(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6914844号
(P6914844)
(45)発行日　令和3年8月4日(2021.8.4)　(24)登録日　令和3年7月16日(2021.7.16)

(51)Int.Cl.　　F I
C07K 14/62 (2006.01)　　C07K 14/62 ZNA
C12P 21/00 (2006.01)　　C12P 21/00 E

請求項の数 11　(全 41 頁)

(21)出願番号　特願2017-548008(P2017-548008)
(86)(22)出願日　平成28年3月14日(2016.3.14)
(65)公表番号　特表2018-513843(P2018-513843A)
(43)公表日　平成30年5月31日(2018.5.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/022390
(87)国際公開番号　WO2016/149222
(87)国際公開日　平成28年9月22日(2016.9.22)
審査請求日　平成30年11月6日(2018.11.6)
(31)優先権主張番号　62/133,251
(32)優先日　平成27年3月13日(2015.3.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/132,704
(32)優先日　平成27年3月13日(2015.3.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】グルコース制御立体配座スイッチを含むインスリン類似体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
修飾されたＡ鎖ポリペプチドおよび修飾されたＢ鎖ポリペプチドを含むインスリン類似体であって、前記Ａ鎖は、前記Ａ鎖Ｎ末端の５残基、または５残基内に、フェニルボロン酸またはハロゲン修飾フェニルボロン酸誘導体を有する単量体グルコース結合構造によって修飾されるものであり、および、前記Ｂ鎖は、位置Ｂ２７、Ｂ２８、Ｂ２９、Ｂ３０、または、伸長位置Ｂ３１またはＢ３２のいずれかで単糖修飾によって修飾されるものである、インスリン類似体。
【請求項２】
請求項１記載のインスリン類似体において、前記単糖修飾はチオール基を含むＤアミノ酸の側鎖、またはアミノ基を含むＤアミノ酸の側鎖を介して共役する、インスリン類似体。
【請求項３】
請求項２記載のインスリン類似体において、前記Ｄアミノ酸は、Ｄ－システイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｄ－リジン、Ｄ－オルニチン、Ｄ－ジアミノ酪酸、またはＤ－ジアミノプロピオン酸である、インスリン類似体。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか１つに記載のインスリン類似体において、前記単量体グルコース結合構造は、選択的に１～１６炭素原子を有するアシル基であるスペーサー要素を介してインスリンＡ鎖に共役する、インスリン類似体。

【請求項５】
請求項１～４のいずれか１つに記載のインスリン類似体において、前記単量体グルコース結合構造は、αアミノ官能基に結合する、インスリン類似体。
【請求項６】
請求項５記載のインスリン類似体において、前記単量体グルコース結合構造は、Ａ１位で置換されたＤ－リジン、Ｄ－オルニチン、Ｄ－ジアミノ酪酸、またはＤ－ジアミノプロピオン酸の側鎖アミノ官能基、Ａ４位で置換されたＬ－リジン、Ｌ－オルニチン、Ｌ－ジアミノ酪酸、またはＬ－ジアミノプロピオン酸の側鎖アミノ官能基に結合する、インスリン類似体。
【請求項７】
請求項１記載のインスリン類似体において、Ｂ鎖は配列ＩＤ番号：７～５０のいずれか１つに一致し、Ａ鎖は配列ＩＤ番号：５１～５３のいずれか１つに一致する、インスリン類似体。
【請求項８】
請求項１記載のインスリン類似体において、前記単糖修飾は、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、またはホモシステインの側鎖に結合する、インスリン類似体。
【請求項９】
請求項８記載のインスリン類似体において、前記単糖は、前記側鎖またはThr^{B27}、Thr^{B30}、または前記Ｂ鎖の伸長２残基のアミノ酸を介して結合する、インスリン類似体。
【請求項１０】
薬剤として使用される、請求項１記載のインスリン類似体。
【請求項１１】
請求項１～１０のいずれか１つに記載のインスリン類似体を調製する方法であって、前記方法は、
（ａ）インスリンまたはインスリン類似体のｄｅｓ－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメントを提供する工程と、
（ｂ）フェニルボロン酸の糖エステルを提供する工程と、
（ｃ）前記インスリンまたはインスリン類似体のｄｅｓ－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメントのインスリンＡ鎖のＮ末端にカップリングしたフェニルボロン酸を提供するために、フェニルボロン酸の前記インスリンまたはインスリン類似体のデスオクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメントへのカップリングを促進する条件下で、前記インスリンまたはインスリン類似体のｄｅｓ－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメントと前記フェニルボロン酸の糖エステルをインキュベートする工程と、
（ｄ）Ｎ末端残基がグリシンであり、かつ修飾されるとトリプシン開裂部位を含まない６～１０アミノ酸残基長の合成ペプチドを提供する工程であって、前記ペプチドはＮ結合またはＯ結合糖を組み込むものである、提供する工程と、および、
（ｅ）トリプシンが前記合成ペプチドと前記インスリンまたはインスリン類似体のデスオクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメント間の結合の形成を触媒するようなトリプシンの酵素活性を促進する条件下で、トリプシンの存在下で前記インスリンまたはインスリン類似体のデスオクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメントと前記合成ペプチドをインキュベートする工程と
を有する、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
連邦政府の支援を受けた研究又は開発に関する記述
本発明は、助成金番号ＤＫ０４０９４９として米国国立衛生研究所との共同契約のもと、政府支援を受けて行われた。米国政府は本発明に対して一定の権利を有する。
【背景技術】

【０００２】
本発明は、グルコース立体配座スイッチを含むため、ホルモン分解または同族の細胞受容体に対するグルコース反応性結合のグルコース反応性速度を示す、ポリペプチドホルモン類似体に関する。インスリンへの応用は、皮下、腹腔内、または静脈内注射により１型または２型糖尿病に罹患した患者または非ヒト哺乳類の治療に関連して説明される。本発明のインスリン類似体も、熱力学的安定性の上昇、室温以上の熱フィブリル化に対する抵抗性増大、分裂促進性低下、および／または薬物動態学的および薬力学的特性の変化など、他の薬剤学的特性の向上を示す可能性がある。より具体的には、本発明は、前記インスリン受容体に対する前記類似体の親和性が、生理学的範囲未満の濃度（<８０ｍｇ／ｄｌ、低血糖症）で、グルコースを含む溶液に溶解した場合よりも生理学的範囲を超える濃度（>１４０ｍｇ／ｄｌ、高血糖）でグルコースを含む溶液に溶解した場合に高くなるような、（その通常の可溶性製剤の野生型インスリンに対して）速い作用、（当該分野で既知のＮＰＨインスリン製剤と同等の）中間の作用、または（インスリンデテミルおよびインスリングラルギンを例とする、当該分野で既知の基礎インスリンと同等の）遅延性の作用を与えるインスリン類似体に関する。

【０００３】
治療薬およびワクチンを含む非標準的タンパク質の設計は、広く医学的および社会的利益を有する可能性がある。一般に、ヒト、その他の哺乳類、脊椎生物、無脊椎生物、真核細胞でコードされる天然タンパク質は、細胞内で選択的に機能するように進化した可能性があるが、治療用途では最適には及ばない。そのようなタンパク質の類似体は、生物物理学的、生化学的、または生物的特性が向上する可能性がある。タンパク質類似体の利益は、（高血糖状態で血糖濃度を低下させる代謝調節などの）活性を向上させ、（低血糖症またはその増悪などの）好ましくない作用は抑制することであろう。治療用タンパク質の例はインスリンにより示される。ＲＮＡスプライシングの別の形式、または翻訳後糖鎖付加の別のパターンにより生成した受容体イソ型とは関係なく、他の哺乳類遺伝子でコードされ、インスリン受容体に結合する野生型ヒトインスリンおよびインスリン分子は、複数の臓器および多様な細胞に存在する。医学的利益の例は、標的細胞表面のインスリン受容体に対する内因性の親和性、したがって、生物学的力価が血流中グルコース濃度に依存する、非標準的デザインの溶解性インスリン類似体であろう。

【０００４】
前記インスリン分子には２１残基から成るＡ鎖と３０残基から成るＢ鎖が含まれる。成熟ホルモンは、図１に概要を示したより長い単鎖前駆体、すなわち指定のプロインスリンに由来する。インスリン分子の特定残基は、アミノ酸の種類（典型的には標準的な三文字のコード、例えば、ＬｙｓおよびＡｌａはリジンおよびアラニンを示す）と、その鎖の上付き文字（ＡまたはＢ）およびその鎖の位置によって示される。例えば、ヒトインスリンＢ鎖１４位のアラニンは$Ａｌａ^{Ｂ１４}$で示され、同様に、インスリンリスプロ（ヒューマログ（登録商標）の活性成分、Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ ａｎｄ Ｃｏ.）Ｂ２８位のリジンは$Ｌｙｓ^{Ｂ２８}$で示される。前記ホルモンは$Ｚｎ^{２＋}$により安定化した六量体として膵臓のβ細胞に保存されるが、血中では$Ｚｎ^{２＋}$が遊離した単量体として機能する。インスリンの投与は糖尿病の治療として長く確立されてきた。糖尿病患者における従来のインスリン補充療法の主な目標は、血糖濃度を厳密にコントロールし、健康なヒト被験者に特徴的な正常範囲を上下に逸脱しないようにすることである。正常範囲以上に逸脱すると、網膜症、失明、および腎不全などの微小血管疾患の長期的リスクが上昇する。糖尿病患者の低血糖症はインスリン補充療法に多い合併症であり、重度の場合は（精神状態の変化、意識喪失、発作、および死亡を含む）重大な疾患に至る可能性がある。実際、そのような合併症の恐れがあることから、患者（および医師が）血糖濃度の厳密なコントロールを行う（すなわち、正常範囲内またはその上限値をやや上回る値とする）努力への大きな障害が生じ、２型糖尿病が確定してから長い患者では、そのような努力（「厳密なコントロール」）によって死亡率が上昇する可能性がある。上記の重度低血糖症（神経低糖作用とする）の結果に加え、軽度低血糖症は不安および振戦（アドレナリン作動性とされる症状）に変

化する交感神経系の過剰活性化を含め、対抗制御的機序を活性化する可能性がある。糖尿病患者はそのような警告徴候を示さない可能性もあるが、これは無自覚性低血糖として知られる状態である。軽度低血糖症の症状がないと、重大な低血糖リスクとそれに関連した罹患率および死亡率が上昇する。頻回の再発性低血糖エピソードも、長期にわたる糖尿病患者の痴呆有病率上昇の根底にあるメカニズムとして提案された、慢性的な認識衰退と関連している。したがって、低血糖リスクは低下させるが、正常範囲を超えて血糖濃度を上方逸脱させない新しい糖尿病治療技術が早急に必要である。

【０００５】

インスリンを投与した患者の低血糖の脅威を軽減する努力として、多様な技術が開発された。そのような努力全ての基本は、低血糖症状に関する患者（およびその家族）の教育であり、その後、そのような症状、グルコース、スクロース、または他の急速に消化される炭水化物が豊富な飲食物を摂取する必要性の緊急性について認識することであり、その例はスクロース（甘庶糖）添加オレンジジュースによって示される。このベースラインのアプローチは、口、咽頭、胃、および小腸粘膜から急速に吸収することのできる形態でグルコースを含むエマルジョン含有スクイーズチューブなど、特定の糖尿病向け製剤の開発により拡大適用されてきた。粉末として提供される対抗制御的ホルモンであるグルカゴンの調整は、同様に、急速に溶解されやすい形態および重度低血糖の緊急治療としての皮下注射において開発された。インスリンポンプを連続グルコースモニターに接続し、間質性グルコース濃度が低血糖の測定値になった場合にインスリンの皮下注射が中止され、アラームがなるようになっている。そのような装置によるアプローチから、前記ポンプとモニターを「人工膵」としてコンピュータにより作成したアルゴリズムと組み合わせた、閉ループ系の実験検査が行われた。

【０００６】

３０年以上、皮下デポーからのホルモン放出速度が間質グルコース濃度に依存するように、インスリン類似体または修飾インスリン分子を同時投与することを目的とし、グルコース反応性材料を開発することに関心がもたれていた。そのような系には、一般に、グルコース反応性ポリマー、ゲル、またはその他のカプセル化材料を含み、上記材料に前記ホルモンが結合できる修飾を含むインスリン誘導体も必要となる。皮下注射部位で間質液中の周囲グルコース濃度が上昇すると、前記ホルモンの競合的置換により、またはポリマー、ゲル、または他のカプセル化材料の性質が物理化学的に変化することで、結合インスリンまたはインスリン誘導体が置換されることがある。そのような系の目標は、周囲のグルコース濃度が正常範囲内またはそれ未満である場合に、インスリンの放出が遅延することで低血糖リスクが軽減されるように、カプセル化またはゲルコーティングした皮下デポーに内因性の自己調節機能を提供することである。現在まで、そのようなグルコース反応系は臨床的に使用されていない。

