(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2017-522282
(P2017-522282A)
(43)公表日　平成29年8月10日(2017.8.10)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C07K 14/62 | (2006.01) | C07K | 14/62 | ZNA | 4B064 |
| C12P 21/02 | (2006.01) | C12P | 21/02 | E | 4C076 |
| A61K 38/28 | (2006.01) | A61K | 38/28 | | 4C084 |
| A61K 47/12 | (2006.01) | A61K | 47/12 | | 4H045 |
| A61K 47/54 | (2017.01) | A61K | 47/54 | | |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 39 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-571710 (P2016-571710)
(86)(22)出願日　平成27年6月10日 (2015.6.10)
(85)翻訳文提出日　平成29年1月31日 (2017.1.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/035096
(87)国際公開番号　WO2015/191705
(87)国際公開日　平成27年12月17日 (2015.12.17)
(31)優先権主張番号　62/010,271
(32)優先日　平成26年6月10日 (2014.6.10)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　508032284
カリフォルニア　インスティチュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９１１２５，パサデナ，イースト・カリフォルニア・ブールヴァード　１２００，エムシー　６－３２
(74)代理人　100147485
弁理士　杉村　憲司
(74)代理人　100119530
弁理士　冨田　和幸
(74)代理人　100136858
弁理士　池田　浩

最終頁に続く

(54)【発明の名称】非標準的インスリンおよびそれらの使用

(57)【要約】
いくつかの態様において、本発明はインスリン派生物に関し、それには、位置B28またはB29にて環状アミノ酸が含まれ、環状アミノ酸はL-プロリンでない。いくつかの態様では、本発明は前記インスリン派生物を作成する方法に関する。いくつかの態様では、本発明は前記インスリン派生物が含まれる薬学的組成物に関する。いくつかの態様では、本発明は疾患または症状を対象において処置する方法に関し、それには、前記インスリン派生物が含まれる組成物を対象に施与することが含まれる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
環状アミノ酸が位置B28またはB29に含まれ、環状アミノ酸はL-プロリンではない、インスリン派生物。
【請求項２】
環状アミノ酸はαアミノ酸またはβアミノ酸である、請求項1のインスリン派生物。
【請求項３】
環状アミノ酸はLアミノ酸またはDアミノ酸である、請求項1または2のインスリン派生物。
【請求項４】
環状アミノ酸には、環状アミノ酸のアミド窒素、α炭素、およびβ炭素を含む複素環が含まれる、請求項1-3のいずれか一項のインスリン派生物。
【請求項５】
環状アミノ酸は生理学的pHで中性、正、または負の電荷をもつ、請求項1-4のいずれか一項のインスリン派生物。
【請求項６】
環状アミノ酸には、3員環、4員環、5員環、または6員環が含まれる、請求項1-5のいずれか一項のインスリン派生物。
【請求項７】
環状アミノ酸は、フルオロプロリンアナログ、ヒドロキシプロリンアナログ、またはプロリンリングアナログである、請求項1-6のいずれか一項のインスリン派生物。
【請求項８】
環状アミノ酸は、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、アジリジン-2-カルボン酸、アゼチジン-2-カルボン酸、ピペリジン-2-カルボン酸、3-カルボキシ-モルホリン、3-カルボキシ-チアモルホリン、4-オキサプロリン、ピログルタミン酸、1,3-オキサゾリジン-4-カルボン酸、1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸、3-チアプロリン、4-チアプロリン、3-セレノプロリン、4-セレノプロリン、4-ケトプロリン、3,4-デヒドロプロリン、4-アミノプロリン、4-フルオロプロリン、4,4-ジフルオロプロリン、4-クロロプロリン、4,4-ジクロロプロリン、4-ブロモプロリン、4,4-ジブロモプロリン、4-メチルプロリン、4-エチルプロリン、4-シクロヘキシル-プロリン、3-フェニルプロリン、4-フェニルプロリン、3,4-フェニルプロリン、4-アジドプロリン、4-カルボキシ-プロリン、α-メチルプロリン、α-エチルプロリン、α-プロピルプロリン、α-アリルプロリン、α-ベンジルプロリン、α-(4-フルオロベンジル)-プロリン、α-(2-クロロベンジル)-プロリン、α-(3-クロロベンジル)-プロリン、α-(2-ブロモベンジル)-プロリン、α-(4-ブロモベンジル)-プロリン、α-(4-メチルベンジル)-プロリン、α-(ジフェニルメチル)-プロリン、α-(ナフチルメチル)-プロリン、D-プロリン、またはβ$^{3}$-ホモプロリンである、請求項6のインスリン派生物。
【請求項９】
環状アミノ酸は、(2S,4S)-4-フルオロ-L-プロリン、(2S,4R)-4-フルオロ-L-プロリン、(2S)-3,4デヒドロ-L-プロリン、(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4S)-4-アジド-L-プロリン、(2S)-4,4-ジフルオロ-L-プロリン、(2S)-アゼチジン-2-カルボン酸、(2S)-ピペリジン-2-カルボン酸、または(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸である、請求項8のインスリン派生物。
【請求項１０】
環状アミノ酸は、シス-4-フルオロプロリン、トランス-4-フルオロプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、またはトランス-4-ヒドロキシプロリンである、請求項9のインスリン派生物。
【請求項１１】
環状アミノ酸は、置換シス-4-(1H-1,2,3,-トリアゾール-1-イル)-プロリンまたは置換トランス-4-(1H-1,2,3,-トリアゾール-1-イル)-プロリンである、請求項7のインスリン派

生物。
【請求項１２】
インスリンA鎖には、配列番号1で表される配列が含まれる、請求項1-11のいずれか一項のインスリン派生物。
【請求項１３】
インスリンB鎖には、配列番号2または配列番号32で表される配列が含まれ、$X_1$は位置B28に対応し、および$X_2$は位置B29に対応する、請求項1-12のいずれか一項のインスリン派生物。
【請求項１４】
位置B28でのアミノ酸は、プロリン、リシン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、または
位置B29でのアミノ酸は、プロリン、リシン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸である、請求項1-13のいずれか一項のインスリン派生物。
【請求項１５】
インスリンB鎖には、配列番号32で表される配列が含まれ、および
位置B29でのアミノ酸はリシンであり、リシンは置換または非置換のアルキル基またはアシル基にコンジュゲートする、請求項13のインスリン派生物。
【請求項１６】
リシンは、ヘキサデカン二酸にγ-L-グルタミルリンカーを介してコンジュゲートする、請求項15のインスリン派生物。
【請求項１７】
インスリン遺伝子が含まれる細胞を、環状アミノ酸が含まれる培地においてインキュベートすることを含む、請求項1-16のいずれか一項のインスリン派生物を作成する方法。
【請求項１８】
インスリンB鎖が合成されることを含む、請求項1-16のいずれか一項のインスリン派生物を作成する方法。
【請求項１９】
環状アミノ酸が含まれる分子を、インスリンA鎖、インスリンB鎖、またはそれらの双方のいずれかが含まれるペプチドにカップリングさせることを含む、請求項1-16のいずれか一項のインスリン派生物を作成する方法。
【請求項２０】
請求項1-16のいずれか一項のインスリン派生物を含む、薬学的組成物。
【請求項２１】
組成物は皮下注入用に調剤される、請求項20の薬学的組成物。
【請求項２２】
第二のインスリン派生物がさらに含まれ、第二のインスリン派生物は環状アミノ酸を含まない、請求項20または21の薬学的組成物。
【請求項２３】
第二のインスリン派生物は、インスリンB鎖28位にL-プロリンが、およびインスリンB鎖29位にリシンが含まれるインスリンである、請求項22の薬学的組成物。
【請求項２４】
高血糖、2型糖尿病、耐糖能障害、1型糖尿病、肥満、メタボリックシンドロームX、または脂質代謝異常を、対象において処置するにあたり、請求項20ないし23のいずれか一項の薬学的組成物の系統の薬物（pharmaceutical composition derivative）を対象に施与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権主張

この出願は2014年6月10日付け出願の米国仮特許出願第62/010271号に優先権を主張し、ここに参照することによりそれを全体として組み込む。

【背景技術】

【０００２】

世界保健機関（WHO）は、2030年に糖尿病が第7位の死因になると見積もり、成人10人に1人（5億人以上）がこの状態になると予想される。現在の糖尿病治療法は、少なくとも350億ドル（米国）の市場をもち、そして生活様式の変化および糖尿病の罹患率の上昇により、その価値は急上昇すると予測される。この市場の規模および急速な成長は、それを世界的な医療における最大のセクター（部門）の一つにする。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００３】

組換えヒトインスリンは糖尿病薬市場の主流である。組換えヒトインスリンの標準的な薬学的調製物はフェノール性保存料と共に亜鉛イオンを含有する。亜鉛イオンの添加は、インスリン六量体の形成を誘導することによってタンパク質製剤を安定化させる。しかしながら、これらの製剤中のインスリンの可溶性状態にもかかわらず、活性の遅延が観察される。この遅延は、六量体が活性な単量体状態に解離するのに必要な時間に関連し、それが間質から吸収される前である。したがって、長期間の安定性を維持しながらインスリンの自己会合に対する傾向を低下させることにより、インスリン投与後の活性の開始前の遅延時間を最小限に抑えることができる。

【０００４】

意義深い研究投資は、より一層長い作用時間、増加した有効性および高められた作用速度を含め、改善された治療特性を有するインスリンアナログの設計（エンジニアリング）に費やされている。自然なインスリンの凝集の広範な生物物理学的特徴は、改善された治療上プロファイルを有するインスリンアナログ（インスリン類似体）を設計することを可能にした。これらには、以下のものが含まれ、インスリンB鎖においてLys29およびPro28の位置が切り換わるという、迅速作用のインスリンリスプロ〔Humalog(R)（商標）、Eli Lilly（イーライリリー社）〕およびPro28がアスパラギン酸で置換される、インスリンアスパルト〔Novalog(R)、Novo Nordisk（ノボノルディスク社）。さらに加えて、インスリングルリジン〔Apidra(R)、Sanofi-Aventis（サノフィ・アベンティス社）〕は、インスリンB鎖においてのAsn3のLysine（リシン）による置換、およびB鎖においてのLys29のグルタミン酸による置換を含む。それでも、インスリンアナログのさらなる設計はその治療上のプロファイルをさらに改善しうる。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

いくつかの態様では、本発明はインスリン派生物に関し、それには、環状アミノ酸が位置B28またはB29に含まれ、そこでは、環状アミノ酸はL-プロリンではない。

【０００６】

いくつかの態様では、本発明はインスリン派生物を作成する方法に関し、それには、インスリン遺伝子が含まれる細胞を環状アミノ酸が含まれる培地においてインキュベートすることを含み、そこでは環状アミノ酸はL-プロリンではない。

【０００７】

いくつかの態様では、本発明は薬学的組成物に関し、それには、環状アミノ酸が位置B28またはB29に含まれるインスリン派生物が含まれ、そこでは、環状アミノ酸はL-プロリンではない。

【０００８】

いくつかの態様では、本発明は疾患または状態を対象において処置する方法に関し、それには、環状アミノ酸がB28またはB29位に含まれるインスリン派生物を含む組成物を対象に施与することが含まれ、そこでは、環状アミノ酸はL-プロリンではない。疾患または状態（症状など）は、たとえば、高血糖、2型糖尿病、耐糖能障害、1型糖尿病、肥満、メタ

ボリックシンドロームX（代謝X症候群）、または脂質代謝異常でありうる。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】本発明のいくつかの実施態様に従う種々のインスリン派生物の配列およびジスルフィド結合パターンを示す。アミノ酸配列は、ヒトインスリンA鎖（配列番号1）ならびに置換をB28およびB29位置において含むヒトインスリンB鎖（配列番号2）に対応する。様々な実施態様において、B28およびB29位置での置換は、ヒトインスリンのPro28および/またはLys29を環状アミノ酸で置き換えることを含みえ、そこでは環状アミノ酸はプロリンではない。

【図２】リーダーペプチド（ATG-His-R）、B鎖、C-ペプチド、およびA鎖が含まれる発現構築物を示す。発現構築物は、分子クローニングのための5'EcoRI制限部位および3'BamHI制限部位を含む。「RBS」はリボソーム結合部位を表す。「R」はアルギニンを表し、それはトリプシンによる切断を許容する。環状アミノ酸は、位置B28（プロリンについては「P」と標識する）または位置B29（リシンについては「K」と標識する）にてインスリンB鎖中に組み込むことができる。

【図３】インスリン派生物の調製および特徴付けにおけるステップを集約するフローチャートである。

【図４】シス-4-フルオロプロリン（「シス-フルオロ」）またはトランス-4-フルオロプロリン（「トランス-フルオロ」）のいずれかを含む培地において増殖させたE. coli（大腸菌）からのタンパク質のポリアクリルアミドゲルを示す。「SF」と標識されるレーンは培養物の可溶性画分（すなわち、細胞質ゾル）から回収されるタンパク質に対応し、および「IBs」と標識されるレーンは封入体から回収されるタンパク質に対応する。プロインシュリン派生物は、コロイドブルー染色によって描写されるように、14kDa未満の分子量を有する封入体レーンにおいてバンドを示す。これらのバンドの同一性は、抗ポリヒスチジン抗体を用い、ウエスタンブロッティングによって確認された。

【図５】4-ヒドロキシプロリンを含む培地で増殖させたE. coliにおいて発現させたインスリンのポリアクリルアミドゲルを示す。「IBs」と標識されるレーンは封入体から回収されるタンパク質に対応し、「AS」と標識されるレーンは亜硫酸分解後に封入体から回収されるタンパク質に対応し、「Mis」と標識されるレーンはミスフォールド（誤って折り畳まれた）プロインスリンに対応し、および「リフォールディング」と標識されるレーンは適切に折り畳まれたプロインスリンに対応し、それは、矢印で示された単一のバンドを表示する。

【図６－１】プロインスリン派生物のMALDI-MSスペクトルを示す。自然なプロインスリンペプチドRGFFYTPKTRRE（配列番号25）は1558amuの分子量を有する。(2S,4S)-4-フルオロ-L-プロリン派生物は1575amuの予想原子質量を有する。(2S,4R)-4-フルオロ-L-プロリン派生物は1575amuの予想原子質量を有する。(2S)-3,4-デヒドロ-L-プロリン派生物は1556amuの予想原子質量を有する。(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸派生物は1576amuの予想原子質量を有する。(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン派生物は1574amuの予想原子質量を有する。(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン派生物は1574amuの予想原子質量を有する。(2S)-4,4-ジフルオロ-L-プロリン派生物は1593amuの予想原子質量を有する。(2S)-アゼチジン-2-カルボン酸派生物は1544amuの予想原子質量を有する。(2S)-ピペリジン-2-カルボン酸派生物は1572amuの予想原子質量を有する。(2S,4S)-4-アジド-L-プロリン派生物は1599amuの予想原子質量を有し、およびそれは1573amuにもアミノピークを示すと予想される。各環状アミノ酸はインスリンB鎖B28位に組み込まれた。

