(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-530473
(P2019-530473A)
(43)公表日　令和1年10月24日(2019.10.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/17	(2006.01)	C12N	15/17		4B064
C07K 14/62	(2006.01)	C07K	14/62	ZNA	4C084
C07K 7/64	(2006.01)	C07K	7/64		4H045
C12P 21/06	(2006.01)	C12P	21/06		
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 44 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-533714 (P2019-533714)
(86)(22)出願日　平成29年9月5日 (2017.9.5)
(85)翻訳文提出日　平成31年4月16日 (2019.4.16)
(86)国際出願番号　PCT/IB2017/055336
(87)国際公開番号　WO2018/047062
(87)国際公開日　平成30年3月15日 (2018.3.15)
(31)優先権主張番号　20160100458
(32)優先日　平成28年9月6日 (2016.9.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
ギリシャ (GR)

(71)出願人　519077311
ケミカル　アンド　バイオファーマスーティカル　ラボラトリーズ　オブ　パトラ　エス．エー．
ＣＨＥＭＩＣＡＬ　＆　ＢＩＯＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＩＥＳ　ＯＦ　ＰＡＴＲＡＳ　Ｓ．Ａ．
ギリシャ国　ジーアール－２６０００　パトラ　ブロック１　インダストリアル　エリア　オブ　パトラ　ビルディング
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(74)代理人　100102255
弁理士　小澤　誠次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】プロインスリン誘導体

(57)【要約】
本発明の第１の態様は、式（Ｉ）：Ａ－Ｃ－Ｂ（Ｉ）［式中、Ａは、インスリンのＡ鎖又はその機能性誘導体若しくはバリアントであり、Ｂは、インスリンのＢ鎖又はその機能性誘導体若しくはバリアントであり、Ｃは、式：$(X_1)_p-(X_2)_n-(X_3)_q$（式中、各X_1及びX_3は、独立して塩基性アミノ酸であり、各X_2は、独立して天然又は非天然のアミノ酸であり、ｐは１又は２であり、ｑは０、１又は２であり、ｎは０、１、２又は３である）のペプチドである］のポリペプチド化合物に関する。本発明のさらなる態様は、前述のポリペプチド化合物を含む医薬組成物、及びその治療的使用に関する。別の態様は、インスリン及びその誘導体の調製における前述のポリペプチド化合物の使用に関する。

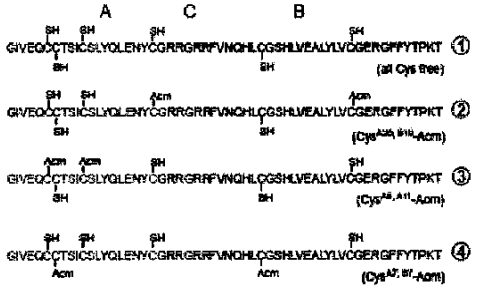


FIGURE 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）：
Ａ－Ｃ－Ｂ　（Ｉ）
［式中、
Ａは、インスリンのＡ鎖又はその機能性誘導体若しくはバリアントであり、
Ｂは、インスリンのＢ鎖又はその機能性誘導体若しくはバリアントであり、
Ｃは、式：
$(X_1)_p-(X_2)_n-(X_3)_q$
（式中、
各X_1及びX_3は、独立して塩基性アミノ酸であり、
各X_2は、独立して天然又は非天然のアミノ酸であり、
ｐは１又は２であり、
ｑは０、１又は２であり、
ｎは０、１、２又は３である）
のペプチドである］
のポリペプチド化合物。
【請求項２】
各X_2が、塩基性アミノ酸、Ｇｌｙ、β－Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｈｙｐ、シュードプロリン、及び酸性又は親水性アミノ酸から独立して選択される、請求項１に記載のポリペプチド化合物。
【請求項３】
酸性又は親水性アミノ酸が、Ｓｅｒ、Ａｓｐ、及びＧｌｕから選択される、請求項２に記載のポリペプチド化合物。
【請求項４】
塩基性アミノ酸が、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｏｒｎ、及びＨｉｓから選択される、請求項１～３のいずれかに記載のポリペプチド化合物。
【請求項５】
各X_2が、Ｇｌｙ及びＡｒｇから独立して選択される、請求項１～４のいずれかに記載の化合物。
【請求項６】
X_1及びX_3が、共にＡｒｇである、請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド化合物。
【請求項７】
ｐ及びｑが、共に２である、請求項１～６のいずれかに記載のポリペプチド化合物。
【請求項８】
ｎが、１又は２である、請求項１～７のいずれかに記載のポリペプチド化合物。
【請求項９】
ｎが、１である、請求項１～８のいずれかに記載のポリペプチド化合物。
【請求項１０】
Ａが、天然インスリン、好ましくは、ヒトインスリンのＡ鎖又はそのバリアントである、請求項１～９のいずれかに記載のポリペプチド化合物であって、（ａ）１又は２以上のアミノ酸残基が、天然に存在する又は天然に存在しないアミノ酸残基で置換されているか、（ｂ）２又は３以上のアミノ酸残基の順序が逆転しているか、（ｃ）１、２又は３個のアミノ酸が欠失しているか、（ｄ）スペーサー基が、任意の２つのアミノ酸残基間に存在するか、（ｅ）１又は２以上のアミノ酸残基が、ペプトイドの形態であるか、（ｆ）ペプチドの１又は２以上のアミノ酸残基の（Ｎ－Ｃ－Ｃ）主鎖が、修飾されているか、（ｇ）１又は２個以上の追加のアミノ酸が、Ｎ末端及び／又はＣ末端に存在するか、又は（ａ）～（ｇ）のいずれかの組合せである、前記ポリペプチド化合物。
【請求項１１】

Ｂが、天然インスリン、好ましくは、ヒトインスリンのＢ鎖又はそのバリアントである、請求項１～１０のいずれかに記載のポリペプチド化合物であって、（ａ）１又は２以上のアミノ酸残基が、天然に存在する又は天然に存在しないアミノ酸残基で置換されているか、（ｂ）２又は３以上のアミノ酸残基の順序が逆転しているか、（ｃ）１、２又は３個のアミノ酸が欠失しているか、（ｄ）スペーサー基が、任意の２つのアミノ酸残基間に存在するか、（ｅ）１又は２以上のアミノ酸残基が、ペプトイドの形態であるか、（ｆ）ペプチドの１又は２以上のアミノ酸残基の（Ｎ－Ｃ－Ｃ）主鎖が、修飾されているか、（ｇ）１又は２個以上の追加のアミノ酸が、Ｎ末端及び／又はＣ末端に存在するか、又は（ａ）～（ｇ）のいずれかの組合せである、前記ポリペプチド化合物。

【請求項１２】

Ｃが、配列番号１、

ＲＲＧＲＲ　［配列番号１］

に示される配列のペプチドである、請求項１～１１のいずれかに記載のポリペプチド化合物。

【請求項１３】

Ａが、配列番号２、

^{1}ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＧ^{21}　［配列番号２］

（式中、各アミノ酸が、非保護であるか、又は保護されていてもよい）

に示される配列のペプチドを含む、請求項１～１２のいずれかに記載のポリペプチド化合物。

【請求項１４】

Ｂが、配列番号３、

^{1}ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＦＹＴＰＫＴ^{30}　［配列番号３］

（式中、各アミノ酸が、非保護であるか、又は保護されていてもよい）

に示される配列のペプチドを含む、請求項１～１３のいずれかに記載のポリペプチド化合物。

【請求項１５】

配列番号４～７、

【化１】

配列番号4
^{1}GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT^{56}

配列番号5
^{1}GIVEQCCTSICSLYQLENY**C**GRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLV**C**GERGFFYTPKT^{56}

配列番号6
^{1}GIVEQ**C**CTSI**C**SLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT^{56}

配列番号7
^{1}GIVEQC**C**TSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHL**C**GSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT^{56}

（式中、配列番号４～７において、下線と太字で示されたＣは、保護基で保護されたシステインを示し、Ｃは、非保護のシステインを示す）

から選択される、請求項１～１４のいずれかに記載のポリペプチド化合物。

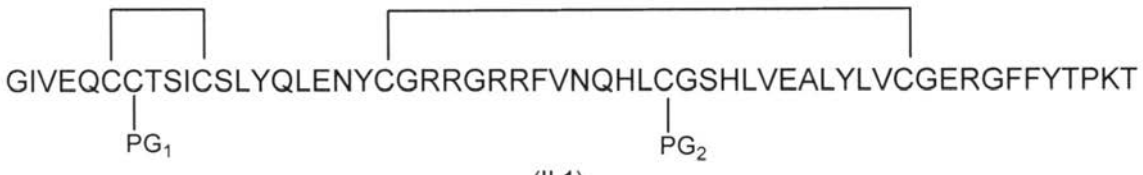
【請求項１６】

システイン保護基が、Ａｃｍ又はＴｒｔである、請求項１５に記載のポリペプチド化合物。
【請求項１７】
式（Ｉ．１）：
【化２】



(I.1)

（式中、PG_1及びPG_2は、それぞれ独立してシステイン保護基である）
のポリペプチドである、請求項１～１６のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項１８】
インスリン又はその誘導体を調製する方法であって、
（ｉ）請求項１～１７のいずれかに記載のポリペプチド化合物を調製するステップと、
（ii）前記ポリペプチドを切断してＣペプチドを切り出すステップと
を含む、前記方法。
【請求項１９】
インスリンＡ鎖７位のシステイン残基及びインスリンＢ鎖７位のシステイン残基が、それぞれ保護基で保護されている、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
保護基が、Ａｃｍ又はＴｒｔ、より好ましくはＡｃｍである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
ポリペプチド化合物の段階的な酸化的フォールディングを含む、請求項１９又は２０に記載の方法であって、
（ｉ）請求項１９に記載のペプチドを酸化して第１の中間体を形成するステップと、
（ii）前記第１の中間体を酸化して第２の中間体を形成するステップと、
（iii）前記第２の中間体を切断してＣペプチドを切り出すステップと
を含む、前記方法。
【請求項２２】
ステップ（ｉ）が、請求項１９に記載のペプチドをＤＭＳＯで処理するステップを含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
ステップ（ii）が、第１の中間体を酢酸／水中のヨウ素で処理するステップを含む、請求項２１又は２２に記載の方法。
【請求項２４】
ステップ（iii）が、第２の中間体をトリプシンで処理するステップを含む、請求項２１～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】
式（II．１）：
【化３】



(II.1)

（式中、PG_1及びPG_2は、それぞれ独立してシステイン保護基である）
のポリペプチド化合物。
【請求項２６】
式（III．１）：
【化４】



(III.1)

のポリペプチド化合物。
【請求項２７】
インスリン又はその誘導体の調製における、請求項１～１７のいずれかに記載のペプチド化合物の使用。
【請求項２８】
１又は２つ以上の薬学的に許容されるその担体、賦形剤又は希釈剤と共に、有効成分として請求項１～１７、２５及び２６のいずれかに記載のポリペプチド化合物を含む医薬製剤。
【請求項２９】
請求項１～１７に記載のペプチド化合物のいずれかをコードするＤＮＡ配列。
【請求項３０】
請求項２９に記載のＤＮＡ化合物を含む組換えＤＮＡベクター。
【請求項３１】
請求項１～１７のいずれかに記載のポリペプチド化合物を遺伝子組換えにより調製する方法であって、
（ｉ）請求項１～１７のいずれかに記載のポリペプチド化合物をコードするＤＮＡ配列を構築するステップと、
（ii）前記ＤＮＡ配列を、宿主細胞中で機能するプロモーター－オペレーター領域を含有する、適切なベクター中に組み込むステップと、
（iii）前記ベクター中の前記ＤＮＡ配列を、前記ＤＮＡ配列の転写及び翻訳を達成し、さらに前記ＤＮＡ配列が、前記プロモーター－オペレーター領域の転写制御下になるように方向付けるステップと、
（iv）前記宿主細胞を、前記ベクターを用いて形質転換するステップと、
（ｖ）形質転換した前記宿主細胞を、前記遺伝子の転写及び翻訳を誘導するのに適した条件下で培養するステップと、
（vi）前記ＤＮＡ配列によりコードされたポリペプチド生成物を回収及び精製するステップと
を含む、前記方法。
【請求項３２】
固相ペプチド合成を使用して、請求項１～１７のいずれかに記載のポリペプチド化合物を調製する方法。
【請求項３３】
インスリン又はその誘導体を調製する方法であって、
（ｉ）請求項１～１７のいずれかに記載のポリペプチド化合物をコードするＤＮＡ配列を構築するステップと、
（ii）前記ＤＮＡ配列を、宿主細胞中で機能するプロモーター－オペレーター領域を含有する、適切なベクター中に組み込むステップと、
（iii）前記ベクター中の前記ＤＮＡ配列を、前記ＤＮＡ配列の転写及び翻訳を達成し、

さらに前記ＤＮＡ配列が、前記プロモーター－オペレーター領域の転写制御下になるように方向付けるステップと、
（ｉｖ）前記宿主細胞を、前記ベクターを用いて形質転換するステップと、
（ｖ）形質転換した前記宿主細胞を、前記遺伝子の転写及び翻訳を誘導するのに適した条件下で培養するステップと、
（ｖｉ）前記ＤＮＡ配列によりコードされたポリペプチド生成物を回収及び精製するステップと、
（ｖｉｉ）前記遺伝子によりコードされた前記ポリペプチド生成物を切断してＣペプチドを切り出すステップと
を含む、前記方法。

【請求項３４】
医薬における使用のための、請求項１～１７、２５及び２６のいずれかに記載のポリペプチド化合物。
【請求項３５】
糖尿病の治療における使用のための、請求項１～１７、２５及び２６のいずれかに記載のポリペプチド化合物。
【請求項３６】
２型糖尿病の治療における使用を目的とした、請求項３５に記載の使用のためのポリペプチド化合物。
【請求項３７】
それを必要とする対象における糖尿病を治療する、又は高血糖症を治療若しくは予防する方法であって、治療上有効量の請求項１～１７のいずれかに記載のポリペプチド化合物を対象に投与するステップを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、インスリンの調製において応用性を有する、プロインスリン誘導体、より詳細には、反転プロインスリン誘導体に関する。本発明のプロインスリン誘導体はまた、それ自体で治療用成分としての有望な応用性を有する。
【背景技術】
【０００２】
インスリン及びその誘導体は、年間２００億を超える売上を有し、市場は着実に拡大している、糖尿病の治療に最も重要な薬物である。
【０００３】
インスリンは、膵臓のβ細胞により分泌されるペプチドホルモンである。これは、２つの分子間ジスルフィド結合により連結された２つのペプチド鎖、Ａ及びＢからなる。Ａ鎖はまた、さらなる分子内ジスルフィド結合を含有する。ヒトインスリンは、構造２を有する。
【０００４】
【化１】