【０００７】

最近の技術では、前記修飾インスリン分子と前記キャリアの複合体が溶解し、血流に入ることができるように、選択的にキャリア分子と同時に修飾インスリン分子の構造を開発する。この概念は、遊離ホルモンが血流に入るときに前記ポリマー、ゲル、または他のカプセル化材料が前記皮下デポー内に留まる、グルコース反応性デポーとは異なる。このアプローチの実施形態は当該分野で既知であり、Ａ鎖がそのＮ末端またはその付近で（糖類部分として定義される）「親和性リガンド」を含むように（残基Ａ１のαアミノ基を利用するか、またはＡ２、Ａ３、Ａ４、またはＡ５位で置換されたリジンのεアミノ基を介して）修飾され、Ｂ鎖がそのＮ末端またはその付近で「一価グルコース結合剤」を含むように（残基Ｂ１のαアミノ基を利用するか、またはＢ２、Ｂ３、Ｂ４、またはＢ５位で置換されたリジンのεアミノ基を介して）修飾される。この説明では、例示または想定されたグルコース結合剤（単量体レクチンドメイン、ＤＮＡアプタマー、またはペプチドアプトマー）のサイズが大きいために、上述のＢ鎖Ｎ末端セグメントへの配置が制限された。外来性グルコースまたは他の外来性糖類がないと、Ａ１結合親和性リガンドとＢ１結合グルコース結合剤との間の分子内相互作用により前記ホルモンの構造が「閉じる」ことで、そ

の活性が低下すると想定された。このクラスの分子デザインでは、控えめなグルコース反応性のみが報告された（Ｚｉｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。

【０００８】

親和性リガンドにより残基Ａ１またはその付近で修飾され、同時に、高分子量のグルコース結合剤により残基Ｂ１またはその付近で修飾されたインスリン類似体の特性が最適ではないことは、このクラスの分子デザインに固有のものである可能性がある。実際、そのようなデザインの根拠は、残基Ａ１とＢ１のαアミノ基間に短い化学的架橋を含むインスリン類似体の活性が低いことに依存していたが、インスリンＡ鎖またはＢ鎖と同等またはこれよりも長いこれらの残基間のペプチドリンカーを含むインスリン類似体の活性は自然であるか、高くなっていることを見落としていた。したがって、上記のインスリン類似体の推定される「閉じた」形態は、実際、（外来性グルコース存在下で修飾されたインスリンと比較し）受容体結合を有意に障害するため、有用なまたは最適なグルコース依存性生物活性を提供する立体配座で十分に抑制されないことがある。上述のインスリン類似体クラスの規定では、遊離グルコース濃度とは無関係に活性の著しい低下も見落としており、（リジンなど）他の脂肪族または非脂肪族アミノ酸により残基Ａ２またはＡ３（$Ｉｌｅ^{A2}$または$Ｖａｌ^{A3}$）の置換に起因する可能性があり、これらの類似体は生物活性が無視できる程度と予測されるため、当該分野で長く知られているとおり、有用ではないだろう。Ａ１位でのリジンの置換によりイスリン類似体へのインスリン類似体の結合も障害を受けるが、その程度は少ない。上記のインスリン類似体クラスで見落とされる点として、皮下デポーのグルコース制御薬物速度論的特性に関すると考えられるとおり、前記インスリン受容体に対する類似体の親和性だけでなく、インスリンの自己会合の程度とその分解速度に影響する可能性がある、別のタイプのグルコース制御立体配座スイッチの利点がある。

【０００９】

驚くべきことに、基本的に異なるクラスの分子デザインが、上記の欠点を生じずに、選択的にインスリン分子の閉じた状態と開いた状態とのグルコース依存性の立体配座スイッチを提供することが分かった。したがって、本発明の類似体はＡ鎖のＮ末端またはその付近ではなく、Ｂ鎖のＣ末端またはその付近に１若しくはそれ以上の糖修飾を含む。さらに、本発明の類似体は、残基Ｂ１またはその付近の嵩高いグルコース結合剤を避け、代わりに残基Ａ１またはその付近の小さな化学構造（フェニルボロン酸誘導体、ＰＢＡ）を利用する。本発明の閉じた状態は、Ｂ鎖Ｃ末端またはその付近の糖修飾（または同様の官能基を持つ非糖類類似体）とＡ鎖Ｎ末端またはその付近の小さな化学構造との間の相互作用（共有結合か否かは問わないが、可逆的であること）でつながっているため、これまでに開示された構造とは異なり、関連性がない。本発明の閉じた状態は、インスリン受容体にはまることができるインスリン分子の保護ヒンジを利用する。短い共有結合がＢ鎖Ｃ末端をＡ鎖Ｎ末端につなぐ、ミニプロインスリンまたは短鎖インスリン類似体は、当該分野で、非常に低い、または検出できない活性を示すことが知られている（図２）。Ａ鎖Ｎ末端またはその付近に結合した小さなＰＢＡ部分と、Ｂ鎖Ｃ末端またはその付近の同族ＰＢＡ結合要素へのその可逆的結合により、インスリンの古典的二量体表面付近の立体配座スイッチを提供するため、グルコースの会合および分解のグルコース制御が可能となる。ＰＢＡ（およびフルオロフェニルボロン酸としてのＰＢＡ誘導体）は、（ａ）（単糖類サブユニットの数および組成が異なる）多様な糖類および（ｂ）単糖類内にみられるものを模倣したジオール官能基（または代わりのＰＢＡ結合官能基としてα－ヒドロキシカルボキシレート）を提示する非糖類有機化合物双方のジオール官能基に可逆的共有結合を示すため、本発明の真髄は前記Ｂ鎖の修飾に関する特定の分子学的実施形態に依存しない（図３Ｂ）。

【００１０】

生物学的利用率（皮下デポーでは、グルコース制御による六量体分解速度により調節される）および／または生物学的効果（前記インスリン受容体のグルコース依存的親和性により調節される）が低血糖条件下よりも高血糖条件下で強くなる本発明のインスリン類似

体は、インスリン置換療法の全体的安全性、有効性、簡潔性、および利便性を向上させるだろう。そのようなインスリン類似体製剤は（インスリンバイアル、インスリンペン、およびインスリンポンプなどの）複数の装置と適合し、当該分野で既知のインスリン分子の修飾と統合し、即効性、中間型、または持続性のインスリン作用を与えることができる。さらに、Ｂ鎖Ｃ末端とＡ鎖Ｎ末端の間に作成されたインスリン分子の本グルコース制御立体配座スイッチは、（閉ループ系またはグルコース反応性ポリマーなどの）他のグルコース反応性技術と組み合わせ、その統合された特性を最適化することができる。したがって、我々は、本発明の生成物は西洋社会および発展途上国のいずれにおいても、１型または２型糖尿病患者の利益になると考えている。

この出願の発明に関連する先行技術文献情報としては、以下のものがある（国際出願日以降国際段階で引用された文献及び他国に国内移行した際に引用された文献を含む）。

（先行技術文献）

（特許文献）

（特許文献１）　国際公開第２０１４／０９３６９６号

（特許文献２）　国際公開第２０１４／１６１８３５号

（特許文献３）　国際公開第２０１４／０１５０７８号

（特許文献４）　米国特許出願公開第２０１４／００３７６９９号明細書

（非特許文献）

（非特許文献１）　（ＣＨＯＵ，　ＤＨ　ｅｔ　ａｌ．）　Ｇｌｕｃｏｓｅ－ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ　Ｉｎｓｕｌｉｎ　Ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｂｙ　Ｃｏｖａｌｅｎｔ　Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　Ａｌｉｐｈａｔｉｃ　Ｐｈｅｎｙｌｂｏｒｏｎｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ．　Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ＵＳＡ．　２４　Ｆｅｂｒｕａｒｙ　２０１５，　Ｖｏｌ．　１１２，　Ｎｏ．　８；　ｐａｇｅｓ　２４０１－２４０６；　ＤＯＩ：　１０．１０７３／ｐｎａｓ．１４２４６８４１１２

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

したがって、本発明の観点は、前記インスリン受容体にグルコース反応性結合を提供するため、グルコース制御生物活性を提供するインスリン類似体を提供することである。本発明の類似体には２つの重要要素を含む。第１の要素は、Ａ１位のグリシン（Ｇｌｙ^{Ａ１}）のαアミノ基、または選択的に、Ａ１位で耐性に優れたアミノ酸置換としてのＤリジン（Ｄ－Ｌｙｓ^{Ａ１}）のεアミノ基、またはＡ４位の置換としてのＬリジンのεアミノ基（Ｌ－Ｌｙｓ^{Ａ４}）にある（ペーサー要素を含む）フェニルボロン酸誘導体である。代わりに、この修飾はＡ鎖Ｎ末端付近、すなわち、Ａ鎖の最初５アミノ酸以内にみられてもよい。フェニルボロン酸構造（図４）は、フッ素、塩素、ホウ素、またはヨウ素などのハロゲン原子による水素原子の置換により、その芳香環内が修飾されてもよく（図５）、前記スペーサー要素は１～１６炭素原子の直鎖アシル鎖を含んでもよい（図６）。第２の要素はＢ２７、Ｂ２８、Ｂ２９、Ｂ３０位の１若しくはそれ以上にある、または１残基Ｂ３１（Ｂ３１）または２残基（Ｂ３１－Ｂ３２）を含むＢ鎖のペプチド伸長に結合したＮ結合またはＯ結合単糖類、二糖類、またはオリゴ糖である。代わりに、Ｌ－ＤＯＰＡまたはＤ－ＤＯＰＡなどの非標準的ジオール含有アミノ酸をＢ２７～Ｂ３０のいずれかの位置で置換してもよい。Ｏ結合単糖類の例は、セレンまたはトレオニン誘導体であり、Ｎ結合単糖類の例はアスパラギンまたはグルタミン誘導体である。単糖類の例はグルコース、マンノース、およびＮ－アセチル－ガラクトースである。本発明のインスリン類似体の全体構造を図３Ａおよび３Ｂの概略図に示す。このスキームでは前記Ａ鎖に結合した一般的な単量体グルコース結合要素には前記Ｂ鎖に結合した同族グルコースまたは糖類が必要となると予想されるが（図３Ａ）、フェニルボロン酸として単量体グルコース結合要素に関する特定の分子学的実施形態が、この要件を、糖類または非糖類試薬であるかにかかわらず、広範な分子学的多様性のジオールを含む構造（または別のＰＢＡ結合官能基としてα－ヒドロ

キシカルボキシレート基を含む付加体）に緩和する（図３Ｂ）。したがって、そのような実施形態では、前記Ｎ結合またはＯ結合型糖類が、単糖類のジオール官能基を模倣したジオール官能基を含む、同様の分子量の有機構造によって置換され、したがって、可逆的ＰＢＡ結合活性（または別のＰＢＡ結合官能基としてα－ヒドロキシカルボキシレート基を含む付加体）を与えてもよい。そのような非糖類ジオール含有化合物は、酸、アルコール、芳香族および非芳香族骨格を含むチオール試薬などの広範な化学的クラスに及び、α－ヒドロキシカルボキシレート基を含む付加体は別のＰＢＡ結合官能基を提供してもよい。そのようなジオール含有およびα－ヒドロキシカルボキシレート含有付加体は、一般に、分子量８０～６００ダルトンであり、一般に炭素原子３～３０個を含む。前記Ｂ鎖への簡便な結合様式は、上述のＮ結合およびＯ結合型糖類誘導体に加えて広範な結合に及び、これらの追加の結合様式には、（ｉ）リジン、オルニチン、ジアミノ酪酸、（主鎖の掌性がＬまたはＤの）ジアミノプロピオン酸の側鎖アミノ官能基、および（ｉｉ）（主鎖の掌性がＬまたはＤの）システインまたはホモシステインの側鎖チオール官能基を含む。

【００１２】

本発明の前記類似体は、皮下デポー製剤の表面レクチンに前記インスリン類似体のグルコース感受性結合を提供することを目的としたメカニズムとして、（スペーサー要素とともに）残基Ｂ１に結合した追加フェニルボロン酸基（またはそのハロゲン誘導体）を選択的に含んでもよい。さらに、本発明の類似体は、選択的に、即効性を与える当該分野で既知の置換（インスリンアスパルト（Ｎｏｖｏｌｏｇ（登録商標）の活性成分）にみられる置換であるＡｓｐ^{Ｂ２８}など）；［Ｌｙｓ^{Ｂ２８}、Ｐｒｏ^{Ｂ２９}］、インスリンリスプロ（Ｈｕｍａｌｏｇ（登録商標）の活性成分）にみられる対置換；Ｇｌｕ^{Ｂ２９}またはその組み合わせ［Ｌｙｓ^{Ｂ３}、Ｇｌｕ^{Ｂ２９}］（後者はインスリングルリジン（Ａｐｒｉｄｒａ（登録商標）の活性成分）にみられる）、またはインスリン六量体の分解加速と関連したＢ２４位の修飾（例えば、シクロヘキサニルアラニンまたは芳香環内に単一のハロゲン置換を含むフェニルアラニン誘導体によるＰｈｅ^{Ｂ２４}の置換）を含んでもよい。代わりに、本発明の類似体は、選択的に、それぞれインスリンデテミル（Ｌｅｖｅｍｉｒ（登録商標）の活性成分）およびインスリンデグルデク（Ｔｒｅｓｉｂａ（登録商標）の活性成分）により示されるとおり、Ｌｙｓ^{Ｂ２９}のεアミノ基のアシル鎖またはアシルグルタミン酸付加体による修飾など、長期的作用を与える当該分野で既知の修飾を含んでもよく、またはインスリングラルギン（Ｌａｎｔｕｓ（登録商標）の活性成分）のＡｒｇ^{Ｂ３１}－Ａｒｇ^{Ｂ３２}伸長により例示されるとおり、等電点（ｐＩ）が中性付近にシフトするようにデザインされた塩基性アミノ酸置換または塩基性鎖の伸長を含んでもよい。また、そのようなｐＩのシフトを示すようにデザインされた本発明の類似体には、グリシン、アラニン、またはセリンなどによるＡｓｎ^{Ａ２１}の置換を含んでもよい。また、本発明の類似体には、選択的に、受容体結合親和性および／または熱力学的安定性に対する上述デザインの主な２つの要素（Ａ鎖Ｎ末端またはその付近のフェニルボロン酸およびＢ鎖Ｃ末端またはその付近の１もしくはそれ以上の糖類誘導体）の有害作用を軽減するために導入可能なとおり、インスリン受容体に対する親和性の上昇および／または熱力学的安定性の上昇と関連したＴｈｒ^{Ａ８}の非β分岐鎖アミノ酸置換を含んでもよい。当該分野で既知のそのようなＡ８置換の例は、Ｈｉｓ^{Ａ８}、Ｌｙｓ^{Ａ８}、Ａｒｇ^{Ａ８}、およびＧｌｕ^{Ａ８}である。

