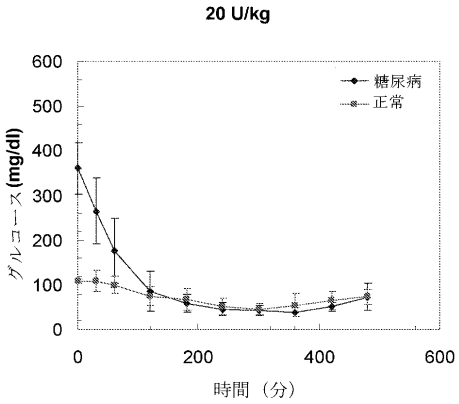


Figure ４２－２

【図４３】

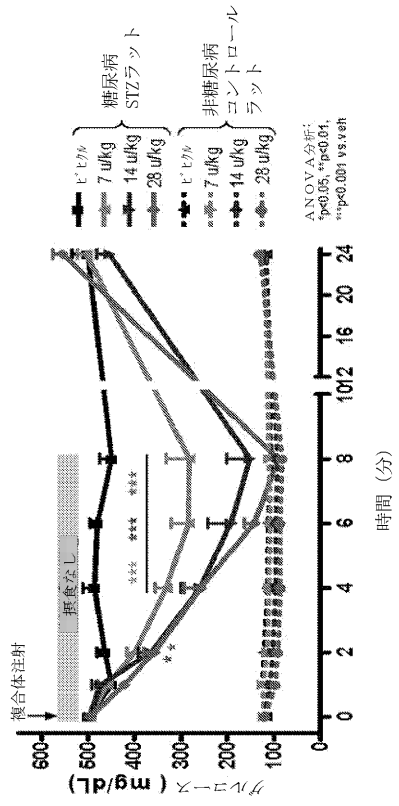


Figure 43

【図４４】

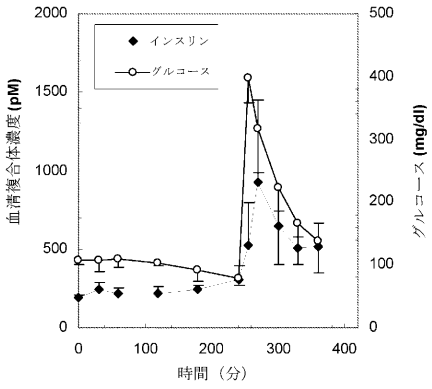
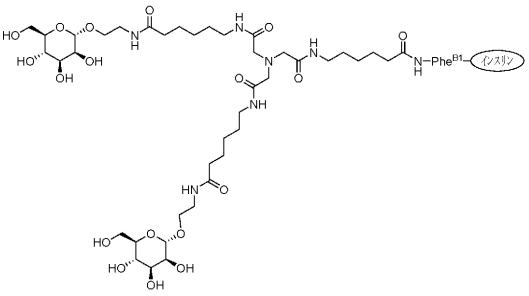
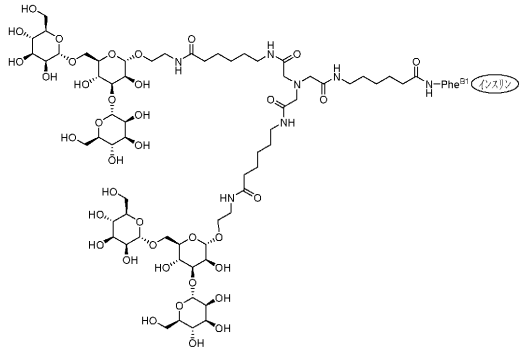


Figure 44

【図４５－１】



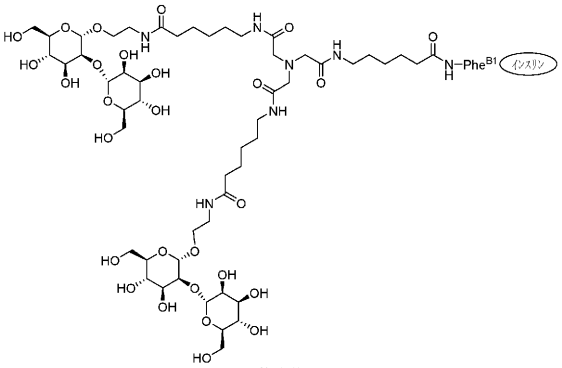
複合体 **I-1**
TSAT-C6-AEM-2 (B1)