【図６－２】図6-1と同様である。

【図６－３】図6-1と同様である。

【図６－４】図6-1と同様である。

【図７】インスリンB鎖のB28位置での(2S,4R)-4-ヒドロキシプロリンの置換を含む、成熟野生型インスリンおよび成熟インスリンのHPLCトレースを示す。

【図８】(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンインスリンおよび野生型インスリン、それら

はここに記載の方法に従って生産されたものであり、およびインスリンリスプロ、インスリンアスパルト、ならびに商業上入手可能な野生型インスリンを含め、成熟インスリンについてのMALDI-MSスペクトルを示す。インスリンフラグメントの見かけの分子量は、MALDI-MS装置の較正のため、およびインスリンが成熟したインスリンであるため、図6に示すものとは異なる。注目すべきは、ここに記載される方法に従って生産される成熟野生型インスリンに対応するペプチドの分子量は、商業上のインスリンおよびインスリンリスプロの分子量に等しく、インスリンB鎖の位置B28およびB29でプロリンおよびリシンの順序を逆転させ、そしてそのようにして、タンパク質の分子量に影響を及ぼすことがない。(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンインスリン派生物は、分子量において予想される16ダルトンのシフトを示した。同様に、アスパラギン酸（MW=132）によるプロリン（MW=115）の置換を含むインスリンアスパルトは、予想される17ダルトンの分子量シフトを示した。

【図９】(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン（「インスリン(2S,4S)-4-OH」）、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン（「インスリン(2S,4R)-4-OH」）、および(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸（「インスリン4-チアゾ」）を含め、インスリンB鎖のB28位置におけるインスリン派生物についての円偏光二色性（「CD」）スペクトル、ならびに野生型インスリン（「インスリン」）およびインスリンリスプロについてのCDスペクトルを示す。

【図１０】(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン（「インスリン(2S,4S)-4-OH」）、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン（「インスリン(2S,4R)-4-OH」）、または(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸（「インスリン4-チアゾ」）を含め、インスリンB鎖のB28位置でのインスリン派生物、ならびに野生型インスリンおよびインスリンアスパルトについての分析的超遠心分離結果を示す。

【図１１】(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン（「インスリン(2S,4S)-4-OH」）、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン（「インスリン(2S,4R)-4-OH」）、または(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸（「インスリン4-チアゾ」）を含め、インスリンB鎖のB28位置でのインスリン派生物、ならびに野生型インスリンおよびインスリンリスプロについての融解曲線を示す。融解曲線は、25℃から95℃への加熱中の楕円率の変化を追跡する。

【図１２】PBSビヒクル（レーン1）、20nMの野生型インスリン（レーン2）、(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン-グルタミン酸を含め、B28位置での200nMのインスリン派生物（レーン3）、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンを含め、B28位置での200nMのインスリン派生物（レーン4）、(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸を含め、B28位での200nMのインスリン誘導体（レーン5）、および200nMの野生型インスリン（レーン6）により処理したHEK293全細胞溶解物のウエスタンブロットを示す。「インスリン」と標識されたバンドは、HEK293細胞に添加されたインスリン調製物のSDS-PAGEゲルからのインスリンバンドである。「p-IR」と標識されたバンドは、リン酸化されたインスリン受容体のウエスタンブロットに対応する。「IR」と標識されたバンドは、合計インスリン受容体についてのウエスタンブロットに対応する。「β-アクチン」と標識されたバンドは、ローディングコントロールとして使用されたβ-アクチンのウエスタンブロットに対応する。下のパネルは、ゲル上の合計タンパク質ランを示す。

【図１３】TAMRAフルオロフォア（下パネル）についておよびInstaBlue（インスタブルー）染色によって視覚化されたポリアクリルアミドゲルを示す（上パネル）。「PR」と標識されたレーンは、L-プロリンを含む培地中でインキュベートされた細胞についてTAMRAアルキンに対してクリックされた細胞溶解物に対応する。「+アジド」と標識されたレーンは、(2S,4S)-4-アジド-L-プロリンを含む培地にてインキュベートされた細胞についてTAMRAアルキンにクリックされた細胞溶解物に対応する。「+アジド」レーンは、TAMRAフルオロフォアについてイメージングすることにより可視であったタンパク質を示し、プロインスリン構築物についての分子量に対応し；このバンドは、コントロールレーンにおいてTAMRAフルオロフォアのイメージングによっては可視でなかった。

【発明を実施するための形態】

【００１０】

定義

冠詞“ａ”および“ａｎ”は、冠詞の文法上の対象の一に、または一よりも多くに（すなわち、少なくとも一つに）言及するために用いられる。一例として、「ある要素」は、一の要素または一よりも多く（一以上）の要素を意味する。

【００１１】

用語「アシル」は当該技術分野で認識され、および一般式ヒドロカルビルC(O)-、好ましくはアルキルC(O)-によって表される基に言及される。

【００１２】

用語「アシルアミノ」は当該技術分野で認識され、およびアシル基により置換されたアミノ基に言及され、およびたとえば、式ヒドロカルビルC(O)NH-によって表すことができる。

【００１３】

用語「アシルオキシ」は当該技術分野で認識され、および一般式ヒドロカルビルC(O)O-、好ましくはアルキルC(O)O-によって表される基に言及される。

【００１４】

用語「アルコキシ」は、アルキル基、好ましくは低級アルキル基で、それに結合した酸素を有するものに言及される。代表的なアルコキシ基には、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、tert-ブトキシおよびその他同種類のものなどが含まれる。

【００１５】

用語「アルコキシアルキル」は、アルコキシ基で置換されたアルキル基に言及し、および一般式アルキル-O-アルキルによって表すことができる。

【００１６】

用語「アルケニル」は、ここに使用されるように、少なくとも一の二重結合が含まれる脂肪族基に言及し、および「置換されてないアルケニル」および「置換されているアルケニル」の双方が含まれ、その後者はアルケニル基の一以上の炭素上の水素を置換する置換基を有するアルケニル部分に言及される。そのような置換基は、一以上の二重結合に含まれるか、または含まれない一以上の炭素上に見出されうる。さらに、そのような置換基には、安定性が非常に厳しい場合を除いて、以下に述べるように、アルキル基について考えられるすべてのものが含まれる。たとえば、一以上のアルキル、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、またはヘテロアリール基によるアルケニル基の置換が考えられる。

【００１７】

「アルキル」基または「アルカン」は、完全に飽和する直鎖または分枝の非芳香族炭化水素である。典型的には、直鎖または分枝アルキル基は、特に断らない限り、1から約20個までの、好ましくは1から約10個までの炭素原子をもつ。直鎖および分枝アルキル基の例には、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ペンチルおよびオクチルが含まれる。$C_1$-$C_6$直鎖または分枝アルキル基は、「低級アルキル」基とも呼ばれる。

【００１８】

さらに、用語「アルキル」（または「低級アルキル」）は、本明細書および請求の範囲を通して使用されるように、「置換されないアルキル」および「置換されるアルキル」の両方を含むことが意図され、その後者は、炭化水素骨格の一以上の炭素上の水素が置換される置換基をもつアルキル部分に言及される。そのような置換基には、他に特定されない限り、たとえば、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（たとえば、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシルなどのようなもの）、チオカルボニル（たとえば、チオエステル、チオアセタート、またはチオホルマートなどのようなもの）、アルコキシル、ホスホリル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルファート、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラルキル、または芳香族もしくはヘテロ芳香族部分が含まれうる。適切であれば、炭化水素鎖上で置換された部分がそれら自体で置換されうることは、この技術において熟練する者（当業者）には理解されるであろう。例として、置換アルキルの置換基には、アミ

ノ、アジド、イミノ、アミド、ホスホリル（ホスホナートおよびホスフィナートが含まれ）、スルホニル（スルファート、スルホンアミド、スルファモイルおよびスルホナートが含まれ）、およびシリル基、ならびにエーテル、アルキルチオ、カルボニル（ケトン、アルデヒド、カルボキシラート、およびエステルが含まれ）、$-CF_3$、-ＣＮおよびその他同種類のものなどのものの置換および非置換形態を含むことができる、模範的な置換アルキルを以下に説明する。シクロアルキルは、アルキル、アルケニル、アルコキシ、アルキルチオ、アミノアルキル、カルボニル置換アルキル、$-CF_3$、-CN、およびその他同種類のものなどでさらに置換されることができる。

【００１９】

用語「アルキルアミノ」は、ここで使用されるように、少なくとも一のアルキル基により置換されたアミノ基に言及する。

【００２０】

用語「アルキルチオ」は、ここで使用されるように、アルキル基で置換されたチオール基を指し、および一般式アルキルS-で表すことができる。

【００２１】

用語「アルキニル」は、ここで使用されるように、少なくとも一の三重結合を含む脂肪族基を指し、および「置換されないアルキニル」および「置換されるアルキニル」の双方が含まれると意図され、その後者は置換基をもつアルキニル部分に言及され、アルキニル基の一以上の炭素上の水素が置換される。そのような置換基は、一以上の三重結合に含まれるか、または含まれない一以上の炭素上に存在しうる。さらに、そのような置換基には、安定性が非常に厳しい場合を除いて、上記で考察したように、アルキル基について考えられるすべてのものが含まれる。たとえば、一以上のアルキル、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、またはヘテロアリール基によるアルキニル基の置換が考えられる。

【００２２】

ここで使用されるように、用語「アミド窒素」および「アミン窒素」は、タンパク質においてカルボキシル基と共にペプチド結合を形成するアミノ酸の窒素を指す。αアミノ酸について、アミド窒素（またはアミン窒素）はアミノ酸のα炭素と共に共有結合を形成する。タンパク質との関連において、アミド窒素は典型的に、隣接するアミノ酸のカルボキシル基と共有結合を形成する。アミド窒素（またはアミン窒素）はまた、たとえば、環状アミノ酸、たとえば、プロリンなどのようなものにおいて、追加の原子と共有結合を形成することもできる。

【００２３】

ここで使用されるように、用語「アミノアルキル」はアミノ基により置換されたアルキル基を指す。

【００２４】

ここで使用されるように、「アラルキル」という用語はアリール基で置換されたアルキル基を指す。

【００２５】

ここで使用されるように、用語「アリール」には、置換または非置換の単環芳香族基が含まれ、そこでは環の各原子は炭素である。好ましくは、環は5ないし7員環であり、より一層好ましくは6員環である。用語「アリール」はまた、二以上の炭素が二の隣接する環に共通であり、そこでは環の少なくとも一が芳香族である二以上の環式環をもつ多環式環システム（系）が含まれ、例は、他の環式環は、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および/またはヘテロシクリルであることができる。アリール基には、ベンゼン、ナフタレン、フェナントレン、フェノール、アニリン、およびその他同種類のものなどが含まれる。

【００２６】

ここで使用されるように、「炭素環」および「炭素環式」という用語は、飽和または不飽和環を指し、そこでは環の各原子は炭素である。用語炭素環には、芳香族炭素環および非芳香族炭素環の双方が含まれる。非芳香族炭素環には、すべての炭素原子が飽和してい

るシクロアルカン環、および少なくとも一つの二重結合を含むシクロアルケン環の双方が含まれる。「炭素環」には、5-7員単環式および8-12員二環式環が含まれる。二環式炭素環の各環は、飽和、不飽和および芳香族環から選ばれうる。炭素環には、二つの環の間で一、二または三またはそれらよりも多くの原子が共有されている二環式分子が含まれる。用語「縮合炭素環」は、二環式炭素環に言及し、そこでは、各々の環が二つの隣接する原子を他の環と一緒に共有する。縮合炭素環の各環は、飽和環、不飽和環および芳香族環から選ぶことができる。模範的な実施態様において、芳香族環、たとえば、フェニルは、飽和または不飽和環、例は、シクロヘキサン、シクロペンタン、またはシクロヘキセンに縮合しうる。原子価が許す限り、飽和、不飽和および芳香族の二環式環の任意の組合せが、炭素環式の定義において含まれる。模範的な「炭素環」には、シクロペンタン、シクロヘキサン、ビシクロ[2.2.1]ヘプタン、1,5-シクロオクタジエン、1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン、ビシクロ[4.2.0]オクト-3-エン、ナフタレンおよびアダマンタンが含まれる。模範的な縮合炭素環には、デカリン、ナフタレン、1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン、ビシクロ[4.2.0]オクタン、4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-インデンおよびビシクロ[4.1.0]ヘプト-3-エンが含まれる。「炭素環」は、水素原子を担持することが可能な任意の一以上の位置で置換されてもよい。

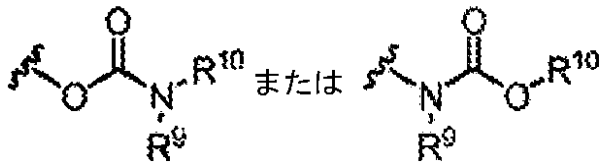
【００２７】

「シクロアルキル」基は完全に飽和した環状炭化水素である。「シクロアルキル」には、単環式および二環式の環が含まれる。典型的には、単環式シクロアルキル基は、特に断らない限り、3から約10個までの炭素原子、より一層典型的には3ないし8個の炭素原子をもつ。二環式シクロアルキルの第二の環は、飽和、不飽和および芳香環から選ばれうる。シクロアルキルには、一、二または三個またはそれらよりも多くの原子が二つの環の間で共有される二環式分子が含まれる。用語「縮合シクロアルキル」は、環のそれぞれが二つの隣接する原子を他の環と一緒に共有する二環式シクロアルキルに言及する。縮合二環式シクロアルキルの第二の環は、飽和、不飽和および芳香族環から選ばれうる。「シクロアルケニル」基は、一以上の二重結合を含む環状炭化水素である。

【００２８】

用語「カルバメート」は当該分野で認識されており、そして次の基に言及される。

【化１】




式中、$R^9$および$R^{10}$は、無関係に、水素またはヒドロカルビル基、たとえば、アルキル基などのようなものを表すか、または$R^9$および$R^{10}$は、介在する原子（群）と一緒になって、環構造において4から8個までの原子をもつ複素環を完成する。

【００２９】

ここで使用されるように、「カルボシクリルアルキル」という用語は、炭素環基により置換されたアルキル基を指す。

【００３０】

用語「カーボナート（カーボネート）」は当該技術分野で認識されており、および基-O$CO_2$-$R^{10}$を指し、式中、$R^{10}$はヒドロカルビル基を表す。

【００３１】

ここで使用されるように、「カルボキシ」という用語は、式-$CO_2$Hで表される基を指す。

【００３２】

この明細書および請求の範囲を通して、単語「含む（comprise）」または変形物で、た

とえば、「comprises」または「comprising」などのようなものは、記載された完全体（integer）または完全体の群を含むが、他の任意の完全体または完全体の群を排除するものでないことを意味すると理解される。

【００３３】

ここで使用されるように、用語「環状アミノ酸」は、（a）アミン窒素またはアミド窒素を含む複素環または（b）骨格炭素、例は、α炭素を含む炭素環のいずれかを含む任意のアミノ酸に言及する。たとえば、αアミノ酸に関して、用語「環状アミノ酸」は、アミン窒素（またはアミド窒素、例は、インスリン派生物に組み込まれるアミノ酸について）、α炭素、およびβ炭素が含まれる複素環を含むアミノ酸に言及されうる。たとえば、プロリンは、アミン窒素、α炭素、β炭素、γ炭素、およびδ炭素が含まれる複素環を含む環状アミノ酸である。文脈によって別段のことが明らかでない限り、ここで使用されるように、「環状アミノ酸」という用語は、L-プロリン以外の環状アミノ酸を指す。