構造2=ヒトインスリン

【０００５】

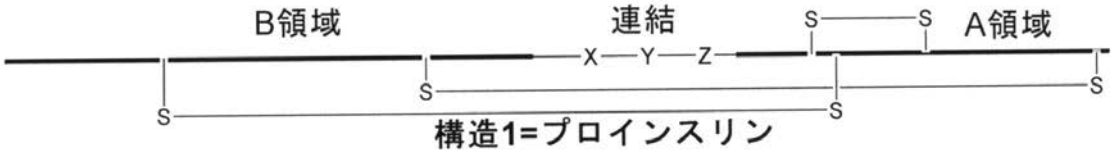
インスリンは、一般的には、遺伝子組換えにより産生されるプロインスリンから（数百ｋｇで）大量生産される。続いてプロインスリンがフォールディングされ、連結しているＣペプチドが、トリプシン及びカルボキシペプチダーゼＢを用いて酵素により除去されて、成熟インスリンペプチドが生じる。

【０００６】

より詳細には、インスリンは、単鎖の前駆体である、プレプロインスリンとして産生され、このプレプロインスリンは、アミノ酸２４個のプロペプチドからなり、後に８６個のアミノ酸を含有するプロインスリンとなる。プレプロペプチドの配列は、プレペプチド－［Ｂ鎖］－Ａｒｇ－Ａｒｇ－［連結ペプチド］－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－［Ａ鎖］であり、ここで、連結ペプチドは、３１個のアミノ酸からなる。プレペプチドが酵素により除去された後、３つのジスルフィド結合が形成され、プロインスリンが産生される。

【０００７】

【化２】



【０００８】

次いで、連結ペプチドをＡｒｇ－Ａｒｇ及びＬｙｓ－Ａｒｇ部位で酵素により切断することによって成熟インスリンを遊離させる。

【０００９】

受容体に結合するための必須残基、すなわちＡ鎖のＮ末端アミノ官能基及びＢ鎖のＣ末端カルボキシ官能基がブロックされるため、プロインスリンは、天然インスリンの１００分の１の、インスリン受容体に対する親和性を有する。インスリンの安定性及び溶解性特性は、インスリン療法において重要である。いくつかのインスリンアナログが、当分野で知られている。例として、インスリン活性を有する単鎖インスリンアナログが、欧州特許第１１９３２７２号明細書に開示されている。このような単鎖インスリンは、アミノ酸５～１８個の修飾したＣペプチドを有し、最大４２％のインスリン活性を有すると報告されている。

【００１０】

米国特許第５，５９７，７９６号明細書は、２又は３以上のアミノ酸残基をＧｌｕ及び／又はＡｓｐで置換する、インスリンアナログを開示している。同様に、米国特許出願公開第２００９／００６９２１６号明細書及び国際公開第２００７／０９６３３２号パンフレットは、修飾したＢ鎖及び連結ペプチドを含有する速効性単鎖インスリンを開示している。生成するアナログは、経皮投与に特によく適している。耐フィブリル化インスリン及びインスリンアナログは、米国特許第８，１９２，９５７号明細書に開示されている。ペグ化単鎖インスリンは、米国特許出願公開第２０１０／０２１６６９０号明細書に開示されており、一方、アシル化単鎖インスリンは、国際公開第２００７／１０４７３８号パンフレットに開示されている。

【００１１】

国際公開第２００５／０５４２９１号パンフレットは、Ａ鎖及びＢ鎖がアミノ酸５～１１個の連結ペプチドで連結されている、単鎖インスリンアナログを開示している。同様に、国際公開第９５／１６７０８号パンフレットもまた、Ｃ末端アミノ酸残基がＬｙｓ又はＡｒｇ以外である、Ａ鎖及びＢ鎖がアミノ酸１～１５個の連結ペプチドで連結されている、単鎖インスリンアナログを開示している。欧州特許第０４２７２９６号明細書は、一般式Ｂ（１－２９）－$Ｘ_{n}$－Ｙ－Ａ（１－２１）（式中、$Ｘ_{n}$は、ｎ残基の天然発生アミノ

酸残基を有するペプチド鎖であり、ｎは０～３３であり、ＹはＡｒｇ又はＬｙｓである）のヒトインスリン前駆体を開示している。同様に、欧州特許第０７４１１８８号明細書は、顕著なインスリン活性を有する式ｂ－ＢＰ－ａ（ＢＰは、アミノ酸１０～１４個の架橋ペプチドである）の単鎖インスリン誘導体を開示している。このような単鎖インスリンは、インスリン活性を有するが、ＩＧＦ－１受容体に対する高い親和性をも有すると報告されている。数々の取組みにもかかわらず、化学的及び経済的に実現可能なインスリンへの道は、未だ開発されていない。現在までに適用されている方法としては、直鎖状Ａ及びＢ鎖のランダム混合及びその空気酸化、スルホン化したＡ及びＢ鎖の混合、３つのジスルフィド結合の部位特異的構築、並びに単鎖前駆体の生体模倣的フォールディングが挙げられる（Sohma, Y. and Kent, S. B. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 16313-16318及びTofteng, A. P.; Jensen, K. J.; Schaffer, L.; Hoeg-Jensen, T. Chem-BioChem 2008, 9, 2989-2996）。

【００１２】

Ｃペプチドが結合したＡ－Ｃ－Ｂ「反転」プロインスリンはまた、インスリン誘導体をもたらすことが知られている。例として、欧州特許第０５１８５８７号明細書は、リンカーペプチドＣが、式X_1－X_2－Ｐ－X_3－X_4（式中、X_1～X_4は、塩基性アミノ酸であり、Ｐは、システイン残基を含有しないアミノ酸４～３５個のペプチドである）の断片である、Ａ－Ｃ－Ｂプロインスリン誘導体を開示している（W. F. Heath et al, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 1, p419-425もまた、参照されたい）。天然成熟プロインスリン又は逆転プロインスリンを正確にフォールディングするのに必要とされる柔軟性を有するために、天然又は反転プロインスリンのＣペプチドが、最小長のものでなければならないことが一般的に理解される。

【００１３】

本発明は、インスリンの調製において、また、それ自体で治療用成分として有用な、代替プロインスリン誘導体を提供しようとするものである。特に、本発明は、溶解性、活性、収率、純度及び／又は合成の容易さにおいて１又は２つ以上の利点をもたらす、プロインスリン誘導体を提供することを目的とする。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１４】

【特許文献１】欧州特許第１１９３２７２号明細書
【特許文献２】米国特許第５，５９７，７９６号明細書
【特許文献３】米国特許出願公開第２００９／００６９２１６号明細書
【特許文献４】国際公開第２００７／０９６３３２号パンフレット
【特許文献５】米国特許第８，１９２，９５７号明細書
【特許文献６】米国特許出願公開第２０１０／０２１６６９０号明細書
【特許文献７】国際公開第２００７／１０４７３８号パンフレット
【特許文献８】国際公開第２００５／０５４２９１号パンフレット
【特許文献９】国際公開第９５／１６７０８号パンフレット
【特許文献１０】欧州特許第０４２７２９６号明細書
【特許文献１１】欧州特許第０７４１１８８号明細書
【特許文献１２】欧州特許第０５１８５８７号明細書

【非特許文献】

【００１５】

【非特許文献１】Sohma, Y. and Kent, S. B. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 16313-16318
【非特許文献２】Tofteng, A. P.; Jensen, K. J.; Schaffer, L.; Hoeg-Jensen, T. Chem-BioChem 2008, 9, 2989-2996
【非特許文献３】W. F. Heath et al, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 1, p419-4255

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１６】
本発明は、プロインスリン誘導体、より詳細には、式Ａ－Ｃ－Ｂの反転プロインスリン誘導体に関する。
【課題を解決するための手段】
【００１７】
したがって、本発明の第１の態様は、式（Ｉ）：
Ａ－Ｃ－Ｂ　（Ｉ）
［式中、
Ａは、インスリンのＡ鎖又はその機能性誘導体若しくはバリアントであり、
Ｂは、インスリンのＢ鎖又はその機能性誘導体若しくはバリアントであり、
Ｃは、式：
$(X_1)_p-(X_2)_n-(X_3)_q$
（式中、
各X_1及びX_3は、独立して塩基性アミノ酸であり、
各X_2は、独立して天然又は非天然のアミノ酸であり、
ｐは１又は２であり、
ｑは０、１又は２であり、
ｎは０、１、２又は３である）
の連結ペプチドである］
のポリペプチド化合物に関する。
【００１８】
ここで特許請求される反転プロインスリン誘導体は、これが、より短い連結ペプチドを含有することにより当分野で公知のものとは異なる（これは「スーパーミニ」インスリンである）。驚くべきことに、本出願人は、７又は６個以下のアミノ酸を含有するＣペプチド（反転プロインスリンＡ－Ａｒｇ－Ｂ等の単一アミノ酸のみを有するものを含む）及びそれらの対応する保護された又は部分的に保護された誘導体が、有用なプロインスリン前駆体であることを見出した。
【発明を実施するための形態】
【００１９】
ここで特許請求されるペプチド化合物は、プロインスリンの固相化学的合成の改善を目的として開発された。
【００２０】
理想的には、ペプチドは、例えば、樹脂上でペプチド鎖を伸長する間にβターン及びβシートの形成を生じるもの等、問題のあるペプチド合成領域を含有してはならない。ここで特許請求されるペプチドは、天然のＢ－Ｃ－Ａの順序ではなくＡ－Ｃ－Ｂの順序の、反転したプロインスリン誘導体である。このような反転プロインスリン誘導体は、対応するＢ－Ｃ－Ａプロインスリンよりも合成的調製が容易であることが示されている。
【００２１】
好ましくは、本発明の反転プロインスリンは、βシート及びβターンの形成を妨害する残基をＣペプチド中に（例えば、アミノ酸X_2として）含む。この点について適切な残基は、Ｐｒｏ、Ｈｙｐ及びシュードプロリン（pseudoproline）を含む。このような残基をＣペプチド中へ挿入することにより、反転プロインスリンの効率的な合成が可能となる。
【００２２】
好ましくは、Ｃペプチドは、精製ステップで使用する溶媒への溶解性を向上させる残基を含有する。この点について適切な残基は、Ｐｒｏ、Ｈｙｐ、塩基性アミノ酸、例えば、ＡｒｇもしくはＬｙｓ、又は酸性及び親水性アミノ酸、例えば、Ｇｌｕ及びＳｅｒを含む。
【００２３】

高純度のプロインスリンを得るために、より小さい保護ペプチドを溶液中又は固相上に縮合し得る。好ましくは、縮合反応におけるラセミ化を回避するために、断片のＣ末端アミノ酸は、一般的にＧｌｙ、Ｐｒｏ、β－Ａｌａ及びそれらの構造中にオリゴ又はポリグリコール部分を含有するアミノ酸、例えば、－ＮＨ－（$CH_2CH_2O)_{n'}$－ＣＯ－の構造要素（式中、ｎ’は、例えば１～１０、より好ましくは１～５の整数である）から選択される。

【００２４】

好ましくは、Ｃペプチドの切り出しを容易にするために、１又は２個以上の塩基性アミノ酸をＡ鎖のＣ末端及びＢ鎖のアミノ末端に置く。すなわち、$(X_1)_p$（式中、ｐは１又は２である）、及び$(X_3)_q$（式中、ｑは１又は２である）とする。

【００２５】

本明細書において使用する場合、用語「バリアント」は、（ａ）１又は２以上のアミノ酸残基が、天然に存在する又は天然に存在しないアミノ酸残基で置き換えられているか、（ｂ）２又は３以上のアミノ酸残基の順序が逆転しているか、（ｃ）１、２又は３個のアミノ酸が欠失しているか、（ｄ）スペーサー基が、任意の２つのアミノ酸残基間に存在するか、（ｅ）１又は２以上のアミノ酸残基が、ペプトイドの形態であるか、（ｆ）ペプチドの１又は２以上のアミノ酸残基の（Ｎ－Ｃ－Ｃ）主鎖が、修飾されているか、（ｇ）１又は２個以上の追加のアミノ酸が、Ｎ末端及び／又はＣ末端に存在するか、又は（ａ）～（ｇ）のいずれかの組合せである、任意のバリアントを含む。好ましくは、バリアントは、（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）のうちの１つから生じる。

【００２６】

より好ましくは、１～５つのアミノ酸残基、又は１～４つのアミノ酸残基、又は１～３つのアミノ酸残基が、１又は２以上の他のアミノ酸残基で置換されている。よりさらに好ましくは、２つのアミノ酸残基が、別のアミノ酸残基で置換されている。よりさらに好ましくは、１つのアミノ酸残基が、別のアミノ酸残基で置換されている。好ましくは、置換は、相同置換である。

【００２７】

相同置換（本明細書では、存在するアミノ酸残基の代替残基との相互交換を示すのに、置換と置き換えが共に使用される）、すなわち、例えば、塩基性と塩基性、酸性と酸性、極性と極性等の同種置換が発生し得る。また、非相同置換、すなわちあるクラスの残基から別のクラスの残基への置換が生じる場合もあり、又はその代わりに、非天然アミノ酸、例えば、オルニチン、ジアミノ酪酸オルニチン、ノルロイシンオルニチン、ピリジルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン及びフェニルグリシン等の取り込みが生じる場合もある。そのより詳細な列挙を下記に示す。２以上のアミノ酸残基を同時に修飾し得る。

【００２８】

本明細書において使用する場合、アミノ酸を次のクラス；
塩基性；Ｈ、Ｋ、Ｒ
酸性；Ｄ、Ｅ
非極性；Ａ、Ｆ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｐ、Ｖ、Ｗ
極性；Ｃ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｙ
に従って分類し（国際的に認められた一文字のアミノ酸表記を使用して）、このようなクラスを使用して相同及び非相同置換を定義する。したがって、相同置換を使用して、同一のクラスの中から置換することを示し、一方、非相同置換は、異なるクラスから、又は非天然アミノ酸により置換することを示す。

【００２９】

担体部分の任意の２つのアミノ酸残基間に挿入し得る、適切なスペーサー基は、アミノ酸スペーサー、例えば、グリシン又はβアラニン残基等に加えて、アルキル基、例えば、メチル、エチル又はプロピル基を含む。ペプトイドの形態の１又は２以上のアミノ酸残基の存在を伴う、タイプ（ｅ）のさらなる変形形態は、当業者により十分に理解されている

と予想される。疑義の回避のため、「ペプトイドの形態」は、α炭素置換基が、残基のα炭素ではなく窒素原子上にある、バリアントアミノ酸残基を示すために使われる。ペプトイドの形態でペプチドを調製する方法は、例えば、Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371及びHorwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134等、当分野で公知である。タイプ（ｆ）の修飾は、国際出願第ＰＣＴ／ＧＢ９９／０１８５５号パンフレット（国際公開第９９／６４５７４号パンフレット）に記載のもの等の方法により行うことができる。

【００３０】

アミノ酸の変形、好ましくはタイプ（ａ）又は（ｂ）の変形が、任意の位置に独立して生じることが好ましい。上述のように、２つ以上の相同又は非相同置換が、同時に発生してもよい。さらなる変形は、いくつかのアミノ酸残基の配列を配列内で逆転することにより生じ得る。

【００３１】

一実施形態では、置き換えられるアミノ酸残基は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンの残基から選択される。