【００１３】

本発明により可能となる２つのグルコース反応性メカニズム（グルコース依存性インスリン六量体分解速度およびインスリン受容体へのグルコース依存性結合強度）は、分子学的実施形態に共存することもあるが、一方の性質または他の性質のみを示す実施形態もある。さらに他の実施形態は、同等ではない特性で前記２つの特性の組み合わせを示すこともある。いずれのメカニズムも、皮下デポーのグルコース依存性インスリン六量体分解速度は低血糖状態でホルモンの生物学的利用能を低下させるため、患者に利益を与えると考えられるが、グルコース依存性結合により、低血糖状態ですでに血流中にあるホルモンの力価が低下する可能性がある。これらの２つの保護的利益は独立していると予想され、または低血糖エピソードのリスクまたは重症度を低下させるように相乗的に作用することも

ある。

【００１４】

革新的な製造方法が開発され、Ａ鎖Ｎ末端またはその付近の単量体グルコース結合要素により修飾され、かつＢ鎖Ｃ末端またはその付近の糖類またはジオール含有構造により修飾されたインスリン類似体の調製を証明したことも本発明の観点であり、後者は代わりのＰＢＡ結合官能基としてα－ヒドロキシカルボキシレート基を含んでもよい。この製造方法では事前に修飾したインスリンフラグメントおよび事前に修飾した合成ペプチドのトリプシン介在性半合成を利用しているため、最終製剤の精製が簡単になる。前記インスリンフラグメントは、インスリンまたは短鎖インスリン前駆体のｄｅｓ－ペンタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメントである。前記合成ペプチドにはＮ末端グリシンを含み、６、７、８、９、または１０残基長である。前記ペプチドは、固相合成の過程で、または合成後修飾の結果として、直接ＮまたはＯ結合型糖類を組み込んでもよい（図３Ａ）。後者のアプローチでは、図３Ｂに示すとおり、フェニルボロン酸により修飾されたＡ鎖と併用されるジオール含有構造により、塩基性側鎖またはチオール側鎖の誘導体化を容易に伸長することができる。

【００１５】

本発明のインスリン類似体は、４．０～６．０の範囲の等電点（ｐＩ）を示すことから、６．８～７．８のｐＨ範囲で製剤に影響が出やすいと考えられ、代わりに、本発明の類似体は６．８～７．８の範囲の等電点（ｐＩ）を示すことから、４．０～４．２のｐＨ範囲で製剤に影響が出やすいと考えらる。後者の条件は当該分野で既知であり、長期作用のメカニズムとして皮下デポーでそのようなｐＩシフトしたインスリン類似体が等電沈殿されている。そのようなｐＩシフトしたインスリン類似体の例はインスリングラルギンにより示され、Ｂ鎖の塩基性残基２つ（$Ａｒｇ^{Ｂ３１}$－$Ａｒｇ^{Ｂ３２}$）が伸長することでｐＩがほぼ中性にシフトするため、皮下デポーからの薬物動態吸収を長くすることができる。一般に、インスリン類似体のｐＩは、塩基性残基を中性または酸性残基で置換することにより、また酸性残基を中性または塩基性残基で置換することにより、塩基性または酸性鎖の伸長を追加することで修正可能であり、この場合、酸性残基をアスパラギン酸およびグルタミン酸、塩基性残基をアルギニン、リジン、および状況によってはヒスチジンと定義する。さらに、中性ｐＨでの側鎖の正味荷電と関連して「中性」残基を定義する。

【００１６】

インスリン類似体のインスリン受容体（ＩＲ－ＡおよびＩＲ－Ｂイソ型）に対する絶対的ｉｎ　ｖｉｔｒｏ親和性は、野生型ヒトインスリンに対して５～１００％の範囲であることは、本発明のさらなる観点であるため、ホルモン－受容体複合体が滞留時間の延長を示す可能性は低く、このような滞留時間の延長は、哺乳類の発癌リスクの上昇または培養時の癌細胞株のより急速な増殖と関連すると考えられる。また、インスリン類似体の１型インスリン様成長因子受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）に対する絶対的ｉｎ　ｖｉｔｒｏ親和性は、野生型ヒトインスリンの５～１００％の範囲であることは、本発明のさらなる観点であるため、ホルモン／ＩＧＦ－１Ｒ複合体が滞留時間の延長を示す、または野生型ヒトインスリンを介する有糸分裂誘発よりも過剰のＩＧＦ－１Ｒ関連有糸分裂誘発を媒介する可能性は低い。

【００１７】

本発明のインスリン類似体は、前記類似体がグルコースまたは他の外因性糖類非存在下、Ａ鎖Ｎ末端またはその付近の単量体グルコース結合構造（選択的に、フェニルボロン酸に由来）に対し、Ｂ鎖のＣ末端又はその付近で（ａ）１もしくはそれ以上の糖類構造、または（ｂ）１もしくはそれ以上の非糖類ジオール含有構造間で可逆的相互作用（共有結合または非共有結合）を示すような、Ａ鎖およびＢ鎖に新規の修飾の組み合わせを含む２つのポリペプチド鎖から成る。例は、$Ｔｈｒ^{Ｂ２７}$および／または$Ｔｈｒ^{Ｂ３０}$のグルコース、マンノース、またはＮ－アセチル－ガラクトースによるＯ結合誘導体で提供され、代わりに、$Ｔｈｒ^{Ｂ２７}$および／または$Ｔｈｒ^{Ｂ３０}$のセリンによる置換を含む、インスリン類似体の類似Ｏ結合誘導体によっても提示される。さらなる単糖修飾の例は、Ｂ２６、

Ｂ２７、Ｂ２８、Ｂ２９、Ｂ３０位での置換、またはＢ鎖の２残基長までのＣ末端伸長（Ｂ３１またはＢ３１～Ｂ３２）の場合、ＡｓｎまたはＧｌｎのＮ結合修飾により提示される。Ｃ末端伸長Ｂ鎖を使用することで、Ｂ３１および／またはＢ３２で酸性残基を使用することができ、溶解性が向上し、分裂促進性ＩＧＦ－１Ｒ受容体への交差連結を妨げる。さらに、Ｂ３０にグリコシル化残基を含むＢ鎖フラグメントの固相ペプチド合成（トリプシンを介した半合成を利用）は、そのような伸長ペプチドで促進されるため、樹脂結合Ｃ末端残基はグリコシル化されない。

【００１８】

Ｎ結合またはＯ結合型糖類構造はジオール官能基（または代わりのＰＢＡ結合官能基としてα－ヒドロキシカルボキシレート基）を含む分子量が同程度の有機構造と置換することができ、Ａ鎖Ｎ末端またはその付近に結合したＰＢＡまたはＰＢＡ誘導体へ可逆的に結合させることができることは本発明のさらなる観点である。一部の実施形態では、前記ジオールが３～２６炭素長であってもよい。さらに、または代わりに、前記ジオールの分子量は９０～５７０であってもよい。そのような非糖類ジオール含有要素の例は、有機酸（グルコン酸、トレオン酸、グリセリン酸、ガラクトン酸、およびジヒドロキシ桂皮酸など）、チオール含有化合物（１－チオグリセロール、および１，２，３－ブタントリオール４－メルカプトなど）、およびアミノ化合物（（±）－３－アミノ－１，２－プロパンジオール、（±）－３－アミノ－１，２－プロパンジオール、およびグルコサミンなど）により提示される。前記チオール含有構造の１－チオ－β－Ｄ－グルコースも、適切に修飾したＢ鎖のシステインまたはホモシステインへのジスルフィド結合で利用することができる。市販のものを容易に利用でき、原則として合成ペプチドに結合しやすい追加試薬を表１に示すが、そのような結合は適切な「化学的ハンドル」を提供するために化合物の活性化またはその誘導体化を必要とすることもある。この表は完全なものではなく、分子構造（ジオール含有化合物またはα－ヒドロキシカルボキシレート基を含むもの）の多様性の概要を示すためのものであり、本発明の範囲内であると想定される。

【００１９】

【表１】

表1. ジオールーまたはα－ヒドロキシカルボキシレート含有前駆体

1,3-ベンゼンジメタノール
マンニトール
フルクトース
ソルビトール
Tris塩基
Fmoc-3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン
酢酸2-(アセトキシメチル)-4-ヨードブチル
1(1R,2S,3R,5R)-3-アミノ-5-(ヒドロキシメチル)-1,2-シクロペンタンジオール塩酸塩
2-(N-Fmoc-4-アミノブチル)-1,3-プロパンジオール
2-(4-アミノブチル)-1,3-プロパンジオール
3-アミノ-1-,2-プロパンジオール
2-アミノプロパン-1,3-ジオール
3-メルカプトプロパン-1,2-ジオール
2-アミノ-4-ペンタン-1,3-ジオール
N-アセチル-D-ガラクトサミン
N-アセチルキノボサミン
アロプミリオトキシン267A
アミノシキミ酸
アトルバスタチン
β-D-ガラクトピラノシルアミン
カフェストール
グラフェニン
グリセルアルデヒド
グリセリン酸
グリセロール3-リン酸
グリセロールモノステアリン酸
臭化水素酸塩
1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-6,7-ジオール
D-スフィンゴシン
シクロヘキサン-1,2-ジオール
シトシングリコール
4,5-ジヒドロキシ-2,3-ペンタンジオン
ジヒドロキシフェニルエチレングリコール
ジチオエリトリトール
ジチオトレイトール
ドロプロピジン
ジフィリン
フラバグリンFL3
フロクタフェニン

(3S,4R)-4-メチル-5-ヘキセン-1,3-ジオール
(3S,4R)-4-メチル-5-ヘキセン-2,3-ジオール1,3ブタンジオール
エリトリトール
サリチルヒドロキサム酸
カテコール
Cis-1,2-シクロペンタンジオール
シクロヘキサン-1,2-ジオール
1,2-ジヒドロキシベンゼン
ジヒドロキシフェニルエチレングリコール
2,2,4,4-テトラメチル-1,3-シクロブタンジオール
ブチルボロン酸
イソソルビド
N,N-ジメチルスフィンゴシン
スフィンゴシン(2-アミノ-4-オクタデセン-1,3-ジオール)
酒石酸
グアイフェネシン
5β-アンドロスタン-3α,17α-ジオール-11-オン-17β-カルボン酸3-(β-D-グルクロニド)
(1*S*-*cis*)-3-ブロモ-3,5-シクロヘキサジエン-1,2-ジオール

【００２０】

理論により制限されることは望まないが、これらの２つのデザイン要素が外因性グルコース非存在下で可逆的相互作用を形成し、前記ホルモンの構造が閉じた、比較的活性の低い立体配座で安定化するようになっていると我々は認識している。当該分野では、化学結合または短い介在ペプチドにより（またはＧｌｙ^{Ａ１}と残基Ｂ２８、Ｂ２９、またはＢ３０との直接ペプチド結合によっても）、残基Ｂ３０とＡ１との間の距離が近づくと、結合型または短鎖インスリン類似体のインスリン受容体に対する親和性が著しく低下することが知られている。前記インスリン受容体の細胞外ドメインにある「微小受容体」フラグメントに結合したインスリンの最新の共結晶構造は、結合したホルモンがインスリンαヘリカルコアのＢ２４－Ｂ２７セグメントを部分的に切り離すことを示しているため、これらの所見の正当性を説明している。さらに、残基Ｇｌｙ^{Ａ１}およびＴｈｒ^{Ｂ３０}は天然で近接した状態にあることが、中心のＢ鎖αヘリックス（残基Ｂ９－Ｂ１９）に対するＢ鎖Ｃ末端β鎖（残基Ｂ２４－Ｂ２８）の位置を反映しており、インスリン単量体の閉じた形態が二量体化、ひいては六量体会合の要素となっていることは、当該分野で周知である。理論により制限されることはないが、我々は、Ａ鎖Ｎ末端またはその付近に結合したＰＢＡ要素、およびＢ鎖Ｃ末端またはその付近に結合した相補的ＰＢＡ結合要素によるこの閉じた立体配座の安定化は、二量体化に有利に働き、皮下デポーでインスリン六量体会合速度を遅くすると予想している。理論に制限されることはないが、我々はさらに、外因性グルコース分子（または他の遊離糖類）のＡ鎖Ｎ末端またはその付近でのフェニルボロン酸構造への結合が、後者のＢ鎖Ｃ末端またはその付近でのＯ結合またはＮ結合型糖類構造との相互作用を妨げるため、Ｂ２４－Ｂ２７セグメントの部分的解離を促し、（ａ）皮下デポーにおけるインスリン六量体と二量体の解離、および／または（ｂ）血流中および標的組織での修飾ホルモンのインスリン受容体への結合を促すと予想している。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