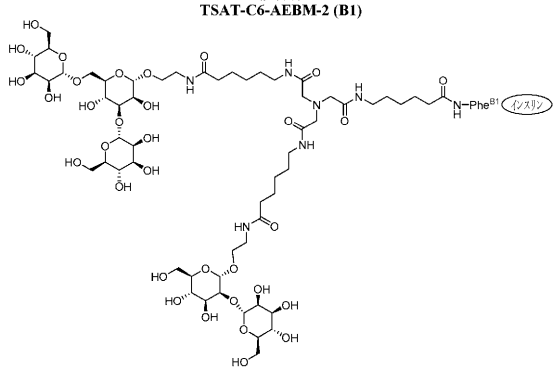
複合体 **I-2**
TSAT-C6-AETM-2 (B1)

Figure ４５－１

【図４５－２】



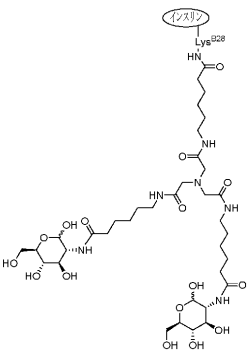
複合体 **I-3**
TSAT-C6-AEBM-2 (B1)



複合体 **I-4**
TSAT-C6-AEBM-1-AETM-1 (B1)

Figure ４５－２

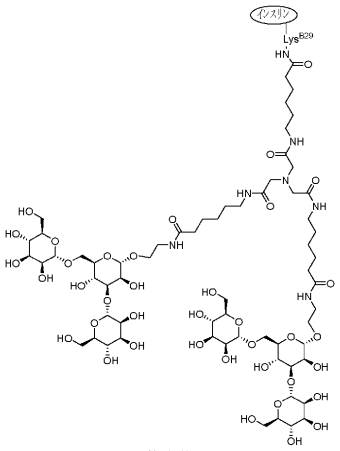
【図４５－３】



複合体 **I-5**
TSAT-C6-GA-2 (B29)

Figure ４５－３

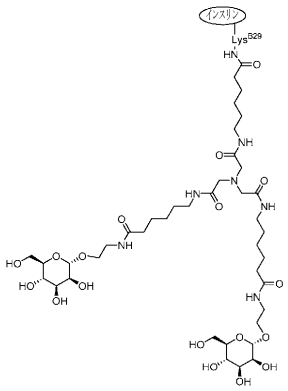
【図４５－４】



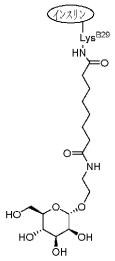
複合体 **I-6**
TSAT-C6-AETM-2 (B29)

Figure ４５－４

【図４５－５】



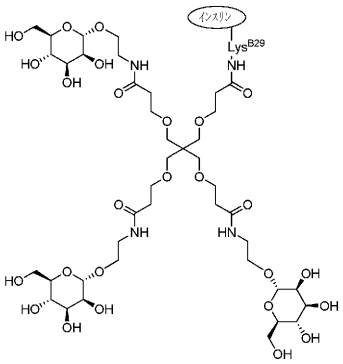
複合体**I-7**
TSAT-C6-AEM-2 (B29)



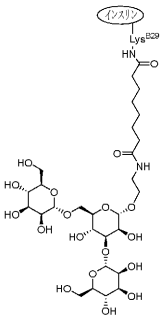
複合体**I-8**
DSS-AEM-1 (B29)

Figure ４５－５

【図４５－６】



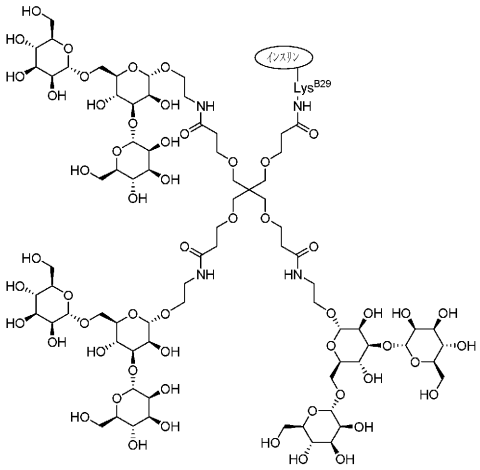
複合体**I-9**
TSPE-AEM-3 (B29)



複合体**I-10**
DSS-AETM-1 (B29)

Figure ４５－６

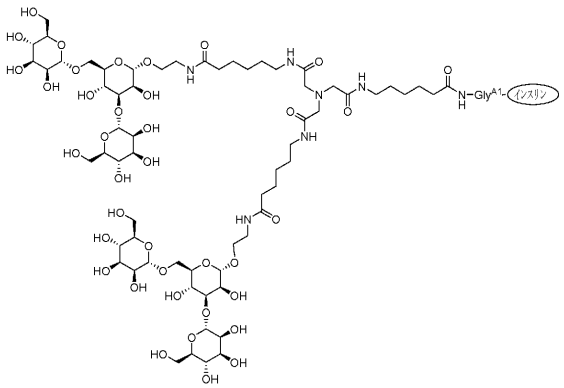
【図４５－７】



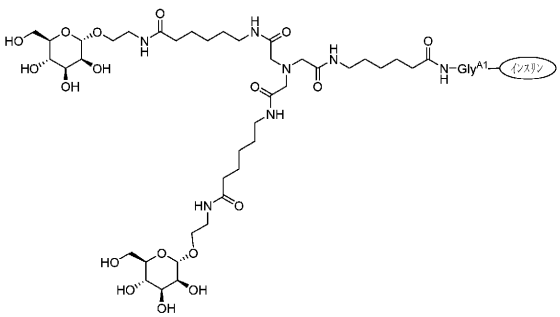
複合体**I-11**
TSPE-AETM-3 (B29)