【００３４】

「糖尿病」という用語は、ここで使用されるように、真性糖尿病、たとえば、1型真性糖尿病、2型真性糖尿病、または妊娠糖尿病などのようなものを意味する。

【００３５】

ここで使用されるように、用語「有効量」および「治療上有効な量」は、たとえば、血糖値を低下させるために望ましい結果を生じるのに十分な投薬量を意味する。

【００３６】

「エステル」という用語は、ここで使用されるように、基-C(O)OR$^{10}$を指し、そこではR$^{10}$はヒドロカルビル基を表す。

【００３７】

「エーテル」という用語は、ここで使用されるように、酸素を介して別のヒドロカルビル基にリンクしたヒドロカルビル基を指す。したがって、ヒドロカルビル基のエーテル置換基はヒドロカルビル-O-でありうる。エーテルは対称でも非対称でもいずれもよい。エーテルの例には、制限されないが、複素環-O-複素環およびアリール-O-複素環が含まれる。エーテルには、「アルコキシアルキル」基が含まれ、それは一般式アルキル-O-アルキルで表すことができる。

【００３８】

「ハロ」および「ハロゲン」という用語は、ここで使用されるように、ハロゲンを意味し、そしてクロロ、フルオロ、ブロモ、およびヨードが含まれる。

【００３９】

「ヘタラルキル（hetaralkyl）」および「ヘテロアラルキル」という用語は、ここで使用されるように、ヘタリール基で置換されたアルキル基を指す。

【００４０】

「ヘテロアルキル」という用語は、ここで使用されるように、炭素原子および少なくとも一個のヘテロ原子の飽和または不飽和鎖に言及し、そこでは二個のヘテロ原子は隣接しない。

【００４１】

「ヘテロアリール」および「ヘタリール」という用語には、置換または非置換の芳香族単環構造、好ましくは5-ないし7-員環、より一層好ましくは5-ないし6-員環が含まれ、その環構造には、少なくとも一のヘテロ原子、好ましくは一ないし四個のヘテロ原子、より一層好ましくは一または二個のヘテロ原子が含まれる。「ヘテロアリール」および「ヘタリール」という用語にはまた、二以上の環式環をもつ多環式環系が含まれ、そこでは二以上の炭素が二つの隣接する環に共通し、それは環の少なくとも一つがヘテロ芳香族であり、例として、他の環式環は、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および/またはヘテロシクリルであることができる。ヘテロアリール基には、たとえば、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、およびピリミジン、およびその他同種類のものなどが含まれる。

【００４２】
「ヘテロ原子」という用語は、ここで使用されるように、炭素または水素以外の任意の元素の原子を意味する。好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、およびイオウである。
【００４３】
用語「ヘテロシクリル」、「複素環」、および「複素環式」は、置換または非置換の非芳香族環構造、好ましくは3-ないし10-員環、より一層好ましくは3-ないし7-員環を指し、その環構造には、少なくとも一個のヘテロ原子、好ましくは一ないし四個のヘテロ原子、より一層好ましくは一または二個のヘテロ原子が含まれる。用語「ヘテロシクリル」および「複素環式」にはまた、二以上の炭素が二つの隣接する環に共通している二以上の環式環をもつ多環式環系も含まれ、そこでは、環の少なくとも一つは複素環式であり、例として、他の環式環は、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および/またはヘテロシクリルである。ヘテロシクリル基には、たとえば、ピペリジン、ピペラジン、ピロリジン、モルホリン、ラクトン、ラクタム、およびその他同種類のものなどが含まれる。ヘテロシクリル基はまたオキソ基によって置換されることもできる。たとえば、「ヘテロシクリル」は、ピロリジンおよびピロリジノンの両方を包含する。
【００４４】
「ヘテロシクリルアルキル」という用語は、ここで使用されるように、複素環基で置換されたアルキル基を指す。
【００４５】
ここで使用されるように、「ヒドロカルビル」という用語は、炭素原子を介して結合している基を指し、それは、=0または=S置換基をもたず、そして典型的には、少なくとも一つの炭素-水素結合および一次炭素骨格をもつが、随意にヘテロ原子を含んでいてもよい。したがって、メチル、エトキシエチル、2-ピリジル、およびトリフルオロメチルのような基は、この出願の目的のためにヒドロカルビルであると考えられるが、しかし、たとえば、アセチル（それはリンキング炭素上に=0置換基をもつ）およびエトキシ（それは炭素ではなく、酸素を介してリンクする）などのような置換基ではない。ヒドロカルビル基には、制限されないが、アリール、ヘテロアリール、炭素環、ヘテロシクリル、アルキル、アルケニル、アルキニル、およびそれらの組合せが含まれる。
【００４６】
ここで使用されるように、「ヒドロキシアルキル」という用語は、ヒドロキシ基で置換されたアルキル基を指す。
【００４７】
用語「低級」は、化学的部分、たとえば、アシル、アシルオキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアルコキシなどのようなものと共に使用されるとき、置換基において十またはそれよりも少ない（十以下の）、好ましくは六個以下の非水素原子が存在する基が含まれることを意図する。たとえば、「低級アルキル」は、十個以下の炭素原子、好ましくは六個以下の炭素原子を含むアルキル基を指す。一定の実施態様では、ここで規定されるアシル、アシルオキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアルコキシ置換基は、それぞれ、低級アシル、低級アシルオキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、または低級アルコキシであり、それらが単独で、または他の置換基、たとえば、規定において、ヒドロキシアルキルおよびアラルキルなどのようなものと組み合わせて現れるかどうかにかかわらない（その場合、たとえば、アリール基内の原子は、アルキル置換基において炭素原子を数えるときには計数されない）。
【００４８】
ここで使用されるように、「オキソ」という用語はカルボニル基を指す。オキソ置換基が、別の飽和した基上に存在し、たとえば、オキソ置換シクロアルキル基と共にあるなどのようなとき（例は、3-オキソ-シクロブチル）、置換基は依然として飽和基であることが意図される。基が「オキソ」基によって置換されているとして称されるとき、このことは、カルボニル部分（すなわち、-C(=O)-）がメチレン単位（すなわち、-CH2-）を置換す

ることを意味することができる。

【００４９】

用語「ポリシクリル」、「多環」、および「多環式」は二以上の環を指し（たとえば、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および/またはヘテロシクリル）、そこでは、二以上の原子が二の隣接する環に共通であり、例としては、環は「縮合環」である。多環の各々の環は、置換されていてもよく、または置換されていなくてもよい。一定の実施態様において、多環の各環は、環において3から10個までの、好ましくは5から7個までの原子を含む。

【００５０】

「妨げる」という用語は、当該技術分野で認識されており、そしてある状態に関連して使用されるとき、当技術分野で十分に理解され、そして組成物の施与が含まれ、それは対象において組成物を受けない対象に対してその状態の可能性を低下させるか、または発症を遅らせる。

【００５１】

「シリル」という用語は、三つのヒドロカルビル部分が結合したケイ素部分に言及する。

【００５２】

用語「置換され」は、骨格の一以上の炭素上の水素を置換する置換基をもつ部分を指す。「置換」または「により置換される」には、そのような置換が置換された原子および置換基の許容される原子価に従うことを暗に示す条件が含まれ、そしてその置換によって安定した化合物がもたらされ、例は、形質転換を、たとえば、再配列、環化、削除などのようなものによって自発的に受けないと理解される。ここで使用されるように、用語「置換され」は、有機化合物のすべての許容可能な置換基を含むことが予期される。広範な態様において、許容可能な置換基には、有機化合物の非環式および環式、分枝および非分枝、炭素環式および複素環式、芳香族および非芳香族置換基が含まれる。許容可能な置換基は、適切な有機化合物について、一以上であってもよく、そして同じであっても、または異なっていてもよい。この発明の目的のために、ヘテロ原子、たとえば、窒素などのようなものは、ここで記載される水素置換基および/または任意の許容可能な置換基をもっていてもよく、それはヘテロ原子の原子価を満たす。置換基には、ここに記載される任意の置換基を含むことができ、たとえば、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（たとえば、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシルなどのようなもの）、チオカルボニル（たとえば、チオエステル、チオアセタート、またはチオホルマートなどのようなもの）、アルコキシル、ホスホリル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルファート、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラルキル、または芳香族もしくはヘテロ芳香族部分である。適切であれば、置換基がそれ自体で置換されうることは、当業者には理解されるであろう。「置換されていない」と具体的に記載されていない限り、ここでの化学的部分への言及は、置換された変形物を含むと理解される。たとえば、「アリール」基または部分への言及は、暗黙的に、置換および非置換変形物の双方を含む。

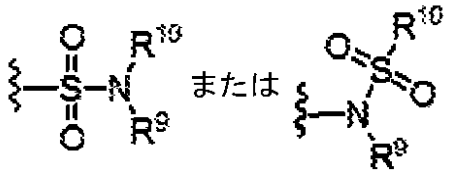
【００５３】

「サルファート（硫酸塩）」という用語は、当該技術分野で認識されており、そして$OSO_3H$基、またはその薬学的に許容可能な塩を意味する。

【００５４】

用語「スルホンアミド」は当該技術分野で認識されており、次の一般式によって表される基に言及される。

【化２】



式中、$R^9$および$R^{10}$は、無関係に、水素またはヒドロカルビル、たとえば、アルキルなどのようなものを表すか、または$R^9$および$R^{10}$は介在する原子（群）と一緒になって、環構造において4から8個までの原子をもつ複素環を完成させる。

【００５５】

用語「スルホキシド」は当該技術分野で認識されており、そして基$S(O)-R^{10}$を指し、式中、$R^{10}$はヒドロカルビルを表す。

【００５６】

「スルホナート」という用語は当該技術分野で認識されており、そして基$SO_3H$、またはその薬学的に許容可能な塩を意味する。

【００５７】

「スルホン」という用語は当該技術分野で認識されており、そして基$S(O)_2-R^{10}$を指し、式中、$R^{10}$はヒドロカルビルを表す。

【００５８】

ここで使用されるように、「チオアルキル」という用語は、チオール基で置換されたアルキル基を指す。

【００５９】

ここで使用されるように、「チオエステル」という用語は、基$-C(O)SR^{10}$または$SC(O)R^{10}$を意味し、ここで$R^{10}$はヒドロカルビルを表す。

【００６０】

ここで使用されるように、「チオエーテル」という用語は、エーテルに相当するものであり、そこでは酸素がイオウで置き換えられる。

【００６１】

「形質転換すること」および「トランスフェクトすること」という用語は、ここでは交換可能に使用され、そしてたとえば、組換え細胞を産生するために、細胞への核酸の導入を指す。核酸によってコードされるヌクレオチド配列は、細胞の子孫に遺伝するものであってもなくてもよい。トランスフェクションは、たとえば、安定でありえ（すなわち、核酸が細胞のゲノムに組み込まれ、それにより細胞の子孫に遺伝する）または一過性でありうる（すなわち、核酸によってコードされるヌクレオチド配列の発現が一定期間後に失われる）。

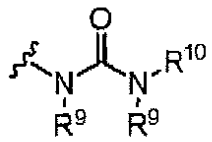
【００６２】

ここで使用されるように、用語「処置する」、「処置すること」、および「処置」は、状態を抑制すること、たとえば、糖尿病などのような状態、障害、または疾患の症状の発症を減少させることを含む。これらの用語はまた、治療も包含する。処置は、状態、障害、または疾患の症状が改善されるか、または有益に変更される任意の方法を意味する。好ましくは、そのような処置を必要とする対象は、ヒト、ペット（例は、ネコまたはイヌ）、または家畜などのような哺乳動物である。

【００６３】

用語「尿素」は当該技術分野で認識されており、そして次の一般式によって表すことができる。

【化３】



式中、$R^9$および$R^{10}$は、無関係に、水素またはヒドロカルビル、たとえば、アルキルなどのようなものを表すか、または$R^{10}$および介在する原子（群）と一緒になる$R^9$の出現のいずれかは、環構造において4から8個までの原子をもつ複素環を完成させる。

I.インスリン派生物

【００６４】

いくつかの見地では、本発明はインスリン派生物（以下、インスリン誘導体と称することがある。）に関し、それには、B28またはB29位での環式アミノ酸が含まれ、そこでは、環式アミノ酸はL-プロリンではない。インスリン派生物は、配列番号1（GIVEQCCTSICSLYQLENYCN）において示されるA鎖を含みうる。インスリン派生物は、配列番号2（FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTX$_1$X$_2$T）において示されるB鎖を含むことができ、ここでは、$X_1$は位置B28であり、および$X_2$は位置B29である（図1）。好ましい実施態様では、インスリン派生物は、図1に描かれるような三つのジスルフィド結合を含み、すなわち、A6およびA11位のシステインを連結するジスルフィド結合、A7およびB7位のシステインを連結するジスルフィド結合、およびA20およびB19位のシステインを連結するジスルフィド結合である。インスリンは当該分野で知られる置換および/または欠失を含みうる。たとえば、位置B1および/またはB30は欠失してもよく、そして位置A21および/またはB3は中性に荷電したアミノ酸、たとえば、アラニン、アスパラギン、グルタミン、グリシン、またはセリンなどのようなもので置換されていてもよい。

【００６５】

いくらかの実施態様では、位置B28でのアミノ酸はプロリン、リシン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、または位置B29のアミノ酸はプロリン、リシン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸である（たとえば、配列番号29および配列番号31についてプロインスリン配列を参照）。たとえば、位置B29にてアミノ酸はリシンであってもよく、およびリシンは置換または非置換のアルキル基またはアシル基にコンジュゲート（共役、結合）していてもよい。リシンは、たとえば、γ-L-グルタミルリンカーを介し、ヘキサデカン二酸にコンジュゲートすることができる。（たとえば、米国特許第8,710,000号および同第7,615,532号を参照し、それらは参照によりここに組み込まれる）。同様に、リシンはミリスチン酸にコンジュゲートされてもよい（たとえば、米国特許第6,869,930号および同第5,750,497号を参照し、それらは参照によりここに組み込まれる）。

【００６６】

いくつかの実施態様では、インスリン派生物の二量体会合定数（dimer association constant）は、非修飾ヒトインスリンの二量体会合定数よりも低い。たとえば、インスリン派生物の二量体会合定数は、未修飾ヒトインスリンの二量体会合定数の0.9倍未満、たとえば、未修飾ヒトインスリンの二量体会合定数の以下の数値未満でありえ、0.80倍、0.70倍、0.60倍、0.50倍、0.40倍、0.30倍、0.20倍、0.10倍、0.095倍、0.090倍、0.085倍、0.080倍、0.075倍、0.070倍、0.065倍、0.060倍、0.055倍、0.050倍、0.045倍、0.040倍、0.035倍、0.030倍、0.025倍、0.020倍、0.015倍、0.010倍、0.0095倍、0.0090倍、0.0085倍、0.0080倍、0.0075倍、0.0070倍、0.0065倍、0.0060倍、0.0055倍、0.0050倍、0.0045倍、0.0040倍、0.0035倍、0.0030倍未満であり、またはさらに0.0025倍未満などのようなものである。インスリン派生物の二量体会合定数は、非修飾インスリンの二量体会合定数に匹敵しうる。いくつかの実施態様では、インスリン派生物の二量体会合定数は、非修飾ヒトインスリンの二量体会合定数よりも高い。二量体会合定数は、たとえば、円二色性分光法、サイズ排除クロマトグラフィー、分析超遠心法、または表面プラズモン共鳴によっ