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

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

【図１Ｃ】図１Ｃは、Ａ鎖（配列ＩＤ番号：２）およびＢ鎖（配列ＩＤ番号：３）を含み

、Ｂ鎖の残基Ｂ２７およびＢ３０の位置を示す略図である。
【図２】図２は、ペプチド結合がLys^{B29}とGly^{A1}をつないでいるミニプロインスリン（単鎖インスリン）の円柱モデルであり、Thr^{B30}は削除されている。当該分野では、この類似体は検出可能な活性を有さないことが知られている。
【図３Ａ】図３Ａは、インスリン分子（上部）および本発明に関係する修飾を示す略図である。Ａ鎖は短い水平方向の円柱で表現され、Ｂ鎖は長い水平方向の円柱で表現されている。野生型インスリンの標準的なジスルフィド架橋を黒の線で示す（右下の枠を参照）。前記Ａ鎖は、単量体のグルコース結合構造およびそのＮ末端またはその付近のスペーサー（それぞれ赤色のカップ型の図形および黒色の波線、左下の枠を参照）により修飾され、選択的に、Ｂ鎖のαアミノ基で修飾される（括弧に赤色のアスタリスク）。前記Ｂ鎖は、Ｃ末端又はその付近の１もしくはそれ以上の糖類（緑色の三角）により修飾され、これはセリンまたはトレオニンの側鎖酸素原子と結合するか（Ｏ結合型糖類）、アスパラギンまたはグルタミンの側鎖窒素原子と結合していてもよい（Ｎ結合型糖類）。前記糖類は、単糖類、二糖類、またはオリゴ糖としてもよい。
【図３Ｂ】図３Ｂは、単糖であろうと、または広範な分子多様性を持つ非糖類ジオール含有化合物に由来するものであろうと、芳香族であろうと、非芳香族であろうと、および合成Ｂ鎖由来ペプチドのアミノ酸側鎖への結合を促すアミノ基、カルボキシレート基、またはチオール基を含むか否かによらず、図３Ａで示したスキームの修飾の略図であり、前記単量体グルコース結合要素は（選択的にハロゲン化した）フェニルボロン酸であるのに対し、前記Ｂ鎖の対応する要素はジオール含有構造としてもよい。
【図４】図４は、フェニルボロン酸の分子構造を示したものである。
【図５】図５は、ハロゲン修飾フェニルボロン酸の分子構造図であり、この場合、芳香環のハロゲン原子はボロン酸構造に対してオルトの位置にあるフッ素原子で置換されている。前記ボロン酸基のｐＫａを調節するためのフェニル環のハロゲン化修飾は当該分野で既知である。
【図６】図６は、全フェニルボロン酸構造がどのように糖類のジオールと結合しているかを示した反応スキームの略図である。同様の可逆的反応スキームは、ジオールまたはトリオール官能基を含む広範な非糖類化学構造に関する。
【図７】図７は、ペプチド結合として単一のカルボニル（中央の矢印部分）を介したＰＢＡ構造（左）とGly^{A1}（右）間の最も簡単な結合の分子構造を示している。前記フェニル基の選択的フルオロ誘導体を示している。この化学構造は、我々の例の説明研究に使用した。我々は、ＰＢＡ構造は選択的な１～１２炭素のアシルリンカーにより、残基Ａ１と離れていてもよい、と予想している。
【図８Ａ】図８Ａは、ＥＤＴＡコバルト金属イオン封鎖試験で調査したとおり、２５℃、ｐＨ７．４でグルコース（２５ｍＭ）存在下または非存在下、野生型ヒトインスリンの解離速度のコントロール試験を行った結果のグラフである。過量のＥＤＴＡを追加し、R_6状態特異的ｄ－ｄの光学バンド減衰速度に差は認められなかった。
【図８Ｂ】図８Ｂは、本発明の代表的類似体における六量体分解のグルコース制御解離速度を示したグラフである（ここで、Gly^{A1}はフルオロ－フェニルボロン酸（配列ＩＤ番号：５１）により誘導体化されており、Thr^{B30}はＯ結合型マンノシル修飾を含む、表２）。前記類似体は、インスリンリスプロ（Ｈｕｍａｌｏｇ）の対となるLys^{B28}－Pro^{B29}置換およびGlu^{B31}－Glu^{B32}によるＢ鎖Ｃ末端伸長を含んでいた（配列ＩＤ番号：１６）。
【図８Ｃ】図８Ｃは、Thr^{B30}に結合したＯ結合型マンノースを用いた場合を含め、残基Ａ１（または他の位置）にＰＢＡ修飾がないが、それ以外はパネルＢに説明した類似体と同一の類似体の対照コバルト金属イオン封鎖試験の結果を示したグラフである。この対照類似体は、２５ｍＭグルコース存在下または非存在下での分解速度にほとんどまたは全く差がないことを示し、曲線のわずかな差は実験誤差であるか、または高血糖条件下での好ましくないわずかな分解の遅延を示していると考えられる（すなわち、糖尿病患者に有益である状態の反対）。

【図９】図９は、糖尿病ラットモデルにおける静脈内ボーラス注射での特定インスリン類似体の力価に関するラット試験の結果のグラフを示している。前記データは、本発明のインスリン類似体の生物活性（ダイアモンド、Ｎ＝６、マンノース－ＴｈｒＢ３０をＧｌｙＡ１のαアミノ基に結合したフルオロ－ＰＢＡと併用し、Ｃ末端の伸長ＧｌｕＢ３１およびＧｌｕＢ３２を有するＬｙｓＢ２８およびＰｒｏＢ２９を含む変異型Ｂ鎖において検討した）を、Ａ１にＰＢＡ修飾がない同様の類似体（丸、Ｎ＝５）およびインスリンリスプロ（四角、Ｎ＝５、インスリンリスプロはＨｕｍａｌｏｇの活性成分である）と比較している。パネルＡでは、データを血糖濃度の絶対値と関連させてプロットしているが（垂直軸、ｍｇ／ｄｌ）、パネルＢでは、データを血糖濃度の初期値（１．０とした）と関連させてプロットしている。本研究は、３００ｇのラットにつき２０μｇのタンパク質に相当する用量でストレプトゾトシンにより糖尿病とした雄Ｌｅｗｉｓラットで行った。

【発明を実施するための形態】

【００２２】

本発明は、皮下デポーにおいてグルコース依存性の速度でインスリン六量体を分解し、および／または血流中および標的組織においてインスリン受容体にグルコース依存的に結合することで、ｉｎ　ｖｉｖｏでの血糖コントロールを向上させるインスリン類似体に関する。表２に示すとおり、６種類の新規インスリン類似体を調整した。それぞれグルコース検出要素としてフルオロフェニルボロン酸を利用している。フルオロ－ＰＢＡ構造とＧｌｙＡ１のαアミノ基との間の化学結合を図７に示しているが、ＰｈｅＢ１のαアミノ基では同時にフルオロ－ＰＢＡ付加体を用い、類似体に対応する結合を採用した（図示せず）。

【００２３】

２つの類似体には（Ａ鎖のαアミノ基に）そのような付加体を１つ含み（表２Ａ）、３つの類似体には（Ａ鎖およびＢ鎖両方のαアミノ基に）そのような付加体を２つ含む（表２Ｂ）。活性ＦＰＡ試薬によるインスリンフラグメントの誘導体化プロトコールを以下に示す。これらの類似体は、ヒトインスリンの自然に発生したトレオニンの位置（残基Ｂ２７および／またはＢ３０）にＯ結合α－Ｄ－マンノピラノシド（マンノース－Ｏ$^{\beta}$－Ｔｈｒ）またはα－Ｄ－グルコピラノシド（グルコース－Ｏ$^{\beta}$－Ｔｈｒ）を含んでいた。各ケースで予想分子量を質量分析により確認した。マンノース含有インスリン類似体は、図８に示すとおり、野生型インスリン（ただし、分解速度は異なる、下記参照）と同様のコバルトＲ$_6$六量体会合特性を示した。前記マンノース含有インスリン類似体は、Ｈｕｍａｌｏｇ（登録商標）（Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ）の活性成分であるインスリンリスプロと同等のストレプトゾトシンにより糖尿病とした雄Ｌｅｗｉラットに静脈内ボーラス投与した場合、図９に示すとおり生物活性を示した。

【００２４】

【表２】

表2. インスリン類似体

A. 1箇所のPBA修飾（Gly^{A1}）	B. 2箇所のPBA修飾（Gly^{A1}およびPhe^{B1}）
マンノース-Thr^{B30}-Lys^{B28}-Pro^{B29}-Glu^{B31}-Glu^{B32}	マンノース-Thr^{B30}-Lys^{B28}-Pro^{B29}-Glu^{B31}-Glu^{B32} マンノース-Thr^{B30}-Orn^{B29}-Glu^{B31}-Glu^{B32}
グルコース-Thr^{B27}-Glucose-Thr^{B27}-Lys^{B28}-Pro^{B29}-Glu^{B31}-Glu^{B32}	グルコース-Thr^{B27}-グルコース-Thr^{B27}-Lys^{B28}-Pro^{B29}-Glu^{B31}-Glu^{B32}

【００２５】

本発明の代表的類似体はインスリン受容体に対して高い親和性を保持することを証明するため、上記親和性をｉｎ　ｖｉｔｒｏ競合置換シンチレーション近接分析により測定し

た（以下）。標準的な対照サンプルはOrn^{B29}－インスリンによって提供されたが、その活性は野生型インスリンと区別できない。［Ｇｌｕ，Ｇｌｕ］－伸長リスプロＢ鎖（すなわち、置換Lys^{B28}およびPro^{B29}を有し、Ｃ末端の伸長Glu^{B31}およびGlu^{B32}を有する）との関連で、Ｏ結合マンノース－Thr^{B30}を含むインスリン類似体の親和性は、（ｉ）Gly^{A1}のαアミノ基に結合したフルオロ－ＰＢＡ付加体存在下、（Orn^{B29}－インスリンに対して）５０～７５％の範囲、および（ｉｉ）Gly^{A1}およびPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフルオロ－ＰＢＡ付加体存在下、（Orn^{B29}－インスリンに対して）１０～３０％の範囲であることが認められた。当該分野で周知のとおり、我々は、これらの親和性のわずかな低下は、Ａ１およびＢ１付加体の好ましくない作用の結果であると考える。リスプロの置換（Lys^{B28}およびPro^{B29}）およびＣ末端の伸長Glu^{B31}およびGlu^{B32}では、その他の点では多様なインスリン類似体の単離インスリン受容体に対する親和性への影響はごくわずかであることが、我々のおよび他の先行研究で開示されており、Ｏ結合マンノシル構造によるThr^{B30}の修飾は同様に忍容性に優れている。

【００２６】

スペクトロスコピーの測定によりグルコース反応性分解速度が検討され、R_6六量体としてのフェノール存在下、コバルト（Co^{2+}）置換インスリン六量体の可視吸収スペクトルを得た。この測定は（Ｒｉｃｈａｒｄ，　Ｊ．Ｐ．　ｅｔ　ａｌ．（"Ｓｅｌｆ－ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ　ｏｆ　ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　ｉｎｓｕｌｉｎ　ａｎａｌｏｇｓ　ｕｎｄｅｒ　ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ　ｃｏｎｄｉｔｉｏｎｓ．"Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１５：１４３４－４１；１９９８に説明があるとおり）、金属イオンのＲ状態特異的４面体配位を利用しており、青色の吸収バンドを発生する。

【００２７】

このバンドはコバルトイオンの埋まっていないｄシェル電子から生じており、４面体配位環境の特徴となっている。キレート剤であるエチレンージアミンーテトラー酢酸（ＥＤＴＡ）を過量に追加すると、（無色の８面体錯体で）進行性に金属イオン封鎖が起こるため、六量体分解の動態を迅速かつ簡便に調査することができる。野生型インスリン、２５ｍＭの濃度でグルコース存在下または非存在下、同じＲ状態特異的ｄ－ｄシグナル消失速度を示している（図８Ａ）。対照的に、表２Ａに示した類似体（マンノース－Thr^{B30}－Lys^{B28}－Pro^{B29}－Glu^{B31}－Glu^{B32}）は、高血糖の条件下で著しい分解の加速を示している（図８Ｂ）。Ｂ鎖ではマンノース付加体存在下、Ａ鎖ではＮ末端のＰＢＡ付加体非存在下、そのようなグルコース制御による分解は起こらない（図８Ｃ）。

