

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6701208号
(P6701208)

(45) 発行日 令和2年5月27日 (2020.5.27)

(24) 登録日 令和2年5月8日 (2020.5.8)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/62 (2006.01) C O 7 K 14/62 Z N A
C O 7 K 19/00 (2006.01) C O 7 K 19/00
A 6 1 K 38/28 (2006.01) A 6 1 K 38/28
A 6 1 K 47/65 (2017.01) A 6 1 K 47/65
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 2 3

請求項の数 14 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-536216 (P2017-536216)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月23日 (2015.9.23)
 (65) 公表番号 特表2017-534675 (P2017-534675A)
 (43) 公表日 平成29年11月24日 (2017.11.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/051705
 (87) 国際公開番号 W02016/049174
 (87) 国際公開日 平成28年3月31日 (2016.3.31)
 審査請求日 平成30年9月13日 (2018.9.13)
 (31) 優先権主張番号 62/054,670
 (32) 優先日 平成26年9月24日 (2014.9.24)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 517103681
 インディアナ ユニヴァーシティ リサー
 チ アンド テクノロジー コーポレイシ
 ョン
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462
 02 インディアナポリス インディアナ
 アヴェニュー 518
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100103610
 弁理士 ▲吉▼田 和彦
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤

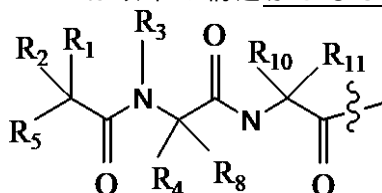
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質化アミド系インスリンプロドラッグ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造A-B-C-Qを含むインスリンプロドラッグであって、式中、QはインスリンA鎖およびインスリンB鎖を含むインスリンペプチドであり、さらに、
 A-B-Cは以下の構造からなる、前記インスリンプロドラッグ：



(式中、

A-B-Cは、QのB鎖のN-末端アミノ酸を介してアミド結合によりQと連結され；R₁は(C₁-C₆アルキル)NHR₉であり、R₂、R₄、及びR₁₁が各々Hであり、R₃は、C₁-C₁₈アルキル、C₃-C₈アルケニル、(C₁-C₄アルキル)(C₄-C₆シクロアルキル)、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₅複素環)、又は(C₁-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)であり、R₅がNH₂であり、R₈がH又はC₁-C₈アルキルであり、R₉がC₁₈-C₃₀アシルであり、

R_{10} は、H、又は CH_3 である)。

【請求項 2】

R_3 が C_1 - C_8 アルキルである、請求項 1 に記載のプロドラッグ。

【請求項 3】

R_8 がHであり、

R_3 が C_2 - C_8 アルキル、

である、請求項 1 又は 2 に記載のプロドラッグ。

【請求項 4】

R_1 が $(\text{CH}_2)_4\text{NHR}_9$ であり、

R_3 が C_3 - C_4 アルキルであり、さらに

R_9 が C_{18} - C_{28} アシルである、請求項 3 に記載のプロドラッグ。

【請求項 5】

A-B-CのN-末端アミノ酸のアミノ基を介してA-B-Cに連結される血清酵素切断性部分をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のプロドラッグ。

【請求項 6】

血清酵素切断性部分がジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) によって切断されるペプチドである、請求項 5 に記載のプロドラッグ。

【請求項 7】

血清酵素切断性ペプチド部分が配列Z-プロリン又はZ-アラニンを含むジペプチドであり、ここでZが、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、及びグルタミン酸から成る群から選択される、請求項 6 に記載のプロドラッグ。

【請求項 8】

当該血清酵素切断性ペプチド部分がArg-Pro又はLys-Proである、請求項 7 に記載のプロドラッグ。

【請求項 9】

インスリンペプチドが、 $\text{GIVEQCX}_8\text{X}_9\text{ICSLYQLENYCX}_{21}\text{-R}_{44}$ (配列番号:73) のA鎖配列及び $\text{R}_{22}\text{-X}_{25}\text{LCGX}_{29}\text{X}_{30}\text{LVX}_{33}\text{X}_{34}\text{LYLVCGX}_{41}\text{X}_{42}\text{GFX}_{45}$ (配列番号:20) のB鎖配列を含み、ここで、前記B鎖はジスルフィド結合を介して前記A鎖と連結され、

X_8 はヒスチジン又はスレオニンであり、

X_9 はセリン、リジン又はアラニンであり、

X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X_{25} はヒスチジン又はスレオニンであり、

X_{29} はアラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸、及びシステイン酸から成る群から選択され、

X_{33} はアスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X_{34} はアラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{41} は、グルタミン酸、アスパラギン酸及びアスパラギンから成る群から選択され、

X_{42} はアラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され、

X_{45} はチロシン又はフェニルアラニンであり、

R_{22} は、FVNQ (配列番号:12)、FVKQ (配列番号:8)、トリペプチドのバリン-アスパラギン-グルタミン、ジペプチドのアスパラギン-グルタミン、グルタミン、及びN-末端アミンから成る群から選択され；さらに

R_{44} は COOH 又は CONH_2 である、

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のプロドラッグ。

【請求項 10】

A鎖が配列 $\text{GIVEQCCTSLCSLYQLENYCN-R44}$ (配列番号:1) を含み、さらにB鎖が、 $\text{FVNQHLCGS HLVEALYLVCGERGFFYTPKT}$ (配列番号:2)、 $\text{FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT}$ (配列番号:9

10

20

30

40

50

)、FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (配列番号:5) 及びFVKQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (配列番号:6) から成る群から選択される配列を含む、請求項 9 に記載の プロドラッグ。

【請求項 1 1】

Bが、グリシン(N-メチル)、グリシン(N-エチル)、グリシン(N-プロピル)、グリシン(N-ブチル)、グリシン(N-ペンチル)、グリシン(N-ヘキシル)、グリシン(N-ヘプチル)、及びグリシン(N-オクチル)から成る群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の プロドラッグ。

【請求項 1 2】

A-B-Cが 3つのアミノ酸からなるペプチドを表し、N-末端のアミノ酸AがD-立体空間配置を有する、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の プロドラッグ。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか1項に記載の プロドラッグを含む、医薬組成物。

【請求項 1 4】

高血糖症又は糖尿病治療用医薬の製造のための請求項 1 ~ 1 2 のいずれか1項に記載の プロドラッグの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互引用) 本出願は、米国仮特許出願No.62/054,670 (2014年9月24日出願) の35USC § 119(e)における権利を主張する(前記出願の全開示が参照により本明細書に含まれる)。

(電子提出資料の参照による包含) 本明細書と同時に提出され、以下のとおりのコンピュータ読み出し可能ヌクレオチド/アミノ酸配列表は、参照によりその全体が本明細書に含まれる(22KB ACIIテキスト、2015年9月22日作成)。

(技術分野)

本開示はインスリン プロドラッグ 誘導体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

インスリンは二鎖ヘテロダイマーから構成され、前記は、効能の低い単鎖プロインスリン前駆体から酵素的プロセッシングを経て生合成的に誘導される。ヒトインスリンは、ジスルフィド結合により結びつけられ合計51アミノ酸を有する、2つのペプチド鎖(“A鎖”(配列番号:1)及び“B鎖”(配列番号:2))から構成される。B鎖のC-末端領域及びA-鎖の2つの末端領域は三次元構造で会合して、インスリン受容体との高親和性結合のための部位を組み立てる。

インスリンは実質的に全ての糖尿病型で絶大なブドウ糖低下能力を示す。残念なことに、インスリンの薬理はブドウ糖感受性ではなく、したがってインスリンは生命にかかわる低血糖をもたらしうる過剰作用を起こしかねない。相反する薬理は、インスリンが低血糖を生じることなく血糖を正常化することが極めて困難であるようにインスリン療法の最重要課題である。さらにまた、自然のままのインスリンは作用時間が短く、基礎ブドウ糖管理での使用に適切であるように改変が要求される。インスリン作用の開始を遅らせる確立されたアプローチには可溶性の低下及びアルブミン結合が含まれる。

【0 0 0 3】

図3に示すように、市販のインスリンアナログ(例えばLantus & Degludec)におけるインスリン作用の開始を遅らせる従来の戦略は、時間(k_1)の経過にしたがって血漿中にゆっくりと放出される“不溶性”インスリンの蓄えを皮下組織内に作ることに頼っている。続いて血漿中に存在する可溶性がインスリン標的組織に比較的迅速な速度(k_2)で進入する。しかしながら皮下組織から血漿への移動と関係する変動性のために、 k_1 が k_2 より遅いとき、標的組織によるインスリンの取り込みはこの変動性の影響を受けるであろう。したがって、 k_1 に随伴する変動性が標的組織によるインスリン取り込みに対し最小の影響を

10

20

30

40

50

有するように、 k_2 よりはるかに速い k_1 をもつインスリンアナログが望ましい。

市場で入手できるインスリン誘導体のあるものは[LysB29-テトラデカノイル、des(B30)]インスリンである（前記ではLysB29は C_{14} 脂肪酸でアシル化されている（Mayer et al., Peptide Science, 88, 5, 687-713））。脂肪酸鎖の存在はペプチドと血清アルブミンの結合を強化し、血漿半減期の延長をもたらす。しかしながら、この誘導体はin vivoでの効能の低下という欠点を抱える。加えて、このインスリン誘導体はまた患者ごとに生物学的作用の変動性を示す。この変動性は、部分的には可溶化及び皮下組織の貯蔵部から血漿循環への移動における相違、並びに k_1 が k_2 よりも遅いという事実による。

【0004】

プロドラッグ化学は、投与部位からクリアランスされた後のインスリン作用の開始及び持続時間、および漿中で厳密に規定された濃度における平衡化を厳密に制御する機会を提供する。従来の長時間作用性インスリンアナログ及び処方物と比較して、そのようなアプローチの主要な長所は、インスリンレザバーは注入場所の皮下脂肪組織ではなく血液コンパートメントであるということである（すなわち k_1 は k_2 よりもはるかに速い）。このことは、インスリン誘導体の開始を遅らせる、従来技術において遭遇する吸収及び可溶化の変動性を排除する。前記はまた、皮下注射以外のルートによるこのペプチドホルモンの投与を可能にする。

インスリンのその受容体への結合は生物学的刺激を生じるであろうが、この結合はまたインスリンによって誘発される薬理作用のその後の脱活性化をインスリンペプチドの酵素的分解を介して開始させるであろう。インスリンプロドラッグ誘導体を使用することで付け加えられる利点は、そのようなアプローチはまた対応する受容体によるプロドラッグの認識阻害戦略によってインスリンの生物学的半減期を延長するということである。プロドラッグ誘導体に随伴するこれらの利点にもかかわらず、そのようなプロドラッグの調製の複雑性はこれまで効果的なインスリンプロドラッグ誘導体の調製を妨げてきた。思い通りのプロドラッグホルモンを構築するためには、プロドラッグの構造的エレメントの可逆的付着のための基礎を形成することができる活性部位の構造的対処が要求される。構造的対処は2つの重要な特色を提供しなければならない：（1）選択的な化学的改変のための潜在能力及び（2）プロドラッグの構造要素の除去に際して自然のままの形態で高度な活性を提供する能力。本明細書に開示するインスリンプロドラッグは、受容体によって認識される構造に化学的に変換され、この場合、前記化学的変換の速度はin vivoにおける生物学的作用の開始及び持続時間を決定するであろう。本出願で開示するプロドラッグの化学構造は、追加の化学添加物、又は酵素若しくは酵素阻害剤に依存しない分子内化学反応を抛りどころとする。

理想的なプロドラッグは生理学的条件（例えばpH7.2及び37℃）で水溶性であり、長期保存中に散剤形で安定であるべきである。それはまた免疫学的にサイレントであり、親薬剤と比較して低い活性を示すべきである。典型的には、プロドラッグは親薬剤の10%を超えない活性を示すであろう。ある実施態様では、プロドラッグは、親薬剤に対して10%未満、5%未満、約1%、又は1%未満の活性を示す。さらにまた、身体に注射されたとき、プロドラッグは、所定の時間内に活性な薬剤に定量的に変換されるべきである。出願人は、これらの目的のそれぞれに適合するインスリンプロドラッグを開示する最初の者である。

【発明の概要】

【0005】

ペプチド系薬剤は、比較的短い作用持続時間及び変動可能な治療指数を有する高度に有効な医薬である。本開示はインスリンプロドラッグに関し、当該プロドラッグ誘導体は、作用の開始を遅らせ、さらに当該薬剤の半減期を延長するように設計される。作用開始の延期は、その活性化前に当該プロドラッグの全身分布を可能にするという点で有利である。したがって、プロドラッグの投与は投与時のピーク活性によって引き起こされる合併症を排除し、親薬剤の治療指数を高める。