Figure ４５－７

【図４５－８】



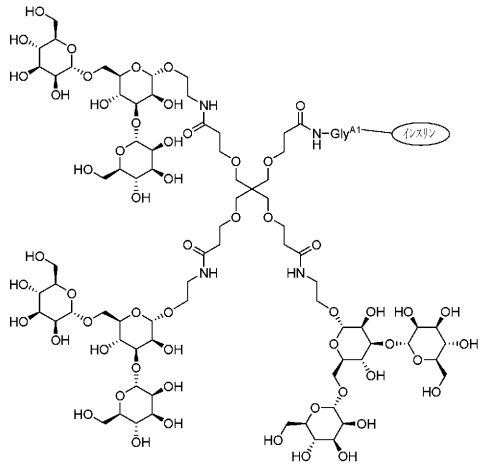
複合体**I-12**
TSAT-C6-AETM-2 (A1)



複合体**I-13**
TSAT-C6-AEM-2 (A1)

Figure ４５－８

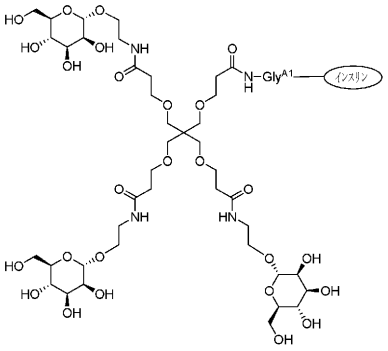
【図４５－９】



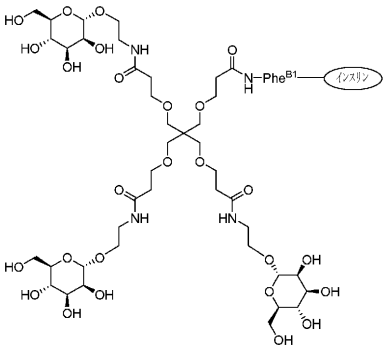
複合体 **I-14**
TSPE-AETM-3 (A1)

Figure ４５－９

【図４５－１０】



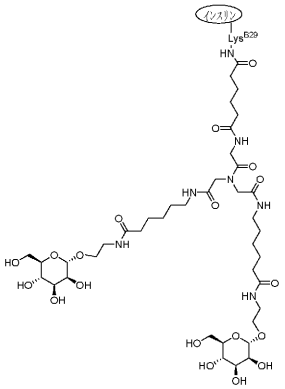
複合体 **I-15**
TSPE-AEM-3 (A1)



複合体 **I-16**
TSPE-AEM-3 (B1)

Figure ４５－１０

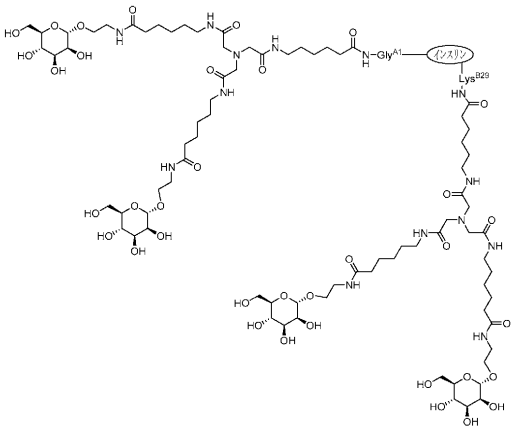
【図４５－１１】



複合体 **I-17**
C6-Amide-AEM-2 (B29)

Figure ４５－１１

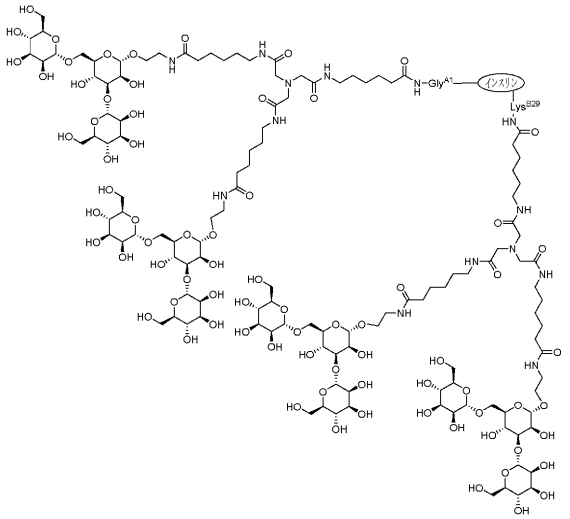
【図４５－１２】



複合体 **II-1**
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1,B29)