【００３２】

置き換えられるアミノ酸残基は、以下に記載のように、非天然アミノ酸からさらに選択され得る。

【００３３】

本明細書において使用する場合、用語「誘導体」は、例えば、アミノ酸側鎖のＮ末端及び／又はＣ末端に化学修飾を受けたインスリンを指す。好ましくは、化学修飾は、アナログの吸収、分布、代謝、及び排泄の特徴を変えるように作用する。動物インスリンの化学修飾に基づいて、半合成インスリンをしばらくの間、臨床的に使用した。例えば、Novo Nordisk社は、ヒト型と異なる単一アミノ酸を除去し、ヒトアミノ酸を化学的に添加することにより、ブタインスリンを半合成「ヒト」インスリンに酵素により変換した。

【００３４】

好ましい一実施形態では、インスリンを化学的に修飾して、その等電点を変える。通常の非修飾インスリンは、生理的ｐＨで可溶性である。溶解度平衡でこれらが存在するように等電点を変えた、修飾したインスリン誘導体が生成されており、この場合、ほとんどは沈殿するが、血流において徐々に溶解し、腎臓により最終的に排泄される。

【００３５】

本明細書において使用する場合、用語「インスリンの機能性誘導体」は、インスリンと同様又は等価な生物学的機能を果たす、任意の分子を指す。機能性誘導体は、その化学構造においてインスリンに構造的に類似していてもしていなくてもよい。

【００３６】

好ましい一実施形態では、本発明の単鎖インスリンアナログは、動物インスリン由来である。

【００３７】

異なる哺乳動物における動物インスリンのアミノ酸配列は、ヒトインスリン（インスリンヒトINN）と類似していてもよい。しかし、脊椎動物種では、かなりの多様性がある。ブタインスリンは、ヒト型と１個のみ異なるアミノ酸の変形を有し、ウシインスリンは、３個のアミノ酸が異なる。共にヒト受容体に対して、ほぼ同一の強度で活性である。ウシインスリン及びブタインスリンは、生合成ヒトインスリン（インスリンヒトrDNA）が入手不可能であった時に、初めて臨床的に使用されたインスリンアナログ（天然発生の、動物の膵臓から抽出して産生された）であった。サメ及び魚類の一部の種由来のインスリンもまた有効でありうる。

【００３８】

別の好ましい実施形態では、本発明の単鎖インスリンアナログは、ヒトインスリン、又

はそのアナログ由来である。より好ましくは、インスリンは、生合成インスリン（インスリンヒトrDNA）である。好ましい一実施形態では、インスリンは、インスリングラルギン（Lantus）、インスリンリスプロ（Humalog）、インスリンデテミル（Levemir）、インスリンアスパルト（novolog）、インスリンデグルデク及びビオチン化インスリンから選択される誘導体である。

【００３９】

本発明の他の実施形態は、ウサギ、サル、ウマ、ラットＩ、ラットII、ブタ、ウシ－ヒツジ、イヌ、モルモット、チンチラ、又はアヒルのＡＣＢ－プロインスリン分子を含む。

【００４０】

好ましい一実施形態では、Ａ鎖は、インスリンＡ鎖の天然発生アミノ酸配列である。好ましい一実施形態では、Ｂ鎖は、インスリンＢ鎖の天然発生アミノ酸配列である。このような種のＡＣＢ－プロインスリン分子のアミノ酸配列が、Ａ鎖の天然発生アミノ酸配列及びＢ鎖の天然発生の配列であることが好ましい。本発明の他の実施形態は、上述の種由来のプロインスリン分子の機能性アナログを対象としてもよい。

【００４１】

したがって、好ましい一実施形態では、Ａ鎖は、インスリンのＡ鎖の機能性誘導体又はバリアントである。別の好ましい実施形態では、Ｂ鎖は、インスリンのＢ鎖の機能性誘導体又はバリアントである。別の好ましい実施形態では、Ａ鎖は、インスリンのＡ鎖の機能性誘導体又はバリアントであり、Ｂ鎖は、インスリンのＢ鎖の機能性誘導体又はバリアントである。

【００４２】

天然アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを含む。

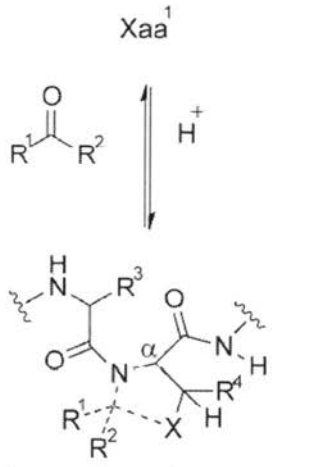
【００４３】

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

【００４４】

好都合には、１又は２個以上の非天然アミノ酸を導入すると、ペプチドの酵素安定性が増加する。

【００４５】
本発明のインスリンアナログは、Ｌ又はＤ形態のアミノ酸を含んでいてもよい。すなわち、１又は２残基以上、好ましくは、すべての残基が、Ｌ又はＤ形態であってもよい。
【００４６】
本発明のペプチドでは、各X_1及びX_3は、独立して塩基性アミノ酸である。塩基性アミノ酸が連結ペプチドに存在すると、ペプチドをトリプシン及びカルボキシペプチダーゼで切断することが可能となる。
【００４７】
本発明のペプチドでは、各X_2は、独立して天然又は非天然アミノ酸である。X_2がシステイン残基である場合、後続の酸化的フォールディングの間、不要なＳ－Ｓ結合の形成を回避するために保護が必要であることを当業者は理解していると予想される。適切なシステイン保護基は当業者に周知であり、Ａｃｍ及びＴｒｔを含む。
【００４８】
好ましい一実施形態では、X_2は、システイン以外のものである。
【００４９】
好ましい一実施形態では、各X_2は、塩基性アミノ酸、Ｇｌｙ、β－Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｈｙｐ、シュードプロリン、酸性アミノ酸及び親水性アミノ酸から独立して選択される。
【００５０】
好ましい一実施形態では、X_2は、シュードプロリンである。シュードプロリンは、ペプチドのＦＭＯＣ固相合成の間、凝集を最小化する、人工的に生成されたジペプチドである。シュードプロリンは、プロリン様環構造を有する、セリン由来（Ｏｘａ）又はスレオニン由来のオキサゾリジン［Ｏｘａ（５－Ｍｅ）］及びシステイン由来のチアゾリジン（ＴＨｚ）からなる（下記参照）。
【００５１】
【化３】



「シュードプロリン」

Xaa^1 = Ser, Thr, Cys

【００５２】
Ｃ２－置換シュードプロリンの前の残基とのｃｉｓ－アミド結合が優先されるため、これらを組み込むと、ペプチド主鎖のねじれ構造が生じ、これにより、ペプチド凝集、自己会合、又はβ構造形成を防止する。したがって、シュードプロリンは、２つの機能を同時に満たす。第１に、これらは、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、及びＣｙｓの一時的な側鎖保護として働き、第２に、これらは、可溶化ビルディングブロックとして作用して、ペプチド合成の間及び後続の鎖集合において溶媒和及び結合率を増加させる。
【００５３】
シュードプロリンは、フリーのアミノ酸をアルデヒド又はケトンと反応させることによ

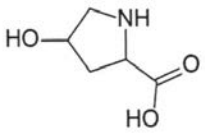
り得られる。シュードプロリンジペプチドは、他のアミノ酸誘導体と同一の方法で導入することができる。好ましくは、シュードプロリンは、Ｓｅｒ－Ｘ、Ｔｈｒ－Ｘ又はＣｙｓＸ基由来であり、ここで、Ｘは、天然又は非天然のアミノ酸である。セリン含有及びスレオニン含有ペプチドのＦＭＯＣ固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）において、シュードプロリン（オキサゾリジン）ジペプチドを常用すると、粗生成物の品質及び収率の顕著な向上がもたらされる。ペプチドが脱保護されると、シュードプロリンは、Ｘ－Ｓｅｒ、Ｘ－Ｔｈｒ又はＸ－Ｃｙｓの形態（ここで、Ｘは、天然又は非天然アミノ酸である）の従来のジペプチドとなる。

【００５４】

好ましい一実施形態では、X_2は、Ｈｙｐである。本明細書において使用する場合、Ｈｙｐは、（２Ｓ，４Ｒ）－４－ヒドロキシプロリン、又はＬ－ヒドロキシプロリンを指し、これは、次の構造を有する非タンパク質性アミノ酸である。

【００５５】

【化４】



【００５６】

好ましい一実施形態では、X_2は、酸性又は親水性アミノ酸である。Ａｓｐ及びＧｌｕは、酸性アミノ酸の例であり、一方、Ｓｅｒ、Ｃｙｓ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ及びＴｈｒは、親水性アミノ酸の例である。好ましくは、酸性又は親水性アミノ酸は、Ｓｅｒ、Ａｓｐ及びＧｌｕから選択される。

【００５７】

好ましい一実施形態では、X_2は、塩基性アミノ酸である。より好ましくは、塩基性アミノ酸は、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｏｒｎ及びＨｉｓから選択される。よりさらに好ましくは、塩基性アミノ酸はＡｒｇである。

【００５８】

非常に好ましい一実施形態では、各X_2は、Ｇｌｙ及びＡｒｇから独立して選択される。より好ましくは、X_2はＧｌｙである。

【００５９】

好ましい一実施形態では、X_1及びX_3は、共にＡｒｇである。

【００６０】

好ましい一実施形態では、ｐ及びｑは、共に１である。

【００６１】

別の好ましい実施形態では、ｐ及びｑは、共に２である。

【００６２】

好ましい一実施形態では、ｎは１又は２である。

【００６３】

特に好ましい一実施形態では、ｎは１である。

【００６４】

特に好ましい一実施形態では、ｐ及びｑは共に２であり、ｎは１である。

【００６５】

好ましい一実施形態では、ｎ及びｑは共に０であり、ｐは１である。すなわち、Ａ鎖及びＢ鎖を単一の塩基性アミノ酸で分割する。この実施形態では、好ましくは、X_1はＡｒｇ又はＬｙｓ、より好ましくはＡｒｇである。

【００６６】

別の好ましい実施形態では、X_1及びX_3は共にＡｒｇであり、ｐ及びｑは共に２であ

る。
【００６７】
別の好ましい実施形態では、X_2はＧｌｙであり、ｎは１である。
【００６８】
特に好ましい一実施形態では、Ａ鎖及びＢ鎖は、ペプチドＲＲＧＲＲにより連結される。すなわち、Ｃは、X_1がＡｒｇであり、X_2がＧｌｙであり、X_3がＡｒｇであり、ｐ及びｑが共に２であり、ｎが１である、ペプチドである。
【００６９】
好ましい一実施形態では、Ａは、天然インスリン、好ましくは、ヒトインスリンのＡ鎖、又はそのバリアントであり、それにおいて、（ａ）１又は２以上のアミノ酸残基が、天然に存在する又は天然に存在しないアミノ酸残基で置換されているか、（ｂ）２又は３以上のアミノ酸残基の順序が逆転しているか、（ｃ）１、２又は３個のアミノ酸が欠失しているか、（ｄ）スペーサー基が、任意の２つのアミノ酸残基間に存在するか、（ｅ）１又は２以上のアミノ酸残基が、ペプトイドの形態であるか、（ｆ）ペプチドの１又は２以上のアミノ酸残基の（Ｎ－Ｃ－Ｃ）主鎖が、修飾されているか、（ｇ）１又は２個以上の追加のアミノ酸が、Ｎ末端及び／又はＣ末端に存在するか、又は（ａ）～（ｇ）のいずれかの組合せである。
【００７０】
好ましい一実施形態では、天然のＡ鎖のアミノ酸１～５個を置換し、好ましくは１～４個、より好ましくは１～３個、さらに好ましくは１又は２個のアミノ酸を置換する。好ましい一実施形態では、単一のアミノ酸を置換する。
【００７１】
非常に好ましい一実施形態では、Ａ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて１～２１番目のヒトインスリンのアミノ酸を含む。
【００７２】
非常に好ましい一実施形態では、Ａ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて１～２１番目のヒトインスリンのアミノ酸からなる。
【００７３】
別の非常に好ましい実施形態では、Ａ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて１～２０番目のヒトインスリンのアミノ酸を含む。
【００７４】
別の非常に好ましい実施形態では、Ａ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて１～２０番目のヒトインスリンのアミノ酸からなる。
【００７５】
好ましい一実施形態では、Ｂは、天然インスリン、好ましくは、ヒトインスリンのＢ鎖、又はそのバリアントであり、それにおいて、（ａ）１又は２残基以上のアミノ酸残基が、天然に存在する又は天然に存在しないアミノ酸残基で置換されているか、（ｂ）２又は３以上のアミノ酸残基の順序が逆転しているか、（ｃ）１、２又は３個のアミノ酸が欠失しているか、（ｄ）スペーサー基が、任意の２つのアミノ酸残基間に存在するか、（ｅ）１又は２以上のアミノ酸残基が、ペプトイドの形態であるか、（ｆ）ペプチドの１又は２以上のアミノ酸残基の（Ｎ－Ｃ－Ｃ）主鎖が、修飾されているか、（ｇ）１又は２個以上の追加のアミノ酸が、Ｎ末端及び／又はＣ末端に存在するか、又は（ａ）～（ｇ）のいずれかの組合せである。
【００７６】
好ましい一実施形態では、天然のＢ鎖の１～５個のアミノ酸を置換し、好ましくは１～４個、より好ましくは１～３個、さらに好ましくは１又は２個のアミノ酸を置換する。好ましい一実施形態では、単一のアミノ酸を置換する。
【００７７】
好ましい一実施形態では、Ｂ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて１～２９番目のヒトインスリンのアミノ酸を含む。