ある実施態様にしたえば、インスリンのプロドラッグ誘導体は、アミド結合を介してジペプチドをインスリンペプチドに共有結合させることによって調製され、ここで当該ジ

10

20

30

40

50

ペプチドは共有結合により連結される部分（例えば自然のままではないアルキル又はアシル基）を含み、前記部分は哺乳動物の血漿タンパク質（例えば哺乳動物血清アルブミン）を不可逆的に結びつけるために十分なサイズである。生理学的条件下及び酵素活性の非存在下における分子内反応によるその後のジペプチドの除去（ジケトピペラジン又はジケトモルホリン形成をもたらす）によって、当該インスリンペプチドは完全な活性を取り戻す。ある実施態様では、ジペプチドの置換基を選択して、血清中及び生理学的条件下で約2から約168時間又は約12から約168時間の切断半減期が得られる。ある実施態様では、ジペプチドの置換基を選択して、血清中及び生理学的条件下で約0.5日から約10日又は約2から約10日の切断半減期が得られる。

ある実施態様にしたがえば、糖尿病を治療する方法、又は高血圧を治療/予防する方法は、本明細書に開示のインスリンプロドラッグを投与する工程を含む。ある実施態様では、インスリンプロドラッグは、生理学的条件下の血清中でのプロドラッグの半減期に基づいて分割投薬量で毎日投与される。例えば、プロドラッグが n (n は1日以上)の半減期を有するならば、1日の投薬量は、対応する非プロドラッグ形の当該インスリンペプチドの最適投薬量の $1/n$ である。したがって、10日の半減期を有するインスリンプロドラッグは、対応する非プロドラッグ形の当該インスリンペプチドの最適投薬量の $1/10$ で毎日投与される。

【0006】

ある実施態様にしたがえば、インスリンプロドラッグは構造A-B-C-Qを含むことを条件とされ、ここで

Qはインスリンペプチドであり；

Aはアミノ酸又は $(C_1-C_8 \text{ アルキル})NH_2$ 側鎖を含むヒドロキシ酸であり、ここでAの側鎖は、哺乳動物の血漿タンパク質（例えば哺乳動物血清アルブミンを含む）と不可逆的に結合する部分に共有結合により連結される。ある実施態様では、Aの側鎖は、長さが好ましくは少なくとも16、18又は20炭素である、アシル又はアルキル基（脂肪酸、コール酸、胆汁酸の胆汁塩又はステロイド部分を含む）に共有結合により連結される。ある実施態様では、Aの側鎖は $C_{16}-C_{30}$ アシル基又は $C_{16}-C_{30}$ アルキル基に共有結合により連結され；

BはN-アルキル化アミノ酸であり；さらに

Cはアミド結合、 X_{70} 又は $X_{70}X_{71}$ であり、ここで、 X_{70} 及び X_{71} は、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から独立に選択されるアミノ酸であり、

A-B-Cは、Qの脂肪族アミノ基によるアミド結合を介してQと連結される。任意的に、Aの側鎖とアシル又はアルキル基との間の連結はスペーサーを介し、スペーサーは1つ又は2つの荷電アミノ酸を含む。ある実施態様にしたがえば、構造A-B-Cは、脂肪族アミノ基でアミド結合による連結を介してQに連結され、前記脂肪族アミノ基は、A鎖又はB鎖のN-末端アミノ酸のアルファアミノ基、又はQのB3、B28若しくはB29アミノ酸の側鎖の脂肪族アミノ基から選択される。ある実施態様にしたがえば、Bは、 C_1-C_{18} アルキル、 C_3-C_{18} アルケニル、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_4-C_6 \text{ シクロアルキル})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_3-C_5 \text{ 複素環})$ 、又は $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_6-C_{10} \text{ アリール})$ でN-アルキル化されたアミノ酸である。

【0007】

別の実施態様では、インスリンプロドラッグは構造A-B-C-Qを含むことを条件とされ、ここでQはインスリンペプチドであり、さらにA-B-Cは以下の構造を含み、

【0008】

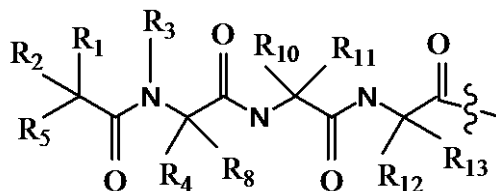
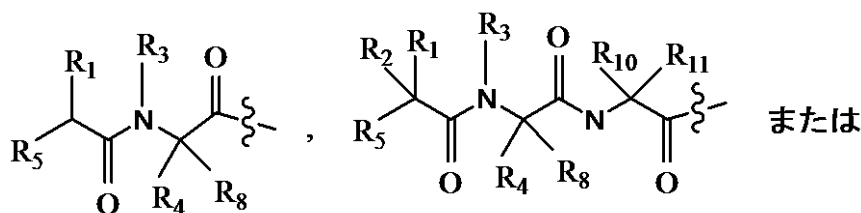
10

20

30

40

【化 1】



10

【 0 0 0 9 】

ここで、

R_1 は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-R_9$ 又は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-S_1-R_9$ であり；

R_2 は H 又は $C_1-C_6 \text{ アルキル}$ であり；

R_3 は、 $C_2-C_4 \text{ アルキル}$ 、 $C_3-C_8 \text{ アルケニル}$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_4-C_6 \text{ シクロアルキル})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_3-C_5 \text{ 複素環})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_6-C_{10} \text{ アリール})$ 、及び $(C_1-C_4 \text{ アルキル})(C_6-C_{10} \text{ ヘテロアリール})$ から成る群から選択されるか、又は R_4 及び R_3 はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員複素環式環を形成し；

20

R_4 及び R_8 は独立に、H、 $C_1-C_{18} \text{ アルキル}$ 、 $C_2-C_{18} \text{ アルケニル}$ 、 $(C_1-C_{18} \text{ アルキル})OH$ 、 $(C_1-C_{18} \text{ アルキル})SH$ 、 $(C_2-C_3 \text{ アルキル})SCH_3$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})CONH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NHC(NH_2^+)NH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_3-C_6 \text{ シクロアルキル})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_2-C_5 \text{ 複素環})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_6-C_{10} \text{ アリール})R_7$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})(C_3-C_9 \text{ ヘテロアリール})$ 、及び $C_1-C_{12} \text{ アルキル}(W_1)C_1-C_{12} \text{ アルキル}$ （式中 W_1 は N、S 及び O から選択されるヘテロ原子）から成る群から選択されるか、又は R_4 及び R_8 は、それらに結合する原子と一緒に $C_3-C_6 \text{ シクロアルキル}$ を形成し；

R_5 は NHR_6 又は OH であり；

30

R_6 は H 又は $C_1-C_8 \text{ アルキル}$ であり；

R_7 は H、OH、 $C_1-C_{18} \text{ アルキル}$ 、 $C_2-C_{18} \text{ アルケニル}$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 、及び $(C_0-C_4 \text{ アルキル})OH$ から成る群から選択され；

R_9 は $C_{18}-C_{30} \text{ アシル}$ から成る群から選択され；

R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} は、独立に H、 CH_2 、 $CHOH$ 、 CH_2SH 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NHC(NH_2^+)NH_2$ 及び $CH_2(C_3-N_2 \text{ 複素環})$ から成る群から選択され；

S_1 はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであり、ここで A-B-C は Q の脂肪族アミノ基を介してアミド結合により Q に連結される。ある実施態様では、 R_1 は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-S_1-R_9$ であり； R_3 は、 $C_2-C_4 \text{ アルキル}$ から成る群から選択され； R_2 、 R_4 、 R_{11} 及び R_{13} は各々 H であり； R_5 は NH_2 であり； R_8 は H 又は $C_1-C_8 \text{ アルキル}$ であり； R_9 は $C_{18}-C_{30} \text{ アシル}$ であり； R_{10} 及び R_{12} は、独立に $(C_1-C_4 \text{ アルキル})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 及び $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NHC(NH_2^+)NH_2$ から成る群から選択され；さらに S_1 はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸を含むスペーサーであり、A-B-C はインスリンの B 鎖の N-末端アミンを介してアミド結合により Q に連結される。

40

【 0 0 1 0 】

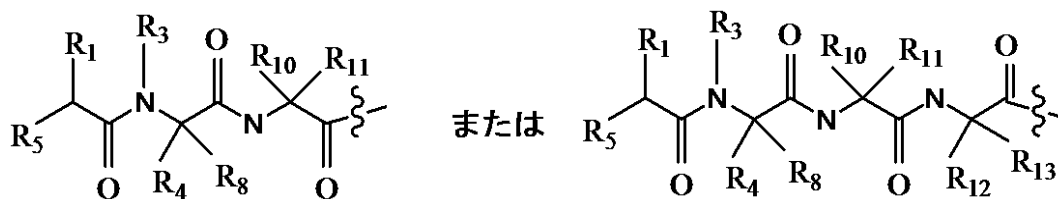
ある実施態様では、構造 A-B-C-Q を含むインスリンプロドラッグが提供され；

50

ここでQはインスリンペプチドであり、さらにA-B-Cは以下の構造を含み、

【0011】

【化2】



【0012】

ここで、

R_1 は C_{18} - C_{30} アルキル、 $(C_1$ - C_6 アルキル) NH - R_9 又は $(C_1$ - C_6 アルキル) NH - S_1 - R_9 であり；

R_3 は C_2 - C_4 アルキルから成る群から選択され；

R_4 、 R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり；

R_5 は NH_2 であり；

R_8 はH又は C_1 - C_8 アルキルであり；

R_9 は C_{18} - C_{30} アシルであり；

R_{10} 及び R_{12} は、独立に $(C_1$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) $NHC(NH_2^+)NH_2$ 、及び $CH_2(C_3-N_2$ 複素環)から成る群から選択され；さらに

S_1 はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであり、ここでA-B-CはQの脂肪族アミノ基を介してアミド結合によりQに連結される。ある実施態様では、 R_1 は $(CH_2)_4-S_1-NHR_9$ 又は $(CH_2)_4NHR_9$ であり； R_3 は、 C_3 - C_4 アルキルであり； R_5 は NH_2 であり； R_9 は C_{18} - C_{28} アシルであり；さらにA-B-CはインスリンのB鎖のN-末端アミンを介してアミド結合によりQに連結される。

【0013】

本明細書に開示するプロドラッグのインスリンペプチドは、インスリン受容体でアゴニスト活性を有する、当業者に公知のインスリンのいずれかを含むことができる。ある実施態様にしたがえば、インスリンペプチドはGIVEQCCX₈SICSLYQLENYCX₂₁R₄₄（配列番号:3）のA鎖配列及びR₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号:20）のB鎖配列を含み（B鎖はジスルフィド結合を介してA鎖と連結される）；

X_8 はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され；

X_{21} はアスパラギン、オルニチン、グリシン、アラニン、スレオニン、及びセリンから成る群から選択され；

X_{25} はヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され；

X_{29} はアラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され；

X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸、及びシステイン酸から成る群から選択され；

X_{33} はアスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され；

X_{34} はアラニン及びスレオニンから成る群から選択され；

X_{41} はグルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され；

X_{42} はアラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され；

X_{45} はチロシン又はフェニルアラニンであり；

R_{22} は、AYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、FVKQ（配列番号:8）、PGPE（配列番号:11）、トリペプチドのグリシン-プロリン-グルタミン酸、トリペプチドのバリン-アスパラギン-グルタミン、ジペプチドのプロリン-グルタミン酸、ジペプチドのアスパラギン-グルタミン、グルタミン、グルタミン酸、及びN-末端アミンから成る群から選択され；さらに

R_{44} は $COOH$ 又は $CONH_2$ である。

【0014】

ある実施態様では、本明細書に開示するプロドラッグのインスリンペプチドは、GIVEQC CX₈SICSLYQLENYCX₂₁ (配列番号:3) のA鎖及びR₂₂-HLCGSHLVEALYLVCGERGFX₄₅ (配列番号:15) のB鎖を含み (B鎖はジスルフィド結合を介して前記A鎖と連結される) ;

R₂₂は結合であるか、又はFVNQ (配列番号:12)、FVKQ (配列番号:8)、VNQ、NQ及びQから成る群から選択される1から4アミノ酸の配列であり ;

X₈はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され ;

X₂₁はアスパラギン、リジン、グリシン、アラニンから成る群から選択され ; さらに

X₄₅はヒスチジン、チロシン又はフェニルアラニンである。

ある実施態様では、A鎖は配列GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-R₄₄ (配列番号:1) を含み、前記B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号:2)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (配列番号:9)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (配列番号:5)、FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (配列番号:6) から成る群から選択される配列を含む (式中R₄₄はCOOH又はCONH₂である)。