Figure ４５－１２

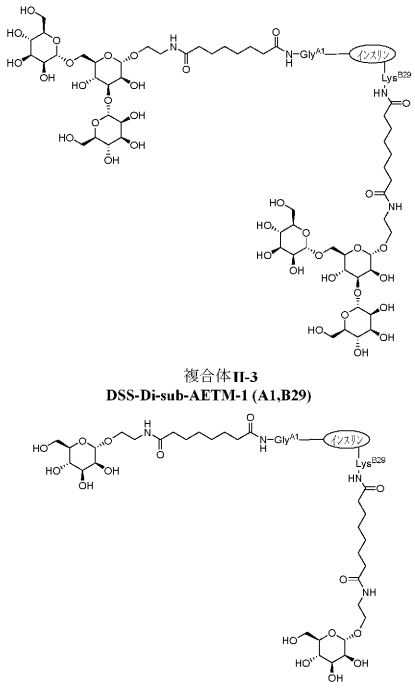
【図４５－１３】



複合体 **II-2**
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1,B29)

Figure ４５－１３

【図４５－１４】

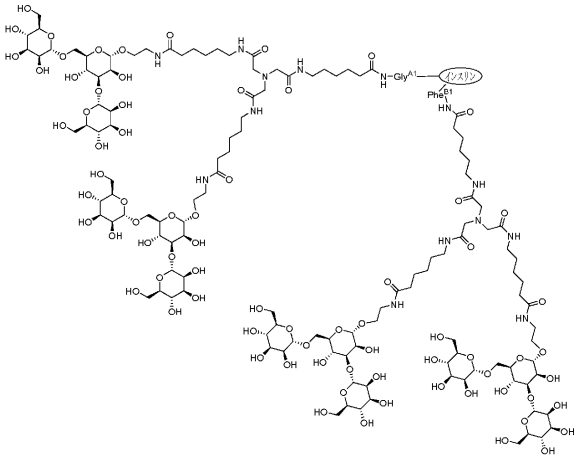


複合体 **II-3**
DSS-Di-sub-AETM-1 (A1,B29)

複合体 **II-4**
DSS-Di-sub-AEM-1 (A1,B29)

Figure ４５－１４

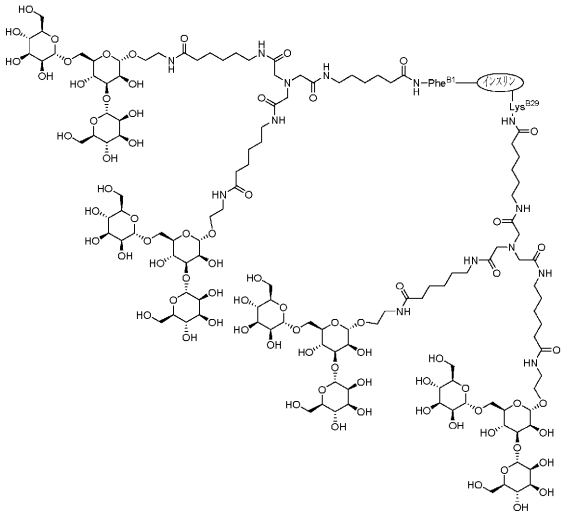
【図４５－１５】



複合体 **II-5**
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1,B1)

Figure ４５－１５

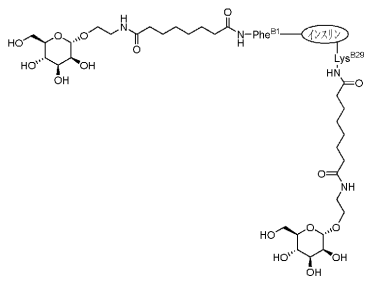
【図４５－１６】



複合体 **II-6**
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (B1,B29)

Figure ４５－１６

【図４５－１７】



複合体 **II-7**
DSS-Di-sub-AETM-2 (B1,B29)

