

(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2012-511506

(P2012-511506A)

(43) 公表日 平成24年5月24日 (2012.5.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 14/62 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/62 Z N A	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10	4 H O 4 5
<b>A 6 1 K 38/28 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/26	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2011-539029 (P2011-539029)	(71) 出願人	511099685
(86) (22) 出願日	平成21年12月3日 (2009.12.3)		ノヴォ・ノルディスク・アー／エス
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月25日 (2011.5.25)		デンマーク・DK-2880・ハウスベア
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/066335		・ノヴォ・アレ・ (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02010/066636	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成22年6月17日 (2010.6.17)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	08171086.5	(74) 代理人	100064908
(32) 優先日	平成20年12月9日 (2008.12.9)		弁理士 志賀 正武
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	09161014.7		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成21年5月25日 (2009.5.25)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 実広 信哉
(31) 優先権主張番号	09161232.5		
(32) 優先日	平成21年5月27日 (2009.5.27)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規インスリンアナログ

## (57) 【要約】

インスリンアナログ (ここで、B25アミノ酸残基がHisまたはAsnであるが、ただしB25アミノ酸残基がHisである場合、B27アミノ酸残基はAspまたはGluであり、A14アミノ酸残基がGluとは異なる) は、肝臓選択的作用を有する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

B25アミノ酸残基がHis (H)またはAsn (N)であるが、ただしB25アミノ酸残基がHisである場合、B27アミノ酸残基はAsp (D)またはGlu (E)であり、A14アミノ酸残基がGlu (E)とは異なる、インスリンアナログ。

## 【請求項 2】

A14Q, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; B25N, B27E, desB30ヒトインスリン; A8H, B25N, B27E, desB30ヒトインスリン; B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; B1E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A8H, B1E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A8H, B25N, B27D, desB30ヒトインスリン; B25H, B27D, desB30ヒトインスリン; A8H, B25H, B27D, desB30ヒトインスリン; B25N, desB30ヒトインスリン及びA21G, B25N, desB30-ヒトインスリンとは異なる、請求項1に記載のインスリンアナログ。

## 【請求項 3】

B25アミノ酸残基がHis (H)であり、B27アミノ酸残基がAsp (D)またはGlu (E)であり、A14アミノ酸残基がGlu (E)とは異なる、請求項1または2に記載のインスリンアナログ。

## 【請求項 4】

B25アミノ酸残基がAsn (N)である、請求項1または2に記載のインスリンアナログ。

## 【請求項 5】

B29及びB30の位置にアミノ酸残基を有しない(すなわち、desB29, desB30ヒトインスリンアナログである)、請求項1から4のいずれかの可能な一項に記載のインスリンアナログ。

## 【請求項 6】

B28, B29及びB30の位置にアミノ酸残基を有しない(すなわち、desB28, desB29, desB30ヒトインスリンアナログである)、請求項1から5のいずれかの可能な一項に記載のインスリンアナログ。

## 【請求項 7】

B27, B28, B29及びB30の位置にアミノ酸残基を有しない(すなわち、desB27, desB28,

desB29, desB30ヒトインスリンアナログである)、請求項1から6のいずれかの可能な一項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 8】

B27, B28, B29及びB30の位置にアミノ酸残基を有しない(すなわち、desB27, desB28, desB29, desB30ヒトインスリンアナログである)、請求項1から7のいずれかの可能な一項に記載のインスリンアナログであって、好ましくは、B鎖の位置26, 27または28におけるアミノ酸がAspまたはGluである、インスリンアナログ。

【請求項 9】

[A8H, B25N, B27D]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27E]ヒトインスリン; [A8H, B25N]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27D]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27E]ヒトインスリン; [B25H, B27D]ヒトインスリン; [B25H, B27E]ヒトインスリン; [B25H]ヒトインスリン; [B25N, B27D]ヒトインスリン; [B25N, B27E]ヒトインスリン; [B25N]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27E, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27D, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27E, desB30]ヒトインスリン; [B25H, B27D, desB30]ヒトインスリン; [B25H, B27E, desB30]ヒトインスリン; [B25H, desB30]ヒトインスリン; [B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン; [B25N, B27E, desB30]ヒトインスリン及び[B25N, desB30]ヒトインスリンからなる群から選択される、可能な限りにおいて請求項1から8のいずれか一項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 10】

[A8H, B25H]ヒトインスリンまたは[A8H, B25H, desB30]ヒトインスリンである、可能な限りにおいて請求項1から8のいずれか一項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 11】

[A8H, B25N, B27A, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27R, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27N, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27Q, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27E, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27G, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27H, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27I, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27L, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27M, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27F, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27P, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27S, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27W, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27Y, desB30]ヒトインスリン及び[A8H, B25N, B27V, desB30]ヒトインスリンからなる群から選択される、可能な限りにおいて請求項1から10のいずれか一項に記載のインスリンアナログ。

【請求項 12】

物に関する請求項1から11のいずれか一項に記載の化合物を治療上有効量でそれを必要とする対象に投与する工程を含む、糖尿病の治療方法。

【請求項 13】

物に関する請求項1から11のいずれか一項に記載のインスリンアナログを治療上有効量でそれを必要とする対象に投与する工程を含む、糖尿病の治療方法、及び同時に、ヒトインスリンと関連する糖尿病よりは低い、癌の発症リスクを知らせる方法。

【請求項 14】

物に関する請求項1から11のいずれか一項に記載の化合物が、請求項2に記載の化合物とは異なる、方法に関する請求項12または13に記載の方法。

【請求項 15】

本明細書に開示されるいずれかの新規特徴または特徴の組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規インスリンアナログに関する。

【背景技術】

## 【 0 0 0 2 】

インスリンは、ヒトにおける血中グルコース濃度の制御並びにタンパク質及び脂質代謝の役割に關与する膵臓ホルモンである。インスリンは20世紀初頭に発見された。

## 【 0 0 0 3 】

初期の商業用インスリン（ブタ及びウシインスリン）は、ウシまたはブタの膵臓からの抽出に続く精製により得られた。80年代に、ヒトインスリンは市場に出された。ヒトインスリンを製造する一態様は組換えDNA技術によるものであった。まもなく、組換えDNA技術がさらに発達し、多くの異なるインスリンアナログが製造され、今やその一部は上市されている。前世紀に、多くの異なるインスリン製品が上市されており、それには、インスリン亜鉛懸濁液、例えば硫酸プロタミンとの、インスリン複合体、及び、例えばアシル化インスリンなどの、インスリン誘導体も含まれる。

10

## 【 0 0 0 4 】

糖尿病は地球上のほとんどすべての社会に影響を及ぼしており、人間が今日直面する最も差し迫った健康危機の一つである。現在、世界中で2億4600万人以上の人間がこの病気とともに生き、その数は19年内に3億8000万人にまで爆発的に増えると予測されている。