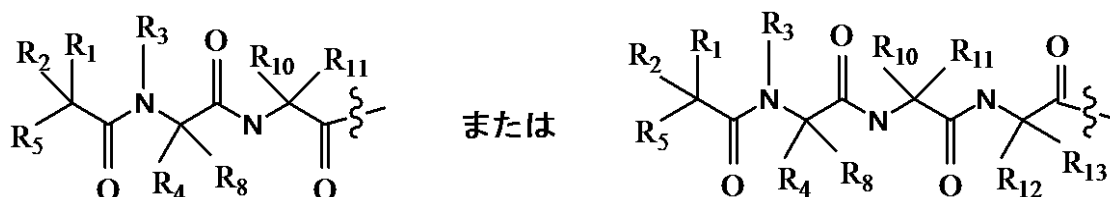
ある実施態様では、プロドラッグのエLEMENTのアミノ酸A及び/又はBはD立体異性体配置のアミノ酸である。いくつかの例示的实施態様では、AはD立体異性体の立体配置のアミノ酸であり、BはL立体異性体配置のアミノ酸である。いくつかの例示的实施態様では、AはL立体異性体の立体配置のアミノ酸であり、BはD立体異性体の立体配置のアミノ酸である。いくつかの例示的实施態様では、AはD立体異性体立体配置のアミノ酸であり、BはD立体異性体立体配置のアミノ酸である。ある実施態様では、BはN-アルキル化アミノ酸であるが、置換プロリン又はプロリンアナログではない。

【0015】

ある実施態様にしたがえば、インスリンアナログが提供され、ここで当該インスリンペプチドのA鎖は配列GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (配列番号:1) を含み、B鎖は、Z-FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号:2)、Z-FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (配列番号:5)、Z-FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (配列番号:6) 及びZ-FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (配列番号:9) から成る群から選択される配列を含み、ここでZは以下の一般構造を含むペプチドであり ;

【0016】

【化3】



【0017】

式中、

Zは、B鎖のN-末端アミノ酸又はB鎖のB28若しくはB29の側鎖の脂肪族アミノ基を介してアミド結合によりQと連結され ;

R₁は、H、C₁₈-C₃₀アルキル、(C₁-C₄アルキル)NHR₉、(C₁-C₄アルキル)O-S₁-R₉、(C₁-C₄アルキル)S-S₁-R₉、(C₁-C₄アルキル)CONH-S₁-R₉、(C₁-C₄アルキル)COO-S₁-R₉、(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉、及び(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)-S₁-R₉から成る群から選択され ; R₂及びR₈は独立に、H、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、(C₁-C₄アルキル)OH、(C₁-C₄アルキル)SH、(C₂-C₃アルキル)SCH₃、(C₁-C₄アルキル)CONHH、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NHH、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)、及びC₁-C₁₂アルキル(W₁)C₁-C₁₂アルキルから成る群から選択されるか (式中、W₁はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子である)、又はR₁及びR₂はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₁₂シクロアルキル又はアリールを形成し ;

R₃は、C₁-C₁₈アルキル、C₃-C₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)(C₄-C₆シクロアルキル)、(C₀

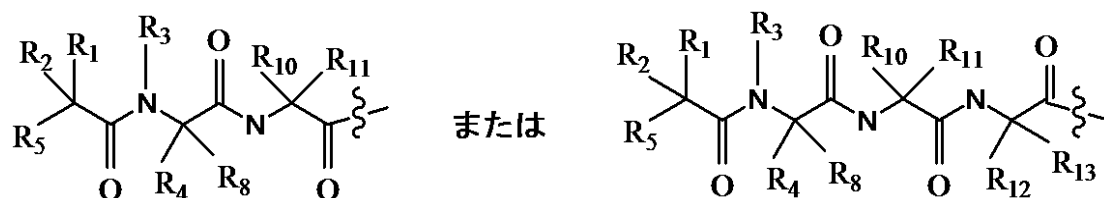
-C₄アルキル)(C₃-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)であるか、又はR₄及びR₃はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成し；
 R₄はH、C₁-C₁₈アルキル、(C₁-C₆アルキル)NH-R₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり；
 R₅はOH、NHR₆又はNHR₉であり；
 R₆はH、C₁-C₈アルキルであり；
 R₇はH、OH及びOR₉から成る群から選択され；
 R₉はC₁₆-C₃₀アシル及びC₁₆-C₃₀アルキルから成る群から選択され；
 R₁₁及びR₁₃は各々Hであり；
 R₁₀及びR₁₂は独立に、H、CH₂、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；さらに
 S₁は、結合又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであるが、ただしR₄がH又はC₁-C₁₈アルキルであるときR₁はH以外であることを条件とする。ある実施態様では、R₁は(CH₂)₄-S₁-NHR₉又は(CH₂)₄NHR₉であり；R₃はC₃-C₄アルキルであり；R₅はNH₂であり；さらにR₉はC₁₈-C₂₈アシルであり、Zはアミド結合によりインスリンのB鎖のN-末端アミンに連結される。

【0018】

ある実施態様にしたがえば、単鎖インスリンプロドラッグアナログが提供される。この実施態様では、ヒトインスリンB鎖（又はその機能的アナログ）のカルボキシ末端は、ヒトインスリンA鎖（又はその機能的アナログ）のN-末端に共有結合により連結され、この場合、下記一般構造を有するペプチドプロドラッグエレメントは、インスリンペプチドのA若しくはB鎖のN-末端で又はB鎖のB3、B28若しくはB29の位置に対応するアミノ酸の側鎖でアミド結合により共有結合される：

【0019】

【化4】



【0020】

ある実施態様では、B鎖は、4 - 12又は4 - 8アミノ酸のペプチドリinkerを介してA鎖に連結される。

さらに別の実施態様では、本発明のインスリンプロドラッグは、保存中及び患者への投与前のペプチドプローブの切断を防ぐためにさらに改変される。ある実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメントのN-末端アミンは、N-末端との結合状態を患者への投与まで維持する部分に連結される。ある実施態様では、式A-B-C-Qのインスリンプロドラッグはさらに血清酵素切断性部分を含み、前記部分はAのN-末端アミンを介してAに連結される。ある実施態様では、酵素切断性部分は、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）によって切断されるペプチドである（例えばArg-Pro、Lys-Pro又はGlu-Proを含む）。

【0021】

別の実施態様では、インスリンプロドラッグアナログの可溶性は、親水性部分のペプチドとの共有結合によって強化される。ある実施態様では、親水性部分は以下のどれかに連結される：B鎖のN-末端アルファアミン、プロドラッグペプチドアミノ酸の側鎖、又はA鎖のA9、A14及びA15位又はB鎖のB1、B2、B3、B10、B22、B28若しくはB29位のアミノ酸の側鎖（例えば配列番号：9の28位のアミノ酸又は配列番号：2の29位のアミノ酸を含む）。ある実施態様では、親水性部分はポリエチレングリコール（PEG）鎖であり、前記は約500から約40,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。ある実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は約500から約5,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。別

の実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は約10,000から約20,000ダルトンの分子量を有する。

アシル化又はアルキル化は循環中のインスリンペプチドの半減期を増加させることができる。アシル化又はアルキル化は作用の開始を有益に遅らせるか、及び/又はプロドラッグの活性化時にインスリン受容体での作用の持続時間を延長することができる。インスリンアナログは、親水性部分が連結される同じアミノ酸場所で、又は異なるアミノ酸場所でアシル化又はアルキル化されうる。

【0022】

ある実施態様にしたがえば、医薬組成物が提供され、前記は、本明細書に開示する新規なインスリンプロドラッグアナログのいずれか（好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度レベルで）及び医薬的に許容できる希釈剤、担体又は賦形剤を含む。そのような組成物は、本明細書に開示するA19インスリンアナログを、少なくとも0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL、9mg/mL、10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL、15mg/mL、16mg/mL、17mg/mL、18mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、21mg/mL、22mg/mL、23mg/mL、24mg/mL、25mg/mLの濃度又はそれより高い濃度で含むことができる。ある実施態様では、医薬組成物は水溶液を含み、前記は滅菌され場合により多様な包装容器に保存収納されている。他の実施態様では、医薬組成物は凍結乾燥散剤を含む。医薬組成物はさらに、組成物を患者に投与するための使い捨て装置を含むキットの部分として包装されうる。容器又はキットには周囲温度又は冷蔵温度での保存のために付箋を添付することができる。

ある実施態様にしたがえば、インスリン依存患者の血糖レベルの調節の改善方法が提供される。前記方法は、本明細書開示のインスリンプロドラッグアナログを糖尿病の管理に治療的に有効な量で投与する工程を含む。ある実施態様では、インスリンプロドラッグアナログは、高親和性を有するアルブミンの結合に十分なサイズのアシル基でアシル化されるか、及び/又は約5,000から約40,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有するPEG鎖でPEG化される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】インスリンプロドラッグアナログMIU-30a:B¹(Y16,L17,Y25)29a:A¹(dLys(Ac),Sar-aF19)（このアナログではアシル化ジペプチドdLys(Ac),SarはA19 4-aminoPheを介してインスリンアナログとアミド結合により連結される）の比較インスリン耐性試験から得られた結果を示す。当該プロドラッグの半減期は約20時間と推定される。図1Aに示すデータは、親化合物は低い効能を有するが、20%血漿中で48時間インキュベートした後は（“MIU-30c”を生成する）効能は増加することを明らかにする。= ビヒクルコントロール、= MIU30a（90nm/kg）、= MIU30c（90nm/kg）、= MIU30a（270nm/kg）、= MIU30c（270nm/kg）。

【図1B】インスリンプロドラッグアナログMIU-30a:B¹(Y16,L17,Y25)29a:A¹(dLys(Ac),Sar-aF19)（このアナログではアシル化ジペプチドdLys(Ac),SarはA19 4-aminoPheを介してインスリンアナログとアミド結合により連結される）の比較インスリン耐性試験から得られた結果を示す。当該プロドラッグの半減期は約20時間と推定される。図1Aに示すデータは、親化合物は低い効能を有するが、20%血漿中で48時間インキュベートした後は（“MIU-30c”を生成する）効能は増加することを明らかにする。= ビヒクルコントロール、= MIU30a（90nm/kg）、= MIU30c（90nm/kg）、= MIU30a（270nm/kg）、= MIU30c（270nm/kg）。図1Aと同様に、図1BはC57/Blkマウスでの8時間後の血糖AUCであり、当該化合物の効能は投与前にin vitroでインキュベートした時間にあわせて増加することを示す。

【図2】30% ACN/PBS（37℃、pH7.4）においてex vivoでインキュベートした時間に対応するアシル化プロドラッグMIU42:B¹(Y16,L17,Y25)29a:A¹(dLys(rE-C14),Sar-aF19)（このプロドラッグではジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸はアシル化され、グルタミン酸リンカーのガンマ位“rE”で連結される）の活性を示すグラフである。このデータ

によって示されるように、親化合物MIU42は、ex vivoでインキュベートされる時間が増加するとともに活性を取り戻す。

【図3】超基礎/基礎/ボラスインスリン療法を示す。インスリン作用の開始を遅らせる市販のインスリンアナログの従来の戦略は、時間(k1)の経過にしたがって血漿中にゆっくりと放出される“不溶性”インスリン貯蔵部を皮下組織内に作ることを根拠とする。続いて、血漿に存在する可溶性は比較的速い速度(k2)でインスリン標的組織に入る。明瞭な意図の下に分割された1日の用量の可溶性の長期作用性インスリン(qw)は、単回投与につきものの変動性を最小限にする。

【図4】B鎖のN-末端アミンに連結した脂質化プロドラッグエレメントへの血清アルブミンの不可逆的結合によるインスリンアナログの不活化を示す模式図である。生理学的条件下及び酵素活性の非存在下におけるその後のジペプチドの除去は、当該ジペプチドプロドラッグエレメントの遊離によりインスリンの活性化をもたらす。

【図5】B鎖のN-末端アミンに連結された脂質化プロドラッグエレメントを含む二鎖インスリンアナログの製造のための合成図を提供する。

【図6】B鎖のN-末端アミンに連結された脂質化プロドラッグエレメントの切断半減期を提供し、ここでは、第一のアミノ酸のN-アルキル化が改変され、第二のアミノ酸に連結されるアルキル鎖の長さが変更される。

【図7-1】インスリンプロドラッグアナログ(Aib-(N-Me)Lys(C22)-Cys-(S-プロピル)B1-インスリン)の分解を示すHPLCトレースを提供する。当該インスリンプロドラッグのプロドラッグエレメントは約8時間の半減期を示した。

【図7-2】図7-1 続き。

【図7-3】図7-2 続き。

【図8-1】インスリンプロドラッグアナログ((アルファ-Me)Lys(C18)-Sar,B1-インスリン)の分解を示すHPLCトレースを提供する。当該インスリンプロドラッグのプロドラッグエレメントは約6時間の半減期を示した。