て測定することができる。いくつかの実施態様では、インスリン派生物の発現は、たとえば、ヒト患者における未修飾ヒトインスリンの発現よりも速い。

【００６７】

いくつかの実施態様において、インスリン派生物は、非修飾ヒトインスリンよりも、すなわち同様の条件下で、より一層長い貯蔵寿命をもつ。たとえば、インスリン派生物は、修飾されていないヒトインスリンより少なくとも1週間、たとえば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、またはさらに12週間などのようなものよりも長い貯蔵寿命をもちうる。インスリン派生物は、非修飾ヒトインスリンより少なくとも1か月、たとえば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、またはさらに18か月などのようなものよりも長い貯蔵寿命をもちうる。インスリン派生物は、非修飾ヒトインスリンよりも1か月ないし36か月、たとえば、非修飾ヒトインスリンよりも1ないし30か月、1か月ないし24か月、1か月ないし18か月、1か月ないし18か月、1か月ないし12か月、1か月ないし9か月、または1か月ないし6か月などのようなもの長い貯蔵寿命をもちうる。インスリン派生物の貯蔵寿命は、未修飾ヒトインスリンの貯蔵寿命に匹敵しうる。

【００６８】

いくつかの実施態様では、インスリン派生物は、非修飾ヒトインスリンよりも、すなわち同様の条件下でより一層安定である。インスリン派生物は、非修飾ヒトインスリンよりも高い熱安定性を有することができる。インスリン派生物は、たとえば、円偏光二色性分光法によってモニターされるように、未修飾ヒトインスリンよりも高い融解温度をもちうる。たとえば、インスリン派生物の融解温度は、非修飾ヒトインスリンの融解温度より少なくとも1℃高く、たとえば、少なくとも2℃高い、少なくとも3℃高い、少なくとも4℃高い、少なくとも5℃高い、少なくとも6℃高い、少なくとも7℃高い、少なくとも8℃高い、少なくとも9℃高い、少なくとも10℃高い、少なくとも11℃高い、at少なくとも12℃高い、少なくとも13℃高い、少なくとも14℃高い、少なくとも15℃高い、少なくとも16℃高い、少なくとも17℃高い、少なくとも18℃高い、少なくとも19℃高い、または少なくとも20℃高いなどのようなものである。インスリン誘導体の融解温度は、未修飾ヒトインスリンよりも1℃ないし50℃高く、たとえば、5℃高いないし40℃高い、または1℃高いないし20℃高いなどでありうる。インスリンの融解温度は、非修飾ヒトインスリンの融解温度に匹敵しうる。

II．環状アミノ酸

【００６９】

環状アミノ酸は、αアミノ酸またはβアミノ酸であってもよい。好ましい実施態様では、環状アミノ酸はαアミノ酸である。好ましい実施態様では、環状アミノ酸は、アミノ酸のアミド窒素が含まれる複素環を含む。環状アミノ酸は、環状アミノ酸のアミド窒素、α炭素、およびβ原子が含まれる複素環を含んでもよい。環状アミノ酸はLアミノ酸またはDアミノ酸であってもよい。

【００７０】

環状アミノ酸には、3員環、4員環、5員環、または6員環が含まれうる。いくつかの好ましい実施態様では、環式アミノ酸には、5員環が含まれる。いくつかの好ましい実施態様では、環状アミノ酸には、環状アミノ酸のアミド窒素、α炭素、β原子、γ原子、およびδ原子から構成される5員環が含まれる。五員環のβ原子、γ原子およびδ原子は、炭素、窒素、酸素、イオウ、およびセレンからなる群より選びうる。好ましい実施態様では、五員環のδ原子は炭素原子である。好ましい実施態様では、五員環のβ原子およびγ原子の少なくとも一つは炭素原子である。いくつかの実施態様では、五員環のβ原子またはγ原子は、窒素、酸素、イオウ、およびセレンからなる群より選ばれる。

【００７１】

環状アミノ酸には、飽和複素環または不飽和複素環が含まれうる。

【００７２】

環状アミノ酸は、生理学的pHにおいて中性、正または負の電荷をもつことができる。

【００７３】

環状アミノ酸はハロゲン化されてもよい。たとえば、環式アミノ酸はフッ素化されてもよい。

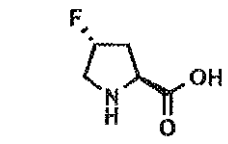
【００７４】

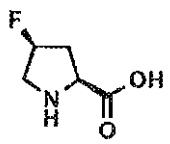
いくつかの実施態様では、環状アミノ酸は、フルオロプロリンアナログ（アナログは類似体とも称されることがある）、ヒドロキシプロリンアナログ、またはプロリンリング（プロリン環）アナログである。環状アミノ酸は、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、アジリジン-2-カルボン酸、アゼチジン-2-カルボン酸、ピペリジン-2-カルボン酸、3-カルボキシ-モルホリン、3-カルボキシ-チアモルホリン（thiamorpholin、チオモルホリン）、4-オキサプロリン、ピログルタミン酸、1,3-オキサゾリジン-4-カルボン酸、1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸、3-チアプロリン、4-チアプロリン、3-セレノプロリン、4-セレノプロリン、4-ケトプロリン、3,4-デヒドロプロリン、4-アミノプロリン、4-フルオロプロリン、4,4-ジフルオロプロリン、4-クロロプロリン、4,4-ジクロロプロリン、4-ブロモプロリン、4,4-ジブロモプロリン、4-メチルプロリン、4-エチルプロリン、4-シクロヘキシル-プロリン、3-フェニルプロリン、4-フェニルプロリン、3,4-フェニルプロリン、4-アジドプロリン、4-カルボキシ-プロリン、α-メチルプロリン、α-エチルプロリン、α-プロピルプロリン、α-アリルプロリン、α-ベンジルプロリン、α-(4-フルオロベンジル)-プロリン、α-(2-クロロベンジル)-プロリン、α-(3-クロロベンジル)-プロリン、α-(2-ブロモベンジル)-プロリン、α-(4-ブロモベンジル)-プロリン、α-(4-メチルベンジル)-プロリン、α-(ジフェニルメチル)-プロリン、α-(ナフチルメチル)-プロリン、D-プロリン、またはβ[3]-ホモプロリンから選ぶことができる。環状アミノ酸は、シス-3-ヒドロキシプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、シス-4-アミノプロリン、シス-4-フルオロプロリン、シス-4-クロロプロリン、シス-4-ブロモプロリン、シス-4-メチルプロリン、シス-4-エチルプロリン、シス-4-シクロヘキシルプロリン、シス-3-フェニルプロリン、シス-4-フェニルプロリン、シス-4-アジドプロリン、シス-4-カルボキシ-プロリンから選ばれうる。環状アミノ酸は、トランス-3-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシ-プロリン、トランス-4-アミノプロリン、トランス-4-フルオロプロリン、トランス-4-クロロプロリン、トランス-4-ブロモプロリン、トランス-4-メチルプロリン、トランス-4-エチルプロリン、トランス-4-シクロヘキシル-プロリン、トランス-3-フェニルプロリン、トランス-4-フェニルプロリン、トランス-4-アジドプロリン、トランス-4-カルボキシ-プロリンから選ばれうる。環状アミノ酸は、4-フルオロプロリン、4-アジドプロリン、3,4-デヒドロプロリン、4-ヒドロキシプロリン、4,4-ジフルオロプロリン、アゼチジン-2-カルボン酸、ピペリジン-2-カルボン酸、1,3-オキサゾリジン-4-カルボン酸、または1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸から選ばれうる。環状アミノ酸は、(2S,4S)-4-フルオロ-L-プロリン、(2S,4R)-4-フルオロ-L-プロリン、(2S)-3,4-デヒドロ-L-プロリン、(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S)-4,4-ジフルオロ-L-プロリン、(2S)-アゼチジン-2-カルボン酸、(2S)-ピペリジン-2-カルボン酸、または(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸であってよい。いくつかの実施態様では、環状アミノ酸は、シス-4-フルオロプロリン、トランス-フルオロプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、またはトランス-4-ヒドロキシプロリンである。

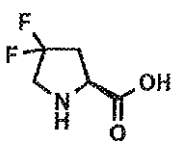
【００７５】

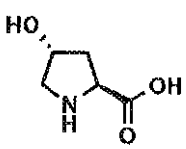
環状アミノ酸は、式I-XXVIIのアミノ酸のいずれか一つであってもよい：

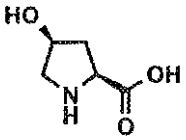
【化４】

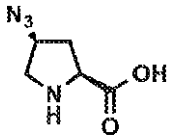

I

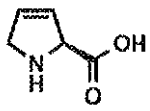

II

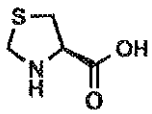

III

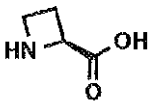

IV

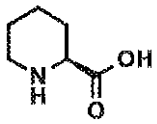

V

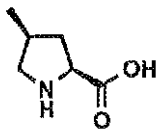

VI

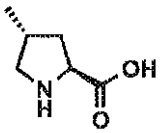

VII

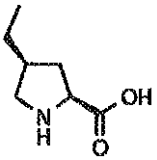

VIII

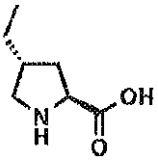

IX

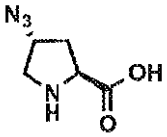

X

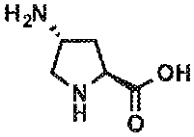

XI

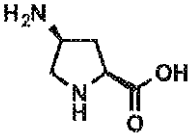

XII

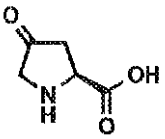

XIII

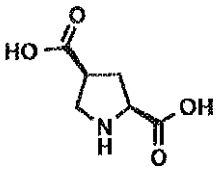

XIV

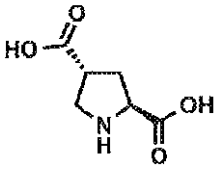

XV

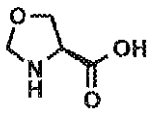

XVI

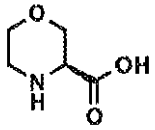

XVII

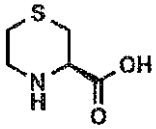

XVIII

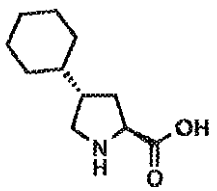

XIX

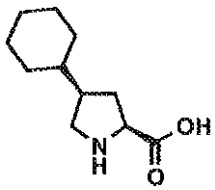

XX

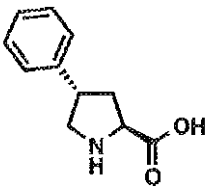

XXI

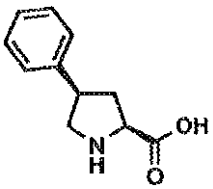

XXII


XXIII


XXIV


XXV


XXVI


XXVII

【００７６】

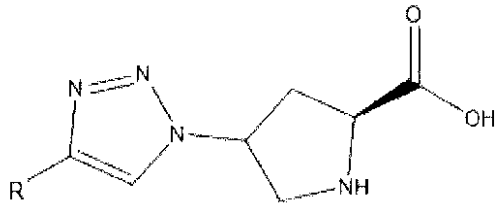
環状アミノ酸および環状アミノ酸を合成するための方法は、当該技術分野でよく知られ

ている〔たとえば、ROBERT（ロバート）M. WILLIAMS（ウィリアムズ）、SYNTHESIS OF OPTICALLY ACTIVE α-AMINO ACIDS（光学活性α-アミノ酸の合成）{Pergamon Press（ペルガモン・プレス社）2013}を参照〕。さらに、多くの環状アミノ酸を、たとえば、プロリンの代わりに組換えタンパク質に組み込むことができる〔たとえば、NEDILJKO BUDISA（ネデルジコ・バディサ）、ENGINEERING THE GENETIC CODE{エンジニアリング・ザ・ジェネチック・コード（遺伝子コードの設計）}125{Wiley-VCH（ワイリーVCH）2006}参照〕。

【００７７】

さらに、環式アミノ酸は、1,2,3-トリアゾール修飾プロリン、たとえば、置換4-(1H-1,2,3,-トリアゾール-1-イル)-プロリンなどのようなものであってもよい。環状アミノ酸は、式XXVIIIの構造をもちうる：

【化５】




XXVIII

式中、Rは、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、(ヘテロシクリル)アルキル、アラルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、シリル（例は、トリアルキルシリルまたはアリールジアルキルシリル）、またはヘテロアラルキルを表し、ここでアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、(ヘテロシクリル)アルキル、アラルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、シリルおよびヘテロアラルキル基は、随意に置換される。いくつかの実施態様では、環状アミノ酸は、式XXVIIIの構造をもち、そこでは、Rはアルキルで、カルボキシラート基によって置換され、たとえば、アルキルの末端位置で、たとえば、$C_{12}$-$C_{18}$アルキルで、カルボキシラート〔たとえば、$(CH_2)_{15}COOH$などのようなもの〕で置換されるなどのようなものである。1,2,3-トリアゾール修飾プロリンは、アジドアルキンのヒュスゲン環化付加反応を使用して合成してよく、そこでは、アジドプロリンのアジド（例は、シス-4-アジドプロリンまたはトランス-4-アジドロリン）およびアルキンが、1,3-双極子環化付加反応を受ける（たとえば、米国特許第8,575,095号参照し、ここに参照により組み込まれる）。アルキンの性質は特に制限されず、そしてアルキンは芳香族、アルキル、またはアシル基、たとえば、ヘキサデカン二酸などのようなものにコンジュゲートされてもよい。いくつかの実施態様において、1,2,3-トリアゾール修飾プロリンは、ポリエチレングリコール部分を含みうる。環状アミノ酸は、置換シス-4-(1H-1,2,3,-トリアゾール-1-イル)-プロリン〔たとえば、シス-4-(4-R-1H-1,2,3,-トリアゾール-1-イル)-プロリンであり、ここでは、Rは、置換または非置換アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、(ヘテロシクリル)アルキル、アラルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、シリル、またはヘテロアラルキルを表し〕、または置換トランス-4-(1H-1,2,3,-トリアゾール-1-イル)-プロリン〔たとえば、トランス-4-(4-R-1H-1,2,3,-トリアゾール-1-イル)-プロリンであり、ここでは、Rは、置換または非置換アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、(ヘテロシクリル)アルキル、アラルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、シリル、またはヘテロアラルキルを表す

〕であってよい。

III．インスリン派生物が含まれるペプチドおよびタンパク質

【００７８】

いくつかの見地では、本発明は、ここで説明するようなインスリン誘導体が含まれるタンパク質、またはインスリンB鎖の部分配列を含むペプチドまたはタンパク質に関する。たとえば、タンパク質は、プロインスリン誘導体または融合タンパク質などのようなインスリン誘導体の前駆体であってもよい。