## 【 0 0 0 5 】

インスリン受容体(IR)は、IR遺伝子のエクソン11に關与するインスリン受容体mRNAの選択的スプライシングから生じる、2つのアイソフォーム、IR-A及びIR-Bとして発現する。IR-A サブユニットはエクソン11によりコードされるC末アミノ酸配列が欠如している。

20

## 【 0 0 0 6 】

インスリン受容体の2つのアイソフォームは異なって発現される。Bアイソフォームは肝臓で優性に発現する（90%）が、Aアイソフォームとともに多くの組織で広く発現する（~50/50）。

## 【 0 0 0 7 】

健常人及び糖尿病患者において、肝臓は、グルコースを産生して低血糖を避ける。しかしながら、2型糖尿病患者では、肝臓グルコースの生産量の調節は、ほとんど制御されず、増加し、一晩の断食後には倍増し得る。さらに、皮下のインスリン投与は肝臓の前に末梢組織にインスリンを送達させるが、通常の生理学的な条件下では、肝臓が受け取るインスリン濃度が脂肪及び筋肉などの末梢組織におけるよりも3~4倍高くなるような態様で、インスリンは膵臓から肝臓に直接送達される。糖尿病患者は肝臓選択的インスリンアナログで処置することにより、末梢組織にほとんど影響を与えずに肝臓のグルコース生産量を効果的に減らして、それによりグルコース制御の改善、低血糖症のリスクの減少、体重増加の減少、より良好な脂質プロファイル、及び心血管保護効果へと結びつく、恩恵を受けるであろう。それを追求する一態様は、インスリン受容体のBアイソフォームに対して選択性を有するインスリンアナログを開発することである。しかし、かかるアナログは現在では知られていない。報告によれば、ヒトインスリンは、インスリン受容体の、BアイソフォームよりもAアイソフォームに対して、わずかに高い親和性を有する（EMBO Journal 9 (1990), 2409-13を参照のこと）

30

## 【 0 0 0 8 】

インスリン受容体アイソフォームの発現のための時間次元(temporal dimension)もまた存在する。IR-Aは、胎児の発達期に主に発現し、その後、細胞分化はIR-Bの発現を上方に調節する。IR-Aは複数の腫瘍並びに乳癌及び大腸癌を含む癌細胞系において上方に調節され、IR-BよりもIR-Aに対して40~50倍高い親和性を有する、IGF-IIの増殖促進作用のいくつかを媒介する。

40

## 【 0 0 0 9 】

WO 90/01038によると、His<sup>B25</sup>ヒトインスリン; His<sup>B25</sup>, Asp<sup>B28</sup>, desB30ヒトインスリン及びHis<sup>B25</sup>ヒトインスリン B30アミドは高い生物学的活性を有する。EP 837,072 A2によると、His<sup>B25</sup>, des B26, desB30ヒトインスリンは溶液中での会合能力が低い。これらの文献において肝臓活性についての言及はない。WO 2008/034881によると、いくつかのA14E, B25H及びB25H, B27Tインスリンアナログはプロテアーゼに対して抵抗性を示す。WO 0

50

0/69901では、図5Aにおいて、「ヒトインスリンと比較して少なくとも約1~20アミノ酸の置換を有するアミノ酸配列、特に6アミノ酸を有するIAタンパク質」と開示される。WO 00/69901における請求項9によると、アミノ酸N (Asn)は位置B25における起こり得る置換の一つであるが、請求項9は請求項8のみを参照しているので、B25N置換は、少なくとも5つの置換を含むIAタンパク質に対するうわべだけのものとして言及されている。

【0010】

US 5,446,020では、アミノ残基A12、A14、A15及びA19で改変されているインスリンアナログが開示されている。WO 90/12814は、A13、A14、A15、A19及びB16の位置で置換されている肝臓特異的なインスリンアナログを開示する。

【先行技術文献】

10

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】WO 90/01038

【特許文献2】EP 837,072 A2

【特許文献3】WO 2008/034881

【特許文献4】WO 00/69901

【特許文献5】US 5,446,020

【特許文献6】WO 90/12814

【非特許文献】

【0012】

20

【非特許文献1】EMBO Journal 9 (1990), 2409-13

【非特許文献2】Greene and Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999

【非特許文献3】EPOガイドラインC, III, 4.13

【非特許文献4】Kjeldsen et al., (1998), Prot. Expr. Pur. 14, 309-316

【非特許文献5】Kristensen et al., (1997), J. Biol. Chem. 20, 12978-12983

【非特許文献6】Glendorf et al. (2008), Biochemistry, 47, 4743-4751

【非特許文献7】Volund, A., (1978), Biometrics, 34, 357-365

【非特許文献8】Kohler, G & Milstein C. (1976), European J. Immunology, 6:511-19

【非特許文献9】Taggart RT et al (1983), Science 219:1228-30

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的は、先行技術の不利益の少なくとも1つを克服しまたは改善する、あるいは有用な代替手段を提供することである。

【0014】

本発明の一態様は、インスリン受容体の、AアイソフォームよりもBアイソフォームに対して高い親和性を有するインスリンアナログの提供に関する。

【0015】

本発明の別の態様は、グルコースの制御を改善するインスリンアナログの提供に関する。

40

【0016】

本発明の別の態様は、低血糖のリスクを減少させるインスリンアナログの提供に関する。

【0017】

本発明の別の態様は、全くまたはほとんど体重増加を提供しないインスリンアナログの提供に関する。

【0018】

本発明の別の態様は、改善された脂質プロファイルの提供に関する。

【0019】

50

本発明の別の態様は、心臓保護作用の提供に関する。

【0020】

本発明の別の態様は、ヒトインスリンに關与する癌のリスクと比較して、癌のリスクを低減させるインスリンアナログの提供に関する。

【0021】

本発明の別の態様は、肝臓選択的であるインスリンアナログの提供に関する。

【0022】

定義

本明細書で使用される用語「インスリンアナログ」は、1または複数のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、並びに/あるいは、1または複数のアミノ酸残基が欠失している、並びに/あるいは、1または複数のアミノ酸残基が追加されている、ヒトインスリンを意味する。

【0023】

A1, A2及びA3などのような本明細書の用語は、インスリンのA鎖において(N末端から計算して)、それぞれ、位置1、2及び3などにおけるアミノ酸残基を示す。同様に、B1, B2及びB3などのような用語は、インスリンのB鎖において(N末端から計算して)、それぞれ、位置1、2及び3などにおけるアミノ酸残基を示す。アミノ酸残基をコードする一文字を使用した、A21A, A21G及びA21Qのような用語は、A21の位置におけるアミノ酸残基が、それぞれ、A, G及びQであることを示す。アミノ酸残基をコードする三文字を使用して、対応する表現は、それぞれ、A21Ala, A21Gly及びA21Glnである。