【図8-2】図8-1 続き。

【図9-1】インスリンプロドラッグアナログ(Lys(C18)-N(sBu)Gly,Gly B1-インスリン)の分解を示すHPLCトレースを提供する。当該インスリンプロドラッグのプロドラッグエレメントは約16時間の半減期を示した。

【図9-2】図9-1 続き。

【図10】ジペプチドプロドラッグエレメントの第二のアミノ酸のN-アルキル化の当該ジペプチドの切断速度における影響を示す。

【図11】プロドラッグエレメントの構造のための追加の実施態様を提供する。

【図12】2-ブロモカルボン酸によるペプチドへのN-アルキル基の導入のための合成図を提供する。

【図13】光延反応による、ペプチドへのN-アルキル基の導入及びアルファ炭素置換のための合成図を提供する。

【図14A】追加の合成図を提供する。図14Aは、ウギ反応によってペプチドへN-アルキル基を導入しさらにアルファ炭素を置換するための液相合成を提供する。

【図14B】追加の合成図を提供する。図14Bは、N-アルキル化アミノ酸を有する脂質化トリペプチドのまた別の固相合成を提供する。

【図14C】追加の合成図を提供する。図14Cは、A1,B29-di-tBoc-インスリンを用いる脂質化インスリンプロドラッグの合成のための合成図を提供する。

【図14D】追加の合成図を提供する。図14Dは、A1,B29-di-(Fmoc)-インスリンを用いる脂質化インスリンプロドラッグの合成のための合成図を提供する。

【図15A】インスリン耐性実験のデータを提供する(前記実験では、糖尿病モデルマウスに自然のままのインスリン又は自然のままのインスリンを土台にしたプロドラッグが投与される)。図15Aは実験手順の概略を提供し図15Bはその結果を提供し、アシル化プロドラッグインスリンアナログの血糖レベルの低下における作用時間の延長を示す。

【図15B】インスリン耐性実験のデータを提供する(前記実験では、糖尿病モデルマウス

10

20

30

40

50

スに自然のままのインスリン又は自然のままのインスリンを土台にしたプロドラッグが投与される)。図15Aは実験手順の概略を提供し図15Bはその結果を提供し、アシル化プロドラッグインスリンアナログの血糖レベルの低下における作用時間の延長を示す。

【図15C】インスリン耐性実験のデータを提供する(前記実験では、糖尿病モデルマウスに自然のままのインスリン又は自然のままのインスリンを土台にしたプロドラッグが投与される)。図15Aは実験手順の概略を提供し図15Bはその結果を提供し、アシル化プロドラッグインスリンアナログの血糖レベルの低下における作用時間の延長を示す。図15Cは血中インスリンレベルが血糖レベルと相関関係を有することを示す。

【図16A】インスリン耐性実験のデータを提供する(前記実験では、糖尿病モデルマウスに自然のままのインスリン又は自然のままのインスリンを土台にしたプロドラッグが投与される)。図16Aは実験手順の概略を提供し図16Bはその結果を提供し、アシル化プロドラッグインスリンアナログの血糖レベルの低下における作用時間の延長を示す。

【図16B】インスリン耐性実験のデータを提供する(前記実験では、糖尿病モデルマウスに自然のままのインスリン又は自然のままのインスリンを土台にしたプロドラッグが投与される)。図16Aは実験手順の概略を提供し図16Bはその結果を提供し、アシル化プロドラッグインスリンアナログの血糖レベルの低下における作用時間の延長を示す。

【図16C】インスリン耐性実験のデータを提供する(前記実験では、糖尿病モデルマウスに自然のままのインスリン又は自然のままのインスリンを土台にしたプロドラッグが投与される)。図16Aは実験手順の概略を提供し図16Bはその結果を提供し、アシル化プロドラッグインスリンアナログの血糖レベルの低下における作用時間の延長を示す。図16Cは、自然のままのインスリン又はインスリンプロドラッグを投与された糖尿病の絶食マウスのデータを提供し、投与後の血糖変化を示す。

【図17A】インスリン耐性実験のデータを提供する(前記実験では、正常なマウスに自然のままのインスリン又は自然のままのインスリンを土台にしたプロドラッグが投与される)。図17Aは実験手順の概略を提供し図17Bはその結果を提供し、アシル化プロドラッグインスリンアナログの血糖レベルの低下における作用時間の延長を示す。

【図17B】インスリン耐性実験のデータを提供する(前記実験では、正常なマウスに自然のままのインスリン又は自然のままのインスリンを土台にしたプロドラッグが投与される)。図17Aは実験手順の概略を提供し図17Bはその結果を提供し、アシル化プロドラッグインスリンアナログの血糖レベルの低下における作用時間の延長を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

定義

本発明を記述しさらに特許請求の範囲を記載するに際して、下記に説明する定義にしたがって以下の用語が用いられるであろう。

本明細書で用いられるように、“プロドラッグ”という用語は、その薬理学的効果を示す前に化学的改変を経る任意の化合物と定義される。

“生物活性ポリペプチド”は、*in vitro*及び/又は*in vivo*で生物学的作用を示すことができるポリペプチドを指す。

本明細書で用いられるように“アミノ酸”という用語は、アミノ及びカルボキシ官能基の両方を含む任意の分子を包含し、ここでアミノ及びカルボキシレート基は同じ炭素(アルファ炭素)に結合される。アルファ炭素は、任意的に1つ又は2つの更なる有機置換基を有することができる。その立体空間配置が特定されないアミノ酸の指定は、当該アミノ酸のL若しくはD型又はラセミ混合物のどちらかを包含することを意図する。しかしながら、アミノ酸がその三文字コードによって指定されかつ上付き数字を含む場合には、当該アミノ酸のD型は三文字コードの前の小文字d及び上付き数字を含むことによって特定され(例えばdLys⁻¹)、小文字を欠く指定(例えばLys⁻¹)は当該アミノ酸の自然のままのL型を特定することを意図する。この命名法では、上付き数字の含有はIGFペプチド配列におけるアミノ酸の位置を指定し、この場合、IGF配列内に位置するアミノ酸はN-末端から連続して番号付けされる正の上付き数字によって指定される。N-末端で又は側鎖を介してIGF

ペプチドに連結される追加アミノ酸は、0で始まりIGF配列からさらに移動するにつれ負の整数値として増加する番号が付与される。例えば、IGFのN-末端に連結されるジペプチド内のアミノ酸の位置は、 aa^{-1} - aa^0 -IGFと指定される（ここで aa^0 はジペプチドのカルボキシ末端アミノ酸を表し aa^{-1} はジペプチドのアミノ末端アミノ酸を示す）。

【0025】

本明細書で用いられるように“ヒドロキシ酸”という用語は、改変されアルファ炭素のアミノ基がヒドロキシル基で入れ替えられてあるアミノ酸を指す。

本明細書で用いられるように“非コードアミノ酸”という用語は、以下の20アミノ酸（Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr）のいずれかのL-異性体ではないアミノ酸を包含する。

10

“ジペプチド”は、アルファアミノ酸又はアルファヒドロキシ酸と別のアミノ酸のペプチド結合を介する連結によって形成される化合物である。

本明細書で定義するペプチドプロドラッグエレメントは、N-末端自己切断ジペプチドを含むペプチドであり、ここで当該ジペプチドは、生理学的条件下で偶発的にアミド結合の化学的切断を経てジケトピペラジン又はジケトモルホリンを形成する。ペプチドプロドラッグエレメントはジペプチドから成りうるが、自己切断ジペプチドのカルボキシ末端にアミド結合を介して連結される追加のアミノ酸を含むことも可能である。

本明細書で用いられるように、更なる指定が全くない“化学的切断”という用語は、化学的共有結合の破壊をもたらす非酵素的反応を包含する。

血清酵素切断性部分は、ペプチドに共有結合により連結され酵素活性の非存在下で安定な構造を形成できる化合物である。哺乳動物の血清で見出される酵素への暴露に際して、当該完全部分はペプチドから切断される。例えば、血清酵素切断性部分は、アミド結合を介してポリペプチドに連結される血清酵素切断性ペプチドであることができ、ここで当該酵素切断性ペプチドはジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）による切断に感受性である。

20

【0026】

“生物活性ポリペプチド”はin vitro及び/又はin vivoで生物学的作用を示すことができるポリペプチドを指す。

本明細書で用いられるように、ペプチドと一般的にいう場合は、改変されたアミノ及びカルボキシ末端を有するペプチドを包含することが意図される。例えば、標準的アミノ酸を指定するアミノ酸配列は、N-及びC-末端の標準的アミノ酸とともにN-末端の対応するヒドロキシ酸及び/又は末端カルボン酸の代わりにアミドを含むように改変された対応するC-末端アミノ酸を含むことが意図される。

30

本明細書で用いられるように“アシル化”アミノ酸は、生成される手段に関係なく、天然に存在するアミノ酸と対比して自然のままではないアシル基を含むアミノ酸である。アシル化アミノ酸及びアシル化ペプチドを生成する例示的方法は当業界で公知であり、ペプチドへの挿入前にアミノ酸をアシル化する方法又はペプチド合成の後で当該ペプチドを化学的にアシル化する方法が含まれる。ある実施態様では、アシル基によってペプチドは以下の1つ以上を有するようになる：（i）循環中の半減期の延長、（ii）作用開始の延期、（iii）作用持続時間の延長、（iv）プロテアーゼ（例えばDPP-IV）耐性の改善、及び（v）インスリンペプチド受容体での効能の増加。

40

本明細書で用いられるように、“アルキル化”アミノ酸は、生成される手段に関係なく、天然に存在するアミノ酸と対比して自然のままではないアルキル基を含むアミノ酸である。アルキル化アミノ酸及びアルキル化ペプチドを生成する例示的方法は当業界で公知であり、ペプチドへの挿入前にアミノ酸をアルキル化する方法又はペプチド合成の後で当該ペプチドを化学的にアルキル化する方法が含まれる。いずれの特定の理論にも拘束されないが、ペプチドのアルキル化は、ペプチドのアシル化と（たとえ同じでないとしても）類似する効果（例えば循環中の半減期の延長、作用開始の延期、作用持続時間の延長、プロテアーゼ（例えばDPP-IV）耐性の改善、及びインスリンペプチド受容体での効能の増加）を達成するであろうと考えられる。

50

【0027】

本明細書で用いられるように、“医薬的に許容できる担体”という用語は、任意の標準的医薬担体、例えばリン酸緩衝食塩水溶液、水、エマルジョン（例えば油/水又は水/油エマルジョン）、及び多様なタイプの湿潤剤を含む。当該用語はまた、米連邦政府の規制庁によって承認されているか、又は動物（人間を含む）での使用のために米国薬局方に列挙されている任意の薬剤を包含する。

本明細書で用いられるように“医薬的に許容できる塩”という用語は、親化合物の生物学的活性を保持する化合物の塩を指し、さらに当該塩は生物学的に又は他の態様でも望ましくないものではない。本明細書に開示する化合物の多くが、アミノ及び/又はカルボキシル基又はそれらに類似する基の存在により酸及び/又は塩基塩を形成することができる

10

。医薬的に許容できる塩基付加塩は無機及び有機塩基から調製することができる。無機塩基から誘導される塩には、単に例示としてナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム及びマグネシウム塩が含まれる。有機塩基から誘導される塩には第一、第二及び第三アミンの塩が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

医薬的に許容できる酸付加塩は無機及び有機酸から調製できる。無機酸から誘導される塩は塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などを含む。有機酸から誘導される塩は酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などを含む。

20

【0028】

本明細書で用いられるように、“治療”という用語は、特定の異常若しくは症状の予防、又は特定の異常若しくは症状に随伴する徴候の緩和、及び/又は前記徴候の防止若しくは排除を含む。例えば、本明細書で用いられるように“糖尿病を治療する”という用語は、一般的には血糖レベルを正常レベル近くに維持することを指し、与えられた状況に応じて血糖を増加又は低下させることを含むことができる。

本明細書で用いられるようにプロドラッグの“有効な量”又は“治療的に有効な量”は、所望の効果を提供するために無害であるが十分な量を指す。例えば、所望される効果のあるものは高血糖症の予防又は治療であろう。“有効な”量は、個体の年齢及び一般的状態、投与態様などに応じて対象動物ごとに変動するであろう。したがって、厳密な“有効量”を特定することは常に可能であるとは限らない。しかしながら、任意の個体例における適切な“有効”量は、当業者が日常的な実験を用いて決定できる。