【００７９】

いくつかの実施態様では、本発明は、配列番号3（SGERGFFYTX$_1$X$_2$T）、配列番号4（GERGFFYTX$_1$X$_2$T）、配列番号5（ERGFFYTX$_1$X$_2$T）、配列番号6（RGFFYTX$_1$X$_2$T）、配列番号7（GFFYTX$_1$X$_2$T）、配列番号8（FFYTX$_1$X$_2$T）、配列番号9（FYTX$_1$X$_2$T）、配列番号10（YTX$_1$X$_2$T）、配列番号11（TX$_1$X$_2$T）、または配列番号12（X$_1$X$_2$T）で表される配列を含むペプチドまたはタンパク質に関し、ここでは、X$_1$およびX$_2$の少なくとも一方はL-プロリン以外の環式アミノ酸である。いくつかの実施態様において、位置X$_1$のアミノ酸は、プロリン、リシン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、および位置X$_2$のアミノ酸は環状アミノ酸である。たとえば、X$_1$はプロリンまたはリシンでありえ、およびX$_2$は環状アミノ酸でありうる。いくつかの実施態様では、位置X$_2$のアミノ酸は、プロリン、リシン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、および位置X$_1$のアミノ酸は環状アミノ酸である。たとえば、X$_2$はプロリンまたはリシンでありえ、およびX$_1$は環状アミノ酸であってよい。

【００８０】

いくつかの実施態様では、本発明は、配列番号13（SGERGFFYTX$_1$X$_2$）、配列番号14（GERGFFYTX$_1$X$_2$）、配列番号15（ERGFFYTX$_1$X$_2$）、配列番号16（RGFFYTX$_1$X$_2$）、配列番号17（GFFYTX$_1$X$_2$）、配列番号18（FFYTX$_1$X$_2$）、配列番号19（FYTX$_1$X$_2$）、配列番号20（YTX$_1$X$_2$）、または配列番号21（TX$_1$X$_2$）で表される配列を含むペプチドまたはタンパク質に関し、そこでは、X$_1$およびX$_2$の少なくとも一方はL-プロリン以外の環状アミノ酸である。いくつかの実施態様において、位置X$_1$のアミノ酸はプロリン、リシン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、および位置X$_2$のアミノ酸は環状アミノ酸である。たとえば、X$_1$はプロリンまたはリシンでありえ、およびX$_2$は環状アミノ酸であることができる。いくつかの実施態様では、位置X$_2$のアミノ酸は、プロリン、リシン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸であり、および位置X$_1$のアミノ酸は環状アミノ酸である。たとえば、X$_2$はプロリンまたはリシンでありえ、そしてX$_1$は環状アミノ酸であることができる。いくつかの実施態様では、X$_1$は環状アミノ酸であり、およびX$_2$は欠失される。

【００８１】

いくつかの実施態様において、本発明は、配列番号2で表される配列を含むペプチドまたはタンパク質に関する。ペプチドまたはタンパク質は配列番号1をさらに含みうる。ペプチドまたはタンパク質が配列番号1を含む実施態様では、配列番号1を含むペプチドまたはタンパク質の部分は、配列番号2を含むペプチドまたはタンパク質の部分に、ペプチド結合によって（例は、プロインスリンでのように）、またはジスルフィド結合によって（例は、インスリンでのように）連結されることができる。

【００８２】

いくつかの実施態様では、ペプチドまたはタンパク質はシグナルペプチドをさらに含む。シグナルペプチドは、たとえば、配列番号22（MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA）で表される配列であってもよい。ペプチドおよびタンパク質は、ヒトインスリンプリフォーム配列を含みえ、たとえば、ここで説明するように置換（配列番号23；MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTX1X2TRR EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN）が含まれる。

【００８３】

ペプチドまたはタンパク質は、少なくとも一つの親和性タグで、例は、精製用の、たとえば、AviTag（アビタグ）、カルモジュリンタグ、ポリグルタマートタグ、E-タグ、FLAG（フラグ）-タグ、HA-タグ、His-タグ、Myc-タグ、S-タグ、SBP-タグ、Softag（ソフタグ

）1、Softag 3、Strep（ストレプ）タグ、TCタグ、V5タグ、VSV-タグ、Xpress（エックスプレス）タグ、Isopeptag（アイソペプタグ）、および/またはSpyTag（スパイタグ）などのようなものを含むことができる。いくつかの実施態様では、ペプチドはHis-タグを含む。

【００８４】

いくつかの実施態様では、ペプチドまたはタンパク質は、プロテアーゼ開裂部位を、例は、アフィニティータグ、シャペロン、および/またはシグナルペプチドを除去するため、たとえば、エンテロペプチダーゼ、ファクターXa、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、TEVプロテアーゼ、またはトロンビンによる開裂のためのプロテアーゼ開裂部位などのようなものを含む。いくつかの実施態様では、ペプチドまたはタンパク質は、例は、トリプシンによる開裂のために、アルギニンおよび/またはリシンを含む。いくつかの実施態様では、ペプチドまたはタンパク質は、メチオニンを、たとえば、臭化シアンでの加水分解によって親和性タグまたはシャペロンを除去するために含む。

IV. インスリン派生物の製造方法

【００８５】

ヒト膵臓では、インシュリンは一本鎖プレプロインシュリン前駆体として合成され、リーダー配列とそれに続く接続（connecting）C-ペプチド（35残基）によって連結されたA鎖（21残基）およびB鎖（30残基）とから構成される。A鎖およびB鎖は二つの鎖間ジスルフィド架橋（A7-B7およびA20-B19）によって連結される。また、A鎖内ジスルフィド架橋もA6およびA11にてシステイン残基間に存在する。その後のトリプシン様酵素によるプロインスリンのタンパク質分解は、C-ペプチドを除去して、成熟した活性インスリンを産生する。組換えインスリン発現における主要なボトルネック（障害と言うことがある）は、プロインシュリンのローバスト（強力）な翻訳後プロセシングを達成することに中心を置いており、プロテイン分解、タンパク質の正確な折りたたみ、および鎖間ジスルフィド架橋の形成が含まれる。これらのステップは、精製され成熟したインスリンの最適な活性を確実にするために注意深く制御しなければならない。

【００８６】

エシェリキア・コリ（大腸菌、E. coli）におけるインスリンの発現のための強力な産生プロセスは、当該技術分野で知られる〔たとえば、Jonasson（ヨナッソン）、Eur. J. Biochem.（ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー）236：656-661（1996）；Cowley（カウリー）、FEBS Lett.（FEBSレターズ）402：124-130（1997）Cho（チョー）、Biotechnol. Bioprocess Eng.（バイオテクノロジー・アンド・バイオプロセス・エンジニアリング）6：144-149（2001）；Tikhonov（チーホノフ）、Protein Exp. Pur.（プロテイン・イクスプレッション・アンド・ピューリフィケーション）21：176-182（2001）；Malik（マーリク）、Protein Exp. Pur. 55：100-111（2007）；Min（ミン）、J. Biotech.（ジャーナル・オブ・バイオテクノロジー）151：350-356（2011）参照〕。最も一般的なプロセスにおいて、タンパク質は、融合タンパク質または親和性タグを有する一本鎖プロインスリン構築物として発現される。このアプローチは、良好な全体収量をもたらし、および中間処理ステップの数を減少させることによって実験的複雑性を低減すると同時に、一方でまた、リフォールディングが天然様インスリンを生じることを確実にする〔たとえば、Jonasson、Eur. J. Biochem. 236：656-661（1996）；Cho、Biotechnol. Bioprocess Eng.6：144-149（2001）；Tikhonov、Protein Exp. Pur.、21：176-182（2001）；Min、J. Biotech.、151：350-356（2011）参照〕。E. coliで発現されるとき、プロインスリンは通常、封入体中に見出される。適切な株および発現ベクターを選定することにより、この戦略は高発現および最小タンパク質分解を可能にする。インスリンはまた、ペリプラズム経路および分泌経路を介して発現されうる。好都合なことに、E. coli宿主はまた、非標準アミノ酸、たとえば、環状アミノ酸などのようなものをタンパク質中に組み込むためによく適する。

A. 組換えペプチドおよびタンパク質の発現に関連する方法

【００８７】

いくつかの態様において、本発明は、ここに記載のペプチド、タンパク質、および/またはインスリン派生物のいずれか一つを細胞において発現させる方法に関する。本方法は、環状アミノ酸、たとえば、環状アミノ酸がL-プロリンでないものを含む、培地において細胞をインキュベートすることを含むことができる。とは言っても、培地はプロリンを含んでいてもよく、それはプロリンが細胞培養物から完全に除去することができないことが多いからであり、および環状アミノ酸は細胞のプロリン要求を完全に補うことができないからである。

【００８８】

いくつかの実施態様では、細胞は、細菌、酵母、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である。適切な発現細胞には、エシェリキア・コリ（大腸菌）、バチルス・サブティリス（枯草菌）、シュードモナス・フルオレッセンス、リーシュマニア・タレンテラエ（Leishmania tarentolae）、サッカロミセス・セレビシエ、ピキア・パストリス（Pichia Pastoris）、ニコチアナ（Nicotiana）、ドロソフィラ・メラノガスター（キイロショウジョウバエ）、スポドプテラ・フルギペルダ（ヨトウガ）、トリコプルシア・ニ（Trichoplusia ni、イラクサギンウワバ）、ガルス・ガルス（Gallus gallus、ニワトリ、セキショクヤケイ）、ムス・ムスクルス（Mus musculus、ハツカネズミ）、スース・スクロファ（Sus scrofa、イノシシ）、オウィス・アリエース（Ovis aries、ヒツジ）、カプラ・アエガグルス（Capra aegagrus、キャプラ）、ボス・タウルス（Bos taurus、ウシ）、Sf9細胞、Sf21細胞、シュナイダー2細胞、シュナイダー3細胞、ハイファイブ細胞、NS0細胞、チャイニーズハムスター卵巣（「CHO」）細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、COS細胞、Vero（ベロー）細胞、HeLa（ヒーラ）細胞、およびHEK293細胞が含まれる。いくつかの好ましい実施態様では、細胞は、エシェリキア・コリ、サッカロミセス・セレビシエ、またはCHO細胞である。細胞はエシェリキア・コリであることができる。

B. 環状アミノ酸を含むペプチドの合成に関連する方法

【００８９】

いくつかの見地において、本発明は、ここで記載するペプチド、タンパク質、および/またはインスリン誘導体のいずれか一つを合成する方法に関する。本方法は、配列番号（以下、「SEQ ID NO:」と称する）3（SGERGFFYTX$_1$X$_2$T）；SEQ ID NO：4（GERGFFYTX$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：5（ERGFFYTX$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：6（RGFFYTX$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：7（GFFYTX$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：8（FFYTX$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：9（FYTX$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：10（YTX$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：11（TX$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：12（X$_1$X$_2$T）、SEQ ID NO：13（SGERGFFYTX$_1$X$_2$）、SEQ ID NO：14（GERGFFYTX$_1$X$_2$）、SEQ ID NO：15（ERGFFYTX$_1$X$_2$）、SEQ ID NO：16（RGFFYTX$_1$X$_2$）、SEQ ID NO：17（GFFYTX$_1$X$_2$）、SEQ ID NO：18（FFYTX$_1$X$_2$）、SEQ ID NO：19（FYTX$_1$X$_2$）、SEQ ID NO：20（YTX$_1$X$_2$）、またはSEQ ID NO：21（TX$_1$X$_2$）が含まれるペプチドまたはタンパク質を合成することを含み、式中、X$_1$およびX$_2$は、ここで上記に記載されるように選ばれる。次いで、ペプチドまたはタンパク質は、インスリンB鎖の残りの部分にコンジュゲートすることができる。たとえば、本方法は、SEQ ID NO：3（SGERGFFYTX$_1$X$_2$T）またはSEQ ID NO：13（SGERGFFYTX$_1$X$_2$）で表されるペプチドを合成することを含んでいてもよく、および本方法はさらに、インスリンB鎖N-末端（たとえば、SEQ ID NO: 24；FVNQHLCGSHLVEALYLV）が含まれる分子に、たとえば、自然な化学的連結によってペプチドを連結することを含んでいてもよい。

【００９０】

いくつかの実施態様では、本方法は、インスリンB鎖、たとえば、SEQ ID NO:2またはSEQ ID NO:32を合成することを含む。本方法は、インスリンA鎖、たとえば、SEQ ID NO:1を合成することを含みうる。このようにして、本方法はインスリン派生物を合成することを含むことができる。

C. 精製

【００９１】

本方法はさらに、ペプチドまたはタンパク質を、たとえば、遠心分離、濾過、アフィニティータグ、および/またはクロマトグラフィーで、たとえば、イオン交換クロマトグラ

フィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、またはHPLCなどのようなものによって精製および/または分離することを含みうる。

V．インスリンアナログを含む薬学的調剤物

【００９２】

いくつかの見地では、本発明は、ここに記載するようなインスリンアナログが含まれる組成物に関する。本組成物は注入用に調剤されてよく、たとえば、本組成物は液状でありうる。本組成物は、対象、たとえば、ヒト対象などのようなものへの注入のために調剤されうる。本組成物は滅菌されてよい。本組成物は、製薬上組成物、たとえば、滅菌の注入可能な製薬上の組成物などのようなものであってもよい。本組成物は、皮下注入のために調剤されうる。いくつかの実施態様において、本組成物は、経皮、皮内、経粘膜、経鼻、吸入、筋肉内または経腸投与用に調剤される。本組成物は経口剤形または肺剤形（pulmonary dosage form）において調剤することができる。

【００９３】

本組成物は、薬学的に許容可能な担体において、ここで説明するように、インスリンアナログを含むことができる。ここで使用されるように、「薬学的に許容可能な担体」には、任意の、およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、ならびにその他同種類のものなどが含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、本技術分野においてよく知られている。任意の慣習的な媒体または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、治療上の組成物におけるそれらの使用が意図される。補助的な活性化合物もまた、本組成物に組み込むことができる。

【００９４】

薬学的に許容可能な希釈剤には、塩類溶液および水性緩衝剤溶液が含まれる。注入のために適する薬学的組成物には、滅菌水性溶液（水溶性の場合）または滅菌注入可能な溶液または分散物の即時調製のための分散物および滅菌粉体が含まれる。等張剤、たとえば、糖、ポリアルコールで、たとえば、マンニトールおよびソルビトールなどのようなもの、および/または塩化ナトリウムを、薬学的組成物において含めることができる。すべての場合において、本組成物は滅菌されなければならず、および流体とすべきである。それは、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、および微生物、たとえば、細菌および真菌などのようなものによる汚染を防ぐ保存剤を含まなければならない。また、分散物は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物において、および油において調製することもできる。貯蔵および使用の通常の条件下、これらの調製物は、微生物の増殖を防ぐために保存剤を含有しうる。

【００９５】

担体は、溶媒またはたとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール、およびその他同種類のものなど）、およびそれらの適切な混合物を含有する分散媒であってもよい。適切な流動性は、たとえば、コーティング、たとえば、レシチンなどのようなものの使用によって、分散物の場合には必要とされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持させることができる。