【0024】

本明細書において用語A(0)及びB(0)は、A1及びB1に対するN末端側のアミノ酸残基の位置をそれぞれ示す。用語A(-1)及びB(-1)はA(0)及びB(0)に対するN末端側の最初のアミノ酸残基の位置をそれぞれ示す。このようにして、A(-2)及びB(-2)は、A(-1)及びB(-1)に対するN末端側のアミノ酸残基の位置をそれぞれ示し、A(-3)及びB(-3)は、A(-2)及びB(-2)に対するN末端側のアミノ酸残基の位置をそれぞれ示していき、その他同様である。

【0025】

本明細書において、用語アミノ酸残基は、形式上、カルボキシ基からヒドロキシ基が除去されている、及び/または、形式上、アミノ基から水素原子が除去されている、アミノ酸である。

【課題を解決するための手段】

【0026】

簡潔には、本発明は、B25アミノ酸残基がHis (H)またはAsn (N)であるが、ただしB25アミノ酸残基がHisである場合、B27アミノ酸残基がAsp (D)またはGlu (E)であり、A14アミノ酸残基がGlu (E)とは異なる、インスリンアナログに関する。

【発明を実施するための形態】

【0027】

隣接するB23Gly及びB27Thr残基とともに、B24Phe, B25Phe及びB26Tyrからなる芳香族化合物のトリプレットに関する解析により、一連の新しいクラスの受容体アイソフォーム選択的アナログが発見された。ヒトインスリンと比較して、インスリン受容体のAまたはBアイソフォームのいずれかに関する相対的な結合親和性において2~4倍の差を有する複数のアナログにより、位置B25が受容体アイソフォーム選択性のための重要な決定因子であることの同定が可能になった。B25PheをAsnで置換することにより、受容体のAアイソフォームと比較してBアイソフォームに対して2倍以上高い相対的な結合親和性を有するアナログが得られたが、かかる位置にTyr残基を導入した場合には逆のことが観察された。位置B27での酸性アミノ酸残基は、B25N変異を含むアナログに対して、受容体Bアイソフォームに対する親和性をさらに2倍選択的に増加させた。さらに、B25HをB27DまたはB27Eのいずれかと組み合わせることにより、対応する単一突然変異アナログが相対的なアイソフォーム結合親和性において何らの差も示さないにも関わらず、Bアイソフォーム選択的アナログが得られることも発見された。これらの結果は、インスリン分子における位置B25単独で

の突然変異の一つまたは位置B27での突然変異との組み合わせが、インスリン受容体アイソフォーム選択性を与えることを示している。

【0028】

インスリンアナログの製造

ポリペプチド、例えばインスリンの製造は、当該技術分野において周知である。本発明のインスリンアナログは、古典的なペプチド合成、例えば、t-BocまたはFmocケミストリーを用いた固相ペプチド合成、あるいは他のよく確立された技法（例えば、Greene and Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999を参照）により、例えば製造可能である。本発明のインスリンアナログは、アナログをコードするDNA配列を含む宿主細胞を培養する工程を含み、インスリンアナログの発現を可能にする条件下で適当な栄養培地中でインスリンアナログを発現可能である方法によって、製造されてもよい。従って、簡潔に、本発明のインスリンアナログは、既知のインスリンアナログの製造に類似的に製造される。

10

【0029】

適応：

糖尿病

用語「糖尿病」または「（真性）糖尿病」は、1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠性糖尿病（妊娠中）及び高血糖症を引き起こす他の状態を含む。かかる用語は、哺乳類、特にヒトにおける、膵臓が不十分な量のインスリンを産生する、あるいは体の細胞がインスリンに適切に応答できないので細胞がグルコースを吸収することができない代謝疾患のために使用される。結果として、グルコースが血中に増大する。

20

【0030】

インスリン依存性糖尿病(IDDM)及び若年発症型糖尿病とも呼ばれる、1型糖尿病は、B細胞の破壊により生じ、それにより通常全くのインスリン欠損に陥る。

【0031】

インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)及び成人発症型糖尿病とも呼ばれる、2型糖尿病は、主にインスリン抵抗性、及びそれによる相対的なインスリン欠乏、並びに／あるいは、インスリン抵抗性を伴う主にインスリンの分泌欠陥に関連する。

【0032】

他の適応

30

一実施態様において、本発明のインスリンアナログは、高血糖症、2型糖尿病、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満、高血圧、X症候群、脂質異常症、認知障害、アテローム性動脈硬化、心筋梗塞、脳卒中、冠動脈性心疾患及び他の循環器疾患、炎症性腸疾患、消化不良、及び胃潰瘍の治療または予防のための医薬の製造のためにも使用される。

【0033】

他の実施態様において、本発明のインスリンアナログは、2型糖尿病の病気の進行を遅らせるまたは防止するための医薬として使用される。

【0034】

他の実施態様において、本発明のインスリンアナログは、食物摂取を減少させ、細胞のアポトーシスを減少させ、細胞の機能及び細胞の集団を増加させ、及び／または、細胞に対するグルコース感受性を回復させるための医薬として使用される。

40

【0035】

本発明の一実施態様において、本発明のインスリンアナログは、高血糖症、2型糖尿病、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満、高血圧、X症候群、脂質異常症、認知障害、アテローム性動脈硬化、心筋梗塞、冠動脈性心疾患及び他の循環器疾患、脳卒中、炎症性腸疾患、消化不良、及び胃潰瘍を治療しまたは予防するための、あるいは2型糖尿病の病気の進行を遅らせるまたは防止するための、あるいは食物摂取を減少させ、細胞のアポトーシスを減少させ、細胞の機能及び細胞の集団を増加させるための、及び／または、細胞に対するグルコース感受性を回復させるための医薬として使用するために提供される。

【0036】

50

本発明のさらなる一実施態様において、高血糖症、2型糖尿病、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満、高血圧、X症候群、脂質異常症、認知障害、アテローム性動脈硬化、心筋梗塞、冠動脈性心疾患及び他の循環器疾患、脳卒中、炎症性腸疾患、消化不良、及び胃潰瘍を治療または予防するための、あるいは2型糖尿病の病気の進行を遅らせるまたは防止するための、あるいは食物摂取を減少させ、細胞のアポトーシスを減少させ、細胞の機能及び細胞の集団を増加させるための、及び/または、細胞に対するグルコース感受性を回復させるための方法が提供され、該方法は、本発明のインスリンアナログのこのような治療に有効な量をこのような治療を必要とする患者に投与する工程を含む。