30

“非経口的”という用語は、消化管を介さないでいくつかの他のルート（例えば鼻内、吸収、皮下、筋肉内、脊髄内又は静脈内）を介することを意味する。

【0029】

本明細書で用いられるように“自然のままのインスリン”という用語は、配列番号:1のA鎖及び配列番号:2のB鎖を含む51アミノ酸のヘテロダイマーとともに配列番号:1及び2を含む単鎖インスリンアナログを指すことが意図される。本明細書で用いられる“インスリンペプチド”用語（更なる説明語句を含まない）は、配列番号:1のA鎖及び配列番号:2のB鎖を含む51アミノ酸のヘテロダイマーとともにその単鎖インスリンアナログを包含することが意図され（前記単鎖インスリンアナログには、例えば国際特許出願公開W096/34882及び米国特許6,630,348号（前記は参照により本明細書に含まれる）に開示されたものが含まれる）、さらに自然のままのA鎖及び/又はB鎖の改変誘導体を含むヘテロダイマー及び単鎖アナログが含まれる。前記改変誘導体を含むものは、A19、B16又はB25位のアミノ酸の4-アミノフェニルアラニンへの改変、又はA5、A8、A9、A10、A12、A14、A15、A17、A18、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B17、B20、B21、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置における1つ以上のアミノ酸置換、又はB1 - 4及びB26 - 30位の任意の又は全ての欠失を含む。本明細書で用いられる“インスリンプロドラッグアナログ”は、インスリンの活性又はIGF1系インスリンアナログの活性（例えばインスリン及びIGF-1受容体と相互作用する能力）に干渉する位置で、アミド結

40

50

合を介して、ジペプチドの共有結合による付着によって改変されてあるインスリンペプチド（又は実施例9で開示するIGF1系インスリンアナログ）を指す。

本明細書で用いられるように、“単鎖インスリンアナログ”という用語は、インスリンA鎖及びB鎖が直鎖として共有結合により連結される、構造的に関連するタンパク質の一群を包含する。

【0030】

本明細書で用いられるようにアミノ酸の“改変”は、アミノ酸の置換、付加若しくは欠失、又は化学基のアミノ酸から/アミノ酸への付加及び/又は除去によるアミノ酸の誘導を指し、さらにヒトのタンパク質で通常的に見いだされる20アミノ酸と同様に非定型的若しくは天然に存在しないアミノ酸のいずれかによる置換又はそれらの付加を含む。非定型的アミノ酸の市場の供給元には、シグマ-アルドリッチ（Sigma-Aldrich（Milwaukee, WI））、ケムペップ社（ChemPep Inc.（Miami, FL））、及びゲンザイムファーマシューティカル（Genzyme Pharmaceuticals（Cambridge, MA））が含まれる。非定型アミノ酸は市場の供給業者から購入するか、最初から合成するか、又は天然に存在するアミノ酸から化学的に改変若しくは誘導することができる。

本明細書で用いられるように“置換”は1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で入れ替えることを指す。本出願を通して、文字及び数字による具体的なアミノ酸の言及は全て、自然のままのヒトインスリンA鎖（配列番号:1）若しくはB鎖（配列番号:2）又は前記の任意のアナログの対応するアミノ酸の位置と対比させたA鎖（例えばA5位）又はB鎖（例えばB5位）の位置のアミノ酸を指す。例えば、本明細書で（更なる説明を全く含まずに）“B28位”と言え、配列番号:2の第一のアミノ酸が欠失しているインスリンアナログのB鎖の対応するB27位を意味するであろう。

本明細書で用いられるように“保存的アミノ酸置換”という用語は、本明細書では以下の5グループの1つの中での交換と定義される：

- I. 小さな脂肪族の非極性又はわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；
- II. 極性の陰性荷電残基及びそれらのアミド：Asp、Asn、Glu、Gln；
- III. 極性の陽性荷電残基：His、Arg、Lys、オルニチン（Orn）；
- IV. 大きな脂肪族の非極性残基：Met、Leu、Ile、Val、Cys、ノルロイシン（Nle）、ホモシステイン；
- V. 大きな芳香族残基：Phe、Tyr、Trp、アセチルフェニルアラニン。

【0031】

本明細書で用いられるように“ポリエチレングリコール鎖”又は“PEG鎖”という包括的用語は、一般式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ （式中nは少なくとも9）で表されるエチレンオキシドと水の分枝又は直鎖状の縮合ポリマーの混合物を指す。更なる特徴付けが全くなければ、前記用語は、500から80,000ダルトンの範囲から選択される平均総分子量を有するエチレングリコールのポリマーを含むことが意図される。“ポリエチレングリコール鎖”又は“PEG鎖”を数字の接尾辞と組み合わせて用いて、その近接する平均総分子量が示される。例えば、PEG-5000は約5000ダルトンの平均総分子量を有するポリエチレングリコール鎖を指す。

本明細書で用いられるように“PEG化”という用語及び同様な用語は、ある化合物にポリエチレングリコール鎖を連結することによってその自然のままの状態から改変されてある化合物を指す。“PEG化ポリペプチド”は、PEG鎖が当該ポリペプチドに共有結合されたポリペプチドである。

本明細書で用いられるように“リンカー”は、2つの別個の実体を結合させて別の1つの実体にする結合、分子又は分子群である。リンカーは2つの実体の最適な間隙を提供することができ、さらにまた2つの実体を互に分離させることができる不安定な結合を供給することができる。不安定な結合には光切断性基、酸不安定性部分、塩基不安定性部分、及び酵素切断性基が含まれる。

本明細書で用いられるように“インスリンダイマー”は、リンカーを介して互に共有結合された2つのインスリンペプチドを含む複合体である。インスリンダイマーという用語

10

20

30

40

50

は、制限的語句を全く含まずに用いられるときインスリンホモダイマー及びインスリンヘテロダイマーの両方を包含する。インスリンホモダイマーは2つの同一のサブユニット（各々はA鎖及びB鎖を含む）を含み、一方、インスリンヘテロダイマーは、異なる2つのサブユニット（各々はA鎖及びB鎖を含む）を含むが、ただしこの2つのサブユニットは実質的に互いに類似する。

【0032】

本明細書で用いられる“ C_1 - C_n アルキル”（式中 n は1から n でありうる）という用語は、1つから規定された数の炭素原子を有する分枝又は直鎖アルキル基を表す。典型的な C_1 - C_6 アルキル基には、メチル、エチル、 n -プロピル、 iso -プロピル、ブチル、 iso -ブチル、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが含まれるが、ただしこれらに限定され

10

れない。本明細書で用いられる“ C_2 - C_n アルケニル”という用語は、2から規定数の炭素原子及び少なくとも1つの二重結合を有するオレフィン系列不飽和の分枝又は直鎖基を表す。そのような基の例には、1-プロペニル、2-プロペニル（ $-CH_2-CH=CH_2$ ）、1,3-ブタジエニル（ $-CH=CHCH=CH_2$ ）、1-ブテニル（ $-CH=CHCH_2CH_3$ ）、ヘキセニル、ペンテニルなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

“ C_2 - C_n アルキニル”という用語は、2から n 炭素原子及び少なくとも1つの三重結合を有する不飽和の分枝又は直鎖基を表す。そのような基の例には、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニルなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

20

本明細書で用いられるように“アリール”という用語は、1つ又は2つの芳香環を有する単環式又は二環式炭素環式環系と定義され、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、インデニルなどが含まれるがただしこれらに限定されない。アリール環のサイズ及び置換基又は連結基の存在は、存在する炭素の数を指定することによって示される。例えば“(C₁-C₃アルキル)(C₆-C₁₀アリール)”という用語は、親部分に1から3員のアルキル鎖を介して結合される6から10員のアリールを指す。

【0033】

本明細書で用いられる“ヘテロアリール”という用語は、1つ又は2つの芳香環を含み、かつ芳香環の中に少なくとも1つの窒素、酸素又は硫黄原子を含む単環式又は二環式環系と定義される。ヘテロアリール環のサイズ及び置換基又は連結基の存在は、存在する炭素の数を指定することによって示される。例えば“(C₁-C_nアルキル)(C₅-C₆ヘテロアリール)”という用語は、親部分に1から“ n ”員のアルキル鎖を介して結合される5又は6員のヘテロアリールを指す。

30

“ C_3 - C_n シクロアルキル”という用語は、非芳香環性、単環式又は多環式環であり存在する炭素原子の数を示す下付き数字を有する炭素及び水素原子を含むものと定義される。例えば、 C_3 - C_8 シクロアルキルという用語は、化合物シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルを表す。

“ C_3 - C_n 複素環”という用語は、1つから“ $n-1$ ”個のヘテロ原子を含むシクロアルキル環系と定義され、ここでヘテロ原子は酸素、硫黄及び窒素から成る群から選択される。例えば“5員の複素環”又は“ C_5 複素環”という用語には、1つのヘテロ原子を含む5員の複素環（例えばチオフェン、ピロール、フラン）；1,2又は1,3位に2つのヘテロ原子を含む5員の複素環（例えばオキサゾール、ピラゾール、イミダゾール、チアゾール、プリン）；3つのヘテロ原子を含む5員の複素環（例えばトリアゾール、チアジアゾール）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

40

【0034】

本明細書で用いられる“ C_3 - C_n 員環”という用語は、互いに連結され環を形成する合計3から“ n ”個の元素を含む飽和又は不飽和の炭化水素環構造と定義され、ここで環の元素はC、O、S及びNから成る群から選択される。前記用語はシクロアルキル、複素環、アリール及びヘテロアリールを包含することが意図される。

本明細書で用いられるように“ハロ”という用語は、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素か

50

ら成る群の1つ以上のメンバーと定義される。

本明細書で用いられるように“荷電アミノ酸”という用語は、生理学的pHの水溶液中で陰性に荷電する（すなわち脱プロトン化する）又は陽性に荷電する（すなわちプロトン化する）側鎖を含むアミノ酸と定義される。例えば、陰性荷電アミノ酸にはアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、及びホモグルタミン酸が含まれ、一方、陽性荷電アミノ酸にはアルギニン、リジン及びヒスチジンが含まれる。荷電アミノ酸は、ヒトのタンパク質で通常的に見いだされる20アミノ酸の中の荷電アミノ酸とともに非定型又は天然に存在しないアミノ酸も同様に含む。

【0035】

本明細書で用いられるように“酸性アミノ酸”という用語は、第二の酸性部分（すなわち全てのアミノ酸が所有する -カルボキシル基以外のものであって、例えばカルボン酸又はスルホン酸基を含む）を含むアミノ酸と定義される。

本明細書で用いられるように、更なる指定を含まない“患者”という用語は、飼育された温血脊椎動物（例えば家畜、ウマ、ネコ、イヌ及び他のペットを含むが、ただしこれらに限定されない）、哺乳動物及び人間を包含することが意図される。

本明細書で用いられるように“血漿タンパク質との不可逆結合”又は“血清アルブミンとの不可逆結合”という語句は、結合された血漿タンパク質/血清アルブミンが生理学的条件下で実質的に遊離されない、高親和性結合と定義される。アシル化インスリンの文脈では、アルブミンと“不可逆的に結合する”ために十分に大きいアシル又はアルキル基は、患者への投与に際して血糖を低下させる基礎インスリンペプチドの能力を、投与後6時間経過したとき、当該アシル又はアルキル基を欠く同じインスリンペプチドで達成される能力の10%未満に抑制するアシル又はアルキル基と定義される。

【0036】

本開示はインスリンプロドラッグ誘導体を提供し、前記誘導体は、当該インスリンペプチドの作用の開始を遅らせかつその半減期を増強し、したがって基礎インスリンペプチドの治療インデックスを改善するように処方される。本明細書に開示するインスリンプロドラッグの化学構造は、非酵素性分解メカニズムにより当該プロドラッグの活性化を可能にする。開示のプロドラッグの化学構造は有機部分に化学的に連結させることができ、この有機部分は哺乳動物の血漿タンパク質と不可逆的に結合し、したがって投与に際して当該インスリンペプチドを不活化する。ある実施態様では、有機部分は血清アルブミンと結合するために十分なサイズのアシル又はアルキル基である。別の実施態様では、有機部分は胆汁酸である。胆汁酸は適切ないずれの胆汁酸でも良く、前記には、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、及びコレステロール酸が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

特定の実施態様では、インスリンアナログはコレステロール酸を含み、前記コレステロール酸は、アルキル化des-アミノCysスペーサー（すなわちアルキル化3-メルカプトプロピオン酸スペーサー）を介してインスリンアナログのLys残基に連結される。アルキル化des-アミノCysスペーサーは、例えばドデカエチレングリコール部分を含むdes-アミノCysスペーサーでありうる。