【００２８】

血糖濃度が正常範囲内またはそれ以下の場合に、請求されたインスリン類似体が野生型インスリンと比較してインスリン受容体に低い親和性を示すことは、本発明の特徴である。理論に制約されることは望まないが、我々は、この親和性低下は、Ｂ鎖Ｃ末端またはその付近の糖修飾とＮ末端またはその付近でＡ鎖に結合したフェニルボロン酸誘導体との可逆的相互作用の結果であると予想している。そのような共有結合であるが、可逆的相互作用はＢ鎖Ｃ末端β鎖（残基Ｂ２４－Ｂ２８）の立体配座を「閉じる」ため、インスリン受容体への結合が妨げられ、このため、インスリン分子のαヘリカルコアからこのβ鎖を部分的に解離する必要がある。Ａ鎖結合フェニルボロン酸誘導体が過剰な外因性グルコース溶液によりＢ鎖結合糖類構造から競合的に置換されるため、血糖濃度が正常範囲を超えた場合に、請求されたインスリン類似体の血糖力価が野生型インスリンと同様のレベルまで回復することは、本発明の特徴である。我々は、２００ｍｇ／ｍｌを超える濃度でのグルコース存在下では、５～１００％の範囲の受容体結合親和性が、糖尿病を有する動物でそのような天然または天然に近い血糖力価を与えるのに十分であろう、と予想している。これらの修飾は、室温またはそれ以上の温度でフィブリル化を受け、インスリンの分裂促進性を減弱するというインスリンの傾向を抑制する可能性があることも、本発明のさらなる特徴であり、これは、癌のリスクおよび癌の増殖の展望からは望ましくない、明確に異な

るシグナル伝達経路である。

【００２９】

Ａ鎖がＮ末端又はその付近でフェニルボロン酸誘導体により修飾され、Ｂ鎖Ｃ末端またはその付近の１もしくはそれ以上のアミノ酸側鎖がＯ結合またはＮ結合型単糖類、二糖類、またはオリゴ糖で修飾されている限り、インスリン類似体は、制限されない例として、ブタ、ウシ、ウマ、およびイヌインスリンなどの動物インスリン由来のＡ鎖およびＢ鎖配列から作られるとも予想される。そのようなヒトインスリンまたは動物インスリン由来の変異型Ｂ鎖は任意にＣ末端ジペプチドの伸長を含むが（それぞれの残基の位置はＢ３１およびＢ３２とする）、これらのＣ末端で伸長した塩基の少なくとも１つはＯ結合またはＮ結合型糖類を含む修飾アミノ酸である。加えてまたは代わりに、本発明のインスリン類似体はＢ１～Ｂ３残基の欠失を含む、またはＢ２８位にプロリンのない（例えば、Ｈｕｍａｌｏｇのような［$Ｌｙｓ^{Ｂ２８}$，$Ｐｒｏ^{Ｂ２９}$］、または$Ａｓｐ^{Ｂ２８}$または$Ｇｌｕ^{Ｂ２８}$とＢ２９位のリジンまたはプロリンとの組み合わせ）またはＢ２９位にグルタミン酸を含む変異型Ｂ鎖と結合してもよい。Ａ１３位のロイシンを選択的にトリプトファン置換し、Ａ１４位のチロシンを選択的にグルタミン酸と置換してもよい。

【００３０】

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

【００３１】

さらに、ヒトと動物のインスリンが同様であり、過去にヒト糖尿病患者で動物インスリンが使用されていたことを考慮すると、インスリン配列に他の軽微な修飾、特に「保存的」と考えられるこれらの置換を導入可能であることも想定される。例えば、本発明から離れずに、同じ側鎖のアミノ酸群内にさらにアミノ酸の置換を加えることもできる。これには、アラニン（ＡｌａまたはＡ）、バリン（ＶａｌまたはＶ）、ロイシン（ＬｅｕまたはＬ）、イソロイシン（ＩｌｅまたはＩ）、プロリン（ＰｒｏまたはＰ）、トリプトファン（ＴｒｐまたはＷ）、フェニルアラニン（ＰｈｅまたはＦ）およびメチオニン（ＭｅｔまたはＭ）といった天然型疎水性アミノ酸を含む。同様に、天然型極性アミノ酸は、グリシン（ＧｌｙまたはＧ）、セリン（ＳｅｒまたはＳ）、トレオニン（ＴｈｒまたはＴ）、チロシン（ＴｙｒまたはＹ）、システイン（ＣｙｓまたはＣ）、グルタミン（ＧｌｕまたはＱ）、およびアスパラギン（ＡｓｎまたはＮ）の群内で互いに置換することができる。酸性アミノ酸はアスパラギン酸（ＡｓｐまたはＤ）およびグルタミン酸（ＧｌｕまたはＥ）である。（リジン（ＬｙｓまたはＫ）、アルギニン（ＡｒｇまたはＲ）およびヒスチジン（ＨｉｓまたはＨ）を含む）塩基性アミノ酸置換の導入は、このクラスの類似体で上昇し

た正味の負電荷を維持するためには好ましくない。ほかに記載がない限り、または内容から明らかな場合は、本明細書に示したアミノ酸はＬアミノ酸と考える。標準的なアミノ酸は、同じ化学的クラスに属する非標準アミノ酸によって置換することもできる。

【００３２】

本発明のインスリン類似体には、（これに限定されるものではないが、）変異型Ｂ鎖が以下の配列ＩＤ番号７～５０に示されるポリペプチド配列と一致し、変異型Ａ鎖が配列ＩＤ番号５１～５３に示されるポリペプチド配列と一致したインスリン類似体を含む。ｎｅｏ－Ｃ末端αアミノ基が選択的にフェニルボロン酸誘導体により修飾されるように、本発明の変異型Ｂ鎖は残基Ｂ１の欠失、残基Ｂ１およびＢ２の欠失、または残基Ｂ１－Ｂ３の欠失も含むことは理解される。比較のため、ヒトプロインスリンのアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：１として提供する。比較のため、ヒトＡ鎖のアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：２として提供する。比較のため、ヒトＢ鎖および当該分野で既知のＢ鎖類似体のアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：３～６として提供する。

【００３３】

比較のため、ヒトプロインスリンのアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：１として提供する。

配列ＩＤ番号：１（ヒトプロインスリン）

Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ

【００３４】

ヒトインスリンＡ鎖のアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：２として提供する。

配列ＩＤ番号：２（ヒトＡ鎖）

Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ａｓｎ

【００３５】

ヒトインスリンＢ鎖のアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：３として提供する。

配列ＩＤ番号：３（ヒトＢ鎖）

Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｔｈｒ

【００３６】

ｐｒａｎｄｉａｌ　ｉｎｓｕｌｉｎ（食事前のインスリン）類似体であるＫＰ－インスリンの「ＫＰ」Ｂ鎖のアミノ酸配列には$Ｐｒｏ^{Ｂ２８}$→ＬｙｓおよびＬｙｓ^{Ｂ２９}→Ｐｒｏの置換が含まれ、配列ＩＤ番号：４として提供する。

配列ＩＤ番号：４

Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｒｙ－Ｔｈｒ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ

【００３７】

ｐｒａｎｄｉａｌ　ｉｎｓｕｌｉｎ（食事前のインスリン）類似体であるＫＰ－インスリンの伸長「ＫＰ」Ｂ鎖の３２残基アミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：５として提供する。

配列ＩＤ番号：５
Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｒｙ－Ｔｈｒ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ

【００３８】
Ｂ２９位にオルニチンを含むように修飾された変異型Ｂ鎖の３０残基アミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：６として提供する。
配列ＩＤ番号：６
Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｘａａ４－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｔｒｙ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｏｒｎ－Ｔｈｒ

【００３９】
Pro^{B28}を保持している場合に残基Ｂ２７でＯ結合グリコシル化により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：７として提供する。
配列ＩＤ番号：７
Xaa^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Xaa^{3}－Ｐｒｏ－Xaa^{4}－Ｔｈｒ－Xaa_{5}－Xaa_{6}
式中、Xaa_{1}は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されるO^{β}－Thr^{B27}結合またはO^{β}－Ser^{B27}結合単糖類ピラノシドであるか、またはXaa^{3}は上記の単糖類サブユニットを１もしくはそれ以上含むO^{β}－Thr^{B27}結合またはO^{β}－Ser^{B27}結合二糖類であり、Xaa^{4}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、グルタミン酸であり、Xaa^{5}－Xaa^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Xaa^{5}－Xaa^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４０】
残基Ｂ２７でＯ結合グリコシル化により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：８として提供する。
配列ＩＤ番号：８
Xaa^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Xaa^{3}－Xaa^{4}－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Xaa_{5}－Xaa_{6}
式中、Xaa_{1}は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラ

クトピラノシドから成る群から選択されるO$^{\beta}$－Thr^{B27}結合またはO$^{\beta}$－Ser^{B27}結合単糖類ピラノシドであるか、またはXaa^{3}は上記の単糖類サブユニットを１もしくはそれ以上含むO$^{\beta}$－Thr^{B27}結合またはO$^{\beta}$－Ser^{B27}結合二糖類であり、Xaa^{4}はリジン、アルギニン、オルニチン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Xaa^{5}－Xaa^{6}は選択的にB鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^{5}（含めた場合）はGlu、Gln、Gly、Ala、またはSerとすることができ、Xaa^{5}－Xaa^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４１】

残基Ｂ２７でN結合グリコシル化により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：９として提供する。

配列ＩＤ番号：９

Xaa$_{1}$－Phe－Val－Glu－Gln－His－Leu－Cys－Gly－Ser－His－Leu－Val－Glu－Ala－Leu－Tyr－Leu－Val－Cys－Gly－Glu－Arg－Gly－Xaa^{2}－Phe－Tyr－Xaa^{3}－Pro－Xaa^{4}－Thr－Xaa$_{5}$－Xaa$_{6}$

式中、Xaa$_{1}$は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Phe、２－クロロ－Phe、２－ブロモ－Phe、４－クロロ－Phe、２－メチル－Phe、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはN－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されるN$^{\beta}$－Asn^{B27}結合またはN$^{\gamma}$－Gln^{B27}結合単糖類ピラノシドであるか、またはXaa^{3}は上記の単糖類サブユニットを１もしくはそれ以上含むN$^{\beta}$－Asn^{B27}結合またはN$^{\gamma}$－Gln^{B27}結合二糖類であり、Xaa^{4}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、グルタミン酸であり、Xaa^{5}－Xaa^{6}は選択的にB鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^{5}（含めた場合）はGlu、Gln、Gly、Ala、またはSerとすることができ、Xaa^{5}－Xaa^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４２】

残基Ｂ２７でN結合グリコシル化により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１０として提供する。

配列ＩＤ番号：１０

Xaa$_{1}$－Phe－Val－Glu－Gln－His－Leu－Cys－Gly－Ser－His－Leu－Val－Glu－Ala－Leu－Tyr－Leu－Val－Cys－Gly－Glu－Arg－Gly－Xaa^{2}－Phe－Tyr－Xaa^{3}－Xaa^{4}－Pro－Thr－Xaa$_{5}$－Xaa$_{6}$

式中、Xaa$_{1}$は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Phe、２－クロロ－Phe、２－ブロモ－Phe、４－クロロ－Phe、２－メチル－Phe、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはN－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されるN$^{\beta}$－Asn^{B27}結合またはN$^{\gamma}$－Gln^{B27}結合単糖類ピラノシドであるか、またはXaa^{3}は上記の単糖類サブユニットを１もしくはそれ以上含むN$^{\beta}$－Asn^{B27}結合またはN$^{\gamma}$－Gln^{B27}結合二糖類であり、Xaa^{4}はリジン、アルギニン、オルニチン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピ

オン酸、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４３】

Ｂ２７位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１１として提供する。

配列ＩＤ番号：１１

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｘａａ^{3}－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{4}－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}は側鎖アミノ基がジオール含有試薬と結合した、リジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{4}はアルギニン、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４４】

Ｂ２７位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１２として提供する。

配列ＩＤ番号：１２

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｘａａ^{3}－Ｘａａ^{4}－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}は側鎖アミノ基がジオール含有試薬と結合した、リジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{4}はアルギニン、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４５】

Ｂ２７位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾されているが、Ｐｒｏ^{B28}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１３として提供する。

配列ＩＤ番号：１３

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙ

ｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｘａａ^{3}－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{4}－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したシステインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{4}はアルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４６】

Ｂ２７位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１４として提供する。

配列ＩＤ番号：１４

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｘａａ^{3}－Ｘａａ^{4}－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{4}はアルギニン、オルニチン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４７】

残基Ｂ３０でＯ結合グリコシル化により修飾されているが、Ｐｒｏ^{Ｂ２８}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１５として提供する。

配列ＩＤ番号：１５

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{3}－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{4}$はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されたＯ^{β}－Ｔｈｒ^{Ｂ３１}結合またはＯ^{β}－

Ser^{B31}結合単糖類ピラノシドであり、またはXaa^{4}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むO^{β}－Thr^{B31}結合またはO^{β}－Ser^{B31}結合二糖類であり、Xaa^{5}－Xaa^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Xaa^{5}－Xaa^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４８】

残基Ｂ３０でＯ結合グリコシル化により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１６として提供する。

配列ＩＤ番号：１６

Xaa^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Xaa^{3}－Ｐｒｏ－Xaa^{4}－Xaa^{5}－Xaa^{6}

式中、Xaa_{1}は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はリジン、アルギニン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、ジ－アミノプロピオン酸、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Xaa_{4}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されたO^{β}－Thr^{B31}結合またはO^{β}－Ser^{B31}結合単糖類ピラノシドであり、またはXaa^{4}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むO^{β}－Thr^{B31}結合またはO^{β}－Ser^{B31}結合二糖類であり、Xaa^{5}－Xaa^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Xaa^{5}－Xaa^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００４９】

残基Ｂ３０でＮ結合グリコシル化により修飾されているが、Pro^{B28}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１７として提供する。

配列ＩＤ番号：１７

Xaa^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Xaa^{3}－Xaa^{4}－Xaa^{5}－Xaa^{6}