【００９６】

薬学的組成物において、微生物の作用の防止は、種々の抗菌物質および抗真菌剤によって達成することができ、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、クロロクレゾール、レゾルシノール、メチルp-ヒドロキシベンゾアート（p-ヒドロキシ安息香酸メチル）、プロピルp-ヒドロキシベンゾアート（p-ヒドロキシ安息香酸プロピル）、2-フェノキシエタノール、ブチルp-ヒドロキシベンゾアート（p-ヒドロキシ安息香酸ブチル）、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノール、およびチオメロサール（thiomerosal）、ブロモポール、安息香酸、イミドウレア（imidurea）、クロロヘキシジン、ナトリウムデヒドロアセタート（デヒドロ酢酸ナトリウム）、エチルp-ヒドロキシベンゾアート（p-ヒドロキシ安息香酸エチ

ル）、ベンゼトニウムクロライド（塩化ベンゼトニウム）、クロルフェネシン（chlorphenesine）（3p-クロルフェノキシプロパン-1,2-ジオール）、アスコルビン酸、チメロサール、およびその他同種類のものなどである。いくつかの好ましい実施態様では、組成物はフェノールおよび/またはm-クレゾールを含む。

【００９７】

いくつかの好ましい実施態様では、薬学的組成物は、亜鉛、すなわち$Zn^{2+}$を含む（例は、米国特許第9,034,818号;米国特許出願公開第2015/0126442号を参照し、ここで参照することにより組み込まれる）。たとえば、薬学的組成物は、亜鉛を、インスリン誘導体に対して、約1：6、約1：5、約1：4、約1：3、約1：2、約2：3、約5：6、約1：1、約7：6、約4：3、約9：6、約5：3、約11：6、または約2：1（モル：モル）の比で含むことができる。

【００９８】

施与の容易さ、および投薬量の均一性のために、組成物は、投薬ユニット形態（単位剤形）において調剤することができる。投薬ユニット形態は、哺乳動物対象のためのユニタリー投薬量（unitary dosages）として適する物理的に別個のユニットを指し；各ユニットは、求められる薬学的担体と関連して、望ましい治療上の効果を生じるように計算された予め定められる量の活性物質（例は、インスリンアナログ）を含有する。本発明の投薬ユニット形態のための仕様は、（a）活性物質の独特な特性および達成すべき特定の治療効果、および（b）そのような活性化合物を個々の対象の処置、および感受性のために配合する技術における固有の制限により指示され、および直接依存する。

【００９９】

肺点滴注入（lung instillation）のために、エアロゾル化溶液が使用される。噴霧可能なエアロゾル調剤物において、活性タンパク質は、固体または液体の不活性担体物質と組み合わせてもよい。本組成物はまた、スクイズボトルにおいて、または圧縮された揮発性の通常気体の推進剤との混合物において包装されうる。エアロゾル調製物は、本発明のインスリンアナログに加えて、溶媒、緩衝剤、界面活性剤、および酸化防止剤を含有することができる。

【０１００】

薬学的組成物は第二のインスリン派生物をさらに含みえ、そこでは第二のインスリン派生物は環状アミノ酸を含まない。たとえば、第二のインスリン派生物は環状アミノ酸の代わりにL-プロリンを含んでもよい。第二のインスリン派生物は、環状アミノ酸のL-プロリンによる置換を除いて、インスリン派生物と同じアミノ酸配列を含むことができる。したがって、第二のインスリン派生物は、野生型インスリン、すなわち、インスリンB鎖B28位にL-プロリンを含み、およびインスリンB鎖B29位にリシンを含むことができる。本組成物は、たとえば、約9：1（モル：モル）以上の比で、インスリン派生物および第二のインスリン派生物を含むことができる。

VI．疾患または状態を処置する方法

a．インスリン派生物を施与することを含む方法

【０１０１】

いくつかの態様では、本発明は、ここに記載のインスリン派生物を含む組成物を対象に施与することを含む、対象における疾患または状態を処置するための方法に関する。いくつかの態様において、本発明は、ここに記載の薬学的組成物を対象に施与することを含む、対象における疾患または状態を処置する方法に関する。疾患または状態は、高血糖、2型糖尿病、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満、メタボリックシンドロームX、または脂質代謝異常であることができる。

【０１０２】

本組成物の施与は、ペプチド、タンパク質、またはインスリン誘導体を送る任意の適切な手段を含むことができる。本組成物の施与は、好適には、非経口投与が含まれる。いくつかの好ましい実施態様では、本組成物は皮下注射によって施与される。いくつかの好ましい実施態様において、本組成物は吸入により施与される。インスリン派生物の施与は、

経皮、皮内、経粘膜、経鼻、筋肉内、または経腸施与が含まれうる。

b．対象

【０１０３】

対象は、インスリンを自然に産生する有機体の任意の種でありうる。いくつかの実施態様において、対象は、ネズミ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、および霊長類から選ばれる。たとえば、対象は、フェリス・カトウス（Felis catus、イエネコ）、：カニス・ルプス・ファミリアリス（Canis lupus familiaris、アキタイヌ）、およびホモ・サピエンス（Homo sapiens、ヒト）から選ばれうる。対象は糖尿病を患っていても、またはそうでなくてもよい。いくつかの実施態様では、対象は1型真性糖尿病を有する。対象は2型糖尿病でありうる。対象は妊娠糖尿病を有することがある。対象は高血糖を有しうる。対象は5.6 mmol（ミリモル）/Lより高い血糖値、たとえば、7mmol/Lより高い、または11.1mmol/Lより高いなどのような血糖値を有しうる。対象は、高血糖、2型糖尿病、耐糖能障害、1型糖尿病、肥満、メタボリックシンドロームX、または脂質代謝異常を有しうる。

例示

【実施例】

【０１０４】

本説明は、以下の例によってさらに説明されるが、これらは決して制限されるものと解釈されるべきではない。すべての引用参考文献の内容は（文献参照、発行された特許、および公開された特許出願を含め）、これによって参照により明示的に組み込まれる。ここにおいて参照により組み込まれる文書における用語の定義が、ここで使用される用語と矛盾する場合、ここで使用される定義が適用される。

例1－発現構築物の設計

【０１０５】

発現構築物を設計し、それは短いリーダー配列、ヘキサヒスチジンタグ（His-Tag）、および塩基性アミノ酸、アルギニンをリーダー配列とB鎖との間のリンカーとして、含む（図2）。この構築物は、C-ペプチドおよびリーダー配列の一段階タンパク質分解開裂を可能にする。C-ペプチドは、N末端にArg-Arg二塩基リンカーを、およびタンパク質分解開裂のためにC末端にArg残基を含む。このC-ペプチドは、Jonasson（ヨナッソン）らによって記載されるように64位のLysの置換によって自然なヒトC-ペプチド配列とは異なる〔Eur. J. Biochem.、236：656-661（1996）〕。

例2－環状アミノ酸を含むインスリン誘導体の発現

【０１０６】

プロリンアナログの小さなライブラリーを、ヒトインスリンのB鎖の28位および29位にてインスリンに導入する。具体的には、4-フルオロプロリン、4-アジドプロリン、3,4-デヒドロプロリン、4-ヒドロキシプロリン、4,4-ジフルオロプロリン、アゼチジン-2-カルボン酸、ピペリジン-2-カルボン酸、1,3-オキサゾリジン-4-カルボン酸、および1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸がそれぞれ無関係に導入される。フッ素化アナログは、プロリン残基のシス-トランス異性化傾向を変化させ、および他のアミノ酸のフッ素化アナログは、タンパク質の折りたたみ、安定性、溶解性および凝集特性を変えるために使用される〔Link（リンク）、Curr. Opin. Biotechnol.（カレント・オピニオン・イン・バイオテクノロジー）14：603-609（2003）；Johnson（ジョンスン）、Curr. Opin. Chem Biol.（カレント・オピニオン・イン・ケミカル・バイオロジー）14：774-780（2010）〕。これらのアナログの多くは、E. coli細胞において良好な翻訳活性を示す〔Kim（キム）、ChemBioChem（ケムバイオケム）5：928-936（2004）〕。成熟ヒトインスリンは一つのプロリン残基だけを含み（位置B28）、そして従って、異なる環状アミノ酸によるL-プロリンの置換はインスリン誘導体の発現に著しく影響を及ぼすとは考えにくい。

【０１０７】

インスリンアナログは、発現され、折り畳まれ、および十分に確立され、および最適化されたプロトコルに従って精製される〔たとえば、Jonasson、Eur. J. Biochem.、236：6

56-661（1996）；Cho、Biotechnol. Bioprocess Eng.、6：144-149（2001）；Tikhonov、Protein Exp. Pur.、21：176-182（2001）；Min、J. Biotech.、151：350-356（2011）〕。簡潔に述べると、細胞をバッチ発現後に溶解し、および遠心分離に供して封入体を分離する。封入体を含むペレットをトリス緩衝剤において十分に洗浄する。プロインスリン変形物（バリアント）は、可溶化され、および酸化的亜硫酸分解によってそれらのヘキサスルホナート誘導体に変換される。このステップの後、タンパク質をリフォールディング緩衝剤中に希釈してジスルフィド結合形成を誘導する。リフォールディング後、プロインシュリン誘導体は金属アフィニティークロマトグラフィーを介して精製される（ate purified）。精製した融合タンパク質を収集し、凍結乾燥させ、およびサイズ排除クロマトグラフィーによりさらに精製する。ワンステップトリプシンおよびカルボキシペプチダーゼB開裂は、成熟インスリンを産生する。代わりのアプローチとして、Alpプロテアーゼを使用するワンステップ開裂を使用することができる。成熟インスリンおよびそのアナログの純粋なサンプルを取得するために、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）によって開裂産物の最終精製を達成する。全体の発現、精製、およびリフォールディング戦略を図3に示す。

例3－シス-4-フルオロプロリン、トランス-4-フルオロプロリン、および4-ヒドロキシプロリンが含まれるプロインスリン誘導体の発現

【０１０８】

プロインスリン誘導体は、例2に記載されているように、シス-4-フルオロプロリン、トランス-4-フルオロプロリン、または4-ヒドロキシプロリンのいずれかが含まれる培地においてE.coliにて発現された。強力なプロインスリンバンドが、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検出されるように、封入体において観察された（図4）。プロインシュリンバンドの同一性はウエスタンブロッティングによって確認した（図4）。

例4－4-ヒドロキシプロリンが含まれるプロインスリンの発現およびフォールディング

【０１０９】

プロインスリン誘導体は、例2に記載されているように、4-ヒドロキシプロリンが含まれる培地においてE. coliにて発現された。ジスルフィド結合の適切な形成を確実にするために、亜硫酸分解プロトコルに従ってプロインスリンをリフォールディングした。精製され、リフォールディングされたプロインスリンは、リフォールディング法の他のステップからのプロインスリン画分に沿って、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析された（図5）。

例5－環状アミノ酸のプロインスリンへの組込みについての収量

【０１１０】

インスリン誘導体をプロリン栄養要求性E. coliにおいて発現させ、およびL-プロリン、(2S,4S)-4-フルオロ-L-プロリン、(2S,4S)-4-フルオロ-L-プロリン、(2S,4R)-4-フルオロ-L-プロリン、(2S)-3,4-デヒドロ-L-プロリン、(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4S)-4-アジド-L-プロリン、(2S)-4,4-ジフルオロ-L-プロリン、(2S)-アゼチジン-2-カルボン酸、(2S)-ピペリジン-2-カルボン酸、および(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸の一つを補充した培地において例1に概説した戦略を用いて処理した。インスリン遺伝子は、環状アミノ酸をインスリンB鎖B28位（配列番号26）に組み込むために、野生型配列を含んだ。タンパク質濃度はビシンコニン酸（「BCA」）アッセイを用いて測定した（表1）。

【０１１１】

【表１】

プロインスリンへの環状アミノ酸の収量および組込み

| # | 名称 | 収量[1,2] | 組込み[3] |
|---|---|---|---|
| 1 | L-プロリン | 40 mg/L[4] | -- |
| 2 | (2S,4S)-4-フルオロ-L-プロリン | 35 mg/L | 93% (+18Da) |
| 3 | (2S,4R)-4-フルオロ-L-プロリン | 22 mg/L | 86% (+18Da) |
| 4 | (2S)-3,4-デヒドロ-L-プロリン | 19 mg/L | 100% (-2Da) |
| 5 | (2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン | 18 mg/L | 89% (+16Da) |
| 6 | (2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン | 32 mg/L[5] | 86% (+16Da) |
| 7 | (2S)-4,4-ジフルオロ-L-プロリン | 12 mg/L | 91% (+36Da) |
| 8 | (2S)-アゼチジン-2-カルボン酸 | 14 mg/L | 100% (-14Da) |
| 9 | (2S)-ピペリジン-2-カルボン酸 | 11 mg/L | 86% (+14Da) |
| 10 | (4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸 | 28 mg/L[5] | 89%(+18Da) |

[1]BCAアッセイ、精製およびリフォールディング後の可溶性プロインスリンを用いて評価した
[2]特に断りのない限り、収量は100mL培養から算出する
[3]MALDI-MSを用いて定量した
[4]6L培地容量から、リッチメディアおよび原栄養E. coliを用いる
[5]1L培地容量から、最少培地およびプロリン栄養要求性E. coliを用いる

【０１１２】

各環状アミノ酸の取り込み速度は、各インスリン誘導体のプロインスリン形態についてMALDI-MSによって決定した。簡潔には、各プロインスリン誘導体をアセトンにより沈殿させ、および尿素緩衝剤において再溶解させた。タンパク質を還元し、アルキル化し、および次いでGlu-Cにより消化した。ペプチドをC18ジップチップにより精製し、およびMALDI-MSによって分析した。Glu-C消化は、インスリンB鎖B28およびB29残基を含む野生型インスリンについて1557.8amuペプチド（配列番号25；RGFFYTPKTRRE）をもたらす。各環状アミノ酸の組込み速度は、野生型インスリンについて、1557.8amuでのイオンカウントに対して環状アミノ酸に対応する質量を有するペプチドについてのイオンカウントをモニターすることによって近似した（図6）。

例6－成熟インスリンのHPLC精製

【０１１３】

野生型プロインスリンおよびインスリンB鎖B28位において(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンが含まれるプロインスリンを、トリプシンおよびカルボキシペプチダーゼBにより37℃で1-2時間開裂させた。成熟インスリンを分取C18カラム〔Advanced Chromatography Technologies（アドバンスド・クロマトグラフィー・テクノロジー社）、Aberdeen（アバディーン）、Scotland（スコットランド）〕およびアセトニトリル勾配、55分かけて0%から39%までを用いた逆相HPLCによって精製した。インスリンB鎖B28位において(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンが含まれるインスリン誘導体は、野生型インスリンに対して同様の溶出プロファイルを示した（図7）。

【０１１４】

成熟野生型および(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンインスリンを、上記のようにMALDI-MSによって分析し、およびインスリンリスプロ、インスリンアスパルト、および実験室グレードのインスリンについてMALDI-MSスペクトルにより比較した〔Sigma-Aldrich（シグマー-アルドリッチ社）、St.Louis（セントルイス）、MO（ミズーリ州）〕（図8）。