この新規な生物体にやさしいプロドラッグ化学構造は生理学的条件下で（例えば水性環境下でpH約7、37℃）偶発的に分解し、ここで、プロドラッグエレメントの切断は結合された血漿タンパク質（例えばアルブミン）をインスリンペプチドから分離させて当該インスリンペプチドに活性を取り戻させる。ある実施態様では、アシル又はアルキル基が本明細書に開示のペプチドプロドラッグエレメントに連結され（ここでアルキル又はアシル基は直鎖状又は分枝状）、さらにある実施態様では、前記はC18からC30の炭化水素骨格の鎖である。例えばアシル又はアルキル基はC18、C20、C22、C24、C26、C28又はC30の炭化水素骨格鎖のいずれかでありうる。ある実施態様では、開示するプロドラッグの化学構造は、C16からC20の脂肪酸（例えばC18脂肪酸又はC20脂肪酸）に化学的に連結される。プロドラッグ誘導体の持続時間はペプチドプロドラッグエレメントの配列を選択することによって決定され、したがってプロドラッグ処方物の融通性を可能にする。

【0037】

ある実施態様では、非酵素的活性化半減期 ($t_{1/2}$) が、生理学的条件下で約2から約240時間、約2から約168時間、約6から約168時間、又は約12から約168時間、又は約12から約120時間であるプロドラッグが提供される。ある実施態様では、血清中及び生理学的条件下でのプロドラッグエレメントの切断半減期は約0.5日から約10日である。本明細書に開示する生理学的条件は、水性環境下で、約35から40 の温度及び約7.0から約7.4のpH、より典型的には7.2から7.4のpH及び36から38 の温度を含むことが意図される。ある実施態様では、生理学的条件下でジケトピペラジン形成を経ることが出来るペプチドが、インスリンペプチドの脂肪族アミノ基にアミド結合を介して共有結合により連結される。

有利には、プロドラッグの切断 (したがって活性化) の速度は、ジペプチドプロ部分の構造及び立体空間配置さらにまた求核性の強度に左右される。本明細書に開示するプロドラッグは最終的には、当該薬剤の自然のままの受容体によって認識されうる構造に化学的に変換され、この場合、この化学的変換の速度はin vivoの生物学的作用の開始時間及び持続時間を決定するであろう。本出願で開示するプロドラッグの化学構造は、追加の化学添加物又は酵素に依存しない分子内化学反応を抛りどころとする。変換の速度はジペプチドの置換基の化学的性質及び生理学的条件下でのその切断によって制御される。生理学的pH及び温度は高度に規定された範囲内で厳密に調節されるので、プロドラッグからドラッグ (薬剤) への変換の速度は一患者内でさらに患者間で高い再現性を示すであろう。

【0038】

本明細書で開示されるようにプロドラッグが提供され、ここで当該生物活性ポリペプチドは、少なくとも1時間、より典型的には24時間を超えるが10日を超えない半減期延長を有し、固有の化学的不安定性によって駆動される非酵素反応を介して生理学的条件下で活性形に変換される。ある実施態様では、プロドラッグの非酵素活性化 $t_{1/2}$ 時間は、約12から約168時間、より典型的には12から約120時間又は12から72時間であり、ある実施態様では、 $t_{1/2}$ 時間は、37 及びpH7.2のリン酸緩衝食塩水溶液 (PBS) でプロドラッグをインキュベートすることによって測定したとき24 - 48時間である。多様なプロドラッグの半減期が式 $t_{1/2} = .693/k$ を用いて計算される (式中 'k' はプロドラッグの分解の一次速度定数である)。ある実施態様では、プロドラッグの活性化は、アミド結合連結ジペプチドの切断、並びにジケトピペラジン又はジケトモルホリン及び活性インスリンペプチドの形成後に生じる (ジペプチドは、血清アルブミンとの結合に十分なサイズ (例えばC18からC30) のアルキル又はアシル基に共有結合されている)。

生理学的条件下で分子内分解を促進して活性インスリンペプチドを遊離させる、天然又は合成アミノ酸から構成される具体的なジペプチドが同定された。ペプチドは、自然のままのインスリンに存在するアミノ基に、又は自然のままのインスリンペプチドを改変することによりインスリンに導入されたアミノ基に (アミド結合を介して) 連結できる。追加のアミノ酸をジペプチドのカルボキシ末端に付加して、トリペプチド又はテトラペプチド (前記はアミド結合を介してインスリンペプチドに連結できる) を生成することが出来る。追加の1つ又は2つのアミノ酸が最初のジペプチドエレメントに付加されてあるそれら実施態様では、ジケトピペラジン又はジケトモルホリンを形成するジペプチドの切断に際して、追加の1つ又は2つのアミノ酸はインスリンペプチドに付着されたままである。ある実施態様では、1つ又は2つの追加アミノ酸は荷電アミノ酸である。

【0039】

ある実施態様では、ジペプチド構造は哺乳動物血清に存在するペプチダーゼ (例えばジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV)) による切断に抵抗するように選択される。したがって、ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントの生物活性ペプチド (例えばインスリンペプチド (Q)) からの切断速度は、血清プロテアーゼの存在下で生理学的条件を用いて反応を実施するとき、プロテアーゼの非存在下で反応を実施する場合に対比して実質的に強化されない (例えば2Xより大きくない)。したがって、インスリンペプチドからのジペプチドプロドラッグエレメントの (生理学的条件下でPBS中における) 切断半減期は、DPP-IVを含む溶液中におけるインスリンペプチドからのジペプチドプロドラッ

グエレメントの切断半減期の2倍、3倍、4倍又は5倍より長くない。ある実施態様では、DP P-IVプロテアーゼを含む溶液は血清、より具体的には哺乳動物の血清（ヒトの血清を含む）である。

【0040】

ある実施態様では、A-B-C-Qの構造を含むインスリンプロドラッグが提供され、式中、Qはインスリンペプチドであり、A-B-Cはアミド結合を介してQに連結されるペプチドであり、Aはアミノ酸であり、BはN-アルキル化アミノ酸であり、Cはアミド結合、 X_{70} 又は $X_{70}X_{71}$ であり、ここで X_{70} 及び X_{71} は、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から独立に選択されるアミノ酸であり、A又はBの1つは C_{16} - C_{30} アシル基又は C_{16} - C_{30} アルキル基に共有結合により連結される側鎖を含む。ある実施態様では、 C_{16} - C_{30} アシル基又は C_{16} - C_{30} アルキル基に連結されるアミノ酸は (C_1-C_8) アルキル NH_2 側鎖を有する。ある実施態様では、Aは、 (C_1-C_8) アルキル NH_2 側鎖を含むアミノ酸又はヒドロキシル酸であり、ここで当該側鎖は C_{16} - C_{30} アシル基又は C_{16} - C_{30} アルキル基に共有結合により連結される。ある実施態様では、Aの側鎖とアシル又はアルキル基との間の連結はスペーサーを介し、前記スペーサーは1つ又は2つの荷電アミノ酸を含む。ある実施態様では、BはN-アルキルアミノ酸であり、Cは、アミド結合、 X_{70} 又は $X_{70}X_{71}$ であり、ここで X_{70} 及び X_{71} は、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から独立に選択されるアミノ酸である。さらにまた、A、B及びCはアミド結合を介して互に連結され、さらにA-B-Cペプチドは、Qの脂肪族アミノ基を介してアミド結合によりQに連結される。ある実施態様では、脂肪族アミノ基は、A鎖又はB鎖のN-末端アミノ酸のアルファアミノ基、又はQのB3、B28又はB29アミノ酸の側鎖の脂肪族アミノ基から選択される。ある実施態様では、A-B-Cペプチドは、インスリンペプチドのB3、B28又はB29位でリジン側鎖のアミノ基を介してアミド結合によりQに連結される。ある実施態様では、A-B-Cペプチドは、インスリンB鎖のN-末端アミンを介してアミド結合によりQに連結される。

【0041】

さらに別の実施態様では、A-B-Cペプチドは、インスリンB鎖のN-末端アミンを介してアミド結合によりQに連結され、ここでアミノ酸A又はアミノ酸Bの側鎖は、血漿タンパク質と不可逆的に結合する部分に共有結合により連結される。ある実施態様では、血漿タンパク質と不可逆的に結合する部分は C_{16} - C_{30} アシル基又は C_{16} - C_{30} アルキル基であり、さらに別の実施態様では、Aアミノ酸又はBアミノ酸は (C_1-C_8) アルキル NH_2 側鎖を含み、ここで C_{16} - C_{30} アシル基又は C_{16} - C_{30} アルキル基は、 (C_1-C_8) アルキル NH_2 側鎖の脂肪族アミンを介して共有結合される。ある実施態様では、Aアミノ酸は血漿タンパク質と不可逆的に結合する部分に共有結合により連結される。

本明細書に開示するように、ある実施態様では、インスリンプロドラッグのプロドラッグエレメントのA又はBアミノ酸は、A又はBの側鎖のアミン、ヒドロキシル又はチオール直接的又はスペーサー部分を介するアシル化によってアシル基を含むように改変される。ある実施態様にしたがえば、 C_{16} - C_{30} アシル基又は C_{16} - C_{30} アルキル基はスペーサーを介してAに連結され、ここでスペーサーはインスリンペプチドのアミノ酸とアシル又はアルキル基との間に配置される。例示的实施態様では、スペーサーは、アミノ酸、ジペプチド若しくはトリペプチド、又は親水性二官能基スペーサーである。

ある実施態様では、スペーサーは1つ又は2つの荷電アミノ酸を含む。ある実施態様では、スペーサーはただ1つの荷電アミノ酸である。別の実施態様では、スペーサーはジペプチドであり、ここでジペプチドは1つ又は2つの荷電アミノ酸を含む。ある実施態様では、スペーサーはAsp、Glu、His、Arg、Lys及び $NH_2(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mCOOH$ を含むスペーサーから成る群から選択される（式中、mは1から6の任意の整数で、nは2から12の任意の整数である）。ある実施態様では、Aは、ジペプチドガンマグルタミン酸-ガンマグルタミン酸スペーサーを介してC18-C22脂肪酸でアシル化された (C_1-C_8) アルキル NH_2 側鎖を含む。

【0042】

構造A-B-CのBアミノ酸は、そのN-アルキル基がC₁-C₁₈分枝、環式又は直鎖炭化水素鎖を含むN-アルキル化アミノ酸である。ある実施態様にしたがえば、Bは、C₁-C₁₈アルキル、C₃-C₁₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)(C₄-C₈シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₅複素環)、又は(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)でN-アルキル化されたアミノ酸である。ある実施態様では、構造A-B-CのBアミノ酸は、C₁-C₆アルキル、(C₁-C₄アルキル)(C₅-C₆アリール)、又は(C₁-C₄アルキル)(C₄-C₆シクロアルキル)でN-アルキル化される。ある実施態様では、Bはn-プロピル、iso-プロピル、ブチル、iso-ブチル、sec-ブチル又はtert-ブチルでN-アルキル化される。さらに別の実施態様では、Bはiso-プロピル、sec-ブチル、又はtert-ブチルでN-アルキル化される。ある実施態様では、Bは、グリシン(N-C₁-C₁₀アルキル)、イソロイシン(N-C₁-C₁₀アルキル)、バリン(N-C₁-C₁₀アルキル)、及びスレオニン(N-C₁-C₁₀アルキル)から成る群から選択される。ある実施態様では、Bは、グリシン(N-C₁-C₆アルキル)、イソロイシン(N-C₁-C₆アルキル)、バリン(N-C₁-C₆アルキル)、及びスレオニン(N-C₁-C₆アルキル)から成る群から選択される。ある実施態様では、Bは、グリシン(N-メチル)、グリシン(N-エチル)、グリシン(N-プロピル)、グリシン(N-ブチル)、グリシン(sec-ブチル)、グリシン(tert-ブチル)、グリシン(N-ペンチル)、グリシン(N-ヘキシル)、グリシン(N-ヘプチル)、及びグリシン(N-オクチル)から成る群から選択される。ある実施態様では、Bは、グリシン(N-iso-プロピル)、グリシン(N-sec-ブチル)、又はグリシン(N-tert-ブチル)から成る群から選択される。

10

ある実施態様にしたがえば、式A-B-CのCはアミノ酸又はジペプチドである。ある実施態様では、Cを含むアミノ酸は、以下から成る群から独立に選択される側鎖を有する少なくとも1つのアミノ酸を含む：H、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)SO₃H、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂。ある実施態様では、Cはジペプチドであり、ここでジペプチドのアミノ酸の一方又は両方が、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)SO₃H、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂から成る群から選択される側鎖を含む。ある実施態様では、Cのアミノ酸は、独立にグリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される。ある実施態様では、Cのアミノ酸は、独立にグリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される。