#### 【0037】

##### 糖尿病の合併症用化合物

本発明のインスリンアナログを用いる治療は、例えば、抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲調節剤、抗高血圧剤、糖尿病から生じるもしくは糖尿病に関連する合併症の治療剤及び/または予防剤、並びに肥満から生じるもしくは肥満に関連する合併症及び疾患の治療剤及び/または予防剤から選択される、第2またはさらなる薬理活性物質と組み合わせられてもよい。これらの薬理活性物質の例は：GLP-1及びGLP-1の誘導体及びアナログ、GLP-2及びGLP-2の誘導体及びアナログ、エキセンジン-4及びエキセンジン-4の誘導体及びアナログ、アミリン及びアミリンの誘導体及びアナログ、スルホニル尿素、ビグアニド、メグリチニド(meglitinide)、グルコシダーゼ阻害剤、グルカゴンアンタゴニスト、DPP-IV(ジペプチジルペプチダーゼIV)阻害剤、糖新生及び/またはグリコーゲン分解の刺激に關与する肝酵素の阻害剤、グルコース摂取調節剤、HMG CoA阻害剤(スタチン)としての抗脂質異常症薬などの脂質代謝を改善する化合物、食物摂取を減少させる化合物、RXRアゴニスト、及び細胞のATP依存性(感受性)カリウムチャネルに作用する薬剤；コレステラミン、コレステロール、クロフィブラート、ゲンフィブロジル、ロバスタチン、プラバスタチン、シムバスタチン、プロブコール、デキストロチロキシチン、ネテグリニド、レバグリニド；

遮断薬であって、アルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロール及びメトプロロールなど、ACE(アンジオテンシン変換酵素)阻害剤であって、ベナゼプリル、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、アラトリオプリル、キナプリル及びラミプリルなど、カルシウムチャネル阻害剤であって、ニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼム及びベラパミルなど、並びに遮断薬であって、ドキサゾシン、ウラビジル、ブラゾシン及びテルアゾシンなど；CART(コカインアンフェタミン調節転写物)アゴニスト、NPY(ニューロペプチドY)アンタゴニスト、MC4(メラノコルチン4)アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、TNF(腫瘍壊死因子)アゴニスト、CRF(コルチコトロピン放出因子)アゴニスト、CRF BP(コルチコトロピン放出因子結合タンパク質)アンタゴニスト、ウロコルチンアゴニスト、

3アゴニスト、MSH(メラニン細胞刺激ホルモン)アゴニスト、MCH(メラニン細胞凝集ホルモン)アンタゴニスト、CCK(コレシストキニン)アゴニスト、セロトニン再摂取阻害剤、セロトニン及びノルアドレナリン再摂取阻害剤、セロトニン及びノルアドレナリン作動性化合物の混合物、5HT(セロトニン)アゴニスト、ボンベシンアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、TRH(チロトロピン放出ホルモン)アゴニスト、UCP2もしくは3(脱共役タンパク質2もしくは3)調節因子、レプチンアゴニスト、DAアゴニスト(プロモクリプチン、ドブレキシチン)、リパーゼ/アミラーゼ阻害剤、RXR(レチノイドX受容体)調節因子、TRアゴニスト；ヒスタミンH3アンタゴニスト、ガストリン及びガストリンアナログ及び誘導体である。

#### 【0038】

1または複数の前述の化合物及び場合により1または複数のさらなる薬理活性物質の、本発明のインスリンアナログとのいずれの適当な組み合わせもが、本発明の範囲内にあるとみなされると理解されるべきである。

#### 【0039】

##### 本発明の化合物の使用

投与経路は、非経口などで、例えば、皮下に、筋肉内に、または静脈内に、本発明のイ

10

20

30

40

50



ンスリンアナログを体の中の望ましいまたは適切な場所に効果的に輸送するいずれの経路であってもよい。あるいは、本発明のインスリンアナログは、経口的に、経肺的に、または経鼻的に投与され得る。

【0040】

非経口投与に関して、本発明の化合物は、既知のインスリンの製剤と類似して製剤化される。さらに、非経口投与に関して、本発明の化合物は、既知のインスリンの投与と類似して投与され、医師はかかる処置に精通している。

【0041】

非経口投与は、シリンジ、場合によりペン状のシリンジを用いて実施され得る。あるいは、非経口投与は点滴ポンプを用いて実施され得る。

10

【0042】

本発明の化合物を含む注射用組成物は、望ましい最終製品を提供するのに適切な材料を溶解し混合させる工程に関わる医薬品産業の従来技術を用いて製造可能である。従って、一手段に従って、本発明の化合物は調製される組成物の最終体積より幾分少ない量の水に溶解される。等張剤、保存剤及び緩衝剤を必要に応じて添加し、必要に応じて、酸、例えば、塩酸、または、塩基、例えば、水酸化ナトリウム水溶液を用いて、必要があれば、溶液のpH値を調整する。最後に、溶液の体積を水で調整して、材料の望ましい濃度を得る。

【0043】

より正確には、本発明のインスリン製剤、例えばそれらの溶液または懸濁液は、わずかに酸性の状態、例えば、約240から約1200 nモル/mlの範囲にある濃度で、水性媒体中に本発明の化合物を溶解させることによって製造されてよい。水性媒体は例えば塩化ナトリウムまたはグリセロールを用いて等張にされる。さらに、水性媒体は、インスリン活性の1ユニットあたり最大約20  $\mu$ gの $Zn^{++}$ の濃度で亜鉛イオン、酢酸塩及びクエン酸塩などの緩衝剤及びm-クレゾールまたはフェノールなどの保存剤を含んでもよい。溶液のpH値は、沈殿を避けるために、本発明の化合物の等電点にあまりに近づかせることなく中性に調整される。最終的なインスリン製剤のpH値は、本発明の化合物が使用される条件での、亜鉛イオンの濃度及び本発明の化合物の濃度に依存する。インスリン製剤は、例えば、滅菌用濾過により、滅菌される。

20

【0044】

本発明のインスリン製剤は既知のインスリン製剤の使用に類似して使用される。

30

【0045】

投与する本発明の化合物の量、本発明の化合物を投与する頻度の決定、及び場合により他の抗糖尿病用化合物とともに投与される本発明の化合物（単数または複数）の選択は、糖尿病の治療に精通している実務家による診察において決定される。

【0046】

それ故に、本発明は、糖尿病の治療方法にも関し、該方法にはかかる治療を必要とする患者に有効量の本発明の化合物を投与する工程が含まれる。

【0047】

本発明の好ましい特徴

上述の記載をまとめかつ補充するための、本発明の特徴は以下の節に記載の通りである：

40

【0048】

1. B25アミノ酸残基がHis (H)またはAsn (N)であるが、ただしB25アミノ酸残基がHisである場合、B27アミノ酸残基はAsp (D)またはGlu (E)であり、A14アミノ酸残基がGlu (E)とは異なるインスリンアナログであって、さらに、前記インスリンアナログが4つの位置より多くにおいてはヒトインスリンとは異なることを条件とするインスリンアナログ。

【0049】

2. B25アミノ酸残基がHis (H)またはAsn (N)であるが、ただしB25アミノ酸残基がHisである場合、B27アミノ酸残基はAsp (D)またはGlu (E)であり、A14アミノ酸残基がGlu (E

50

)とは異なるインスリンアナログ。

【 0 0 5 0 】

3. B25アミノ酸残基がHis (H)であり、B27アミノ酸残基がAsp (D)またはGlu (E)であり、A14アミノ酸残基がGlu (E)とは異なる、前述の節に記載の、インスリンアナログ。

【 0 0 5 1 】

4. 最大で5つまでのアミノ酸残基がヒトインスリンに存在するそれらと同一の位置で異なる、前述の二節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 5 2 】