【００７８】
好ましい一実施形態では、Ｂ鎖は、Ａ鎖のＮ末端から数えて１～２９番目のヒトインスリンのアミノ酸からなる。
【００７９】
好ましい一実施形態では、本発明のペプチドは、アミノ及び／又はカルボキシル末端においてアミノ酸を１又は２個以上伸長する。例えば、非常に好ましい一実施形態では、ペプチドは、追加のアミノ酸２個を、そのＣ末端、例えば、Ａｒｇ－Ａｒｇに含む。
【００８０】
好ましい一実施形態では、インスリンのＢ鎖は、最大２０個の追加の天然又は非天然アミノ酸をＣ末端にさらに含む。好ましくは、Ｂ鎖は１～１０個、若しくはより好ましくは１～５個の追加の天然又は非天然アミノ酸をＣ末端にさらに含む。非常に好ましい一実施形態では、Ｂ鎖は１、２若しくは３個の追加の天然又は非天然アミノ酸をＣ末端にさらに含む。よりさらに好ましくは、Ｂ鎖は１、２又は３個の追加の天然アミノ酸をＣ末端にさらに含む。
【００８１】
好ましい一実施形態では、ペプチドは、天然配列からの単一アミノ酸の変化を含む。好ましくは、単一アミノ酸変化は、Ａ２１、Ｂ９、Ｂ１０、Ｂ１２、Ｂ１６、Ｂ１７、Ｂ２０、Ｂ２５、Ｂ２６、Ｂ２７、Ｂ２８又はＢ３０の位置（ここで、Ａは、インスリンのＡ鎖を示し、Ｂは、インスリンのＢ鎖を示す）で生じる。
【００８２】
好ましくは、単一アミノ酸の置換は、次から選択される：
Ｇｌｙ　Ａ２１、Ｇｌｕ　Ａ２１、ｈＳｅｒ　Ａ２１、Ｔｈｒ　Ｂ１０、Ａｓｐ　Ｂ２５、Ｓｅｒ　Ａ２１、Ｌｅｕ　Ａ２１、Ｇｌｙ　Ａ２２、Ａｓｐ　Ｂ１０、Ｈｉｓ　Ｂ２５、Ａｌａ　Ａ２１、Ｍｅｔ　Ａ２１、Ａｌａ　Ａ２２、Ａｒｇ　Ｂ１０、Ｇｌｕ　Ｂ２６、Ｈｉｓ　Ａ２１、Ｔｙｒ　Ａ２１、Ａｓｐ　Ｂ９、Ｉｌｅ　Ｂ１２、Ｇｌｕ　Ｂ２７、Ａｓｐ　Ａ２１、Ｖａｌ　Ａ２１、Ａｓｎ　Ｂ９、Ｈｉｓ　Ｂ１６、Ａｓｐ　Ｂ２８、Ｔｈｒ　Ａ２１、Ｉｌｅ　Ａ２１、Ｈｉｓ　Ｂ９、Ｇｌｎ　Ｂ１７、Ａｌａ　Ｂ３０、Ｇｌｎ　Ａ２１、Ｔｒｐ　Ａ２１、Ｇｌｕ　Ｂ１０、Ｇｌｎ　Ｂ２０、ｄｅｓ－Ｂ３０、Ｔｈｒ３０－NH_2及びＡｌａ３０－NH_2。
【００８３】
好ましい一実施形態では、ペプチドは、天然配列からの２個のアミノ酸変化を含む。好ましくは、この２個のアミノ酸は、次の位置で生じる：Ａ２１及びＢ１０、Ａ２１及びＢ１０、Ａ２１及びＢ２７、Ｂ２７及びＢ１６、Ｂ５及びＢ１０、Ｂ１２及びＢ１３、Ｂ１４及びＢ１７、Ｂ２８及びＢ２９、Ａ１２１及びＢ２７、Ｂ１０及びＢ３０、Ｂ２９及びＢ３０、Ｂ１２及びＢ３０、Ｂ１０及びＢ２、Ｂ１０及びＢ２８、Ｂ１０及びＡ１３、Ｂ２７及びＡ１３、Ｂ２７及びＡ２１、Ｂ２７及びＢ１、Ｂ２７及びＢ９、又はＡ２１及びＢ３０。
【００８４】
好ましくは、２個のアミノ酸置換は、次から選択される。
Ｓｅｒ　Ａ２１及びＡｓｐ　Ｂ１０
Ａｓｐ　Ａ２１及びＬｙｓ　Ｂ２７
Ｔｈｒ　Ａ２１及びＡｓｐ　Ｂ１０
Ｇｌｙ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ２７
Ａｌａ　Ａ２１及びＡｓｐ　Ｂ１０
Ａｓｐ　Ｂ５及びＡｓｎ　Ｂ１０
Ｔｈｒ　Ａ２１及びＴｈｒ　Ｂ１０
Ｇｌｕ　Ｂ１２及びＧｌｎ　Ｂ１３
Ａｌａ　Ａ２１及びＴｈｒ　Ｂ１０
Ｓｅｒ　Ｂ１４及びＡｓｐ　Ｂ１７
Ｈｉｓ　Ａ２１及びＴｈｒ　Ｂ１０

Ｓｅｒ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ２７
Ｈｉｓ　Ａ２１及びＡｓｐ　Ｂ１０
Ｔｈｒ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ２７
Ａｓｐ　Ａ２１及びＡｓｐ　Ｂ１０
Ａｌａ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ２７
Ｇｌｙ　Ａ２１及びＴｈｒ　Ｂ１０
Ｇｌｙ　Ａ２１及びＡｓｐ　Ｂ１０
Ｈｉｓ　Ａ２１及びＬｙｓ　Ｂ２７
Ｇｌｕ　Ｂ２７及びＧｌｕ　Ｂ１６
Ｓｅｒ　Ａ２１及びＴｈｒ　Ｂ１０
Ｌｙｓ　Ｂ２８及びＰｒｏ　Ｂ２９
Ａｓｐ　Ａ２１及びＴｈｒ　Ｂ１０
Ｈｉｓ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ２７
Ｇｌｙ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ１０
Ａｓｐ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ２７
Ｓｅｒ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ１０
Ｇｌｕ　Ｂ１２及びｄｅｓ　Ｂ３０
Ｔｈｒ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ１０
Ｇｌｙ　Ａ２１及びＬｙｓ　Ｂ２７
Ｇｌｙ　Ａ２１及びＡｌａ　Ｂ３０
Ｓｅｒ　Ａ２１及びＬｙｓ　Ｂ２７
Ｓｅｒ　Ａ２１及びＡｌａ　Ｂ３０
Ｔｈｒ　Ａ２１及びＬｙｓ　Ｂ２７
Ｔｈｒ　Ａ２１及びＡｌａ　Ｂ３０
Ａｌａ　Ａ２１及びＬｙｓ　Ｂ２７
Ａｌａ　Ａ２１及びＡｌａ　Ｂ３０
ｄｅｓ　Ｂ２９及びｄｅｓ　Ｂ３０
ｈＳｅｒ　Ａ２１及びＡｌａ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ｂ１０及びＳｅｒ　Ｂ２
Ａｌａ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ１０
Ａｓｐ　Ｂ１０及びＡｓｐ　Ｂ２８
Ｈｉｓ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ１０
Ｇｌｕ　Ｂ１０及びＧｌｕ　Ａ１３
Ａｓｐ　Ａ２１及びＡｒｇ　Ｂ１０
Ｇｌｕ　Ｂ２７及びＳｅｒ　Ａ１３
Ａｓｐ　Ｂ１０及びｄｅｓ－Ｂ３０
Ｇｌｕ　Ｂ２７及びＡｓｐ　Ａ２１
Ｔｈｒ　Ｂ１０及びｄｅｓ－Ｂ３０
Ｇｌｕ　Ｂ２７及びＧｌｕ　Ｂ１
Ａｒｇ　Ｂ１０及びｄｅｓ－Ｂ３０
Ｇｌｕ　Ｂ２７及びＡｓｐ　Ｂ９

【００８５】

好ましい一実施形態では、ペプチドは、天然配列からの３個のアミノ酸変化を含む。好ましくは、この３個のアミノ酸変化は、次から選択される。

Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７
Ｓｅｒ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７
Ｔｈｒ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７
Ａｌａ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７

Gly	A21+Lys	B27+Gln	B13
Ser	A21+Lys	B27+Gln	B13
Thr	A21+Lys	B27+Gln	B13
Ala	A21+Lys	B27+Gln	B13
His	A21+Lys	B27+Gln	B13
Asp	A21+Lys	B27+Gln	B13
Gly	A21+Arg	B27+Gln	A17
Ser	A21+Arg	B27+Gln	A17
Thr	A21+Arg	B27+Gln	A17
Ala	A21+Arg	B27+Gln	A17
His	A21+Arg	B27+Gln	A17
Asp	A21+Arg	B27+Gln	A17
Gly	A21+Arg	B27+Gln	B13
Ser	A21+Arg	B27+Gln	B13
Thr	A21+Arg	B27+Gln	B13
Ala	A21+Arg	B27+Gln	B13
His	A21+Arg	B27+Gln	B13
Asp	A21+Arg	B27+Gln	B13
Asp	B10+His	A8+His	B25
Glu	B10+Glu	A3+Glu	B22
Glu	B27+Ser	B5+Asp	B5
Glu	B27+His	A5+Asp	B9
Glu	B27+Asp	A21+Asp	B9
des	B28+des	B29+des	B30
Gly	A21+Asp	B10+Ala	B30
Ser	A21+Asp	B10+Ala	B30
Thr	A21+Asp	B10+Ala	B30
Ala	A21+Asp	B10+Ala	B30
His	A21+Asp	B10+Ala	B30
Asp	A21+Asp	B10+Ala	B30
Gly	A21+Thr	B10+Ala	B30
Ser	A21+Thr	B10+Ala	B30
Thr	A21+Thr	B10+Ala	B30
Ala	A21+Thr	B10+Ala	B30
His	A21+Thr	B10+Ala	B30
Asp	A21+Thr	B10+Ala	B30
Gly	A21+Arg	B10+Ala	B30
Ser	A21+Arg	B10+Ala	B30
Thr	A21+Arg	B10+Ala	B30
Ala	A21+Arg	B10+Ala	B30
His	A21+Arg	B10+Ala	B30
Asp	A21+Arg	B10+Ala	B30
Gly	A21+Asp	B10+des	B30
Ser	A21+Asp	B10+des	B30
Thr	A21+Asp	B10+des	B30
Ala	A21+Asp	B10+des	B30
His	A21+Asp	B10+des	B30
Asp	A21+Asp	B10+des	B30
Gly	A21+Thr	B10+des	B30
Ser	A21+Thr	B10+des	B30

Ｔｈｒ　Ａ２１＋Ｔｈｒ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ａｌａ　Ａ２１＋Ｔｈｒ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ｔｈｒ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ｔｈｒ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ｓｅｒ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ｔｈｒ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ａｌａ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ１０＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ｔｈｒ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ａｒｇ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｔｈｒ　Ｂ１０＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ａｒｇ　Ｂ１０＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｓｅｒ　Ａ２１＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｔｈｒ　Ａ２１＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ａｌａ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ａｒｇ　Ｂ２７＋Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ｔｈｒ　Ｂ３０NH_2

【００８６】

好ましい一実施形態では、ペプチドは、天然配列からの４個のアミノ酸変化を含む。好ましくは、この４個のアミノ酸変化は、次から選択される。

Ｓｅｒ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ｔｈｒ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ａｌａ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ｇｌｕ　Ｂ１０＋Ｈｉｓ　Ａ８＋Ｈｉｓ　Ｂ４＋Ｈｉｓ　Ｂ２７
Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ｓｅｒ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ｔｈｒ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ａｌａ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ａｒｇ　Ｂ２７＋Ｇｌｎ　Ａ１７＋Ｇｌｎ　Ｂ１３
ｄｅｓ　Ｂ２７＋ｄｅｓ　Ｂ２８＋ｄｅｓ　Ｂ２９＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｓｅｒ　Ａ２１＋Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｔｈｒ　Ａ２１＋Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ａｌａ　Ａ２１＋Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９
Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ｔｈｒ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９

Ser	A21+Thr	B10+Glu	B28+Pro	B29
Thr	A21+Thr	B10+Glu	B28+Pro	B29
Ala	A21+Thr	B10+Glu	B28+Pro	B29
His	A21+Thr	B10+Glu	B28+Pro	B29
Asp	A21+Thr	E10+Glu	B28+Pro	B29
Ala	A21+Arg	B10+Glu	B28+Pro	B29
Ala	A21+Asp	B10+Lys	B28+Pro	B29
His	A21+Asp	B10+Lys	B28+Pro	B29
Asp	A21+Asp	B10+Lys	B28+Pro	B29
Gly	A21+Arg	B10+Glu	B28+Pro	B29
Ser	A21+Arg	B10+Glu	B28+Pro	B29
Thr	A21+Arg	B10+Glu	B28+Pro	B29
Gly	A21+Thr	B10+Lys	B28+Pro	B29
Ser	A21+Thr	B10+Lys	B28+Pro	B29
His	A21+Arg	B10+Glu	B28+Pro	B29
Asp	A21+Arg	B10+Glu	B28+Pro	B29
Gly	A21+Asp	B10+Lys	B28+Pro	B29
Ser	A21+Asp	B10+Lys	B29+Pro	B29
Thr	A21+Asp	B10+Lys	B28+Pro	B29
Ser	A21+Arg	B10+Lys	B28+Pro	B29
Thr	A21+Arg	B10+Lys	B28+Pro	B29
Ala	A21+Arg	B10+Lys	B28+Pro	B29
His	A21+Arg	B10+Lys	B28+Pro	B29
Asp	A21+Arg	B10+Lys	B28+Pro	B29
Gly	A21+Glu	B28+Pro	B29+Ala	B30
Ser	A21+Glu	B28+Pro	B29+Ala	B30
Thr	A21+Lys	B28+Pro	B29+Ala	B30
Ala	A21+Lys	B28+Pro	B29+Ala	B30
His	A21+Lys	B28+Pro	B29+Ala	B30
Asp	A21+Lys	B28+Pro	B29+Ala	B30
Thr	A21+Thr	B10+Lys	B28+Pro	B29
Ala	A21+Thr	B10+Lys	B28+Pro	B29
His	A21+Thr	B10+Lys	B28+Pro	B29
Asp	A21+Thr	B10+Lys	B28+Pro	B29
Gly	A21+Arg	B10+Lys	B28+Pro	B29
Gly	A21+Glu	B28+Pro	B29+des	B30
Ser	A21+Glu	B28+Pro	B29+des	B30
Thr	A21+Glu	B28+Pro	B29+des	B30
Ala	A21+Glu	B28+Pro	B29+des	B30
His	A21+Glu	B28+Pro	B29+des	B30
Thr	B10+Glu	B28+Pro	B29+des	B30
Arg	B10+Glu	B28+Pro	B29+des	B30
Asp	B10+Lys	B28+Pro	B29+des	B30
Thr	B10+Lys	B28+Pro	B29+des	B30
Arg	B10+Lys	B28+Pro	B29+des	B30
des	B27+des	B29+des	B29+des	B30
Asp	A21+Glu	B28+Pro	B29+des	B30
Gly	A21+Lys	B28+Pro	B29+des	B30
Ser	A21+Lys	B28+Pro	B29+des	B30
Thr	A21+Lys	B28+Pro	B29+des	B30

Ａｌａ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋ｄｅｓ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ｔｈｒ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ａｒｇ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ｔｈｒ　Ａ２１＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ｈｉｓ　Ａ２１＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ａ２１＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ｇｌｙ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ｓｅｒ　Ａ２１＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ｔｈｒ　Ｂ１０＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ａｒｇ　Ｂ１０＋Ｌｙｓ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋Ａｌａ　Ｂ３０
Ａｓｐ　Ｂ１０＋Ｇｌｕ　Ｂ２８＋Ｐｒｏ　Ｂ２９＋ｄｅｓ　Ｂ３０

【００８７】

好ましい一実施形態では、ペプチドは、天然配列からの５個のアミノ酸変化を含む。好ましくは、この５個のアミノ酸変化は、次の位置で生じる：Ｂ２６、Ｂ２７、Ｂ２８、Ｂ２９及びＢ３０、例えば、ｄｅｓ　Ｂ２６＋ｄｅｓ　Ｂ２７＋ｄｅｓ　Ｂ２８＋ｄｅｓ　Ｂ２９＋ｄｅｓ　Ｂ３０。

【００８８】

好ましい一実施形態では、Ｃは、配列番号１、
ＲＲＧＲＲ　［配列番号１］
に示される配列のペプチドである。

【００８９】

好ましい一実施形態では、Ａは、配列番号２、
^{1}ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＧ^{21}　［配列番号２］
（式中、各アミノ酸は、非保護であるか、又は、例えば、アミノ酸側鎖が官能基を含有する場合、保護されていてもよい）
に示される配列のペプチドを含む。好ましい保護基は、^{t}Ｂｕ、Ａｃｍ、Ｏ^{t}Ｂｕ、Ｔｒｔ、Ｍｍｔ、Ｍｔｔ及びＰｂｆ等、酸で切断可能な保護基を含む。