式中、Xaa_{1}は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Xaa^{4}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されたN^{β}－Asn^{B30}結合またはN^{γ}－Gln^{B30}結合単糖類ピラノシドであり、またはXaa^{4}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むN^{β}－Asn^{B30}結合またはN^{γ}－Gln^{B30}結合二糖類であり、Xaa^{5}－Xaa^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、

Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００５０】

残基Ｂ３０でＮ結合グリコシル化により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１８として提供する。

配列ＩＤ番号：１８

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{3}－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、アルギニン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、ジ－アミノプロピオン酸、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されたＮ$^{\beta}$－Ａｓｎ^{B30}結合またはＮ$^{\gamma}$－Ｇｌｎ^{B30}結合単糖類ピラノシドであり、Ｘａａ^{4}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むＮ$^{\beta}$－Ａｓｎ^{B30}結合またはＮ$^{\gamma}$－Ｇｌｎ^{B30}結合二糖類であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００５１】

Ｂ３０位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：１９として提供する。

配列ＩＤ番号：１９

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{3}－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖アミノ基がジオール含有試薬と結合した、リジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００５２】

Ｂ３０位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２０として提供する。

配列ＩＤ番号：２０

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅ

ｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{3}－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖アミノ基がジオール含有試薬と結合した、リジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００５３】

Ｂ３０位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾されているが、Ｐｒｏ^{B28}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２１として提供する。

配列ＩＤ番号：２１

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{3}－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬と結合した、システインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００５４】

Ｂ３０位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２２として提供する。

配列ＩＤ番号：２２

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{3}－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬と結合した、システインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、

式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００５５】

残基Ｂ３１でＯ結合グリコシル化により修飾されているが、Ｐｒｏ^{Ｂ２８}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２３として提供する。

配列ＩＤ番号：２３

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{3}－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されたＯ^{β}－Ｔｈｒ^{Ｂ３１}結合またはＯ^{β}－Ｓｅｒ^{Ｂ３１}結合単糖類ピラノシドであり、Ｘａａ^{4}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むＯ^{β}－Ｔｈｒ^{Ｂ３１}結合またはＯ^{β}－Ｓｅｒ^{Ｂ３１}結合二糖類であり、Ｘａａ^{5}はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒを表す。

【００５６】

残基Ｂ３１でＯ結合グリコシル化により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２４として提供する。

配列ＩＤ番号：２４

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{4}$－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{4}$－Ｘａａ$_{5}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、アルギニン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、ジ－アミノプロピオン酸、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されたＮ^{β}－Ａｓｎ^{Ｂ３１}結合またはＮ^{γ}－Ｇｌｎ^{Ｂ３１}結合単糖類ピラノシドであり、またはＸａａ^{4}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むＮ^{β}－Ａｓｎ^{Ｂ３１}結合またはＮ^{γ}－Ｇｌｎ^{Ｂ３１}結合二糖類であり、Ｘａａ^{5}はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒを表す。

【００５７】

残基Ｂ３１でＮ結合グリコシル化により修飾されているが、Ｐｒｏ^{Ｂ２８}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２５として提供する。

配列ＩＤ番号：２５

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｘ

ａａ^{3}－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されたＮ^{β}－Ａｓｎ^{Ｂ３１}結合またはＮ^{γ}－Ｇｌｎ^{Ｂ３１}結合単糖類ピラノシドであり、Ｘａａ^{4}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むＮ^{β}－Ａｓｎ^{Ｂ３１}結合またはＮ^{γ}－Ｇｌｎ^{Ｂ３１}結合二糖類であり、Ｘａａ^{5}はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒを表す。

【００５８】

残基Ｂ３１でＮ結合グリコシル化により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２６として提供する。

配列ＩＤ番号：２６

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{4}$－Ｘａａ$_{5}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されたＮ^{β}－Ａｓｎ^{Ｂ３１}結合またはＮ^{γ}－Ｇｌｎ^{Ｂ３１}結合単糖類ピラノシドであり、Ｘａａ^{4}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むＮ^{β}－Ａｓｎ^{Ｂ３１}結合またはＮ^{γ}－Ｇｌｎ^{Ｂ３１}結合二糖類であり、Ｘａａ^{5}はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒを表す。

【００５９】

Ｂ３１位でジオール含有試薬により修飾されているが、Ｐｒｏ^{Ｂ２８}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２７として提供する。

配列ＩＤ番号：２７

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{3}－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{5}$は側鎖アミノ基がジオール含有試薬に結合したリジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、または

ジーアミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ$_5$（含めた場合）は選択的にＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒである。

【００６０】

残基Ｂ３１でジオール含有試薬により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２８として提供する。

配列ＩＤ番号：２８

Ｘａａ$_1$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_2$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_3$－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_4$－Ｘａａ$_5$

式中、Ｘａａ$_1$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンターフルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_5$は側鎖アミノ基がジオール含有試薬に結合したリジン、オルニチン、ジーアミノ酪酸、またはジーアミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ$_5$（含めた場合）は選択的にＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒである。

【００６１】

Ｂ３２位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：２９として提供する。

配列ＩＤ番号：２９

Ｘａａ^1－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^2－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｘａａ^3－Ｔｈｒ－Ｘａａ^4－Ｘａａ^5

式中、Ｘａａ$_1$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンターフルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアルギニン、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_5$は側鎖アミノ基がジオール含有試薬に結合したリジン、オルニチン、ジーアミノ酪酸、またはジーアミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００６２】

残基Ｂ３２でジオール含有試薬により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３０として提供する。

配列ＩＤ番号：３０

Ｘａａ$_1$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_2$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_3$－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_4$－Ｘａａ$_5$

式中、Ｘａａ$_1$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンターフルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアラ

ニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{5}$は側鎖アミノ基がジオール含有試薬に結合したリジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００６３】

Ｂ３２位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾されているが、Ｐｒｏ^{B28}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３１として提供する。

配列ＩＤ番号：３１

Ｘａａ^{1}－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ^{2}－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｐｒｏ－Ｘａａ^{3}－Ｔｈｒ－Ｘａａ^{4}－Ｘａａ^{5}

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{5}$は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したシステインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００６４】

Ｂ３２位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾され、Ｂ２９位をプロリンで置換した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３２として提供する。

配列ＩＤ番号：３２

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｐｒｏ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{4}$－Ｘａａ$_{5}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{5}$は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したシステインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００６５】

Ｂ２９位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３３として提供する。

配列ＩＤ番号：３３

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ2－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン

、ペンターフルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はプロリン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖アミノ基がジオール含有試薬と結合した、リジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００６６】

Ｂ２９位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型ｄｅｓ－Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３４として提供する。

配列ＩＤ番号：３４

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンターフルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はプロリン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖アミノ基がジオール含有試薬に結合したリジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００６７】

Ｂ２９位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３５として提供する。

配列ＩＤ番号：３５

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンターフルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はプロリン、リジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬と結合した、システインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００６８】

Ｂ２９位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾された変異型ｄｅｓ－Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３６として提供する。

配列ＩＤ番号：３６

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はプロリン、リジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したシステインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００６９】

Ｂ２８位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３７として提供する。

配列ＩＤ番号：３７

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したシステインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{4}はリジン、プロリン、アルギニン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００７０】

Ｂ２８位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾された変異型ｄｅｓ－Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３８として提供する。

配列ＩＤ番号：３８

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したシステインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{4}はリジン、プロリン、アルギニン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸

、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸である。

【００７１】

Ｂ２８位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾された変異型ｄｅｓ－［Ｂ２９，Ｂ３０］Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：３９として提供する。

配列ＩＤ番号：３９

Xaa_1－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa_2－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Xaa_3

式中、Xaa_1は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^2はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^3は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したシステインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００７２】

Ｂ２８位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４０として提供する。

配列ＩＤ番号：４０

Xaa_1－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa_2－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Xaa_3－Xaa_4－Ｔｈｒ－Xaa_5－Xaa_6

式中、Xaa_1は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^2はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^3は側鎖アミノ基がジオール含有試薬と結合した、リジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Xaa^5－Xaa^6は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^5（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Xaa^5－Xaa^6（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００７３】

Ｂ２８位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型ｄｅｓ－Ｂ３０　Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４１として提供する。

配列ＩＤ番号：４１

Xaa_1－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa_2－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Xaa_3－Xaa_4

式中、Xaa_1は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^2はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^3は側鎖アミノ基がジオール含有試薬に結合したリジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Xaa^4はリジン、プロリン、アルギニン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ノルロイシ

ン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸である。

【００７４】

Ｂ２８位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型ｄｅｓ－［Ｂ２９，Ｂ３０］Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４２として提供する。

配列ＩＤ番号：４２

Xaa_1－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa_2－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Xaa_3

式中、Xaa_1は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^2はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^3は側鎖アミノ基がジオール含有試薬に結合したリジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００７５】

Ｂ２９位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４３として提供する。

配列ＩＤ番号：４３

Xaa_1－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa_2－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Xaa_3－Xaa_4－Ｔｈｒ－Xaa_5－Xaa_6

式中、Xaa_1は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^2はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^3はプロリン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Xaa^4は側鎖アミノ基がジオール含有試薬と結合した、リジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Xaa^5－Xaa^6は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^5（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Xaa^5－Xaa^6（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００７６】

Ｂ２９位の塩基性残基でジオール含有試薬により修飾された変異型ｄｅｓ－Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４４として提供する。

配列ＩＤ番号：４４

Xaa_1－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Xaa_2－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Xaa_3－Xaa_4

式中、Xaa_1は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^2はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^3はプロリン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Xaa^4は側鎖アミノ

基がジオール含有試薬に結合したリジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸のＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００７７】

Ｂ２９位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾されているが、Ｐｒｏ^{B28}は保持した変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４５として提供する。

配列ＩＤ番号：４５

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{3}はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ^{4}は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬と結合した、システインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００７８】

Ｂ２９位の硫黄含有残基でジオール含有試薬により修飾された変異型ｄｅｓ－Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４６として提供する。

配列ＩＤ番号：４６

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はリジン、オルニチン、アルギニン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、ノルロイシン、アミノ酪酸、アミノプロピオン酸、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{3}$はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{4}$は側鎖硫黄原子がジオール含有試薬に結合したシステインまたはホモシステインのＤまたはＬ立体異性体の誘導体である。

【００７９】

残基Ｂ２８でＯ結合グリコシル化により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４７として提供する。

配列ＩＤ番号：４７

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸

構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Phe、２－クロロ－Phe、２－ブロモ－Phe、４－クロロ－Phe、２－メチル－Phe、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されるO$^{\beta}$－Thr^{B28}結合またはO$^{\beta}$－Ser^{B28}結合単糖類ピラノシドであるか、またはXaa^{3}は上記の単糖類サブユニットを１もしくはそれ以上含むO$^{\beta}$－Thr^{B28}結合またはO$^{\beta}$－Ser^{B28}結合二糖類であり、Xaa^{4}はアルギニン、オルニチン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、プロリン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン、またはグルタミン酸であり、Xaa^{5}－Xaa^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^{5}（含めた場合）はGlu、Gln、Gly、Ala、またはSerとすることができ、Xaa^{5}－Xaa^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００８０】

残基Ｂ２８でＮ結合グリコシル化により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４８として提供する。

配列ＩＤ番号：４８

Xaa$_1$－Phe－Val－Glu－Gln－His－Leu－Cys－Gly－Ser－His－Leu－Val－Glu－Ala－Leu－Tyr－Leu－Val－Cys－Gly－Glu－Arg－Gly－Xaa$_2$－Phe－Tyr－Thr－Xaa$_3$－Xaa$_4$－Thr－Xaa$_5$－Xaa$_6$

式中、Xaa$_1$は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Phe、２－クロロ－Phe、２－ブロモ－Phe、４－クロロ－Phe、２－メチル－Phe、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されるN$^{\beta}$－Asn^{B28}結合またはN$^{\gamma}$－Gln^{B28}結合単糖類ピラノシドであるか、またはXaa^{3}は上記の単糖類サブユニットを１もしくはそれ以上含むN$^{\beta}$－Asn^{B28}結合またはN$^{\gamma}$－Gln^{B28}結合二糖類であり、Xaa^{4}はアルギニン、オルニチン、ジ－アミノ－酪酸、ジ－アミノ－プロピオン酸、プロリン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン、またはグルタミン酸であり、Xaa^{5}－Xaa^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Xaa^{5}（含めた場合）はGlu、Gln、Gly、Ala、またはSerとすることができ、Xaa^{5}－Xaa^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００８１】

残基Ｂ２９でＯ結合グリコシル化により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：４９として提供する。

配列ＩＤ番号：４９

Xaa$_1$－Phe－Val－Glu－Gln－His－Leu－Cys－Gly－Ser－His－Leu－Val－Glu－Ala－Leu－Tyr－Leu－Val－Cys－Gly－Glu－Arg－Gly－Xaa$_2$－Phe－Tyr－Thr－Xaa$_3$－Xaa$_4$－Thr－Xaa$_5$－Xaa$_6$

式中、Xaa$_1$は天然のPhe^{B1}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりPhe^{B1}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Xaa^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Phe、２－クロロ－Phe、２－ブロモ－Phe、４－クロロ－Phe、２－メチル－Phe、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Xaa^{3}はアル