5. B25アミノ酸残基がAsn (N)である、節1に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 5 3 】

6. 最大で5つまでのアミノ酸残基がヒトインスリンに存在するそれらと同一の位置で異なる、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 5 4 】

7. 前記アナログが、A14Q, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン及びA14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリンとは異なる、前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 5 5 】

8. 前記アナログが、B25N, B27E, desB30ヒトインスリン; A8H, B25N, B27E, desB30ヒトインスリン; B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; B1E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A8H, B1E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; A8H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン; B25N, B27D, desB30ヒトインスリン; A8H, B25N, B27D, desB30ヒトインスリン; B25H, B27D, desB30ヒトインスリン及びA8H, B25H, B27D, desB30ヒトインスリンとは異なる、前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 5 6 】

9. 前記アナログが、B25N, desB30ヒトインスリン及びA21G, B25N, desB30ヒトインスリンとは異なる、前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 5 7 】

10. 前記アナログが、A14Q, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン; A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, d

10

20

30

40

50

esB30ヒトインスリン； A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン； A14Q, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン； A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン； A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン； A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30ヒトインスリン； B25N, B27E, desB30ヒトインスリン； A8H, B25N, B27E, desB30ヒトインスリン； B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； B1E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A8H, B1E, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； A8H, B25H, B27E, desB30ヒトインスリン； B25N, B27D, desB30ヒトインスリン； A8H, B25N, B27D, desB30ヒトインスリン； B25H, B27D, desB30ヒトインスリン； A8H, B25H, B27D, desB30ヒトインスリン； B25N, desB30ヒトインスリン及びA21G, B25N, desB30-ヒトインスリンとは異なる、前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

11. B25アミノ酸残基がAsn (N)であり、B27アミノ酸残基がLys (K)及びCys (C)とは異なる、節1または3に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 5 9 】

12. A8アミノ酸残基がHis (H)である、前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 6 0 】

13. A14アミノ酸残基がTyr (Y)である、前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 6 1 】

14. B27アミノ酸残基がE (Glu)またはD (Asp)である、前述のいずれかの可能な一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 6 2 】

15. B30の位置にアミノ酸残基が存在しない（すなわち、desB30ヒトインスリンアナログである）、前述のいずれかの可能な一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 6 3 】

16. B29及びB30の位置にアミノ酸残基が存在しない（すなわち、desB29, desB30ヒトインスリンアナログである）、前述のいずれかの可能な一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 6 4 】

17. B28, B29及びB30の位置にアミノ酸残基が存在しない（すなわち、desB28, desB29, desB30ヒトインスリンアナログである）、前述のいずれかの可能な一節に記載のインスリンアナログ。

【 0 0 6 5 】

18. B27, B28, B29及びB30の位置にアミノ酸残基が存在しない(すなわち、desB27, desB28, desB29, desB30ヒトインスリンアナログである)、前述のいずれかの可能な一節に記載のインスリンアナログ。

【0066】

19. B鎖の位置26, 27または28におけるアミノ酸がAspまたはGluである、前述のいずれかの可能な一節に記載のインスリンアナログ。

【0067】

20. [A8H, B25N, B27D]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27E]ヒトインスリン; [A8H, B25N]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27D]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27E]ヒトインスリン; [B25H, B27D]ヒトインスリン; [B25H, B27E]ヒトインスリン; [B25H]ヒトインスリン; [B25N, B27D]ヒトインスリン; [B25N, B27E]ヒトインスリン; [B25N]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27E, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27D, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27E, desB30]ヒトインスリン; [B25H, B27D, desB30]ヒトインスリン; [B25H, B27E, desB30]ヒトインスリン; [B25H, desB30]ヒトインスリン; [B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン; [B25N, B27E, desB30]ヒトインスリン及び[B25N, desB30]ヒトインスリンからなる群から選択される、可能な限りにおいて前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【0068】

21. [A8H, B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27E, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27D, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25H, B27E, desB30]ヒトインスリン; [B25H, B27D, desB30]ヒトインスリン; [B25H, B27E, desB30]ヒトインスリン; [B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン; [B25N, B27E, desB30]ヒトインスリン及び[B25N, desB30]ヒトインスリンである、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【0069】

22. [A8H, B25H]ヒトインスリンまたは[A8H, B25H, des B30]ヒトインスリンである、可能な限りにおいて前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【0070】

23. [A8H, B25N, B27A, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27R, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27N, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27Q, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27E, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27G, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27H, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27I, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27L, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27M, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27F, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27P, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27S, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27W, desB30]ヒトインスリン; [A8H, B25N, B27Y, desB30]ヒトインスリン及び[A8H, B25N, B27V, desB30]ヒトインスリンからなる群から選択される、可能な限りにおいて前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【0071】

24. 以下の化合物[A8H, B25N, B27D, desB30]ヒトインスリン及び[A8H, B25N, B27E, desB30]ヒトインスリンのいずれでもない、可能な限りにおいて前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【0072】

25. 最大で5つまでのアミノ酸残基がヒトインスリンに存在するそれらと同一の位置で異なる、前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログ。

【0073】

26. 最大で4つまでのアミノ酸残基がヒトインスリンに存在するそれらと同一の位置で異なる、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【0074】

27. 最大で3つまでのアミノ酸残基がヒトインスリンに存在するそれらと同一の位置で

10

20

30

40

50

異なる、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【0075】

28. 最大で2つまでのアミノ酸残基がヒトインスリンに存在するそれらと同一の位置で異なる、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【0076】

29. 最大で1つのアミノ酸残基がヒトインスリンに存在するそれと同一の位置で異なる、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【0077】

30. インスリン受容体のIR-Aアイソフォームに対する親和性の少なくとも1.5倍である、インスリン受容体のIR-Bアイソフォームに対する親和性を有するインスリンアナログ。

10

【0078】

31. インスリン受容体のIR-Aアイソフォームに対する親和性の少なくとも2倍である、インスリン受容体のIR-Bアイソフォームに対する親和性を有する、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【0079】

32. インスリン受容体のIR-Aアイソフォームに対する親和性の少なくとも2.5倍である、インスリン受容体のIR-Bアイソフォームに対する親和性を有する、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【0080】

33. インスリン受容体のIR-Aアイソフォームに対する親和性の少なくとも3倍である、インスリン受容体のIR-Bアイソフォームに対する親和性を有する、前述の節に記載のインスリンアナログ。

20

【0081】

34. インスリン受容体のIR-Aアイソフォームに対する親和性の少なくとも3.5倍である、インスリン受容体のIR-Bアイソフォームに対する親和性を有する、前述の節に記載のインスリンアナログ。