【００９０】

より好ましい実施形態では、Ａは、各アミノ酸が保護されていてもよい、配列番号２のペプチドからなる。

【００９１】

別の好ましい実施形態では、Ａは、配列番号８、
^{1}ＧＩＶＥＱＣＣＴＳＩＣＳＬＹＱＬＥＮＹＣＮ^{21}　［配列番号８］
（式中、各アミノ酸は、非保護であるか、又は、例えば、アミノ酸側鎖が官能基を含有する場合、保護されていてもよい）に示される配列のペプチドを含む。好ましい保護基は、^{t}Ｂｕ、Ａｃｍ、Ｏ^{t}Ｂｕ、Ｔｒｔ、Ｍｍｔ、Ｍｔｔ及びＰｂｆ等、酸で切断可能な保護基を含む。

【００９２】

より好ましい実施形態では、Ａは、各アミノ酸が保護されていてもよい、配列番号８のペプチドからなる。

【００９３】

好ましい一実施形態では、Ｂは、配列番号３、
^{1}ＦＶＮＱＨＬＣＧＳＨＬＶＥＡＬＹＬＶＣＧＥＲＧＦＦＹＴＰＫＴ^{30}　［配列番号３］
（式中、各アミノ酸は、非保護であるか、又は、例えば、アミノ酸側鎖が官能基を含有する場合、保護されていてもよい）に示される配列のペプチドを含む。好ましい保護基は、

^{t}Ｂｕ、Ａｃｍ、Ｏ^{t}Ｂｕ、Ｔｒｔ、Ｍｍｔ、Ｍｔｔ及びＰｂｆ等、酸で切断可能な保護基を含む。

【００９４】

より好ましい実施形態では、Ｂは、各アミノ酸が保護されていてもよい、配列番号３のペプチドからなる。

【００９５】

好ましい一実施形態では、ポリペプチド化合物は、配列番号４、

【００９６】

【化５】

配列番号4

^{1}GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT^{56}

【００９７】

（式中、各アミノ酸は、非保護であるか、又は、例えば、アミノ酸側鎖が官能基を含有する場合、保護されていてもよい）のポリペプチド化合物である。好ましい保護基は、^{t}Ｂｕ、Ａｃｍ、Ｏ^{t}Ｂｕ、Ｔｒｔ、Ｍｍｔ、Ｍｔｔ及びＰｂｆ等、酸で切断可能な保護基を含む。

【００９８】

好ましい一実施形態では、ポリペプチド化合物は、配列番号４～７、

【００９９】

【化６】

配列番号4

^{1}GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT^{56}

配列番号5

^{1}GIVEQCCTSICSLYQLENY**C**GRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLV**C**GERGFFYTPKT^{56}

配列番号6

^{1}GIVEQ**C**CTSI**C**SLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT^{56}

配列番号7

^{1}GIVEQC**C**TSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHL**C**GSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT^{56}

【０１００】

（式中、配列番号４～７において、下線と太字で示されたＣは、保護基で保護されたシステインを示し、Ｃは、非保護のシステインを示す）

から選択される。

【０１０１】

好ましい一実施形態では、システイン保護基は、Ａｃｍ又はＴｒｔである。

【０１０２】

好ましい一実施形態では、ポリペプチド化合物は、式Ｉ．１

【０１０３】

【化７】



【０１０４】
（式中、ＰＧ$_1$及びＰＧ$_2$は、それぞれ独立してシステイン保護基であり、Ｃ－ＳＨは、非保護のシステインを表す）
のポリペプチド化合物である。好ましくは、ＰＧ$_1$及びＰＧ$_2$は、それぞれ独立してＡｃｍ又はＴｒｔである。

【０１０５】
アミノ酸に適切な保護基は、当業者に周知であると予想される。例としては、T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis (2nd edition) J. Wiley & Sons, 1991及びP. J. Kocienski, Protecting Groups, Georg Thieme Verlag, 1994に見出すことができる。

【０１０６】
本明細書において使用する場合、Ａｃｍは、Ｓ－アセトアミドメチル保護基を指す。Ｓ－Ａｃｍ保護基を含有するペプチドをヨウ素で処理すると、スルフヒドリル保護基及びジスルフィド形成が同時に除去される。

【０１０７】
本明細書において使用する場合、Ｔｒｔは、トリフェニルメチル保護基を指す。Ｔｒｔ保護基は、酸に不安定であり、酸性条件下（例えば、ＴＦＡによる処理）で除去することができる。

【０１０８】
より好ましい実施形態では、ポリペプチド化合物は、式（Ｉ．１ａ）：

【０１０９】
【化８】



【０１１０】
（式中、Ｃ－ＳＨは、非保護のシステインを表す）
のポリペプチド化合物である。

【０１１１】
プロインスリン誘導体を調製する方法
本発明のプロインスリン誘導体は、従来の合成方法（例えば、固相法）により、又は遺伝子組換法により調製することができる。

【０１１２】
好ましい一実施形態では、本発明は、固相ペプチド合成を使用した上記のポリペプチド化合物を調製する方法に関する。付随する実施例のセクションでは、そのような合成についてより詳細に説明する。

【０１１３】
合成は、２－クロロトリチル樹脂を固体支持体として用いたＦｍｏｃ／ｔＢｕ保護スキームを使用して実施することができる。Ｃｙｓ－残基の保護については、Ｔｒｔ又はＴｒｔ／Ａｃｍ保護基を使用することができる。

【０１１４】
別の実施形態では、本発明のペプチド化合物は、当分野で公知の方法で遺伝子組換えにより調製することができる。さらなる詳細については、例えば、欧州特許出願公開第０５１８５８７号明細書の教示を参照されたい。
【０１１５】
したがって、本発明の一態様は、上記のペプチド化合物をコードするＤＮＡ配列に関する。
【０１１６】
本発明の別の態様は、上記のＤＮＡ配列を含む組換えＤＮＡベクターに関する。
【０１１７】
本発明の別の態様は、上記のポリペプチド化合物を遺伝子組換えにより調製する方法であって、
（ｉ）上記のポリペプチド化合物をコードするＤＮＡ配列を構築するステップと、
（ii）このＤＮＡ配列を、宿主細胞中で機能するプロモーター－オペレーター領域を含有する、適切なベクター中に組み込むステップと、
（iii）このベクター中のこのＤＮＡ配列を、このＤＮＡ配列の転写及び翻訳を達成し、さらにこのＤＮＡ配列が、このプロモーター－オペレーター領域の転写制御下になるように方向付けるステップと、
（iv）この宿主細胞を、このベクターを用いて形質転換するステップと、
（ｖ）形質転換したこの宿主細胞を、この遺伝子の転写及び翻訳を誘導するのに適した条件下で培養するステップと、
（vi）このＤＮＡ配列によりコードされたポリペプチド生成物を回収及び精製するステップと
を含む、方法に関する。
【０１１８】
本発明の別の態様は、インスリン又はその誘導体を調製する方法であって、
（ｉ）上記のポリペプチド化合物をコードするＤＮＡ配列を構築するステップと、
（ii）このＤＮＡ配列を、宿主細胞中で機能するプロモーター－オペレーター領域を含有する、適切なベクター中に組み込むステップと、
（iii）このベクター中のこのＤＮＡ配列を、このＤＮＡ配列の転写及び翻訳を達成し、さらにこのＤＮＡ配列が、このプロモーター－オペレーター領域の転写制御下になるように方向付けるステップと、
（iv）この宿主細胞を、このベクターを用いて形質転換するステップと、
（ｖ）形質転換したこの宿主細胞を、この遺伝子の転写及び翻訳を誘導するのに適した条件下で培養するステップと、
（vi）このＤＮＡ配列によりコードされたポリペプチド生成物を回収及び精製するステップと、
（vii）この遺伝子によりコードされたこのポリペプチド生成物を切断してＣペプチドを切り出すステップと
を含む、方法に関する。
【０１１９】
プロインスリン誘導体及びその中間体の酸化的フォールディングの方法
本発明のさらなる態様は、インスリン、又はその誘導体を調製する方法であって、
（ｉ）本発明によるポリペプチド化合物を調製するステップと、
（ii）このポリペプチドを切断してＣペプチドを切り出すステップと
を含む、方法に関する。
【０１２０】
本明細書に記載の、得られた反転「スーパーミニ」プロインスリンのフォールディングは、１段階又は２段階のいずれかで実施することができる。Ｃペプチドの除去は、従来の方法でトリプシン及び／又はカルボキシペプチダーゼＢにより実施することができる。付

随する実施例のセクションでは、６つのＴｒｔ基、又は２つのＡｃｍ基及び４つのＴｒｔ基の３つの可能な組合せのいずれかにより保護されたＣｙｓ残基の側鎖を有するＡＣＢ－プロインスリン誘導体の合成について説明する。次いで、これらのフォールディング効率を比較し、得られた生成物の性質をＨＰＬＣにより分析した。

【０１２１】

結果は、Ａ－Ｃ－Ｂプロインスリンペプチドを高い純度及び収率で調製することが可能であることを実証した。２段階酸化手順の使用は、特に効果的であることが示された。この方法では、鎖間架橋したＣペプチドを酵素によって除去することにより、フォールディングされた、単鎖のインスリン前駆体を生体活性二本鎖インスリンに形質転換することができる。

【０１２２】

本発明のさらなる態様は、インスリン、又はその誘導体を調製する方法であって、

（ｉ）Ａ－Ｃ－Ｂポリペプチドを調製するステップと、

（ii）このポリペプチドを切断してＣペプチドを切り出すステップと

を含む、方法に関する。

【０１２３】

好ましい実施形態では、Ａ及びＢは、式（Ｉ）として定義され、Ｃは、インスリンの連結ペプチド、又はそのバリアントである。別の好ましい実施形態では、Ｃは、式（Ｉ）、すなわち、$(X_1)_p-(X_2)_n-(X_3)_q$に定義されるペプチドである。

【０１２４】

好ましい一実施形態では、インスリンＡ鎖７位のシステイン残基及びインスリンＢ鎖７位のシステイン残基は、それぞれ保護基で保護されている。

【０１２５】

好ましい一実施形態では、Ａ鎖の６、１１及び２０位のシステイン残基は、非保護であり、Ｂ鎖の１９位のシステイン残基は、非保護である。

【０１２６】

別の好ましい実施形態では、Ａ鎖の６、１１及び２０位、並びにＢ鎖の１９位のシステイン残基は、非保護であり、Ａ鎖の７位、及びＢ鎖の７位のシステイン残基は、それぞれ保護基で保護されている。

【０１２７】

好ましくは、保護基は、Ａｃｍ又はＴｒｔ、より好ましくは、Ａｃｍである。

【０１２８】

特に好ましい一実施形態では、本発明の方法は、ペプチド化合物の段階的な酸化的フォールディングを含み、

（ｉ）上記のようにペプチドを酸化して第１の中間体を形成するステップと、

（ii）この第１の中間体を酸化して第２の中間体を形成するステップと、

（iii）この第２の中間体を切断してＣペプチドを切り出すステップと

を含む。

【０１２９】

好ましくは、ペプチドは、上記の式Ｉ．１又はＩ．１ａのペプチドである。

【０１３０】

好ましい一実施形態では、第１の酸化ステップであるステップ（ｉ）は、ペプチドをＤＭＳＯで処理して第１の中間体を形成するステップを含む。次いで、残存保護基を除去し、次いで、得られた中間体をさらなる（第２の）酸化ステップに供して第２の中間体を形成する。中間体の保護基を任意の適切な方法により除去してもよい。したがって、直交システイン保護基に出発ペプチドに組み込むことにより、酸化的フォールディングのプロセスが優先的に行われる。

【０１３１】

より好ましくは、ステップ（ｉ）は、Ｇｌｙ緩衝液中のＤＭＳＯで、より好ましくは０．１ＭのＧｌｙ緩衝液中の２０％のＤＭＳＯで処理するステップを含む。好ましくは、混

合物のｐＨは９よりも高く、より好ましくは、１０よりも高く、よりさらに好ましくは、約１０．５である。好ましくは、酸化は、少なくとも４時間、より好ましくは、少なくとも８時間、より好ましくは、少なくとも２１時間、よりさらに好ましくは、１日にわたって行う。好ましくは、反応は、室温で行う。

【０１３２】

好ましい一実施形態では、第２の酸化ステップであるステップ（ｉｉ）は、第１の中間体を酢酸／水中のヨウ素で処理するステップを含む。

【０１３３】

好ましくは、第２の酸化ステップは、ＡｃＯＨ／水中のヨウ素を約４：１の比率で使用して実行する。好ましくは、反応は、少なくとも３０分間、より好ましくは、少なくとも１時間にわたって行う。好ましくは、反応は、室温で行う。

【０１３４】

好ましい一実施形態では、切断ステップ（ｉｉｉ）は、第２の中間体をトリプシンで処理するステップを含む。

【０１３５】

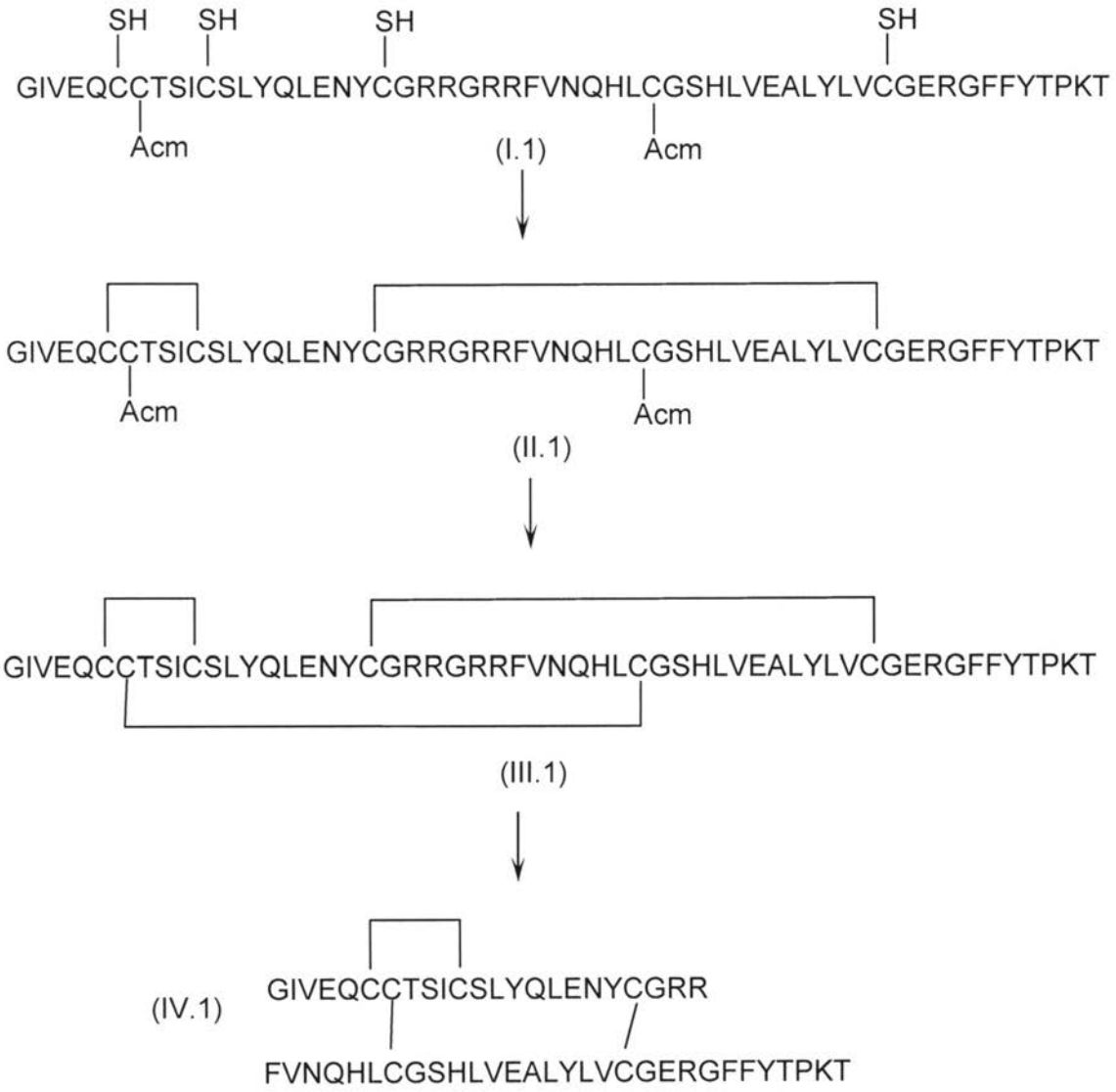
好ましくは、Ｃペプチドの切断は、室温で行う。好ましくは、反応は、トリス緩衝液中のトリプシンを使用して行う。好ましくは、ｐＨは７．５より高く、より好ましくは、約８である。好ましくは、反応は、約５分間にわたって行う。