ギニン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、ジ－アミノプロピオン酸、プロリン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{4}$はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されるＯ^{β}－Ｔｈｒ^{Ｂ２９}結合またはＯ^{β}－Ｓｅｒ^{Ｂ２９}結合単糖類ピラノシドであるか、またはＸａａ^{3}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むＯ^{β}－Ｔｈｒ^{Ｂ２９}結合またはＯ^{β}－Ｓｅｒ^{Ｂ２９}結合二糖類であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００８２】

残基Ｂ２９でＮ結合グリコシル化により修飾された変異型Ｂ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：５０として提供する。

配列ＩＤ番号：５０

Ｘａａ$_{1}$－Ｐｈｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｘａａ$_{2}$－Ｐｈｅ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$－Ｔｈｒ－Ｘａａ$_{5}$－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$は天然のＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基であるか、選択的にフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＰｈｅ^{Ｂ１}のαアミノ基に結合したフェニルボロン酸構造のハロゲン化誘導体であり、Ｘａａ^{2}はフェニルアラニン、ペンタ－フルオロ－Ｐｈｅ、２－クロロ－Ｐｈｅ、２－ブロモ－Ｐｈｅ、４－クロロ－Ｐｈｅ、２－メチル－Ｐｈｅ、またはシクロヘキサニルアラニンであり、Ｘａａ^{3}はアルギニン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、ジ－アミノプロピオン酸、プロリン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{4}$はα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドから成る群から選択されるＮ^{β}－Ａｓｎ^{Ｂ２９}結合またはＮ^{γ}－Ｇｌｎ^{Ｂ２９}結合単糖類ピラノシドであるか、またはＸａａ^{3}は１もしくはそれ以上の上記単糖類サブユニットを含むＮ^{β}－Ａｓｎ^{Ｂ２９}結合またはＮ^{γ}－Ｇｌｎ^{Ｂ２９}結合二糖類であり、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}は選択的にＢ鎖の１または２残基伸長を表し、式中、Ｘａａ^{5}（含めた場合）はＧｌｕ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＳｅｒとすることができ、Ｘａａ^{5}－Ｘａａ^{6}（含めた場合）は少なくとも１つの伸長位がグルタミン酸であるなどの同じアミノ酸の組み合わせから選択される。

【００８３】

Ｇｌｙ^{Ａ１}のα－アミノ基でフェニルボロン酸により修飾された変異型Ａ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：５１として提供する。

配列ＩＤ番号：５１

Ｘａａ$_{1}$－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{2}$－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｘａａ^{3}－Ｘａａ$_{4}$－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｘａａ$_{5}$－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{6}$

式中、Ｘａａ$_{1}$はフェニルボロン酸構造またはペプチド結合または選択的にアシルリンカーによりＧｌｙ^{Ａ１}のα－アミノ基に結合したフェニルボロン酸のハロゲン化物誘導体であり、Ｘａａ$_{2}$はトレオニン、アラニン、ヒスチジン、グルタミン、アルギニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{3}$はＬｅｕまたはＴｒｐであり、Ｘａａ$_{4}$はチロシン、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{5}$はグルタミン酸、グルタミン、またはアルギニンであり、Ｘａａ$_{6}$はアスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、またはグリシンである。

【００８４】

Ａ４位の塩基性残基の側鎖アミノ基でフェニルボロン酸により修飾されたヒトインスリン変異型Ａ鎖のアミノ酸配列は、配列ＩＤ番号：５２として提供する。

配列ＩＤ番号：５２
Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｘａａ$_{1}$－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{2}$－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｘａａ$_{4}$－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{5}$
式中、Ｘａａ$_{1}$はフェニルボロン酸構造またはリジン、オルニチン、ジ－アミノ酪酸、またはジ－アミノプロピオン酸の側鎖アミノ基に結合したフェニルボロン酸のハロゲン化物誘導体であり、Ｘａａ$_{2}$はトレオニン、アラニン、ヒスチジン、グルタミン、アルギニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{3}$はＬｅｕまたはＴｒｐであり、Ｘａａ$_{4}$はチロシン、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{5}$はグルタミン酸、グルタミン、またはアルギニンであり、Ｘａａ$_{6}$はアスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、またはグリシンである。

【００８５】
ヒトインスリンの変異型Ａ鎖のアミノ酸配列を配列ＩＤ番号：５３として提供する。
配列ＩＤ番号：５３
Ｘａａ$_{1}$－Ｉｌｅ－Ｖａｌ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{2}$－Ｓｅｒ－Ｉｌｅ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｘａａ$_{3}$－Ｘａａ$_{4}$－Ｇｌｎ－Ｌｅｕ－Ｘａａ$_{4}$－Ａｓｎ－Ｔｙｒ－Ｃｙｓ－Ｘａａ$_{5}$
式中、Ｘａａ$_{1}$は側鎖アミノ基が選択的にハロゲン修飾を含み、選択的にアシルリンカーにより結合したフェニルボロン酸で誘導体化されたＤ－リジン、Ｌ－リジン、Ｄ－オルニチン、Ｌ－オルニチン、Ｄ－ジ－アミノ－プロピオン酸、Ｌ－ジ－アミノプロピオン酸から選択される塩基性残基であり、Ｘａａ$_{2}$はトレオニン、アラニン、ヒスチジン、グルタミン、アルギニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{3}$はＬｅｕまたはＴｒｐであり、Ｘａａ$_{4}$はチロシン、アラニン、またはグルタミン酸であり、Ｘａａ$_{5}$はグルタミン酸、グルタミン、またはアルギニンであり、Ｘａａ$_{6}$はアスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、またはグリシンである。

【００８６】
トレオニンのＯβ結合付加体としてα－Ｄ－マンノピラノシド、α－Ｄ－グルコピラノシド、および／またはＮ－アセチル－β－Ｄ－ガラクトピラノシドを含むインスリン類似体は、トリプシンを介した半合成により調整した。半合成プロトコールでは、Ｎ末端グリシン（オクタペプチド、ノナペプチド、またはデカペプチド）を含む合成ペプチドおよびＴｈｒ^{Ｂ２７}および／またはＴｈｒ^{Ｂ３０}の単糖付加体とともに、ヒトインスリンまたはインスリン類似体のｄｅｓ－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメントを利用した。前記ｄｅｓ－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］フラグメントには、野生型インスリンの３つの天然型ジスルフィド架橋を含み、高速液体クロマトグラフィーによる前記フラグメント、ペプチド、および生成物の精製を含むプロトコールは、報告済みのものを変更したものであった（Ｍｉｒｍｉｒａ，　Ｒ．Ｇ．，　ａｎｄ　Ｔａｇｅｒ，　Ｈ．Ｓ．，　１９８９．Ｊ．　Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：　６３４９－６３５４）。本プロトコールでは、（ｉ）単糖類ピラノシド付加体を含む合成ペプチド（配列ＩＤ番号：５３－６５）および（ｉｉ）切断型類似体であるｄｅｓ－トリペプチド［Ｂ１－Ｂ３］－ｄｅｓ－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］－インスリン、または［Ｈｉｓ^{Ａ４}，Ｈｉｓ^{Ａ８}，Ｇｌｙ^{Ａ２１}］－インスリン類似体の場合は［Ｈｉｓ^{Ａ４}，Ｈｉｓ^{Ａ８}，Ｇｌｙ^{Ａ２１}］－ｄｅｓ－トリペプチド［Ｂ１－Ｂ３］－ｄｅｓ－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］－インスリン、またはＧｌｎ^{Ｂ１３}－インスリン類似体の場合はＧｌｎ^{Ｂ１３}－ｄｅｓ－トリペプチド［Ｂ１－Ｂ３］－ｄｅｓ－オクタペプチド［Ｂ２３－Ｂ３０］－インスリン、またはＨｉｓ^{Ａ８}－インスリン類似体の場合を利用した。以下の文献は、本明細書に説明された試験および試験法は当業者が理解するものであることを示すために引用する。

【００８７】
フェニルボロン酸のＮＨＳ活性化：
Ｇｌｙ^{Ａ１}のα－アミノ基がＦＰＡで修飾されたインスリン類似体を調整するため、３段階のプロトコールを開発した。

【００８８】
（ｉ）工程１：ＰＢＡ試薬の活性化。
４－カルボキシ－３－フルオロ－フェニルボロン酸ピナコールエステル（ＰＢＡ、Ｃｏｍｂｉ－Ｂｌｏｃｋｓ［米国カリフォルニア州Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ］から購入）のカップリングしやすい種への活性化は、Ｎ－ヒドロキシスクシナミド（ＮＨＳ）（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ［米国ミズーリ州Ｓｔ．　Ｌｏｕｉｓ］）により行った。この工程を以下のとおり説明する。この目的を達するため、ＰＢＡ（３００ｍｇ、１．１２６ｍｍｏｌ）を４．４ｍＬの酢酸エチルに溶解し、４℃で２０分間インキュベートした。この反応混合物に、１３１ｍｇ（１．１４ｍｍｏｌ）のＮＨＳおよび２４７ｍｇ（１．８６ｍｍｏｌ）のジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ［米国ミズーリ州Ｓｔ．　Ｌｏｕｉｓ］）を加えた。この溶液は室温で一晩攪拌した。Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシル尿素の副産物は、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ（登録商標）微量遠心管に入れ、１３，５００ｒｐｍで５分間遠心分離により除去した。前記溶媒は減圧留去した。ＰＢＡ－Ｎ－ヒドロキシスクシニミドエステルは、アセトンおよびｎ－ヘキサンを用いた再結晶により精製した。生成物はアセトニトリル中３０ｍｇ／ｍｌとした。
【００８９】
（ｉｉ）工程２：活性化ＰＢＡのインスリンフラグメントＮ末端へのカップリング。
ｄｅｓ［Ｂ２３－Ｂ３０］－オクタペプチドインスリン（ＤＯＩ）（ｐＨ　７．６で０．１Ｍの炭酸ナトリウム１００μｌに５ｍｇを溶解）をアセトニトリル中１００μｌのＰＢＡのＮＨＳ－エステル（３０ｍｇ／ｍｌ）に加えた。前記溶液を２５℃で２時間攪拌した。１箇所および２箇所が誘導体化されたＤＯＩ分子がいずれも生じた段階で反応を停止し、逆相高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により分離し、それぞれを精製した。Ｗａｔｅｒｓ（登録商標）２５３５　ｑｕａｔｅｒｎａｒｙ－ｇｒａｄｉｅｎｔのクロマトグラフィー系をＨｉｇｇｉｎｓ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ（登録商標）Ｐｒｏｔｏ　３００　Ｃ４カラム（１０μｍ、２５０ｘ２０ｍｍ）と併用した。０．１％トリフルオロ酢酸水溶液（ＴＦＡ、緩衝液Ａ）および０．１％　ＴＦＡアセトニトリル液（緩衝液Ｂ）の２緩衝液混合の移動相を精製に用い、４０分で緩衝液Ｂの勾配を５～９５％とした。タンパク質の溶出時間をＷａｔｅｒｓ　２４８９　ＵＶ／Ｖｉｓ検出器を用い、ＵＶ吸光度２１５ｎｍおよび２８０ｎｍでモニターした。１８分および１９．５分でそれぞれ１カップリング分子および２カップリング分子が溶出した。タンパク質生成物の同定は、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（登録商標）４７００　Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　Ａｎａｌｙｚｅｒを用い、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析により確認した。α－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸（α－ＣＨＣＡ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、米国ミズーリ州Ｓｔ．　Ｌｏｕｉｓ）の５０％アセトニトリル０．１％　ＴＦＡ飽和溶液を基質として用いた。質量分析では、すでに報告されているとおり、レーザー脱離により無水物が形成したことで２つの水酸基がなくなったことが示された（Ｈｏｅｇ－Ｊｅｎｓｅｎ，　ｅｔ　ａｌ）。（１カップリングＤＯＩの質量：４９９７、２カップリングＤＯＩの質量：５１２７）前記反応では、Ｂ鎖へのカップリング前にＡ鎖Ｎ末端にＰＢＡがカップリングすることが分かった。１カップリングした類似体の同定は、室温で１時間、ｐＨ　７．４とし、１ｘＰＢＳで５０ｍＭジチオトレイトール（ＤＴＴ）による還元後に確認した。タンパク質はＭｉｌｌｉｐｏｒｅ（登録商標）Ｃ１８　ＺｉｐＴｉｐ（登録商標）ピペットチップを用いて脱塩し、５μＬ　α－ＣＨＣＡ基質に溶出した。個々のポリペプチド鎖の質量はＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析により確認した（ＰＢＡ結合Ａ鎖の質量：２５１５、Ｂ鎖の質量：２４８８）。サンプルはＬａｂｃｏｎｃｏ（登録商標）Ｆｒｅｅｚｅｚｏｎｅ　６（登録商標）凍結乾燥器を用いて凍結乾燥した。
【００９０】
（ｉｉｉ）工程３：トリプシンを介した半合成。
【００９１】
望みのインスリン類似体は、上述のとおりトリプシンを介した半合成により調整した。
【００９２】