Figure ４５－１７

【図４６】

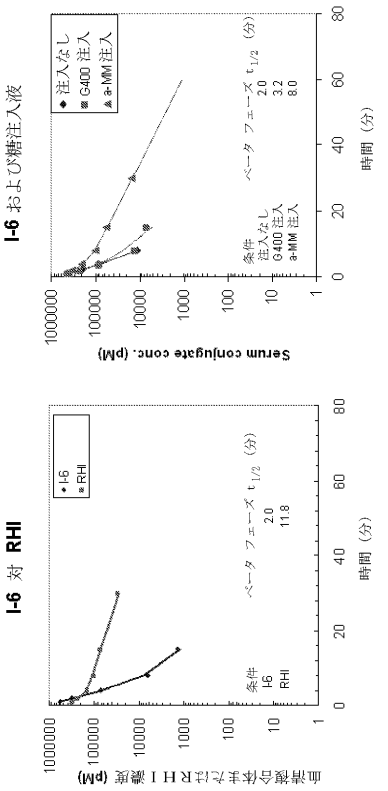


Figure 46

【図４７－１】

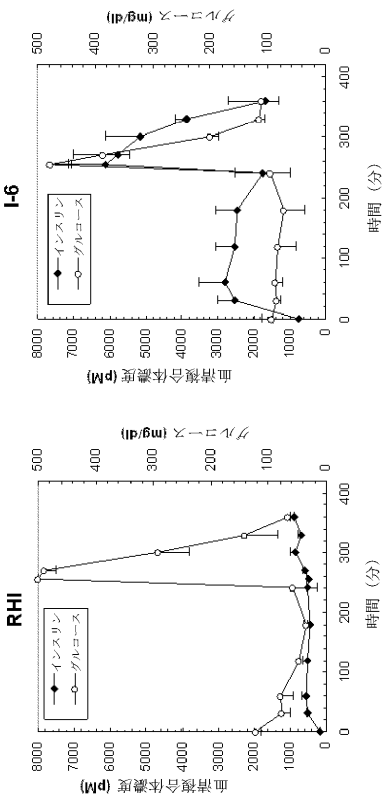


Figure ４７－１

【図４７－２】

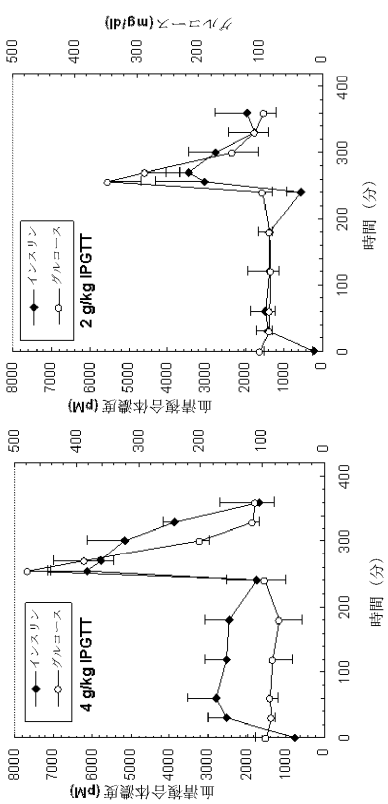


Figure ４７－２

【図４７－３】

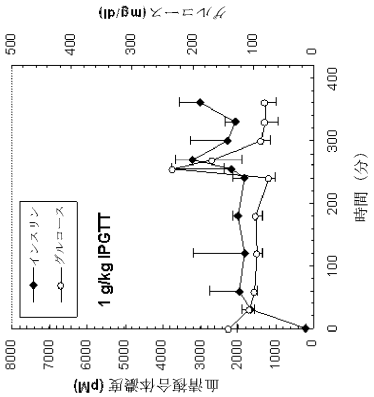
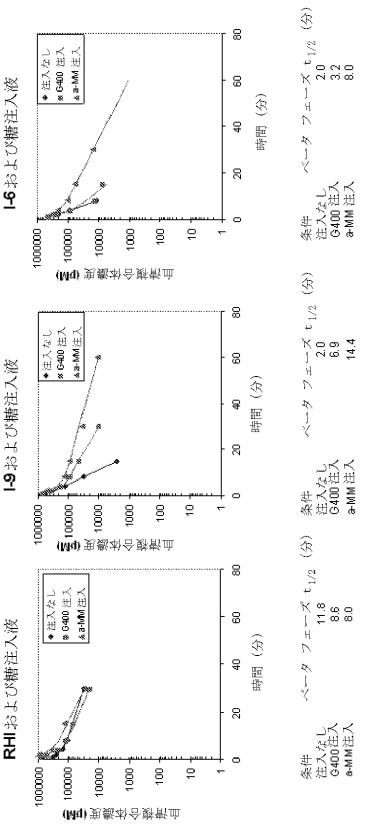


Figure ４７－３

【図４８】



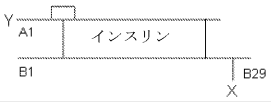
条件	ベータ フェーズ $t_{1/2}$ (分)
注入なし	11.8
G400注入	8.6
a-MM注入	8.0