【０１３６】

特に好ましい一実施形態では、本発明の方法は、以下のスキーム１に示すものである。

【０１３７】

【化９】



スキーム1:2段階酸化的フォールディング

【０１３８】

本発明の別の態様は、インスリン、又はその誘導体の調製における上記のペプチド化合物の使用に関する。

【０１３９】

本発明の別の態様は、酸化的フォールディングプロセスにおける中間ポリペプチド化合物に関する。

【０１４０】

したがって、一実施形態では、本発明は、式（Ｉ．１）：

【０１４１】

【化１０】



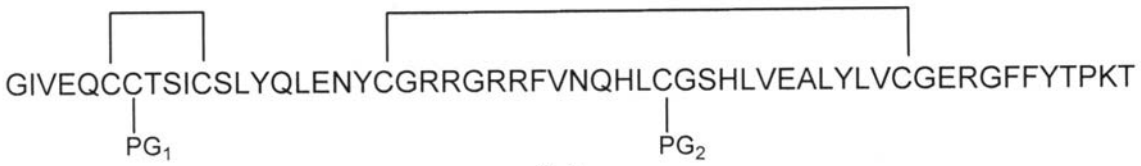
【０１４２】

（式中、ＰＧ$_1$及びＰＧ$_2$は、それぞれ独立してシステイン保護基であり、好ましくは、Ａｃｍ又はＴｒｔ、より好ましくは、Ａｃｍである）
のポリペプチドに関する。
【０１４３】
したがって、好ましい一実施形態では、本発明は、式（Ｉ．１ａ）のポリペプチド化合物に関する。
【０１４４】
【化１１】



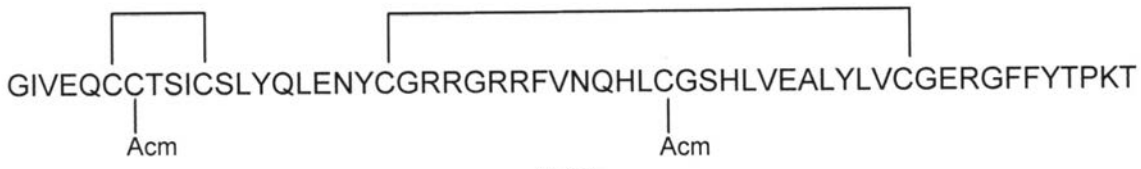
(I.1a)

【０１４５】
別の好ましい実施形態では、本発明は、式（II．１）：
【０１４６】
【化１２】



(II.1)

【０１４７】
（式中、ＰＧ$_1$及びＰＧ$_2$は、それぞれ独立してシステイン保護基であり、好ましくは、Ａｃｍ又はＴｒｔ、より好ましくは、Ａｃｍである）
のポリペプチドに関する。
【０１４８】
したがって、好ましい一実施形態では、本発明は、式（II．１ａ）のペプチド化合物に関する。
【０１４９】
【化１３】



(II.1a)

【０１５０】
別の実施形態では、本発明は、式（III．１）の式のペプチド化合物に関する。
【０１５１】

【化１４】



(III.1)

【０１５２】

式Ｉ．１、Ｉ．１ａ、II．１及びII．１ａのペプチドは、インスリンの調製において有用な中間体である。

【０１５３】

医薬組成物

本発明の一態様は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤若しくは担体、又はその混合物と混合した本発明のプロインスリン誘導体を含む医薬組成物に関する。本発明のプロインスリン誘導体（これらの薬学的に許容される塩、エステル及び薬学的に許容される溶媒和物を含む）が、単独で投与され得るとしても、これらは、特にヒトの治療のために、医薬担体、賦形剤又は希釈剤と混合して一般的に投与される。医薬組成物は、ヒト及び獣医学におけるヒト又は動物用であり得る。

【０１５４】

例えば、本発明の化合物は、従来の医薬担体及び賦形剤と混合し、錠剤、カプセル、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、ウエハー等の形態で使用することができる。ＡＣＢ－プロインスリン化合物を含む組成物は、約０．１～９０重量％、より一般的には、約１０～３０％の活性化合物を典型的に含有する。組成物は、コーンスターチ又はゼラチン、ラクトース、スクロース、微結晶セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸ジカルシウム、塩化ナトリウム、及びアルギン酸等の一般的な担体及び賦形剤を含有してもよい。

【０１５５】

本発明の製剤において一般的に使用する崩壊剤は、クロスカルメロース、微結晶セルロース、コーンスターチ、デンプンナトリウム、グリコール酸及びアルギン酸を含む。

【０１５６】

本明細書に記載の医薬組成物の種々多様な形態に適切な賦形剤の例は、A Wade及びPJ Weller編集の「Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994)」に見出すことができる。

【０１５７】

治療的使用のための許容される担体又は希釈剤は、薬学分野において周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro編 1985)に記載されている。

【０１５８】

適切な担体の例としては、ラクトース、デンプン、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトール等が挙げられる。適切な希釈剤の例としては、エタノール、グリセロール及び水が挙げられる。

【０１５９】

医薬担体、賦形剤又は希釈剤の選択は、投与の対象となる経路及び標準医薬診療を考慮して選択することができる。医薬組成物は、担体、賦形剤又は希釈剤として、又はそれに追加して、任意の適切な結合剤（複数可）、潤滑剤（複数可）、懸濁剤（複数可）、コーティング剤（複数可）、可溶化剤（複数可）を含んでいてもよい。

【０１６０】

適切な結合剤の例としては、デンプン、ゼラチン、天然糖、例えば、グルコース、無水ラクトース、流動性ラクトース、ベーターラクトース、トウモロコシ甘味料、天然及び合成ゴム、例えば、アカシア、トラガカント又はアルギン酸ナトリウム、カルボキシメチル

セルロース並びにポリエチレングリコールが挙げられる。

【０１６１】

含まれ得る錠剤の結合剤は、アカシア、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン（ポビドン）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロース、デンプン及びエチルセルロース等である。

【０１６２】

適切な潤滑剤の例としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム又は他のステアリン酸金属塩、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ステアリン酸、シリコーン溶液、タルク、ワックス、油及びコロイド状シリカ等が挙げられる。

【０１６３】

保存剤、安定剤、色素及び香味剤をも医薬組成物に使用することができる。保存剤の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及びｐ－ヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。抗酸化剤及び懸濁剤も使用することができる。適切な香味剤は、ペパーミント、ウィンターグリーン油、チェリー香料等を含む。着色剤を添加して剤形の外観をより魅力的にする、又は生成物の識別を助けることが望ましい場合もある。

【０１６４】

静脈内（IV）における使用では、水溶性形態の本発明の化合物は、一般的に使用される静脈内輸液のうちの１つに溶解し、点滴により投与することができる。このような液体、例えば、生理食塩水、リンゲル液又は５％のデキストロース溶液を使用してもよい。

【０１６５】

筋肉内用の調製では、適切な可溶性の塩の形態の本発明の化合物の滅菌製剤、例えば、塩酸塩は、発熱物質を含まない（蒸留）水、生理食塩水又は５％のグルコース溶液等の薬学的希釈剤に溶解し、投与することができる。適切な不溶性形態の化合物を、水性ベース又は薬学的に許容される油ベース、例えば、オレイン酸エチル等の長鎖脂肪酸のエステルベースの懸濁剤として調製し、投与してもよい。

【０１６６】

経口使用では、蒸留水又は脱イオン水等の希釈剤中に製剤化した、適切な塩の形態のＡＣＢ－プロインスリンの滅菌製剤、例えば、塩酸塩は、特に有用である。

【０１６７】

あるいは、化合物の単位剤形は、密閉した滅菌アンプル中で適切な希釈剤中の、好ましくは、その塩の形態の化合物の溶液であってもよい。単位用量の化合物の濃度は、化合物の特定の形態及びその溶解性及び医師所望の用量に応じて、例えば、約１％～約５０％の間で、異なってもよい。

【０１６８】

塩／エステル

本発明のプロインスリン誘導体は、塩又はエステルとして、特に薬学的に許容される塩又はエステルとして存在し得る。

【０１６９】

本発明のプロインスリン誘導体の薬学的に許容される塩は、その適切な酸付加塩又は塩基塩を含む。適切な薬学的塩の総説は、Berge et al, J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977)に見出すことができる。塩は、例えば、鉱酸等の強無機酸、例えば、硫酸、リン酸若しくはハロゲン化水素酸を用いて；非置換若しくは（例えば、ハロゲンにより）置換した炭素原子１～４個のアルカンカルボン酸等の強有機カルボン酸、例えば、酢酸を用いて；飽和若しくは不飽和のジカルボン酸、例えば、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸若しくはテトラフタル酸を用いて；ヒドロキシカルボン酸、例えば、アスコルビン酸、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸若しくはクエン酸を用いて；アミノ酸、例えば、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸を用いて；安息香酸を用いて；又は非置換若しくは（例えば、ハロゲンにより）置換した（C_1－C_4）－アルキル－若しくはアリール－スルホン酸等の有機スルホン酸、例えば、メタンスルホン酸若しくはｐ－ト

ルエンスルホン酸を用いて形成する。

【０１７０】

エステル化される官能基に応じて、有機酸又はアルコール／水酸化物のいずれかを使用してエステルを形成する。有機酸は、非置換若しくは（例えば、ハロゲンにより）置換した炭素原子１～１２個のアルカンカルボン酸等のカルボン酸、例えば、酢酸；飽和若しくは不飽和のジカルボン酸、例えば、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸若しくはテトラフタル酸；ヒドロキシカルボン酸、例えば、アスコルビン酸、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸若しくはクエン酸；アミノ酸、例えば、アスパラギン酸若しくはグルタミン酸；安息香酸；又は非置換若しくは（例えば、ハロゲンにより）置換した（C_1－C_4）－アルキル－若しくはアリール－スルホン酸等の有機スルホン酸、例えば、メタンスルホン酸若しくはｐ－トルエンスルホン酸を含む。適切な水酸化物は、無機水酸化物、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アルミニウムを含む。アルコールは、非置換又は（例えば、ハロゲンにより）置換した炭素原子１～１２個のアルカンアルコールを含む。

【０１７１】

鏡像異性体／互変異性体

これまでに考察した本発明のすべての態様では、本発明は、適切な場合、本発明のプロインスリン誘導体のすべての鏡像異性体及び互変異性体を含む。当業者は、光学特性（１又は２個以上のキラル炭素原子）又は互変異性の特徴を有する化合物を認識していると予想される。対応する鏡像異性体及び／又は互変異性体は、当分野で公知の方法により単離／調製してもよい。

【０１７２】

立体及び幾何異性体

本発明のプロインスリン誘導体のうちのいくつかは、立体異性体及び／又は幾何異性体として存在し得る。例えば、これらは１又は２つ以上の不斉中心及び／又は幾何学的中心を有し、そのため２又は３つ以上の立体異性及び／又は幾何学的形態で存在し得る。本発明は、そのようなアナログの個々の立体異性体及び幾何異性体のすべて、及びその混合物の使用を検討する。特許請求の範囲において使用する用語は、この形態が、適した機能活性を保持する限り（必ずしも同程度ではないが）、このような形態を包含する。

【０１７３】

本発明はまた、プロインスリン誘導体又は薬学的に許容されるその塩のすべての適切な同位体的変形を含む。同位体的変形は、少なくとも１個の原子が、同一の原子番号を有するが、通常、天然に見出される原子量とは異なる原子量を有する原子で置換されるものとして定義される。薬剤及び薬学的に許容されるその塩中に組み込まれ得る同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、フッ素及び塩素、例えば、それぞれ^{2}Ｈ、^{3}Ｈ、^{13}Ｃ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{17}Ｏ、^{18}Ｏ、^{31}Ｐ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{18}Ｆ及び^{36}Ｃｌの同位体が挙げられる。特定の同位体的変形、例えば、^{3}Ｈ又は^{14}Ｃ等の放射性同位体が組み込まれたものは、薬物及び／又は基質の組織分布試験において有用である。トリチウム、すなわち^{3}Ｈ、及び炭素１４、すなわち^{14}Ｃの同位体は、これらの調製及び検出が容易であるため特に好ましい。さらに、重水素、すなわち^{2}Ｈ等の同位体で置換すると、より高い代謝安定性、例えば、インビボ半減期の増加又は必要用量の減少等による一定の治療的利点がもたらされ得るため、状況によって好まれ得る。本発明のアナログの同位体的変形及び本発明の薬学的に許容されるその塩は、適切な試薬の適した同位体的変形を使用して、従来の手順により一般的に調製することができる。

【０１７４】

溶媒和物

本発明はまた、溶媒和物の形態の本発明の化合物を含む。特許請求の範囲において使用する用語は、このような形態を包含する。

【０１７５】

多形体

本発明はさらに、その種々の結晶形態、多形体及び（非）水和形態の本発明の化合物に関する。このような化合物の合成的調製において使用する溶媒からの精製及び／又は単離方法を多少変えることにより、任意のこのような形態で化合物を単離することができることは、医薬品業界において十分確立されている。

【０１７６】

プロドラッグ

本発明は、プロドラッグの形態の本発明のプロインスリン誘導体をさらに含む。このようなプロドラッグは概して、ヒト又は哺乳動物対象へ投与すると修飾部位を逆転し得るように、１又は２つ以上の適した基を修飾した、本発明のアナログである。このような逆転は通常、このような対象中に天然に存在する酵素により行われるが、この逆転をインビボで行うために、このようなプロドラッグと共に第２の薬剤を投与することが可能である。このような修飾部位の例としては、エステラーゼ等により逆転が行われ得る、エステル（例えば、上記のもののいずれか）が挙げられる。他のこのような系は、当業者に周知であると予想される。