【0082】

35. インスリン受容体のIR-Aアイソフォームに対する親和性の少なくとも4倍である、インスリン受容体のIR-Bアイソフォームに対する親和性を有する、前述の節に記載のインスリンアナログ。

30

【0083】

36. ヒトインスリンのIR-B親和性に対するインスリンアナログのIR-B親和性を測定し、ヒトインスリンのIR-A親和性に対するインスリンアナログのIR-A親和性を測定し、これら二つの相対的な親和性間の比率を計算することを特徴とする、インスリンアナログがアイソフォーム選択的であるかどうかを評価する方法。

【0084】

37. ヒトインスリンのIR-B親和性に対するインスリンアナログのIR-B親和性を測定し、ヒトインスリンのIR-A親和性に対するインスリンアナログのIR-A親和性を測定し、これら二つの相対的な親和性間の比率を計算することを特徴とする、インスリンアナログが肝臓選択的であるかどうかを評価する方法。

40

【0085】

38. 特には実施例1~4のいずれか一つである、特定の実施例などの、本明細書に具体的に開示される化合物のうちのいずれか一つである、前述の、物に関するいずれか一節に記載の化合物。

【0086】

39. B25N, desB30ヒトインスリン及びB25H, B27E, deB30ヒトインスリンである、前述の、物に関するいずれか一節に記載の化合物。

【0087】

40. 医薬としての使用のため、または医薬における使用のための、前述の、物に関するいずれか一節に記載の化合物。

50

## 【 0 0 8 8 】

41. 糖尿病を治療するための前述の、物に関するいずれか一節に記載の化合物、または糖尿病の治療のための医薬の製造のための前述の、物に関するいずれか一節に記載の化合物の使用。

## 【 0 0 8 9 】

42. 糖尿病の治療のための医薬組成物の製造に関する前節を除いた前述の、物に関するいずれか一節に記載の化合物の使用。

## 【 0 0 9 0 】

43. 前述の、物に関するいずれか一節に記載の化合物を治療上有効量でそれを必要とする対象に投与する工程を含む、糖尿病の治療方法。

## 【 0 0 9 1 】

44. 前述のいずれか一節に記載のインスリンアナログを治療上有効量でそれを必要とする対象に投与する工程を含む、糖尿病の治療方法、及び同時に、ヒトインスリンと関連する糖尿病よりは低い、癌の発症リスクを知らせる方法。

## 【 0 0 9 2 】

45. インスリンアナログが前記節10に記載のインスリンアナログのいずれとも異なる、前述の節に記載の方法。

## 【 0 0 9 3 】

46. 本明細書に開示されるいずれかの新規特徴または特徴の組み合わせ。

## 【 0 0 9 4 】

概論

本明細書に記載の1または複数の実施形態及び/または節の、場合により1または複数の請求項との組み合わせにより、さらなる実施形態が生まれ、本発明は、前述の実施形態及び請求項の可能なすべての組み合わせに関する。

## 【 0 0 9 5 】

本明細書で引用される刊行物、特許出願、及び特許を含むすべての参考文献が、(法により許容される最大の程度まで)各参考文献が個々に及び具体的に参照により援用されるものとして表示され、かつその全体が本明細書中で説明されるものであるように、それらの全体が、かつ同程度まで、参照により本明細書中に援用される。

## 【 0 0 9 6 】

すべての見出し及び小見出しは利便性のためのみに本明細書に使用され、いかなる態様でも本発明を限定するものとして解釈されてはならない。

## 【 0 0 9 7 】

本明細書において提供される、いずれの及びすべての実施例、または例示としての言語(例えば、「など」)の使用は、本発明をより良く例示するためにのみ意図され、特に主張されない限りは本発明の範囲に関して制限を課すものではない。本明細書において言葉がないことは、本発明の実施に本質的なものとしての任意の主張されていない要素を示すものとして解釈される。

## 【 0 0 9 8 】

本明細書における特許文書の引用及び取り込みは、利便性のためのみに行われるものであり、かかる特許文書の有効性、特許性、及び/または権利行使可能性のいずれの観点をも反映しない。参考文献の本明細書中への言及は、それらが先行技術を構成することを了承するものではない。

## 【 0 0 9 9 】

本明細書において、用語「含む(comprise)」は、「含む(include、containまたはcomprehend)」を概して意味するものとして解釈される(EPOガイドラインC, III, 4.13)。

## 【 0 1 0 0 】

本発明は、適用される法律により許容されるようにして、ここに添付される特許請求の範囲に記載の主題(subject matter)のあらゆる修正及び同等物を含む。

## 【 実施例 】

## 【 0 1 0 1 】

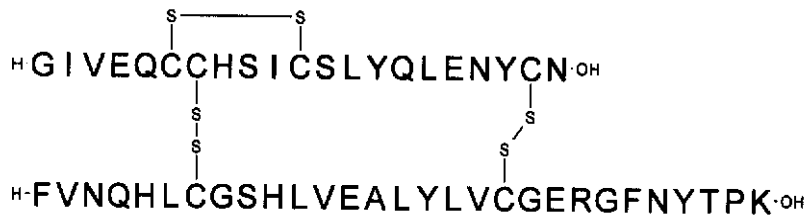
以下の実施例が、制限によるのではなく、例示を目的として提供される。

## [実施例 1]

[A8H, B25N, desB30] ヒトインスリン

## 【 0 1 0 2 】

## 【 化 1 】



10

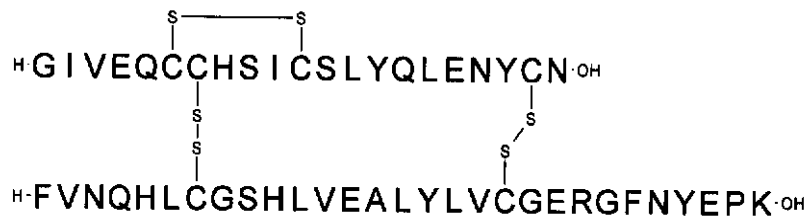
## 【 0 1 0 3 】

## [実施例 2]

[A8H, B25N, B27E, desB30] ヒトインスリン

## 【 0 1 0 4 】

## 【 化 2 】



20

## 【 0 1 0 5 】

使用されるすべての化学物質及び試薬は入手できる最高純度のものである。固定化された *Achromobacter lyticus* プロテアーゼはノボノルディスク A/S 由来のものである。