例7－インスリン誘導体の三次構造

【０１１５】

(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、または(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸がインスリンB鎖B28位置にて含まれるインスリン誘導体の構造は、円偏光二色性（「CD」）分光法によって評価し、およびインスリン誘導体のスペクトルを、野生型インスリンおよびインスリンリスプロのスペクトルと比較した（図9）。各インスリン誘導体および野生型およびインスリンリスプロコントロールを、トリス緩衝剤、pH8において0.6mMにて溶解した。特に著しくは、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン誘導体は、CDスペクトルを示したが、これは野生型インスリンよりもインスリンリスプロにはるかに類似し、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンによる位置B28でのプロリンの置換が単量体状態を支持することが示唆される。さらに、(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸誘導体は、208nmで野生型インスリンよりもわずかに大きい負のバンドを示し、および各インスリン誘導体は222nmで負のバンドを示し、それは野生型インスリンよりも大きさにおいて小さかった。

【０１１６】

(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、または(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸がインスリンB鎖のB28位置にて含まれるインスリン誘導体の三次構造を、分析超遠心分離によってさらに評価した。各インスリン誘導体および野生型およびインスリンアスパルトコントロールを、トリス緩衝剤、pH8において0.6mMにて溶解した。注目すべきことに、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンインスリン誘導体のオリゴマー化は、モノマー状態へのシフトを指し示した（図10）。

例7－インスリン誘導体の熱安定性

【０１１７】

(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、または(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸がインスリンB鎖B28位置に含まれるインスリン誘導体の安定性は、円偏光二色性（「CD」）分光法によって評価し、およびインスリン誘導体の熱溶融（thermal melts）を、野生型インスリンおよびインスリンリスプロの熱融解（thermo melts）と比較した（図11）。(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンインスリン誘導体は、インスリンリスプロと類似する融解曲線を示した。(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリンおよび(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸インスリン誘導体は、野生型インスリンと類似する融解曲線を示した。

例8－インスリン誘導体の生物学的活性

【０１１８】

インスリン誘導体の生物学的活性は、(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、または(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸がインスリンB鎖のB28位置で含まれるインスリン誘導体について、Wharton（ウォートン）J.らによって記載されるように、インスリン受容体リン酸化アッセイを用いて確認した〔J. Biol. Chem. 280（14）：13483（2005）〕。簡潔には、HEK293細胞を、200nMの各インスリン誘導体および野生型インスリン、または20nMの野生型インスリンで処理し、全細胞溶解物をSDS-PAGEゲル上で泳動させ、および合計のイヌリン受容体およびリン酸化インスリン受容体をウエスタンブロット法によって検出した。図12は、各々の(2S,4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、(2S,4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリン、および(4R)-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸インスリン誘導体が、野生型インスリンと同様のレベルでインスリン受容体のリン酸化を促進する能力があったことを示す。さらに、各々のインスリン誘導体は、野生型インスリンのより一層低い濃度（0.1x；20nM）よりも多くのリン酸化を促進することができた。これらの結果は、インスリンB鎖B28位置でのL-プロリンの異なる環状アミノ酸による置換がインスリン活性に影響を与えないことを示唆する。

例9－1,2,3-トリアゾール修飾プロリンの生成

【０１１９】

プロインスリン誘導体を、例2に記載のように、L-プロリンまたは(2S,4S)-4-アジド-L-プロリンのいずれかを含む培地においてE. coliで発現させた。細胞を溶解し、およびTAMRA-アルキンを細胞溶解物に対してクリックした。修飾された細胞溶解物を、ポリアクリ

ルアミドゲル上で泳動させ、それをTAMRAについて視覚化した。TAMRAイメージングは、アジドプロリン溶解物についてのプロインシュリン構築物の分子量に対応する見かけの分子量を有する強いバンドを示し、およびTAMRAアルキンがアジドプロリンと特異的に反応することが示唆される（図13）。

等価物

【０１２０】

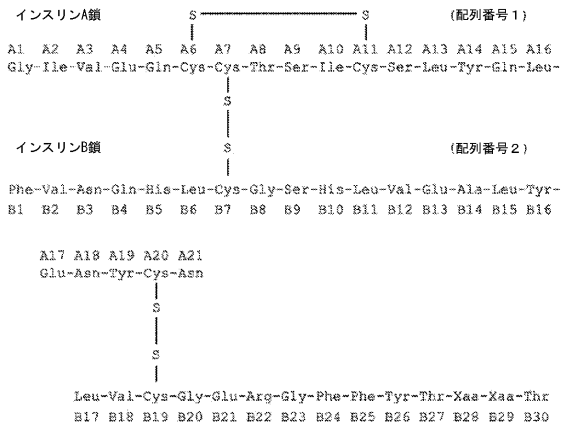
当業者は、ここに記載される本発明の特定の実施態様に対する多くの等価物を認識し、またはわずかに日常的な実験を用いて確認することができるであろう。そのような等価物は、添付の請求の範囲によって包含されることが意図される。

参照による組込み

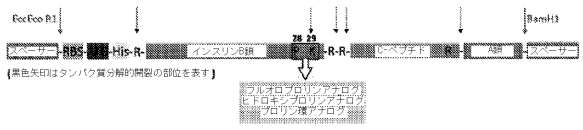
【０１２１】

ここに記載される各々の特許、公開特許出願、および他の参考文献は、その全体が参照によりここに組み込まれる。

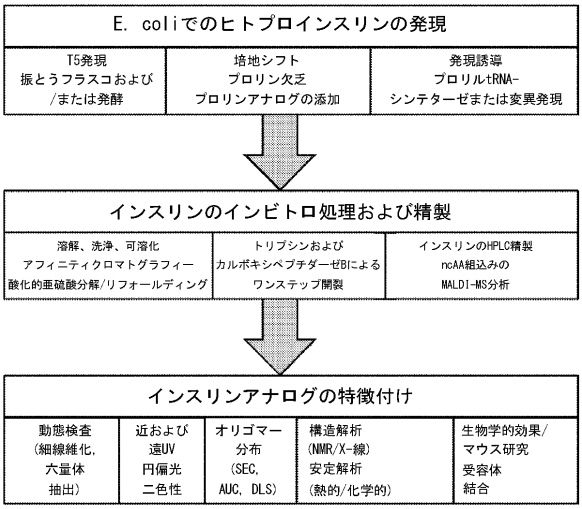
【図１】



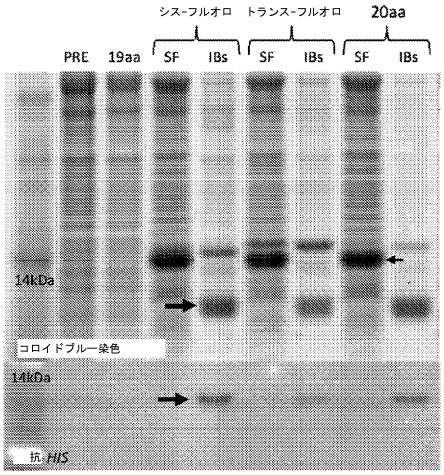

【図２】



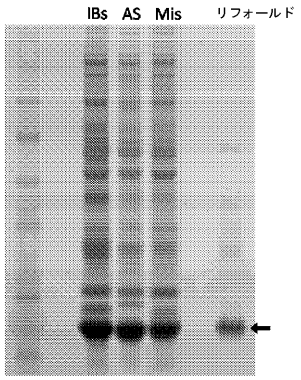

【図３】



【図４】

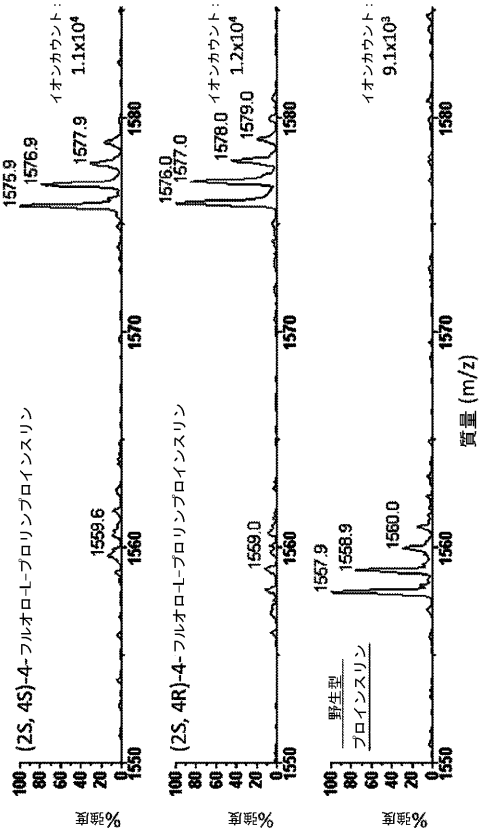



【図５】

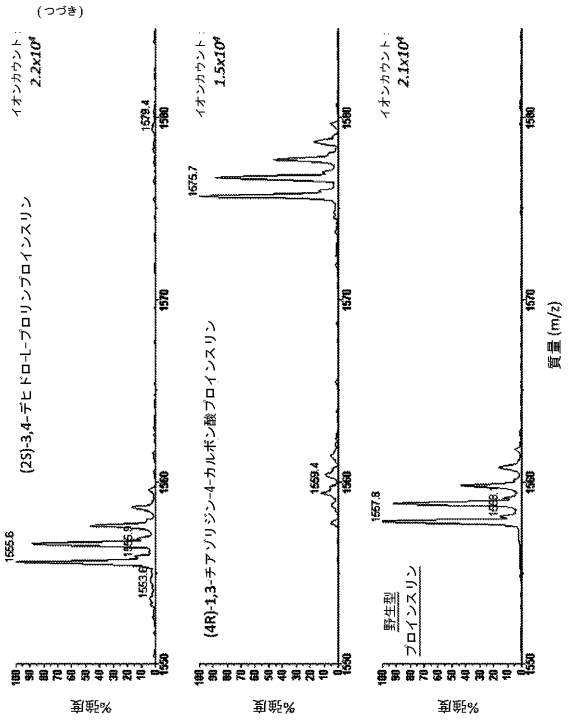



IBs: 封入体
AS: 亜硫酸分解後
Mis: ミスフォールドタンパク質

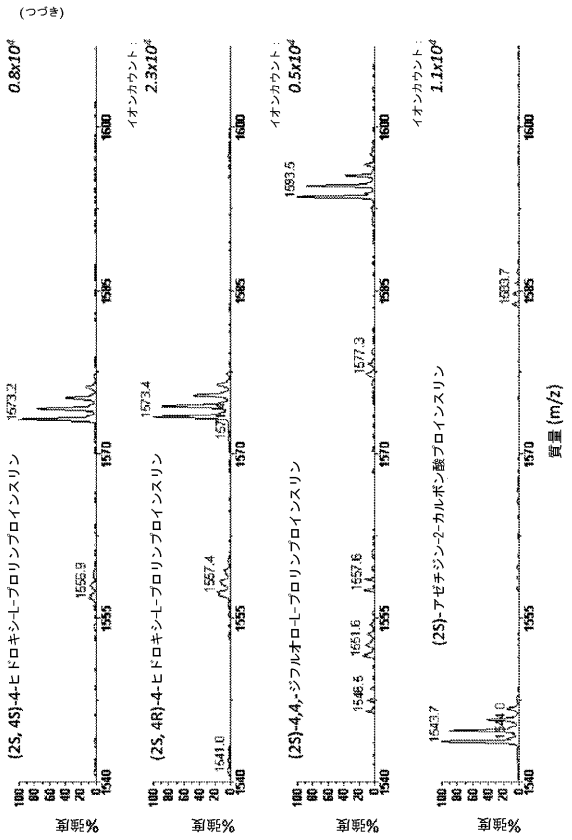
【図６－１】



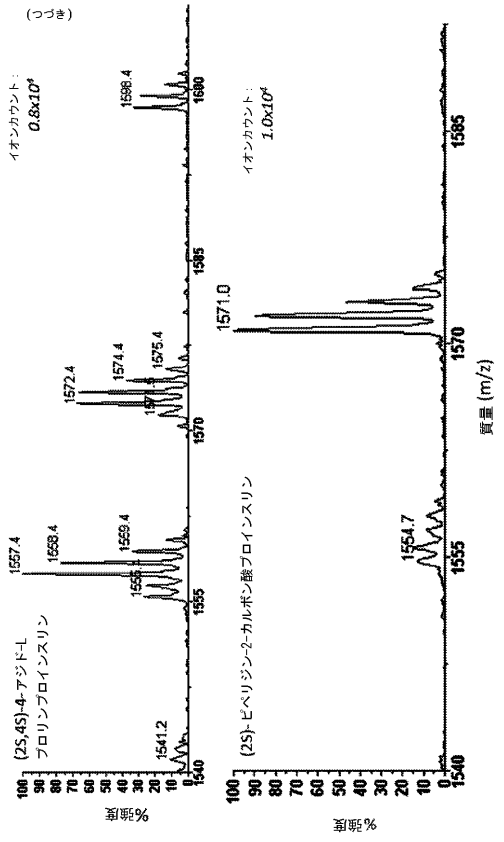

【図６－２】



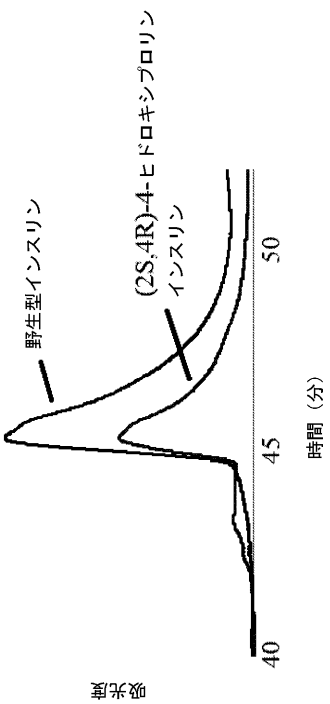
【図６－３】


(つづき)
(2S, 4S)-4-ヒドロキシ-L-プロリンプロインスリン
(2S, 4R)-4-ヒドロキシ-L-プロリンプロインスリン
(2S)-4,4-ジフルオロ-L-プロリンプロインスリン
(2S)-アゼチジン-2-カルボン酸プロインスリン
イオンカウント:
%強度
質量 (m/z)

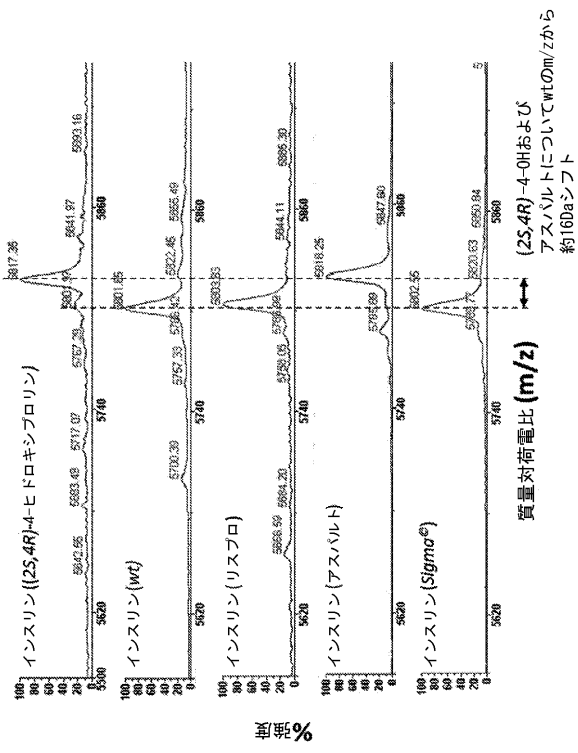
【図６－４】


(つづき)
(2S,4S)-4-アジド-L
プロリンプロインスリン
(2S)-ピペリジン-2-カルボン酸プロインスリン
イオンカウント:
%強度
質量 (m/z)