【０１７７】

投与

本発明の医薬組成物は、経口、直腸内、膣内、非経口、筋肉内、腹腔内、動脈内、髄腔内、気管支内、皮下、皮内、静脈内、鼻腔、頬側又は舌下経路による投与に適合し得る。

【０１７８】

経口投与では、打錠、丸剤、錠剤、ゲルカプセル（gellule）、ドロップ、及びカプセルにより特に使用される。好ましくは、このような組成物は、１用量あたり１～２５０ｍｇ、より好ましくは１０～１００ｍｇの有効成分を含有する。

【０１７９】

他の投与形態は、静脈内、動脈内、髄腔内、皮下、皮内、腹腔内又は筋肉内に注射が可能な溶液又は乳濁液を含み、これらは、滅菌溶液又は滅菌可能な溶液から調製する。本発明の医薬組成物はまた、坐剤、ペッサリー、懸濁剤、乳濁液、ローション、軟膏、クリーム、ゲル、スプレー、溶液又は粉剤の形態であってもよい。

【０１８０】

経皮投与の代替手段は、皮膚パッチ剤の使用による。例えば、ポリエチレングリコール又は液体パラフィンの水性乳濁液からなるクリームに、有効成分を組み込むことができる。有効成分はまた、１～１０重量％の濃度で、白ろう又は白色軟パラフィンベース、並びに必要に応じて、上記安定剤及び保存剤からなる軟膏中に組み込むことができる。

【０１８１】

注射剤は、１用量あたり１０～１０００ｍｇ、好ましくは１０～２５０ｍｇの有効成分を含有することができる。

【０１８２】

組成物は、単位剤形、すなわち、単位若しくは複数用量を含有する個別のポーション、又は単位用量のサブユニットの形態に製剤化することができる。

【０１８３】

用量

当業者は、即席組成物のうちの１つの適した用量を容易に決定して、過度の実験を行うことなく、対象に投与することができる。一般的には、医師は、個々の患者に最も適切な実際の用量を決定し、これは、用いる特定の化合物の活性、その化合物の代謝安定性及び作用の長さ、年齢、体重、健康状態、性別、食事、投与の方法及び時間、排泄率、薬物の組合せ、特定の症状の重症度、並びに個別に受けている治療を含む種々な要因に依存する。本明細書に開示の用量は、平均的なケースの例示である。多いか又は少ない用量範囲が奏効するような個別の場合が当然あり得るが、これは、本発明の範囲内である。

【０１８４】

治療的使用

本発明の別の態様は、医薬としての使用のための上記のプロインスリン誘導体に関する

。
【０１８５】
本発明の別の態様は、糖尿病の治療若しくは予防、又は高血糖症の治療若しくは予防における使用のための上記のプロインスリン誘導体に関する。
【０１８６】
好ましくは、糖尿病は２型糖尿病である。
【０１８７】
本発明の別の態様は、糖尿病の治療、又は高血糖症の治療若しくは予防のための医薬の調製における上記のプロインスリン誘導体に関する。
【０１８８】
本明細書において使用する場合、文言「医薬の調製」は、さらなる治療薬のスクリーニングプログラムにおける、又はこのような医薬の製造の任意の段階における、その使用に加えて、そのまま医薬としての本発明のアナログの使用を含む。
【０１８９】
本発明の別の態様は、それを必要とする対象における糖尿病の治療、又は高血糖症の治療若しくは予防の方法であって、治療上有効量の上記の単鎖インスリンアナログを対象に投与するステップを含む、方法に関する。
【０１９０】
好ましくは、本方法は、ある量のＡＣＢ－プロインスリンを約１０～１０００μｇ／ｋｇの用量で生体に投与するステップを含む。より好ましい用量は、約１０～１００μｇ／ｋｇの活性化合物である。成人のヒトの一般的な１日量は、約０．５～１００ｍｇである。
【０１９１】
本方法の実施において、本発明の化合物は、１日１回又は１日に複数回投与することができる。治療計画により、長期間にわたっての投与を必要とし得る。１投与量あたりの量又は投与総量は、疾患の性質又は重症度、患者の年齢及び健康状態、並びに化合物に対する患者の耐性等の要因に依存する。
【０１９２】
治療方法を実施する簡便な方法は、本発明の化合物を静脈内注射で投与することである。この手順では、化合物の適切な可溶性の塩の滅菌製剤を５％のデキストロース溶液等の生理液に組み込み、得られた溶液を徐々にIV注入する。あるいは、IV注入のピギーバック法も使用することができる。
【図面の簡単な説明】
【０１９３】
本発明を、次の図を参照して、さらに説明する。
【図１】本発明によるＡＣＢ－プロインスリンペプチド１～４を示す図である。
【図２】ペプチド４（Ｃ（Ａｃｍ）^{7}Ｃ（Ａｃｍ）^{33}）の第１の酸化ステップ（ＤＭＳＯ使用）を示す略図である。
【図３】未精製の還元した、Ｃ＝ＲＲＧＲＲを有するＣ（Ａｃｍ）^{7}Ｃ（Ａｃｍ）^{33}逆転プロインスリンのＨＰＬＣプロファイル及びＥＳＩ－ＭＳ（Ａ）、ＤＭＳＯによるその酸化後に得られた生成物のＨＰＬＣプロファイル及びＥＳＩ－ＭＳ（Ｂ）、並びに精製した生成物（Ｃ＝ＲＲＧＲＲを有するビス－酸化ＡＣＢ－プロインスリン）のＨＰＬＣプロファイル（Ｃ）を示すグラフである。
【図４】Ｃ＝ＲＲＧＲＲを有するペプチド４（Ｃ（Ａｃｍ）^{7}Ｃ（Ａｃｍ）^{33}）逆転プロインスリンの第２の酸化ステップ（I_2使用）、及びトリプシン分解（trypsinolysis）によるＣペプチドの切り出しを示す略図である。
【図５】未精製の、ＣペプチドＲＲＧＲＲを有する反転プロインスリン（Ａ）、精製後の、ＣペプチドＲＲＧＲＲを有する反転プロインスリン（Ｂ）、トリプシンによる切断後に得られた混合生成物（Ｄ）、及び最終的な、精製した［Gly^{A21}，$Arg^{A22,A23}$］インスリン誘導体（Ｅ）のＨＰＬＣプロファイル及び対応するＭＳ－スペクトルを

示すグラフである。［実施例］
【０１９４】
本発明を、下記の非限定的実施例により、さらに説明する。
【０１９５】
略語
Ａｃｍ　５－アセトアミドメチル
Ｂｏｃ　ｔ－ブチルオキシカルボニル
ＣＴＣ　クロロトリチルクロリド
ＮＭＰ　Ｎ－メチルピロリドン
ＤＣＭ　ジクロロメタン
ＴＦＡ　トリフルオロ酢酸
ＲＥ　ロータリーエバポレーター
ＤＥＥ　ジエチルエーテル
ＤＩＣ　Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド
ＨＯＢｔ　ヒドロキシベンゾトリアゾール
ＨＯＳｕ　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド
Ｈｙｐ　（２Ｓ，４Ｒ）－４－ヒドロキシプロリン、又はＬ－ヒドロキシプロリン
ＤＭＦ　ジメチルホルムアミド
ＥＤＡＣ　１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド
ＲＴ　室温
ＤＴＴ　ジチオスレイトール
ＤＭＳＯ　ジメチルスルホキシド
ＭＭｔ　モノメトキシトリチル
Ｔｒｔ　トリチル
ＤＩＰＥＡ／ＤＩＥＡ　Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン
Ｆｍｏｃ　フルオレニルメチルオキシカルボニル
ＭｅＯＨ　メタノール
ＡｃＯＨ　酢酸
ＴＦＥ　トリフルオロエチルアルコール
Ｄｄｅ　Ｎ－（１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキシリデン）エチル）
ＩＰＡ　イソプロピルアルコール
ＴＥＳ　トリエチルシラン
【実施例１】
【０１９６】
Ａ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｂプロインスリン（ＡＣＢ－プロインスリン）の固相合成
一般的方法
Ａ１．ロードする２－クロロトリチル樹脂の調製
ＣＢＬ－Ｐａｔｒａｓ社製の２－クロロトリチルクロリド樹脂（ＣＴＣ－Ｃｌ）（２ｇ；１．６ｍｍｏｌ／ｇをロードする）を６０ｍｌのペプチド合成リアクターに入れ、１５ｍｌのジクロロメタン（ＤＣＭ）で１５分間、２５℃で膨潤させた。樹脂をろ過し、１０ｍｌのＤＣＭ中の１ｍｍｏｌのＦｍｏｃ－アミノ酸及び８ｍｍｏｌのジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）の溶液を加えた。この混合物を２時間、２５℃で撹拌した。２－ＣＴＣ樹脂の残存活性部位を、メタノール（ＭｅＯＨ）１ｍｌを加え、１時間反応させることにより中和した。樹脂をろ過し、ＤＣＭ／ＭｅＯＨ／ＤＩＰＥＡ（８５：１０：５）からなる混合物各１０ｍｌで３回、及びＮＭＰで３回洗浄した。洗浄後、ＮＭＰ中の２５容量％のピペリジン１０ｍｌで３０分間、樹脂を２回処理した。樹脂をＮＭＰ１０ｍｌで５回洗浄した。イソプロパノール（ＩＰＡ）１０ｍｌでの３回の洗浄により樹脂を収縮させ、恒量まで乾燥させた。使用したアミノ酸の７０～９５％ｍｍｏｌが樹脂に結合した。

【０１９７】
Ｂ．固相合成、一般的プロトコル
固相合成を２４℃で実施し、実施例１のパートＡに記載のように、アミノ酸１．０ｇをＣＴＣ樹脂とエステル結合させた。全ての合成の間、以下のプロトコルを使用した。
【０１９８】
Ｂ１．樹脂の膨潤
多孔性のポリプロピレンフリットを装填した２０ｍｌのプラスチックシリンジに樹脂を入れ、７ｍｌのＮＭＰで２回処理し、その後、ろ過した。
【０１９９】
Ｂ２．アミノ酸の活性化
アミノ酸（３．０当量）及び１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（４．０当量）を１０ｍｌのバイアル中で２．５倍量のＮＭＰ中に溶解し、０℃まで冷却した。次いで、ＤＩＣを加え（３．０当量）、その混合物を１５分間撹拌した。
【０２００】
Ｂ３．カップリング反応
次いで、Ｂ２で調製した溶液をＢ１のリアクターに加えた。このリアクターを１倍量のＤＣＭで１回洗浄し、リアクターに加え、これを１～３時間、２５～３０℃で撹拌した。カイザーテストを実施して、反応の完了を判定した。カップリング反応が３時間後に完了しなかった場合（カイザーテスト陽性）、反応混合物をろ過し、活性アミノ酸の新たな溶液と再結合させた。カップリングの完了後、反応混合物をろ過し、ＮＭＰ（洗浄毎に５倍量）で６回洗浄した。
【０２０１】
Ｂ４．Ｆｍｏｃ基の除去
Ｂ３で得られた樹脂をろ過し、次いで、２５容量％のピペリジンを含有する５ｍｌの溶液で３０分間処理した。５ｍｌのＮＭＰで３回、樹脂を洗浄する。
【０２０２】
Ｂ５．ペプチド鎖の伸長
各アミノ酸を組み込んだ後、所望のペプチド鎖が形成されるまでステップＢ１～Ｂ５を繰り返した。
【０２０３】
次のＦｍｏｃアミノ酸：Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｕ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ａｃｍ）－ＯＨ；及び次のＢｏｃ－アミノ酸：Ｂｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨを個々のアミノ酸又はアミノ酸断片のカップリングに使用した。
【０２０４】
Ｃ．Ｆｍｏｃ又はＢｏｃ基をそのＮ末端上に含有する、保護ＡＣＢプロインスリンペプチド及びこの保護断片をＣＴＣ樹脂から切断する一般的方法
上記のようにＢ１～Ｂ５で産生した樹脂結合ペプチド又はペプチド断片を５ｍｌのＮＭＰで４回、５ｍｌのＩＰＡで３回、及び最後に７ｍｌのＤＣＭで５回洗浄して、いかなる残留ＮＭＰ又は他の塩基性成分をも完全に除去した。次いで、０℃まで樹脂を冷却し、ＤＣＭからろ過し、５℃のＤＣＭ／ＴＥＳ（９５：５）中の１．０～１．５％のＴＦＡ１０ｍｌの溶液で６回処理した。
【０２０５】
次いで、混合物を２０分間、０℃で撹拌し、ろ過した。次いで、１０ｍｌのＤＣＭで樹脂を３回洗浄した。次いで、ろ液（ＴＦＡと比較して１．３当量）にピリジンを加えて、

ＴＦＡを中和した。次いで、ＤＣＭ中の切断溶液を１等容量の水と混合した。得られた混合物を減圧下で蒸留してＤＣＭを除去した（２８℃で３５０トル）。ＤＣＭを除去した後、ペプチド又はペプチド断片を沈殿させた。得られたペプチドを水及びエーテルで洗浄し、３０～３５℃、１５トルの真空下で乾燥した。あるいは、ＤＣＭを真空下で除去し、ジエチルエーテルを加えることにより保護ペプチドを沈殿させた。

【実施例２】

【０２０６】

保護ＡＣＢ－プロインスリンの脱保護

一般的方法：上記のように実施例１で得られた保護ＡＣＢ－プロインスリン（１００ｍｇ、０．０１ｍｍｏｌ）を１０ｍｌのＴＦＡ／ＴＥＳ／ＤＴＴ／ＤＣＭ（９３：３：３：３）で５℃で３時間、及び２２℃で１時間、処理した。得られた溶液を真空下で濃縮し、次いで、ジエチルエーテルを加えることにより脱保護したペプチドを沈殿させ、ジエチルエーテル１０ｍｌで３回洗浄した。得られた固体を真空下で恒量まで乾燥した（２５℃、１５トル）。収量は６０ｍｇであった。

【実施例３】

【０２０７】

未精製ＡＣＢ－プロインスリン（すべてのＣｙｓはフリーである）の１段階（ランダム）酸化的フォールディング

実施例２に記載のように調製した１０ｍｇの未精製の脱保護ＡＣＢ－プロインスリン（すべてのＣｙｓはフリーである）を２ｍｌのＤＭＳＯ中に溶解した。この溶液に０．１ＭのＧｌｙ緩衝液、ｐＨ１０．５を（８ｍｌ）、次いで、固体Ｇｎｄ．ＨＣｌを、透明な溶液が得られるまで加えた（１．９ｇ、約２Ｍ）。この溶液を室温で一晩置いた。静置の間、少量の沈殿物が生じた。上清（CF_3CO_2HでｐＨ２に酸性化した）のＨＰＬＣ分析を、Waters 996ＰＤＡ検出器を備えたWaters Alliance 2695システム上で、Purospher RP-8、１２５×４ｍｍ、５μｍカラム（Merck社製）及び１０％Ｂ～６０％Ｂの直線勾配、流量１ｍｌ／分（Ａ＝水中１％ＴＦＡ及びＢ＝アセトニトリル中１％ＴＦＡ）により実施し、これにより、三酸化異性体の複合混合物が形成されたことが示された。