条件	ベータ フェーズ $t_{1/2}$ (分)
注入なし	2.0
G400注入	6.9
a-MM注入	14.4

条件	ベータ フェーズ $t_{1/2}$ (分)
注入なし	2.0
G400 注入	3.2
a-MM 注入	8.0

Figure 48

【図４９】



製剤	ｽｶﾌｫｰﾙﾄﾞ－X	ｽｶﾌｫｰﾙﾄﾞ－Y	糖 (n)
RHI	n/a	n/a	n/a
I-7: AEM-2	n/a	TSAT-C_6	AEM (2)
I-6: AETM-2	n/a	TSAT-C_6	AETM (2)
I-11: AETM-3	n/a	TSPE	AETM (3)
II-2: Di-sub-AETM-2	TSAT-C_6	TSAT-C_6	AETM (2x2)

Figure 49

【図５０】

製剤	各種類の注入のベータ フェーズ半減期（分）		
	生理食塩水	グルコース	α メチルシンナーム
RHI	2.7	2.3	3.3
I-7: AEM-2	5.5	5.8	5.4
I-6: AETM-2	4.8	3.3	8.1
I-11: AETM-3	6.7	3.7	10.8
II-2: Di-sub-AETM-2	2.5	n/a	20.3

Figure 50

【図５１】

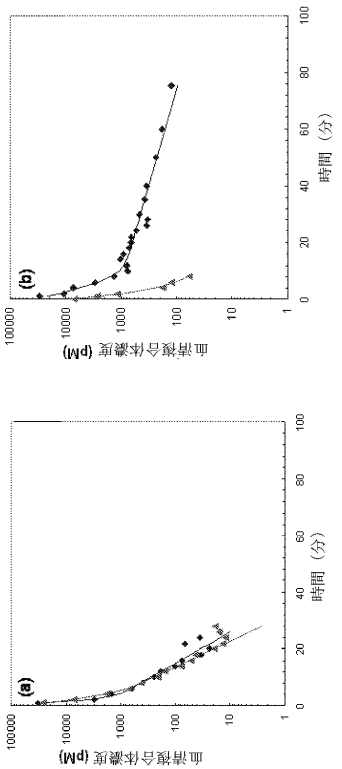


Figure 51

【図５２】

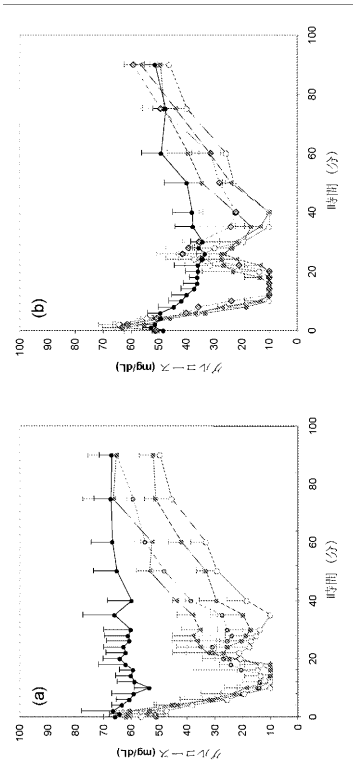


Figure 52

【図５３】

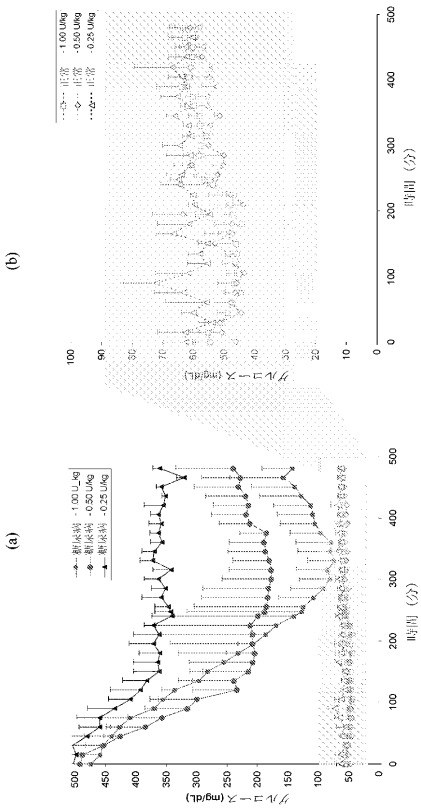


Figure 53

【図５４】