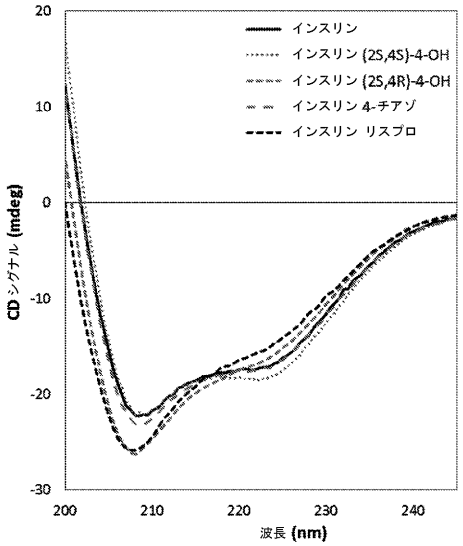
【図７】


野生型インスリン
(2S,4R)-4-ヒドロキシプロリン
インスリン
40
45
50
時間（分）
吸光度

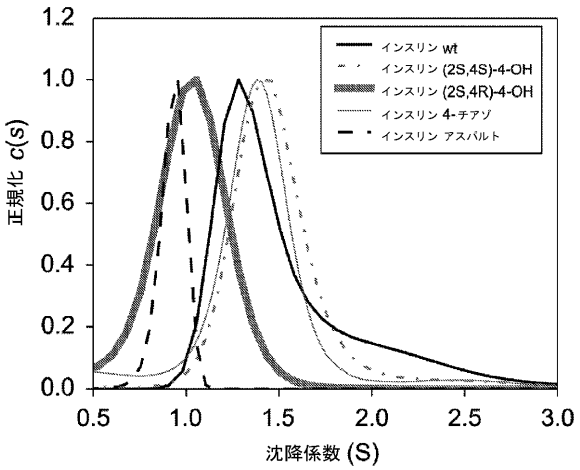
【図８】


インスリン((2S,4R)-4-ヒドロキシプロリン)
インスリン(wt)
インスリン(リスプロ)
インスリン(アスパルト)
インスリン(Sigma®)
(2S,4R)-4-OHおよび
アスパルトについてwtのm/zから
約16Daシフト
%強度
質量対荷電比 (m/z)

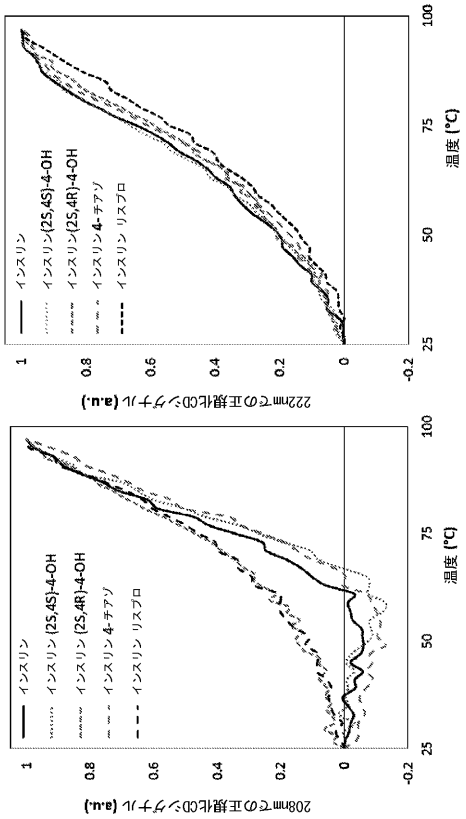
【図９】



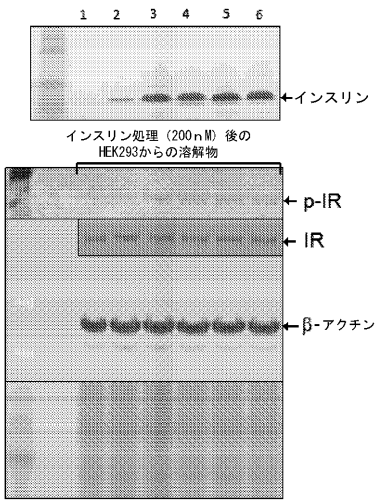

【図１０】



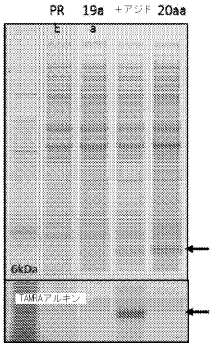

【図１１】




【図１２】



【図１３】




【配列表】
2017522282000001.app

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US2015/035096

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC (2015.01) A61K 38/28, A61P 3/10, C12P 21/02, C07K 14/62

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)
IPC (2015.01) A61K 38/28, A61P 3/10, C12P 21/02, C07K 14/62

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Databases consulted: Google Patents, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, Google Scholar
Search terms used: (Rapid acting insulin or monomeric insulin) and cyclic amino acid and (B28 or B29) and ((D-proline or hydroxyproline or *proline)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | US 5514646 A CHANCE, RONALD E, ; DIMARCHI, RICHARD D, ; FRANK, BRUCE H, ; SHIELDS, JAMES E<br>07 May 1996 (1996/05/07)<br>claims 1, 9, 24, 36, 55, 63; column 1 (line 21) – column 2 (line 5), column 3 (line 45) – column 4 (line 18) | 1-7,13-15,20,21,24 |
| Y | whole document, especially claims 1, 9, 24, 36, 55, 63; column 1 (line 10) – column 2 (line 5), column 3 (line 45) – column 4 (line 18); | 8-12,16,20-24 |
| X | US 5700662 A ELI LILLY AND COMPANY<br>23 Dec 1997 (1997/12/23)<br>claims 1, 11 and 20; examples 1, 2 | 17-19 |
| Y | whole document, especially claims 1, 11 and 20; examples 1, 2; column 1, lines 13-21 | 1-16,20-24 |

☐ 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 application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 06 Sep 2015 | 07 Sep 2015 |
| Name and mailing address of the ISA:<br>Israel Patent Office<br>Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel<br>Facsimile No. 972-2-5651616 | Authorized officer<br>MAZEL Alexander<br><br>Telephone No. 972-2-5651716 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2015/035096

| Patent document cited search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication Date |
|---|---|---|---|
| US 5514646 A | 07 May 1996 | US 5514646 A | 07 May 1996 |
| | | AT 133961 T | 15 Feb 1996 |
| | | AU 630912 B2 | 12 Nov 1992 |
| | | AU 4922690 A | 16 Aug 1990 |
| | | BG 60769 B2 | 29 Feb 1996 |
| | | CA 2009579 A1 | 09 Aug 1990 |
| | | CA 2009579 C | 11 Apr 2000 |
| | | CN 1044820 A | 22 Aug 1990 |
| | | CN 1034080 C | 19 Feb 1997 |
| | | CN 1148984 A | 07 May 1997 |
| | | CN 1103602 C | 26 Mar 2003 |
| | | CY 1911 A | 06 Feb 1990 |
| | | DE 19675034 I2 | 16 Nov 2006 |
| | | DE 69025210 D1 | 21 Mar 1996 |
| | | DE 69025210 T2 | 13 Jun 1996 |
| | | DE 69033889 D1 | 07 Feb 2002 |
| | | DE 69033889 T2 | 22 Aug 2002 |
| | | DK 0383472 T3 | 06 May 1996 |
| | | DK 0678522 T3 | 11 Mar 2002 |
| | | EP 0383472 A2 | 22 Aug 1990 |
| | | EP 0383472 A3 | 18 Sep 1991 |
| | | EP 0383472 B1 | 07 Feb 1996 |
| | | EP 0678522 A1 | 25 Oct 1995 |
| | | EP 0678522 B1 | 02 Jan 2002 |
| | | ES 2083424 T3 | 16 Apr 1996 |
| | | ES 2170122 T3 | 01 Aug 2002 |
| | | FI 95915 B | 29 Dec 1995 |
| | | FI 95915 C | 10 Apr 1996 |
| | | GE P20074095 B | 25 Apr 2007 |
| | | GR 3019501 T3 | 31 Jul 1996 |
| | | HK 60296 A | 12 Apr 1996 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2015/035096

| Patent document cited search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication Date |
|---|---|---|---|
| | | HU 900726 D0 | 28 Apr 1990 |
| | | HU T57795 A | 30 Dec 1991 |
| | | HU 212679 B | 30 Sep 1996 |
| | | HU 211276 A9 | 28 Nov 1995 |
| | | IE 900440 L | 09 Aug 1990 |
| | | IE 73251 B1 | 21 May 1997 |
| | | IL 93282 D0 | 29 Nov 1990 |
| | | IL 93282 A | 31 Aug 1995 |
| | | JP H02264798 A | 29 Oct 1990 |
| | | JP H0822878 B2 | 06 Mar 1996 |
| | | KR 0169727 B1 | 15 Jan 1999 |
| | | LU 88830 I2 | 06 Jan 1997 |
| | | LU 88831 I2 | 10 Jan 1997 |
| | | LV 10291 A | 20 Oct 1994 |
| | | LV 10291 B | 20 Aug 1995 |
| | | MX 19389 A | 28 Feb 1994 |
| | | NL 960026 I1 | 06 Jan 1997 |
| | | NL 960026 I2 | 01 May 1997 |
| | | NO 900615 D0 | 08 Feb 1990 |
| | | NO 900615 A | 10 Aug 1990 |
| | | NO 179587 B | 29 Jul 1996 |
| | | NO 179587 C | 06 Nov 1996 |
| | | NO 950721 A | 10 Aug 1990 |
| | | NO 950721 D0 | 24 Feb 1995 |
| | | NO 319171 B1 | 27 Jun 2005 |
| | | NZ 232375 A | 28 Apr 1992 |
| | | PT 93057 A | 31 Aug 1990 |
| | | PT 93057 B | 29 Dec 1995 |
| | | RU 2109749 C1 | 27 Apr 1998 |
| | | US 5700662 A | 23 Dec 1997 |
| | | ZA 9000838 A | 30 Oct 1991 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2015/035096

| Patent document cited search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication Date |
|---|---|---|---|
| US 5700662 A | 23 Dec 1997 | US 5700662 A | 23 Dec 1997 |
| | | AT 133961 T | 15 Feb 1996 |
| | | AU 630912 B2 | 12 Nov 1992 |
| | | AU 4922690 A | 16 Aug 1990 |
| | | BG 60769 B2 | 29 Feb 1996 |
| | | CA 2009579 A1 | 09 Aug 1990 |
| | | CA 2009579 C | 11 Apr 2000 |
| | | CN 1044820 A | 22 Aug 1990 |
| | | CN 1034080 C | 19 Feb 1997 |
| | | CN 1148984 A | 07 May 1997 |
| | | CN 1103602 C | 26 Mar 2003 |
| | | CY 1911 A | 06 Feb 1990 |
| | | DE 19675034 I2 | 16 Nov 2006 |
| | | DE 69025210 D1 | 21 Mar 1996 |
| | | DE 69025210 T2 | 13 Jun 1996 |
| | | DE 69033889 D1 | 07 Feb 2002 |
| | | DE 69033889 T2 | 22 Aug 2002 |
| | | DK 0383472 T3 | 06 May 1996 |
| | | DK 0678522 T3 | 11 Mar 2002 |
| | | EP 0383472 A2 | 22 Aug 1990 |
| | | EP 0383472 A3 | 18 Sep 1991 |
| | | EP 0383472 B1 | 07 Feb 1996 |
| | | EP 0678522 A1 | 25 Oct 1995 |
| | | EP 0678522 B1 | 02 Jan 2002 |
| | | ES 2083424 T3 | 16 Apr 1996 |
| | | ES 2170122 T3 | 01 Aug 2002 |
| | | FI 95915 B | 29 Dec 1995 |
| | | FI 95915 C | 10 Apr 1996 |
| | | GE P20074095 B | 25 Apr 2007 |
| | | GR 3019501 T3 | 31 Jul 1996 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2015/035096

| Patent document cited search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication Date |
|---|---|---|---|
| | | HK 60296 A | 12 Apr 1996 |
| | | HU 900726 D0 | 28 Apr 1990 |
| | | HU T57795 A | 30 Dec 1991 |
| | | HU 212679 B | 30 Sep 1996 |
| | | HU 211276 A9 | 28 Nov 1995 |
| | | IE 900440 L | 09 Aug 1990 |
| | | IE 73251 B1 | 21 May 1997 |
| | | IL 93282 D0 | 29 Nov 1990 |
| | | IL 93282 A | 31 Aug 1995 |
| | | JP H02264798 A | 29 Oct 1990 |
| | | JP H0822878 B2 | 06 Mar 1996 |
| | | KR 0169727 B1 | 15 Jan 1999 |
| | | LU 88830 I2 | 06 Jan 1997 |
| | | LU 88831 I2 | 10 Jan 1997 |
| | | LV 10291 A | 20 Oct 1994 |
| | | LV 10291 B | 20 Aug 1995 |
| | | MX 19389 A | 28 Feb 1994 |
| | | NL 960026 I1 | 06 Jan 1997 |
| | | NL 960026 I2 | 01 May 1997 |
| | | NO 900615 D0 | 08 Feb 1990 |
| | | NO 900615 A | 10 Aug 1990 |
| | | NO 179587 B | 29 Jul 1996 |
| | | NO 179587 C | 06 Nov 1996 |
| | | NO 950721 A | 10 Aug 1990 |
| | | NO 950721 D0 | 24 Feb 1995 |
| | | NO 319171 B1 | 27 Jun 2005 |
| | | NZ 232375 A | 28 Apr 1992 |
| | | PT 93057 A | 31 Aug 1990 |
| | | PT 93057 B | 29 Dec 1995 |
| | | RU 2109749 C1 | 27 Apr 1998 |
| | | US 5514646 A | 07 May 1996 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2015/035096

| Patent document cited search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication Date |
|---|---|---|---|
| | | ZA 9000838 A | 30 Oct 1991 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｋ* | *9/08* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 9/08 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *3/10* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 3/10 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *3/04* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 3/04 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *3/06* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 3/06 | |

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

(72)発明者 デイビッド エイ ティレール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１１０６ パサデナ アーデン ロード ７１４
(72)発明者 ハワード シー ジサー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９３１０５ サンタ バーバラ ウェスト ロス オリヴォス ストリート １５
(72)発明者 キャサリン ワイ ファング
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１１０６ パサデナ サウス チェスター アヴェニュー １４７
(72)発明者 セス リーブリッヒ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１１０６ パサデナ デル マー ブールバード １０９４イー

Ｆターム(参考) 4B064 AG16 CA02 CA06 CA10 CE12 CE14 DA01
4C076 AA11 AA16 BB16 CC30 CC41 DD42 EE59 FF31 FF33 FF34 FF63
4C084 AA02 AA03 AA07 BA20 BA31 BA44 MA16 MA66 NA03 NA05 NA11 NA12 ZA70 ZC33 ZC35
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA30 DA37 EA20 GA25 GA26 GA31