20

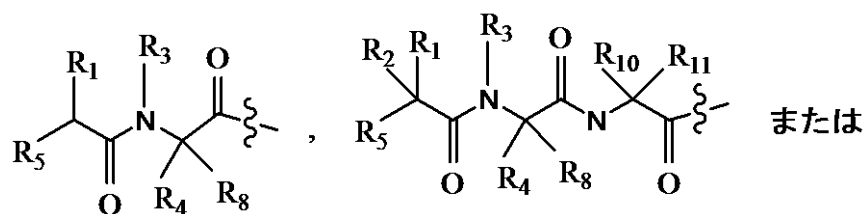
【0043】

30

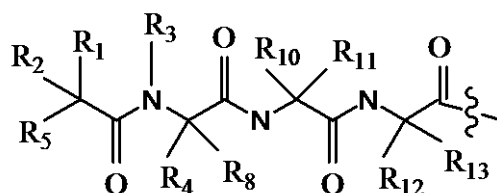
ある実施態様では、構造A-B-C-Qを含むインスリンプロドラッグが提供され、ここでQはインスリンペプチドでありA-B-Cは以下の構造を含み、

【0044】

【化5】



40



【0045】

式中、

R₁は、C₁₈-C₃₀アルキル、(C₁-C₆アルキル)NH-R₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり；

50

R_2 はH又は C_1 - C_6 アルキルであり；

R_3 は、 C_2 - C_4 アルキル、 C_3 - C_8 アルケニル、(C_0 - C_4 アルキル)(C_4 - C_6 シクロアルキル)、(C_0 - C_4 アルキル)(C_3 - C_5 複素環)、(C_0 - C_4 アルキル)(C_6 - C_{10} アリール)から成る群から選択されるか、又は R_4 及び R_3 はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員複素環式環を形成し；
 R_4 及び R_8 は独立に、H、 C_1 - C_{18} アルキル、 C_2 - C_{18} アルケニル、(C_1 - C_{18} アルキル)OH、(C_1 - C_{18} アルキル)SH、(C_2 - C_3 アルキル)SCH₃、(C_1 - C_4 アルキル)CONH₂、(C_1 - C_4 アルキル)COOH、(C_1 - C_4 アルキル)NH₂、(C_1 - C_4 アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C_0 - C_4 アルキル)(C_3 - C_6 シクロアルキル)、(C_0 - C_4 アルキル)(C_2 - C_5 複素環)、(C_0 - C_4 アルキル)(C_6 - C_{10} アリール) R_7 、(C_1 - C_4 アルキル)(C_3 - C_9 ヘテロアリール)、及び C_1 - C_{12} アルキル(W_1) C_1 - C_{12} アルキル(式中 W_1 はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子)から成る群から選択されるか、又は R_4 及び R_8 はそれらに結合する原子と一緒に C_3 - C_6 シクロアルキルを形成し；

R_5 はNHR₆又はOHであり；

R_6 はH又は C_1 - C_8 アルキルであり；

R_7 はH、OH、 C_1 - C_{18} アルキル、 C_2 - C_{18} アルケニル、(C_0 - C_4 アルキル)NH₂、及び(C_0 - C_4 アルキル)OHから成る群から選択され；

R_9 は C_{18} - C_{30} アシルから成る群から選択され；

R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} は独立にH、CH₂、CH₂OH、CH₂SH、(C_1 - C_4 アルキル)CONH₂、(C_1 - C_4 アルキル)COOH、(C_1 - C_4 アルキル)NH₂、(C_1 - C_4 アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂及びCH₂(C_3 - N_2 複素環)から成る群から選択され；さらに

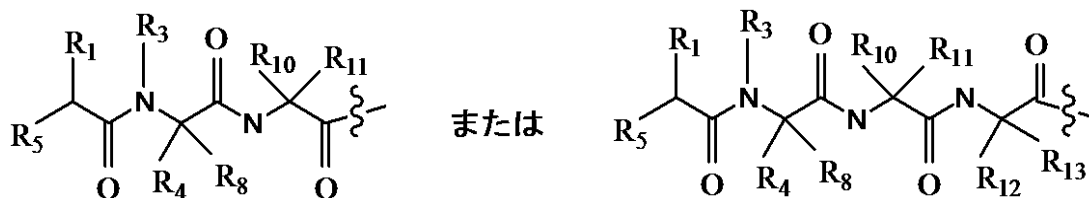
S_1 は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであり、ここでA-B-Cは、Qの脂肪族アミノ基を介してアミド結合によりQに連結される。ある実施態様では、 R_1 は(C_1 - C_6 アルキル)NH- S_1 - R_9 であり； R_3 は C_2 - C_4 アルキルから成る群から選択され； R_2 、 R_4 、 R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり； R_5 はNH₂であり； R_8 はH又は C_1 - C_8 アルキルであり； R_9 は C_{18} - C_{30} アシルであり； R_{10} 及び R_{12} は、独立に(C_1 - C_4 アルキル)COOH、(C_1 - C_4 アルキル)NH₂、(C_1 - C_4 アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂及びCH₂(C_3 - N_2 複素環)から成る群から選択され；さらに S_1 は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸を含むスペーサーであり、A-B-Cは、インスリンのB鎖のN-末端アミンを介してアミド結合によりQに連結される。

【0046】

ある実施態様では、構造A-B-C-Qを含むインスリンプロドラッグが提供され、ここでQはインスリンペプチドでありA-B-Cは以下の構造を含み、

【0047】

【化6】



【0048】

式中、

R_1 は C_{18} - C_{30} アルキル、(C_1 - C_6 アルキル)NH- S_1 - R_9 又は(C_1 - C_6 アルキル)NH- S_1 - R_9 であり；

R_3 は C_2 - C_4 アルキルから成る群から選択され；

R_4 、 R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり；

R_5 はNH₂であり；

R_8 はH又は C_1 - C_8 アルキルであり；

R_9 は C_{18} - C_{30} アシルであり；さらに

R_{10} 及び R_{12} は、独立に(C_1 - C_4 アルキル)COOH、(C_1 - C_4 アルキル)NH₂、(C_1 - C_4 アルキル)NHC(

10

20

30

40

50

$\text{NH}_2^+ \text{NH}_2$ 及び $\text{CH}_2(\text{C}_3\text{-N}_2\text{複素環})$ から成る群から選択され；さらに

S_1 は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであり、ここでA-B-Cは、Qの脂肪族アミノ基を介してアミド結合によりQに連結される。ある実施態様では、 R_1 は $(\text{CH}_2)_4\text{-S}_1\text{-NHR}_9$ 又は $(\text{CH}_2)_4\text{-NHR}_9$ であり、 R_3 は $\text{C}_3\text{-C}_4$ アルキルであり、 R_5 は NH_2 であり、 R_9 は $\text{C}_{18}\text{-C}_{28}$ アシルであり、A-B-Cは、インスリンのB鎖のN-末端アミンを介してアミド結合によりQに連結される。

【 0 0 4 9 】

本明細書に開示するプロドラッグのインスリンペプチドは、インスリン受容体でアゴニスト活性を有する、当業者に公知である既知インスリンのいずれかを含むことができる。ある実施態様にしたがえば、インスリンペプチドは、 $\text{GIVEQCCX}_8\text{SICSLYQLENYCX}_{21}\text{R}_{44}$ (配列番号:3) のA鎖配列及び $\text{R}_{22}\text{-X}_{25}\text{LCGX}_{29}\text{X}_{30}\text{LVX}_{33}\text{X}_{34}\text{LYLVCGX}_{41}\text{X}_{42}\text{GFX}_{45}$ (配列番号:20) のB鎖配列を含み (B鎖はジスルフィド結合を介してA鎖に連結される)、

X_8 はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され、

X_{21} はアスパラギン、オルニチン、グリシン、アラニン、スレオニン及びセリンから成る群から選択され、

X_{25} はヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{29} はアラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸、及びシステイン酸から成る群から選択され、

X_{33} はアスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X_{34} はアラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{41} はグルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、

X_{42} はアラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され、

X_{45} はチロシン又はフェニルアラニンであり、

R_{22} は、AYRPSE (配列番号:14)、FVNQ (配列番号:12)、FVKQ (配列番号:8)、PGPE (配列番号:11)、トリペプチドのグリシン-プロリン-グルタミン酸、トリペプチドのバリン-アスパラギン-グルタミン、ジペプチドのプロリン-グルタミン酸、ジペプチドのアスパラギン-グルタミン、グルタミン、グルタミン酸、及びN-末端アミンから成る群から選択され、

さらに R_{44} は COOH 又は CONH_2 である。

【 0 0 5 0 】

ある実施態様では、インスリンペプチドは、 $\text{GIVEQCCX}_8\text{SICSLYQLENYCX}_{21}$ (配列番号:3) のA鎖配列及び $\text{R}_{22}\text{-HLCGSHLVEALYLVCGERGFX}_{45}$ (配列番号:15) のB鎖配列を含み、ここで、前記B鎖はジスルフィド結合を介して前記A鎖と連結され、

R_{22} は、結合又は、FVNQ (配列番号:12)、FVKQ (配列番号:8)、VNQ、NQ及びQから成る群から選択される1から4アミノ酸の配列であり、

X_8 はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され、

X_{21} はアスパラギン、リジン、グリシン、アラニンから成る群から選択され、さらに

X_{45} はヒスチジン、チロシン又はフェニルアラニンである。

ある実施態様では、A鎖は配列 $\text{GIVEQCCTSI}\text{CSLYQLENYCN}\text{-R}_{44}$ (配列番号:1) を含み、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号:2)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (配列番号:9)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (配列番号:5)、及びFVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (配列番号:6) から成る群から選択される配列を含む (式中 R_{44} は COOH 又は CONH_2 である)。

【 0 0 5 1 】

本明細書に開示するインスリンプロドラッグをさらに改変して保存時のそれらの安定性を改善することができる。ある実施態様では、ジペプチドエレメントのN-末端アミンは、患者に投与するまでN-末端に結合されたままの部分に連結される。ある実施態様では、式A-B-C-Qのインスリンプロドラッグはさらに、AのN-末端アミンを介して連結される血清酵

10

20

30

40

50

素切断性部分を含む。AのN-末端への血清酵素切断性部分の連結は、酵素活性の非存在下でジケトピペラジン又はジケトモルホリンの形成及び当該インスリンからのA-Bの切断を防ぐ。血清酵素への暴露に際して、血清酵素切断性部分は除去され、当該プロドラッグのその後の活性化は、A-Bの構造に基づいてA-Bを切断する非酵素的分解メカニズムに依存するであろう。ある実施態様では、酵素切断性部分は、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) によって切断されるペプチドである。ある実施態様では、血清酵素切断性ペプチドはAのN-末端アミンを介してAに連結され、前記ペプチドは配列Z-プロリン又はZ-アラニンを有し、ここでZは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択される。ある実施態様では、酵素切断性部分はジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) によって切断されるペプチドであり、前記には例えばジペプチドのArg-Pro、Lys-Pro又はGlu-Proが含まれる。

10

ある実施態様では、生理学的条件下の血清中でQから切断されるA-B-Cの切断半減期は約2から約168時間である。別の実施態様では、生理学的条件下の血清中におけるQからのA-B-Cの切断半減期は約0.5日から約10日である。

【 0 0 5 2 】

ある実施態様では、構造A-B-C-Qを含むインスリンプロドラッグ (Qはインスリンペプチドである) が提供され、

Aは(C₁-C₄アルキル)NH₂側鎖を含むアミノ酸であり、ここで、前記側鎖は血漿タンパク質に不可逆的に結合する部分と共有結合により連結され、前記部分はスペーサーを介してAの側鎖に連結され、前記スペーサーは1つ又は2つの荷電アミノ酸を含み；

20

BはN-アルキル化アミノ酸であり；

Cはアミド結合、X₇₀又はX₇₀X₇₁であり、ここでX₇₀及びX₇₁は、H、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)SO₃H、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂から成る群から独立に選択される側鎖を有するアミノ酸であり；

A-B-Cは、Qの脂肪族アミノ基を介してアミド結合によりQと連結され、前記脂肪族アミノ基は、A鎖若しくはB鎖のN-末端アミノ酸のアルファアミノ基又はQのB3、B28若しくはB29アミノ酸の側鎖の脂肪族アミノ基から選択される。ある実施態様では、血漿タンパク質に不可逆的に結合する部分はC₁₆-C₃₀アシル基又はC₁₆-C₃₀アルキルであり、ここでAの側鎖と前記アシル又はアルキル基との間の連結は前記スペーサーを介する。ある実施態様では、Cはアミノ酸又はジペプチドであり、ここでCのアミノ酸は、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される。ある実施態様では、Cはジペプチドであり、ここで前記ジペプチドのアミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される。ある実施態様では、Cはジペプチドであり、ここで前記2つのアミノ酸の一方はグリシン又はアラニンであり、ジペプチドの他方のアミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される。さらに別の実施態様では、Bは、C₁-C₁₈アルキル、C₃-C₁₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)(C₄-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₅複素環)、又は(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)でN-アルキル化されたアミノ酸である。