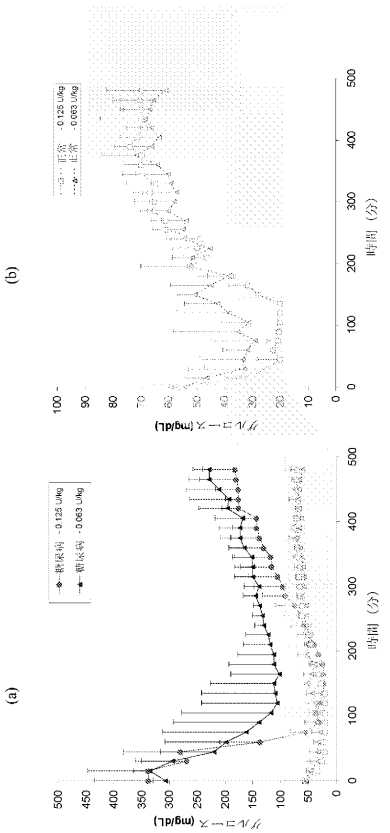
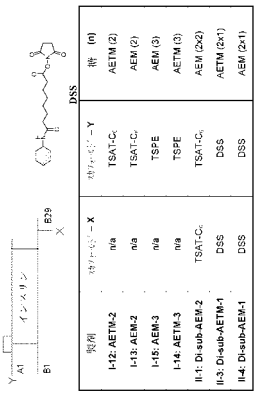


Figure 54

【図５５】



類例	官能基 – X	官能基 – Y	例 (n)
I-12: AETM-2	n/a	TSAT-C_6	AETM (2)
I-13: AEM-2	n/a	TSAT-C_6	AEM (2)
I-15: AEM-3	n/a	TSPE	AEM (3)
I-14: AETM-3	n/a	TSPE	AETM (3)
II-1: DI-sub-AEM-2	TSAT-C_6	TSAT-C_6	AEM (2x2)
II-3: DI-sub-AETM-1	DSS	DSS	AETM (2x1)
II-4: DI-sub-AEM-1	DSS	DSS	AEM (2x1)

Figure 55

【図５６】

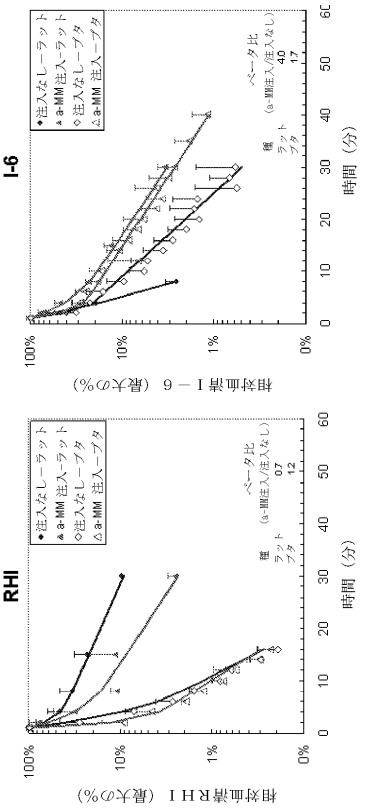


Figure 56

【図５７】

インスリン－複合体	糖組成	$t_{1/2\beta}$ (a-MM)/ $t_{1/2\beta}$ (注入なし)
II-2	B29: AETMx2, A1: AETMx2	8.1
I-12	A1: AETMx2	2.3
I-6	B29: AETMx2	1.7
I-11	B29: AETMx3	1.6
I-9	B29: AEMx3	1.6
II-1	B29: AEMx2, A1: AEMx2	1.5
II-3	B29: AETMx1, A1: AETMx1	1.3
RHI	n/a	1.2
I-7	B29: AEMx2	1.0
II-4	B29: AEMx1, A1: AEMx1	0.9