30

## 【 0 1 0 6 】

インスリンアナログの精製及び消化 (digestion) は、以下のように為されてよい：酵母の上清由来のインスリン前駆体を陽イオン交換により精製しかつ濃縮する (Kjeldsen et al., (1998), Prot. Expr. Pur. 14, 309-316)。単鎖のインスリン前駆体を、リジン特異的な *Achromobacter lyticus* (以降、ALP と示す) プロテアーゼで消化して 2 本鎖のインスリンに成熟させる (Kristensen et al., (1997), J. Biol. Chem. 20, 12978-12983)。インスリン前駆体を含む陽イオン交換クロマトグラフィーの工程から得た溶出液を水で希釈して、15~20% のエタノール濃度にする。グルタミン酸ナトリウムを添加して 15 mM の濃度にし、pH を NaOH により調整して 9.7 にする。固定化 ALP (4 グラム/L) を 1:100 (体積：体積) の割合で添加して、室温で一晩穏やかに攪拌しながら消化が進行するのを可能にする。消化反応を C18 カラムを用いる Waters Acquity Ultra-Performance Liquid クロマトグラフィーシステムで分析用 LC により解析し、分子量をマトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析法により確認する (Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF)。固定化された *A. lyticus* プロテアーゼを 0.2 μm のフィルターで濾過して除去する。2 本鎖のインスリン分子を、アセトニトリル勾配を用いて C18 カラム上で逆相 HPLC (Waters 600 system) により精製する。望ましい A8H, B25N, B27E, desB30 ヒトインスリン (5.11 g) を凍結乾燥により回収する。純度を C18 カラムを用いる Waters Acquity Ultra-Performance Liquid クロマトグラフィーシステムで分析用 LC により決定し、分子量をマトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析法により確認する。

40

## 【 0 1 0 7 】

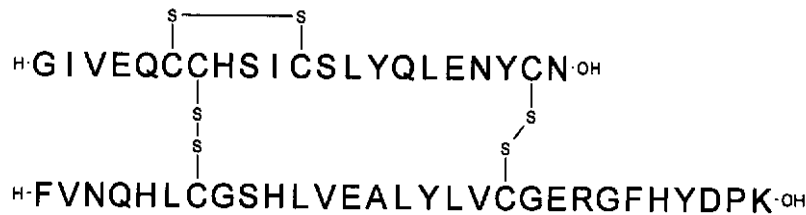
50

## [実施例 3]

[A8H, B25H, B27D, desB30] ヒトインスリン

【 0 1 0 8 】

【 化 3 】



10

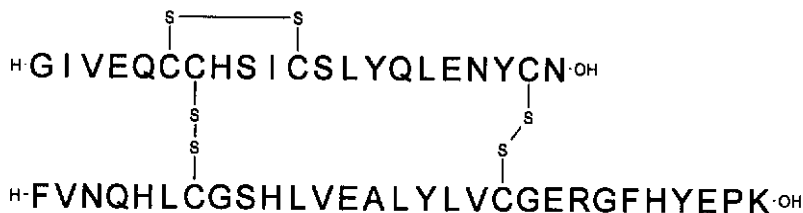
【 0 1 0 9 】

## [実施例 4]

[A8H, B25H, B27E, desB30] ヒトインスリン

【 0 1 1 0 】

【 化 4 】



20

【 0 1 1 1 】

## [実施例 5]

[A8H, B25N, B27D, desB30] ヒトインスリン

【 0 1 1 2 】

## [実施例 6]

[B25H, B27E, desB30] ヒトインスリン

【 0 1 1 3 】

## [実施例 7]

[B25N, desB30] ヒトインスリン

【 0 1 1 4 】

## [実施例 8]

(可溶化されたインスリン受容体上の)インスリン受容体結合アッセイ

ヒトインスリン受容体に対する本発明のインスリンの親和性は、(Glendorf et al. (2008), Biochemistry, 47, 4743-4751による)シンチレーション近接アッセイ(SPA)により決定される。競合結合実験を、ヒトIR-AまたはIR-Bの挿入物を含むpZemベクターで安定的にトランスフェクトした、baby hamster kidney (BHK)細胞よりコムギ胚芽凝集素により半精製した、可溶化したヒトIR (ホロレセプター(holoreceptor))を用いてエッペンドルフ社製のepMotion 5075ロボット上で96ウェルプレート(ポリスチレンOptiplate-96, パーキンエルマー)において実施した。2本鎖アナログ及びヒトインスリン基準(standard)を含む酵母の上清の希釈系列(dilution series)を作製してアッセイを開始した(それぞれ5倍した8つの希釈液、最初の希釈液43倍)。結合バッファー中に再懸濁されたSPAビーズ(SPA PVT抗体結合ビーズ, Anti-Mouse Reagent Cat. No. RPNQ0017, GEヘルスケア)、抗IRモノクローナルマウス抗体(83-7)、可溶化したヒトIR (hIR-AまたはhIR-B)、及び [ $^{125}\text{I}$ ]A14Tyr標識化インスリンからなる試薬混合物を、適当なサンプルの希釈系列に添加した。 [ $^{125}\text{I}$ ]A14Tyr標識化インスリンの最終濃度は7.5 pMであり、バッファーは、100 mM HEPES (

30

40

50



pH 7.8), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 及び 0.025% (v/v) Tween 20から成っていた。プレート室温で24時間穏やかに振りながらインキュベートし、2000 rpmで2分間遠心分離し、TopCount NXTで3分間/ウェルでカウントした。SPAから得たデータを4つのパラメーターロジスティックモデルに従って解析し(Volund, A., (1978), Biometrics, 34, 357-365)、インスリンアナログの親和性を、ヒトインスリンのそれに対して表した。

#### 【0115】

##### モノクローナルmIR抗体の製造

特定の抗体(F12または83-7)をモノクローナル技術により製造する：RBFマウスをFCAにおいて皮下に50 µgの精製したmIRを注射し、続いて、FIAにおいて20 µgのmIRを2回注射することによって免疫した。応答の高いマウスを25 µgのmIRで静脈内投与によりブーストし、3日後に脾臓を収穫する。脾臓細胞を骨髓腫Fox細胞株と融合させる(Kohler, G & Milstein C. (1976), European J. Immunology, 6:511-19; Taggart RT et al (1983), Science 219:1228-30)。上清をmIR特異的ELISAにおける抗体産生用にスクリーニングする。陽性のウェルをクローニングし、ウェスタンブロッティングで試験する。

#### 【0116】

以下の表において、desB30インスリンアナログの親和性を、hIR-AまたはhIR-Bのいずれかを使用したアッセイで、ヒトインスリンに対して表す。IR親和性を酵母上清において直接インスリンアナログを使用して評価した。desB30ヒトインスリンは、hIR-A及びhIR-Bに対して、それぞれ、98及び100%の相対的親和性を示す。

#### 【0117】

以下の表において、見出し「hIR-A」がついているカラム中に与えられるデータは、ヒトインスリンのhIR-A親和性に対する試験された化合物のhIR-A親和性の比であり、見出し「hIR-B」がついているカラム中に与えられるデータは、ヒトインスリンのhIR-B親和性に対する試験された化合物のhIR-B親和性の比であり、見出し「比 B/A」がついているカラム中に与えられるデータは、それぞれ、見出し「hIR-B」及び「hIR-A」がついているカラム中に与えられる数字の比である。