【実施例４】

【０２０８】

［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリンの酸化的フォールディング

実施例２に記載のように調製した１０ｍｇの未精製脱保護［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリンを２ｍｌのＤＭＳＯ中に溶解した。この溶液に０．１ＭのＧｌｙ緩衝液、ｐＨ１０．５を（８ｍｌ）、次いで、固体Ｇｎｄ．ＨＣｌを、透明な溶液が得られるまで加えた（１．９ｇ、約２Ｍ）。この溶液を室温で一晩置いた。静置の間、少量の沈殿物が生じた。上清（CF_3CO_2HでｐＨ２に酸性化した）のＨＰＬＣ分析を上記実施例４に記載のように実施し、これにより、Waters-Micromass ZQ4000システム上でのＥＳＩ－ＭＳ分析によって確認されたように、主要なビス－酸化生成物が形成されたことが示された。Ｍ計算値は６５５８．５６Ｄａ、Ｍ実測値は６５５８．３６Ｄａであった。

【実施例５】

【０２０９】

ビス－酸化［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリンの精製

上記実施例４に記載のように得られたビス－酸化［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリンの溶液を０．２膜シリンジフィルターでろ過後、Purospher RP-18セミ分取カラム、１０×２５０ｍｍ（Merck社製）上の２つのポーションにロードし、Ａ相＝水中１％ＴＦＡ、Ｂ相＝アセトニトリル中１％ＴＦＡ）、アイソクラティックな３０％Ｂを５分間、次いで、直線勾配を３０％Ｂ～４０％Ｂで３０分以内、流量４ｍｌ／分で実施した。主生成物の収集した画分を液体窒素で冷凍し、凍結乾燥した。精製収率は３０％であった。

【実施例６】

【０２１０】
黄色ブドウ球菌（Staphylococcus Aureus）Ｖ８プロテアーゼフィンガープリンティングによるビス－酸化［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリンのジスルフィド結合ペアリングの判定
１００μｇの精製したビス－酸化［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリンを０．１Ｍの酢酸アンモニウム１５０ｕＬ、ｐＨ４．０に溶解した。０．１Ｍの酢酸アンモニウム中の黄色ブドウ球菌Ｖ８プロテアーゼ（シークエンシンググレード、Sigma-Aldrich社から購入可能）の溶液５０ｕＬ（５μｇ）を加え、２５℃で分解培養した。Purospher RP-8ＨＰＬＣカラム上に２０ｕＬの溶液を注入し、１０％Ｂ～６０％Ｂの勾配で３０分以内実施することにより、分解の進行をモニターした。５４時間後、出発ペプチドは、ほとんど消失した。生じたピークのＥＳＩ－ＭＳ分析により、ビス－酸化－［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリンの妥当なジスルフィド結合の配置が確認された。

【実施例７】
【０２１１】
ヨウ素によるビス－酸化［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリンの酸化
上記実施例５に記載のように得られた、精製し凍結乾燥したビス－酸化［Ｃｙｓ（Ａｃｍ）７，３３］－ＡＣＢ－プロインスリン（２ｍｇ）を、酢酸／水４：１ｖ／ｖの混合物（１ｍｌ）中に溶解した。次いで、酢酸／水４：１（１ｍｌ）中のヨウ素（４ｍｇ）の溶液に、この溶液を１０分間にわたって振盪下で加えた。時々振盪しながら１時間、室温で静置した後、水中のアスコルビン酸１Ｍ溶液を２滴加えて、ヨウ素過剰を中和した（脱色）。次いで、この溶液をPurospher RP-8、１２５×４ｍｍ　ＨＰＬＣカラム（Merck社製）上のポーションにロードし、１０％Ｂ～６０％Ｂの勾配で３０分以内、流量１ｍｌ／分で実施することにより精製した。主生成物の収集した画分を液体窒素で冷凍し、凍結乾燥した。収率：７０％。ＥＳＩ－ＭＳ：M計算値６４１４．３９Ｄａ、M実測値６４１３．８３Ｄａ。

【実施例８】
【０２１２】
ＡＣＢ－プロインスリンのトリプシン切断
ＡＣＢ－プロインスリン５００μｇを、２Ｍの尿素及び５μｇのトリプシン（Sigma社製、わずかに混濁した溶液）を含有する０．１ＭのＴｒｉｓ．ＨＣｌ緩衝液５００ｕＬ、ｐＨ７．９に室温で溶解した。反応を、トリフルオロ酢酸（５ｕＬ）による酸性化によって５分後に止めた。遠心分離後、実施例７に記載のように、Purospher RP-8カラム上の１００ｕＬのポーションに溶液をロードし、主生成物を単離した。ＥＳＩ－ＭＳにより生成物を分析したところ、［ＧｌｙＡ２１］－インスリンプラス２Ａｒｇ残基と一致した（ＥＳＩ－ＭＳ：M計算値６０６２．９７Ｄａ、M実測値６０６２．２８Ｄａ）。ＴＣＥＰによるジスルフィド結合の還元後、２つの鎖のＬＣ－ＭＳ分析により、生成物が［ＧｌｙＡ２１，ＡｒｇＡ２２，ＡｒｇＡ２３］－インスリンであると同定された。

【０２１３】
記載した本発明の態様の種々の改変及び変形は、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく当業者に明らかとなる。本発明は、特定の好ましい実施形態に関して記載してきたが、特許請求される本発明が、このような特定の実施形態に不当に制限されてはならないことが理解されるべきである。実際に、関連する分野の当業者に明白な、本発明の実行における記載の方法の種々の改変は、以下の特許請求の範囲の対象内にあることを意図する。

【図１】



FIGURE 1

【図２】

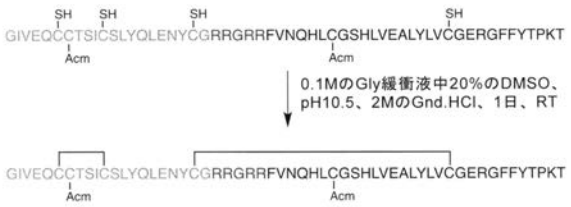


FIGURE 2

【図３】

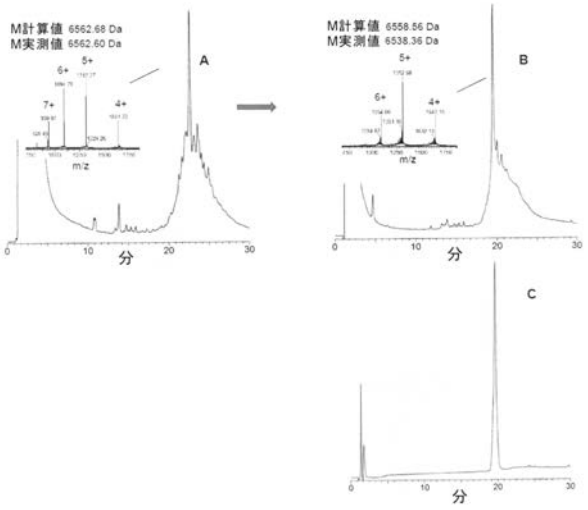


FIGURE 3

【図４】

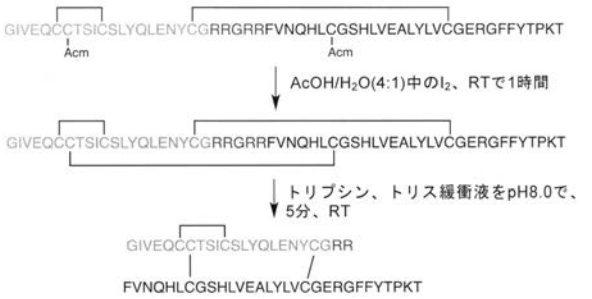


FIGURE 4

【図５】

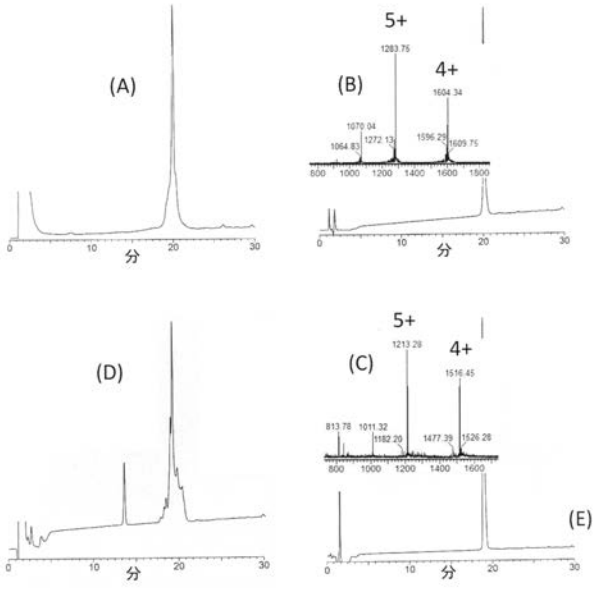


FIGURE 5

【配列表】
2019530473000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/055336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/28 C07K14/62 A61P3/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 6 444 641 B1 (FLORA DAVID BENJAMIN [US]) 3 September 2002 (2002-09-03) col. 16, lines 18-40; col. 20, lines 15-20; col. 16, lines 41-56; ol. 20, lines 15-20; col. 18-21; col 17-18 col. 1, lines 10-14, claims, col. 27, lines 28-34;; sequences 1, 2 the whole document ----- -/--	1-11,13, 18,27-37 12, 14-17, 19-26

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 October 2017	17/11/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Madruga, Jaime

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/055336

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEATH W F ET AL: "(A-C-B) Human Proinsulin, a Novel Insulin Agonist and Intermediate in the Synthesis of Biosynthetic Human Insulin", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 267, no. 1, 5 January 1992 (1992-01-05), pages 419-425, XP003018538, ISSN: 0021-9258 Discussion; page 423, column 2, paragraph 1; figure 1 the whole document -----	12, 14-17, 19-26
Y	EP 0 518 587 A2 (LILLY CO ELI [US]) 16 December 1992 (1992-12-16) cited in the application the whole document pages 3-4; p 5, lines 35-48; claims -----	12, 14-17, 19-26
Y	G. RAJPAL ET AL: "Single-Chain Insulins as Receptor Agonists", MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 23, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 679-688, XP055085086, ISSN: 0888-8809, DOI: 10.1210/me.2008-0349 cited in the application the whole document Abstract, Results; table 1 -----	12, 14-17, 19-26
Y	WETZEL R ET AL: "Expression in escherichia coli of a chemically synthesized gene for a ''mini-c'' analog of human proinsulin", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 16, no. 1-3, 1 December 1981 (1981-12-01), pages 63-71, XP023790906, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/0378-1119(81)90061-5 [retrieved on 1981-12-01] the whole document Results; table 1 Results, Abstract; figure 1 -----	12, 14-17, 19-26

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/055336

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THIM L ET AL: "Secretion and processing of insulin precursors in yeast", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 83, no. 18, 1 September 1986 (1986-09-01), pages 6766-6770, XP002100937, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.83.18.6766 the whole document Abstract, Results; page 6768; table 1	12, 14-17, 19-26
Y	WO 02/079251 A2 (NOVO NORDISK AS [DK]) 10 October 2002 (2002-10-10) page 4, line 5 - line 6; example 1; sequences 9-11	12, 14-17, 19-26
Y	GATOS D ET AL: "AN EFFICIENT STRATEGY FOR THE SYNTHESIS OF INSULIN DERIVATIVES VIA "INVERTED" MINI-PROINSULIN PRECURSORS", JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, vol. 22, no. Suppl. S2, PP I-014, 4 September 2016 (2016-09-04), - 10 December 2016 (2016-12-10), page S61, XP002775163, & 34TH EUROPEAN PEPTIDE SYMPOSIUM; LEIPZIG, GERMANY; SEPTEMBER 04 -09, 2016 abstract	16,17, 19-26
A	BELGI A ET AL: "The chemical synthesis of insulin: From the past to the present", IMMUNOLOGY, ENDOCRINE AND METABOLIC AGENTS IN MEDICINAL CHEMI, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD., NL, vol. 11, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 40-47, XP008164062, ISSN: 1871-5222, DOI: 10.2174/187152211794519412 the whole document page 42, column 1, paragraph 2; figures 3,4, page 47	1-37
A	FA LIU ET AL: "Concise Synthetic Routes to Human Insulin", ORGANIC LETTERS , 14(23), 6012-6015 CODEN: ORLEF7; ISSN: 1523-7052, vol. 15, no. 4, 7 February 2013 (2013-02-07), pages 960-963, XP055419919, ISSN: 1523-7060, DOI: 10.1021/ol400149j the whole document figures 1-3	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2017/055336

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6444641 B1	03-09-2002	NONE	
EP 0518587 A2	16-12-1992	AT 166106 T	15-05-1998
		AU 648670 B2	28-04-1994
		BR 9202180 A	02-02-1993
		CA 2070503 A1	12-12-1992
		CN 1068501 A	03-02-1993
		CZ 9201714 A3	12-05-1993
		DE 69225432 D1	18-06-1998
		DE 69225432 T2	01-10-1998
		DK 0518587 T3	19-10-1998
		EP 0518587 A2	16-12-1992
		ES 2116315 T3	16-07-1998
		FI 922645 A	12-12-1992
		IE 921862 A1	16-12-1992
		JP H05255392 A	05-10-1993
		NO 922224 A	14-12-1992
		NZ 243089 A	26-01-1994
		SK 171492 A3	12-04-1995
		US 5304473 A	19-04-1994
		YU 59392 A	15-11-1994
		ZA 9204080 B	06-12-1993
WO 02079251 A2	10-10-2002	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ
Ａ６１Ｐ 3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｋ 38/28	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/28	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100096482
弁理士 東海 裕作
(74)代理人 100188352
弁理士 松田 一弘
(74)代理人 100113860
弁理士 松橋 泰典
(74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真
(74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子
(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
(74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(72)発明者 ガトス ディミトリオス
ギリシャ国 ジーアール－２６０００ パトラ ブロック１ インダストリアル エリア オブ パトラ ビルディング ケミカル アンド バイオファーマスーティカル ラボラトリーズ オブ パトラ エス．エー．気付
(72)発明者 アナスタシウ アレクサンドラ
ギリシャ国 ジーアール－２６０００ パトラ ブロック１ インダストリアル エリア オブ パトラ ビルディング ケミカル アンド バイオファーマスーティカル ラボラトリーズ オブ パトラ エス．エー．気付
(72)発明者 バルロス クレオメニス
ギリシャ国 ジーアール－２６０００ パトラ ブロック１ インダストリアル エリア オブ パトラ ビルディング ケミカル アンド バイオファーマスーティカル ラボラトリーズ オブ パトラ エス．エー．気付

Ｆターム(参考) 4B064 AG01 AG16 BJ12 CA19 CC24 DA01
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA41 CA53 DB34 NA02 NA05 NA06
NA14 NA20 ZC351 ZC352
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA13 BA14 BA17 BA20 BA30 BA32
CA40 DA37 EA20 FA20 FA33 FA74