Figure 57

【図５８】

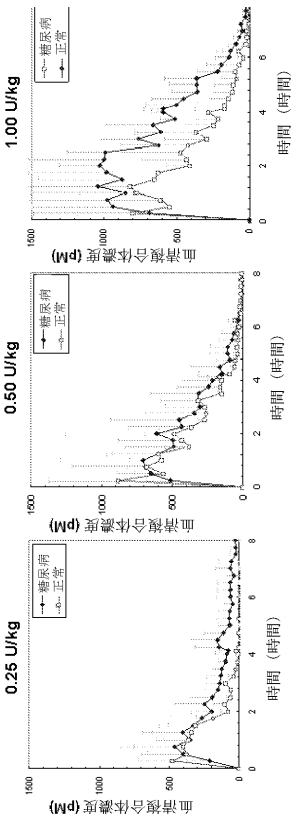


Figure 58

【図６１】

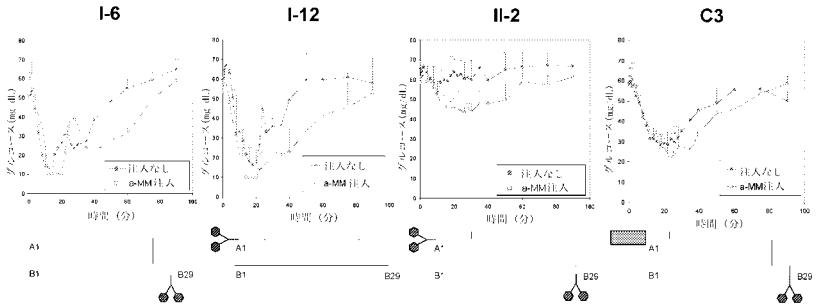


Figure 61

【図６２】

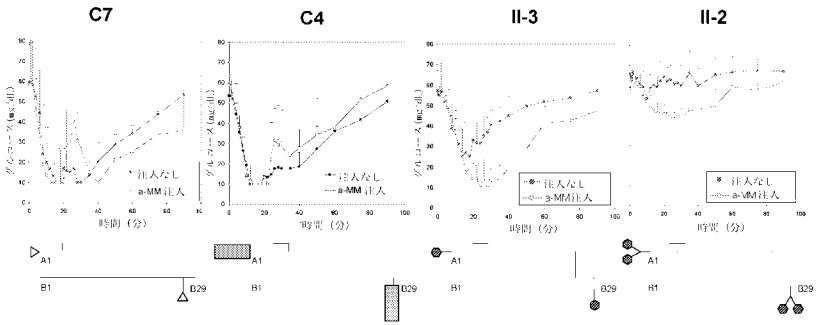
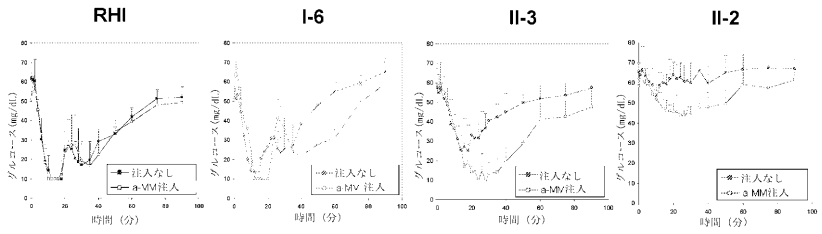


Figure 62

【図５９】



製剤	AOC 比 (a-MM／注入なし)	$t_{1/2,\beta}$ (a-MM)/ $t_{1/2,\beta}$ (注入なし)
RHI	0.99	1.2
I-6	1.36	1.6
II-3	2.34 ←	1.3 ←
II-2	2.58 ←	8.1 ←

糖依存性半減期と生物活性の間に相関関係を欠く

Figure 59

【図６０】

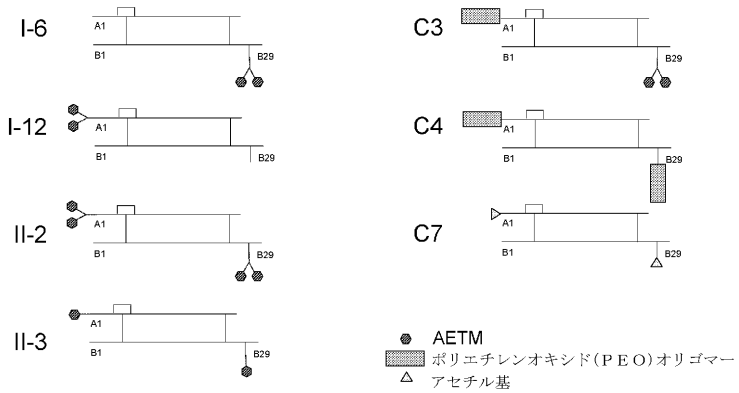


Figure 60

【図６３】

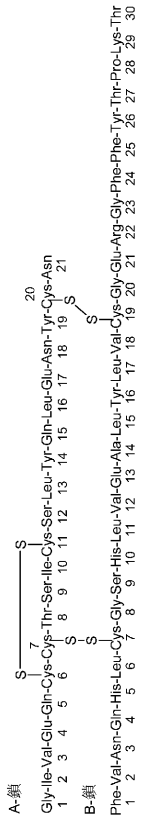


Figure 63

【配列表】

0005508438000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/223,572
(32)優先日 平成21年7月7日(2009.7.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/162,107
(32)優先日 平成21年3月20日(2009.3.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/147,878
(32)優先日 平成21年1月28日(2009.1.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/219,897
(32)優先日 平成21年6月24日(2009.6.24)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/159,643
(32)優先日 平成21年3月12日(2009.3.12)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 230105223
弁護士 城山 康文
(72)発明者 ジオン, トツド・シー
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１９４５、マーブルヘツド、エバンズ・ロード・４５
(72)発明者 ランキヤスター, トーマス・エム
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０２１８０、ストーンハム、エルム・ストリート・６５

審査官 平井 裕彰

(56)参考文献 米国特許出願公開第２００７／００９９８２０（ＵＳ，Ａ１）
特表２００３－５３５１０６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ３１／００～３１／８０
９／００～ ９／７２
４７／００～４７／４８
４５／００～４５／０８
３８／００～３８／５８