#### 【0118】

##### 【表1】

実施例	hIR-A; [% of HI]	hIR-B; [% of HI]; (%)	比 B/A
1	22 ± 4	44 ± 5	2.0
2	15 ± 3	57 ± 3	3.8
3	43 ± 4	82 ± 7	1.9
4	67 ± 3	140 ± 5	2.1
5	10 ± 1	38 ± 4	3.8
6	13 ± 1	30 ± 5	2.3
7	4 ± 0.2	8 ± 0.7	2.0

#### 【0119】

この表から明らかであるように、ヒトインスリンと比較して、hIR-Bに対する相対的親和性は、hIR-Aに対する相対的親和性より最大で4倍高い。

#### 【0120】

[実施例9]

下表における化合物を、実施例 8 に記載されるように試験した。この表において、見出し「比 B/A」がついているカラム中のデータを、実施例 8 に開示されるように計算する。

【 0 1 2 1 】

【 表 2 】

試験された化合物	比 B/A
[A8H, B25N, B27A, desB30] ヒトインスリン	2.9
[A8H, B25N, B27R, desB30] ヒトインスリン	2.2
[A8H, B25N, B27N, desB30] ヒトインスリン	2.2
[A8H, B25N, B27D, desB30] ヒトインスリン	3.5
[A8H, B25N, B27Q, desB30] ヒトインスリン	2.2
[A8H, B25N, B27E, desB30] ヒトインスリン	4.6
[A8H, B25N, B27G, desB30] ヒトインスリン	2.8
[A8H, B25N, B27H, desB30] ヒトインスリン	2.4
[A8H, B25N, B27I, desB30] ヒトインスリン	2.1
[A8H, B25N, B27L, desB30] ヒトインスリン	2.0
[A8H, B25N, B27M, desB30] ヒトインスリン	3.0
[A8H, B25N, B27F, desB30] ヒトインスリン	2.6
[A8H, B25N, B27P, desB30] ヒトインスリン	2.6
[A8H, B25N, B27S, desB30] ヒトインスリン	3.0
[A8H, B25N, B27W, desB30] ヒトインスリン	2.2
[A8H, B25N, B27Y, desB30] ヒトインスリン	3.6
[A8H, B25N, B27V, desB30] ヒトインスリン	2.6

10

20

30

【 0 1 2 2 】

この表から明らかであるように、ヒトインスリンと比較して、hIR-Bに対する相対的親和性は、hIR-Aに対する相対的親和性の2から4.6倍の範囲にある。

【 0 1 2 3 】

配列表

配列番号1は実施例1～4のA鎖であり、配列番号2は実施例1のB鎖であり、配列番号3は実施例2のB鎖であり、配列番号4は実施例3のB鎖であり、配列番号5は実施例4のB鎖である。

【 配列表 】

[2012511506000001.app](#)

40

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/066335

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/62 A61K38/28 A61P3/10

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)

C07K A61K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/034881 A (NOVO NORDISK AS [DK]; NIELSEN PETER KRESTEN [DK]; HUBALEK FRANTISEK [D] 27 March 2008 (2008-03-27) cited in the application	1-3, 5-8, 12-14
A	page 4 - page 5; page 41, lines 14-22; claim 4; example 4	9-10
X	WO 00/69901 A (XENCOR INC [US]) 23 November 2000 (2000-11-23)	1-2, 4, 12-14
A	page 1, lines 5-7; figure 5	5-8, 11
X	WO 90/01038 A (NORDISK GENTOFTE [DK]) 8 February 1990 (1990-02-08) cited in the application	9, 12-14
A	page 3, lines 14-15; claims 1-2; examples VIII, X	1-3, 5-8, 10
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier document 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.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 2010

Date of mailing of the international search report

02/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Spindler, Mark-Peter

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/066335

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2009/115469 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 24 September 2009 (2009-09-24) page 12, lines 30-32 page 20, line 16 - page 22, line 18	1-14
X	US 5 446 020 A (ANDY ROBIN J [US] ET AL) 29 August 1995 (1995-08-29) cited in the application	10-11
A	the whole document	1-9, 12-14
X	WO 90/12814 A (SINAI SCHOOL MEDICINE [US]) 1 November 1990 (1990-11-01) cited in the application	10-11
A	the whole document	1-9, 12-14
A	MOSTHAF L ET AL: "FUNCTIONALLY DISTINCT INSULIN RECEPTORS GENERATED BY TISSUE-SPECIFIC ALTERNATIVE SPLICING" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 9, no. 8, 1990, pages 2409-2414, XP002568950 ISSN: 0261-4189 cited in the application the whole document	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2009/066335**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 15  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2009 /066335

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 15

Claim 15 represents an omnibus claim contravening R. 6(2) PCT (?16.27 PCT Guidelines).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/066335

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008034881	A	27-03-2008	AU 2007298919 A1 CA 2663074 A1 CN 101541830 A EP 2074141 A1 KR 20090071561 A US 2010009898 A1	27-03-2008 27-03-2008 23-09-2009 01-07-2009 01-07-2009 14-01-2010
WO 0069901	A	23-11-2000	AU 5144400 A CA 2372393 A1 JP 2003518917 T	05-12-2000 23-11-2000 17-06-2003
WO 9001038	A	08-02-1990	AU 616205 B2 AU 2263688 A DE 3883397 D1 EP 0425482 A1 ES 2010299 A6 JP 3506023 T NO 905472 A US 5149777 A	24-10-1991 19-02-1990 23-09-1993 08-05-1991 01-11-1989 26-12-1991 20-03-1991 22-09-1992
WO 2009115469	A1	24-09-2009	NONE	
US 5446020	A	29-08-1995	AU 2431492 A CN 1073976 A IE 922570 A1 WO 9303174 A1 US 5268453 A	02-03-1993 07-07-1993 10-02-1993 18-02-1993 07-12-1993
WO 9012814	A	01-11-1990	AT 120762 T AU 631868 B2 AU 5541590 A CA 2014896 A1 DE 69018461 D1 DE 69018461 T2 EP 0469084 A1 GR 90100290 A HU 59941 A2 IE 67353 B1 IL 94163 A JP 4504858 T NO 914085 A PT 93832 A ZA 9002965 A	15-04-1995 10-12-1992 16-11-1990 20-10-1990 11-05-1995 03-08-1995 05-02-1992 27-09-1991 28-07-1992 20-03-1996 31-08-1995 27-08-1992 28-11-1991 20-11-1990 27-02-1991

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 PCT/EP2009/053017

(32)優先日 平成21年3月13日(2009.3.13)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

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

(72)発明者 カーステン・エンガード・スティッセン

デンマーク・DK - 2 8 8 0 ・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス

(72)発明者 ティネ・グレンドルフ

デンマーク・DK - 2 8 8 0 ・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス

(72)発明者 トーマス・ベークルム・ケルセン

デンマーク・DK - 2 8 8 0 ・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA19 CA59 DB34 MA66 NA14 ZC352

4H045 AA10 AA30 BA19 DA37 EA20 GA25