インスリン類似体六量体の分解に関する動態特性を評価するため、Ｒｉｃｈａｒｄｓ，Ｊ．Ｐ．らが報告したとおり、視覚的吸光光度法を利用した（"Ｓｅｌｆ－ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ ｉｎｓｕｌｉｎ ａｎａｌｏｇｓ ｕｎｄｅｒ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ｃｏｎｄｉｔｉｏｎｓ．"Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１５：１４３４－４１； １９９８）。手短かに言えば、視覚的吸光光度法は、フェノール安定化R_6 Co^{2+}置換インスリン六量体の形成および分解をモニターする簡便なプローブを提供する。このために、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ ７．４）、５０ｍＭフェノール、０．２ｍＭ $CoCl_2$、および２ｍＭ ＮａＳＣＮを含む緩衝液中、グルコース非存在下または２５ｍＭグルコース存在下、インスリン類似体０．６ｍＭを作成した。サンプルのｐＨは各ケース７．４であり、試験前にサンプルを室温で一晩インキュベートし、立体配座が平衡となったことを確認した。スペクトル（４００～７５０ｎｍ）を取得し、５７４ｎｍまたはその付近の特徴的なｄ－ｄ吸収バンドにより４面体Co^{2+}配位をモニターした。前記六量体からのCo^{2+}放出速度を決定するため、金属イオン封鎖は、ＥＤＴＡ原液（ｐＨ７．４で５０ｍＭ）をＥＤＴＡの最終濃度２ｍＭ（すなわち、コバルトイオンの総濃度以上）まで加えて３３℃（皮下温度をシミュレート）で開始した。５７４ｎｍの吸収バンドの減衰を秒から時間のスケールでモニターした。分解後の吸収スペクトル（４００～７５０ｎｍ）を収集し、ｄ－ｄ吸収バンドの完全な減衰を確認した。動力学的データは単一指数崩壊関数に当てはめ、分解速度（または、同等のCo^{2+}配位変異型インスリンR_6六量体の半減期）を決定した。

【００９３】

齧歯類試験－報告されているとおり、雄Ｌｅｗｉｓラット（平均体重約３００ｇ）はストレプトゾトシン（ＳＴＺ）を投与して糖尿病とした（３５）。Orn^{B29}－インスリンまたはNle^{B29}－インスリンに関してインスリン類似体のｉｎ ｖｉｖｏ作用強度を試験するため、インスリン類似体を含むタンパク質溶液は、１６ｍｇのグリシン、１．６ｍｇのメタクレゾール、０．６５ｍｇのフェノール、および３．８ｍｇのリン酸ナトリウムから成る緩衝液（ｐＨ７．４）で構成した。３００ｇのラット１匹につき、緩衝液１００μｌ、用量１０μｇでインスリン類似体を尾静脈に静脈内（ＩＶ）注射した。次の数時間、臨床用グルコメーター（ＥａｓｙＭａｘ Ｖｏｉｃｅ Ｂｌｏｏｄ Ｇｌｕｃｏｓｅ Ｍｅｔｅｒ）を用い、連続測定によりこれによる血中グルコース濃度の変化をモニターした。インスリン類似体は逆相ＨＰＬＣによりそれぞれ再精製し、粉末になるまで乾燥し、同じタンパク質の最大濃度で希釈液に溶解し、分析用Ｃ４逆相ＨＰＬＣにより再定量し、希釈液は上記緩衝液を用いて作成した。

【００９４】

ｔ＝０でラットに静脈内注射した。ｔ＝０の時点および最初の１時間は１０分おき、２時間目は２０分おき、３時間目は３０分おき、その後は１時間おきに３６０分まで毛を剃った尾先端部から採血した。高親和性天然類似体の研究はサイズに制限があったが（ラットＮ＝５）、ヨード－Tyr^{B26}修飾の影響は高い検出力で評価された。そのため、３－Ｉ－Tyr^{B26}－Nle^{B29}－インスリンの研究は（Nle^{B29}－インスリンに対して）６ヵ月にわたり４日反復して実施され、週ごとにラット群体の環境に影響が出る交絡変数を回避した。各日に試験したラット（Ｎ＝４または５）は大規模群体（５０匹）から無作為抽出した。ベースラインの平均血糖値は各群、各日で同等であり、各日とも個体ごとに同様の傾向が認められた。血糖濃度を低下させるインスリン作用の効果は、（ａ）最初の１時間の濃度変化（ｄ［グルコース］／ｄｔ）、（ｂ）開始血糖濃度から最終濃度までグルコース時間依存性でほぼ水平のライン間の積分面積、および（ｃ）最初の０～８０分と８０～３６０分の間隔で観察された同曲線の積分面積（後者はインスリン作用が遅れた「テール」を表す）を用いて計算した。高血糖性のベースライン上限の直線下面積および観察された血糖濃度を表す曲線上の面積は、台形近似および示されたＡＯＣにより推定した。統計学的有意性はＳｔｕｄｅｎｔのｔ検定により評価した。

【００９５】

我々のｉｎ ｖｉｔｒｏインスリン受容体結合試験では可溶化インスリン受容体（イソ

型Ｂ）を利用し、前記インスリン受容体イソ型を発現したポリクローナル安定形質移入２９３ＰＥＡＫ細胞株の洗浄剤可溶化液から連続的にコムギ胚芽凝集素（ＷＧＡ）およびストレプトアクチン親和性クロマトグラフィーにより精製したＣ末端ストレプトアビジン結合タンパク質タグを用いた。インスリン類似体（１１段階希釈、最終濃度を最高２μｌとし、それぞれ５倍に希釈）を１００μｌの結合緩衝液（１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．８）、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　$MgSO_4$、０．０２５％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ　２０、および０．５％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン）に段階的に希釈し、９６ウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ）に作成した。前記試験は１００μｌの結合緩衝液のウェルに加えて開始し、（ｉ）ＷＧＡシンチレーション近接アッセイ（ＳＰＡ）ビーズ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）、（ｉｉ）可溶化受容体、および（ｉｉｉ）^{125}Ｉ－Ｔｙｒ^{A14}－インスリンを放射標識トレーサーとして追加した。［^{125}Ｉ］標識リガンドの最終濃度は７．５ｐＭであり、リガンドの欠乏現象を避けるため、競合リガンドがない場合に標識したリガンドの結合度が総追加数の１５％未満になるように、追加する受容体の量を調節した。プレートを室温で２４時間優しく振盪しながらインキュベートし、遠心分離し、１２検出器のＴｒｉｌｕｘシンチレーションカウンター（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ／Ｗａｌｌａｃ）で１ウェル当たり５分カウントした。類似体の解離定数を求めるため、競合結合データを非線形回帰により解析した。

【図１Ａ】

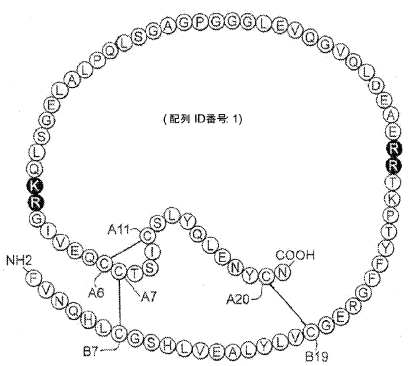


FIG. 1A

(先行技術)
プロインスリン

【図１Ｂ】

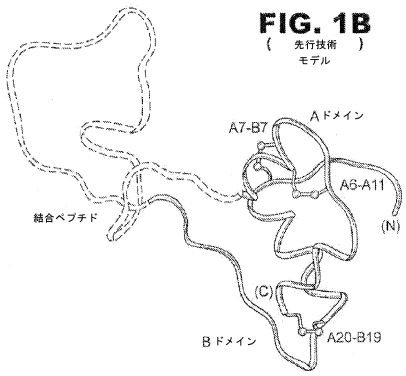


FIG. 1B

(先行技術)
モデル

【図１Ｃ】

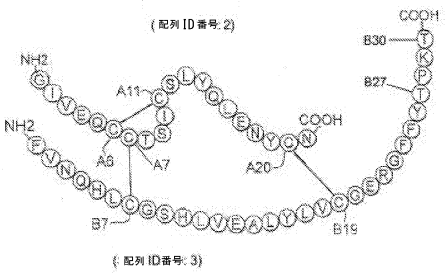


FIG. 1C

(先行技術)

【図２】

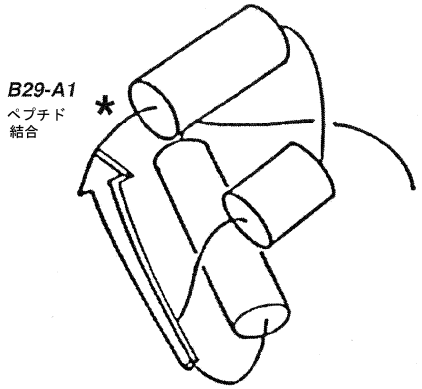


FIGURE 2

【図３Ａ】

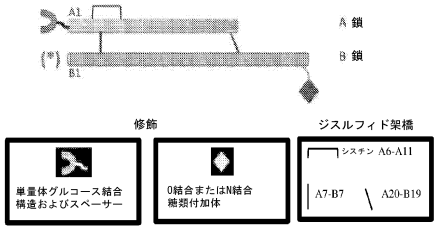


FIGURE 3A

【図３Ｂ】

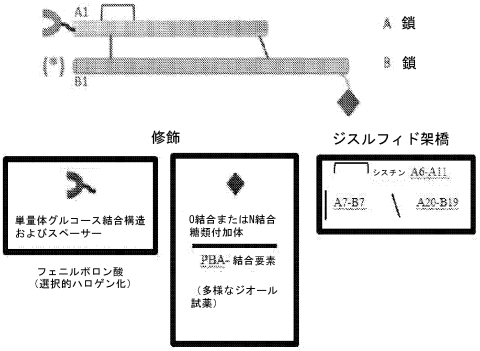


FIGURE 3B

【図４】

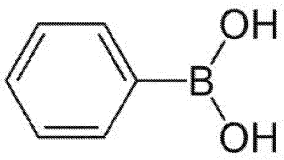


FIGURE 4

【図５】

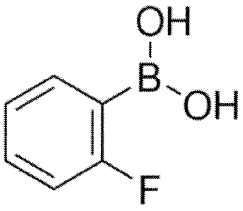


FIGURE 5

【図６】

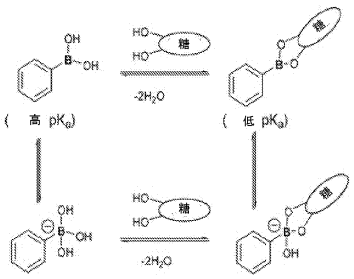


FIGURE 6

【図７】

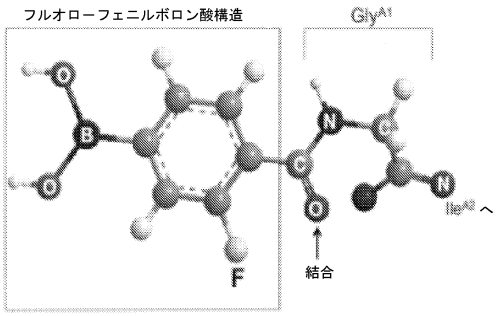


FIGURE 7

【図８Ａ】

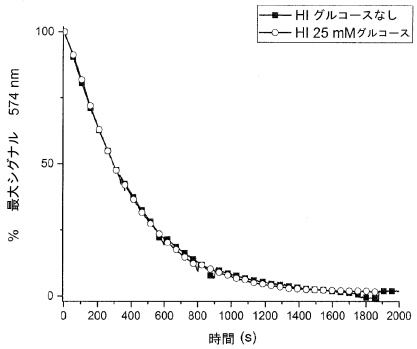


FIGURE 8A

【図８Ｂ】

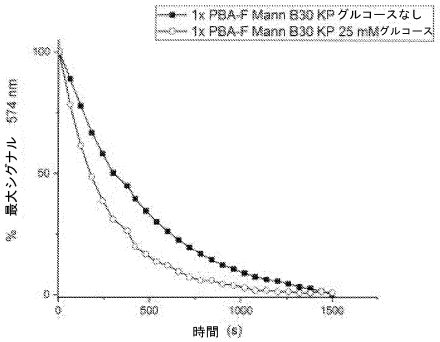


FIGURE 8B

【図８Ｃ】

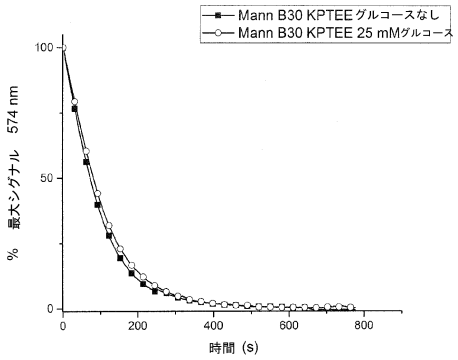


FIGURE 8C

【図９】

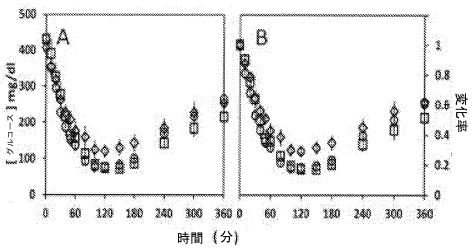


FIGURE 9

フロントページの続き

審査官　佐久　敬

(56)参考文献　国際公開第２０１４／０９３６９６（WO，Ａ２）
国際公開第２０１４／０１５０７８（WO，Ａ１）
国際公開第２０１０／１０７５２０（WO，Ａ１）
国際公開第２００３／０４８１９５（WO，Ａ２）
国際公開第２００１／０９２３３４（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ
Ｃ１２Ｎ
Ｃ１２Ｐ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