30

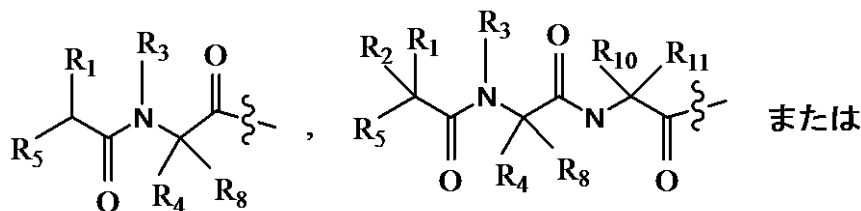
40

【 0 0 5 3 】

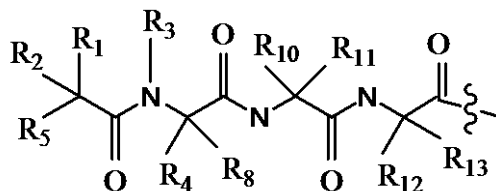
ある実施態様では、インスリンプロドラッグは下記一般構造のペプチドを含み、

【 0 0 5 4 】

【化 7】



または



10

【 0 0 5 5 】

前記ペプチドは、インスリンのA若しくはB鎖のN-末端アミノ基に又はB3、B28若しくはB29位のリジンの側鎖に連結され、ここで、

R₁は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり；

R₂はH又はC₁-C₆アルキルであり；

R₃は、C₂-C₄アルキル、C₃-C₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)(C₄-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)から成る群から選択されるか、又はR₄及びR₃はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員複素環式環を形成し；

20

R₄及びR₈は独立に、H、C₁-C₁₈アルキル、C₂-C₁₈アルケニル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₂-C₃アルキル)SCH₃、(C₁-C₄アルキル)CONH₂、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)、及びC₁-C₁₂アルキル(W₁)C₁-C₁₂アルキル(式中W₁はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子)から成る群から選択されるか、又はR₄及びR₈はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₆シクロアルキルを形成し；

R₁₀、R₁₁、R₁₂及びR₁₃は独立にH、CH₃、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；

30

R₅はNHR₆又はOHであり；

R₆はH又はC₁-C₈アルキルであり；

R₇はH、OH、C₁-C₁₈アルキル、C₂-C₁₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)NH₂、及び(C₀-C₄アルキル)OHから成る群から選択され；

R₉はC₁₈-C₃₀アシルから成る群から選択され；

S₁は結合又は1つから6つのアミノ酸から成るスペーサーであり、ここで前記スペーサーはアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン、及びリジンから成る群から選択される1つ以上の荷電アミノ酸を含む。ある実施態様では、S₁は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。

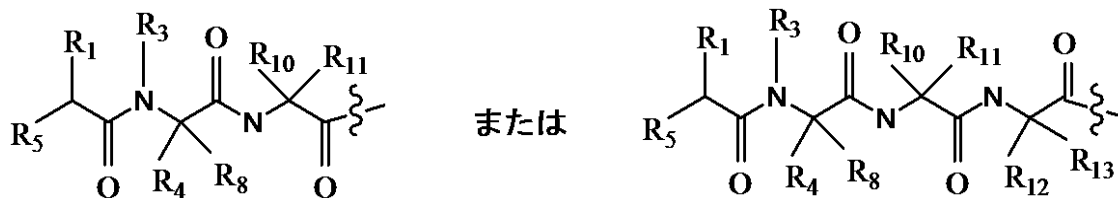
40

【 0 0 5 6 】

ある実施態様では、インスリンプロドラッグは下記の一般構造のペプチドを含み、

【 0 0 5 7 】

【化 8】



【 0 0 5 8】

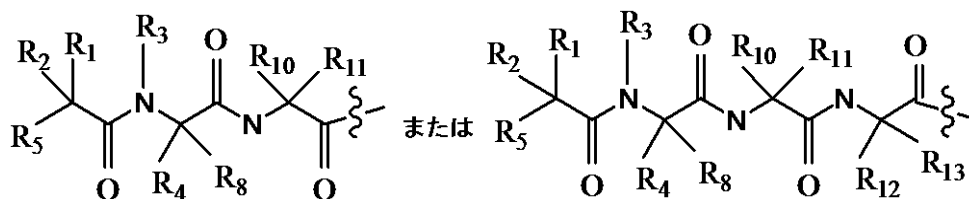
R_1 は C_{18} - C_{30} アルキル、 $(C_1$ - C_6 アルキル) NH - R_9 又は $(C_1$ - C_6 アルキル) NH - S_1 - R_9 であり、
 R_3 は C_2 - C_4 アルキルから成る群から選択され、
 R_4 、 R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり、
 R_5 は NH_2 であり、
 R_8 はH又は C_1 - C_8 アルキルであり、
 R_9 は C_{18} - C_{30} アシルであり、
 R_{10} 及び R_{12} は、独立に $(C_1$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) NH_2 、及び $(C_1$ - C_4 アルキル) $NHC(NH_2^+)NH_2$ から成る群から選択され、さらに
 S_1 は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン、及びリジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであり、インスリンのA若しくはB鎖のN-末端アミノ基に又はB3、B28若しくはB29位のリジンの側鎖に連結される。
ある実施態様では、 S_1 は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、及びリジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。ある実施態様では、式A-B-Cによって表されるペプチドは、インスリンのB鎖のN-末端アミノ基に連結される。さらに別の実施態様では、 R_1 は $(CH_2)_4$ - R_9 又は $(CH_2)_4$ - S_1 - NHR_9 であり、 R_3 は C_3 - C_4 アルキルであり、 R_5 は NH_2 であり、さらに R_9 は C_{18} - C_{28} アシルである。さらに別の実施態様では、 R_1 は $(CH_2)_4NHCO(CH_2)_{17}CH_3$ 、 $(CH_2)_4NHCO(CH_2)_{19}CH_3$ 及び $(CH_2)_4NHCO(CH_2)_{21}CH_3$ から成る群から選択される。

【 0 0 5 9】

ある実施態様にしたがえば、インスリンプロドラッグが提供され、ここで前記インスリンプロドラッグは、GIVEQCCTSI $CSLYQLENYCN$ - R_{44} (配列番号:1)のA鎖配列並びにFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号:2)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (配列番号:9)及びFVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (配列番号:6)から成る群から選択されるB鎖配列を含み、式中、 R_{44} は $COOH$ 又は $CONH_2$ であり、さらにプロドラッグエレメントは、A鎖若しくはB鎖のN-末端アミノ基で又はB3、B28若しくはB29位のリジンの側鎖アミンで前記インスリンペプチドに共有結合により連結され、ここでプロドラッグエレメントは以下の構造を含み：

【 0 0 6 0】

【化 9】



【 0 0 6 1】

式中、

R_1 は、H、 $(C_1$ - C_4 アルキル) O - S_1 - R_9 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) S - S_1 - R_9 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) $CONH$ - S_1 - R_9 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) COO - S_1 - R_9 、 $(C_1$ - C_6 アルキル) NH - S_1 - R_9 、 $(C_1$ - C_6 アルキル) NHR_9 及び $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール)- S_1 - R_9 から成る群から選択され；
 R_2 及び R_8 は、独立にH、 C_1 - C_8 アルキル、 C_2 - C_8 アルケニル、 $(C_1$ - C_4 アルキル) OH 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) SH 、 $(C_2$ - C_3 アルキル) SCH_3 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) $CONHH$ 、 $(C_1$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_1$ - C

₄アルキル)NHH、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)及びC₁-C₁₂アルキル(W₁)C₁-C₁₂アルキル(式中、W₁はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子)であるか、又はR₁及びR₂はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₁₂シクロアルキル又はアリールを形成し；

R₃は、C₁-C₁₈アルキル、C₃-C₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)(C₄-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)であるか、又はR₄及びR₃はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成し；

R₄はH、C₁-C₁₈アルキル、(C₁-C₆アルキル)NHR₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり；

R₅はOH又はNHR₆であり；

R₆はH、C₁-C₈アルキルであり；

R₇はH、OH及びOR₉から成る群から選択され；

R₉はC₁₆-C₃₀アシル及びC₁₆-C₃₀アルキルから成る群から選択され；

R₁₁及びR₁₃は各々H又はC₁-C₆アルキルであり；

R₁₀及びR₁₂は、独立にH、CH₃、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；さらに

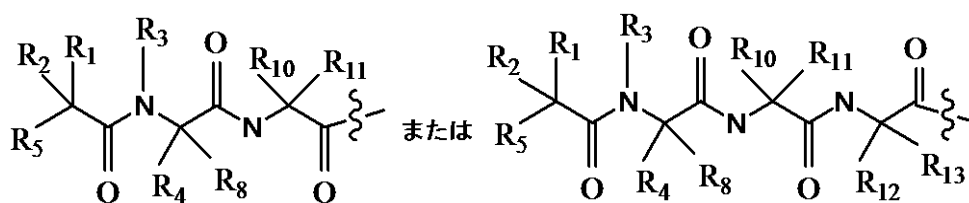
S₁は結合又は1つから6つのアミノ酸から成るスペーサーであり、ここで前記スペーサーは、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される1つ以上の荷電アミノ酸を含むが、ただしR₄がH又はC₁-C₁₈アルキルであるときR₁はH以外であることを条件とする。さらに別の実施態様では、R₁は(C₁-C₆アルキル)NHR₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり、R₂、R₄、R₁₁及びR₁₃は各々Hであり、R₅はNH₂であり；R₈はH又はC₁-C₈アルキルであり、R₉はC₁₈-C₃₀アシルであり、さらにS₁は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。別の実施態様では、R₁は(C₃-C₅アルキル)NH-S₁R₉又は(C₃-C₅アルキル)NHR₉であり、R₂、R₄、R₁₁及びR₁₃は各々Hであり、R₅はNH₂であり；R₈はH又はC₁-C₈アルキルであり、さらにR₉はC₁₈-C₃₀アシルである。

【0062】

別の実施態様では、インスリンプロドラッグは構造A-B-C-Qを含み(式中Qはインスリンペプチド)、さらにA-B-Cは下記構造を含み：

【0063】

【化10】



【0064】

式中、

A-B-Cは、A鎖若しくはB鎖のN-末端アミノ酸又はQのB3、B28若しくはB29アミノ酸の側鎖の脂肪族アミノ基を介してアミド結合によりQと連結され；R₂、R₄、R₈、R₁₁及びR₁₃は各々Hであり；R₁は(C₁-C₆アルキル)NHR₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり；R₃は、C₂-C₈アルキルであり；R₅はNH₂であり；R₁₀及びR₁₂は独立に、H、CH₃、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；R₉はC₁₈-C₃₀アシル及びC₁₈-C₃₀アルキルから成る群から選択され；さらにS₁は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。さらに別の実施態様では、R₁は(CH₂)₄NHR₉又は(CH₂)₄NH-S₁-R₉であり、R₃はC₃-C₄アルキルであり、R₉はC₁₈-C₂₈アシルである。

【0065】

10

20

30

40

50

ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するプロドラッグのインスリン構成要素は、GIVEQCCX₈SICSLYQLENYCX₂₁（配列番号:3）のA鎖配列及びR₂₂-HLCGSHLVEALYLVCGERGFX₄₅（配列番号:15）のB鎖配列を含み（B鎖はジスルフィド結合を介して前記A鎖に連結される）；R₂₂は、結合又は、FVNQ（配列番号:12）、FVKQ（配列番号:8）、VNQ、NQ及びQから成る群から選択される1から4アミノ酸の配列であり；X₈はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され；X₂₁はアスパラギン、リジン、オルニチン、グリシン及びアラニンから成る群から選択され；さらにX₄₅はヒスチジン、チロシン又はフェニルアラニンである。ある実施態様では、インスリンペプチドはA及びB鎖を含み、ここで、A鎖は配列GIVEQCC TSICSLYQLENYCN（配列番号:1）を含み、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号:2）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT（配列番号:9）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFYTDKT（配列番号:5）、FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT（配列番号:6）から成る群から選択される配列を含む。

10

ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するプロドラッグのインスリン構成要素は、GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈YCX₂₁-R₄₄（配列番号:19）のA鎖配列及びR₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号:20）のB鎖配列を含み（前記B鎖はジスルフィド結合を介して前記A鎖に連結される）、

X₄はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、

X₅はグルタミン又はグルタミン酸であり、

X₈はヒスチジン、スレオニン又はフェニルアラニンであり、

X₉はセリン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

20

X₁₀はイソロイシン又はセリンであり、

X₁₂はセリン又はアスパラギン酸であり、

X₁₄はチロシン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₅はグルタミン、グルタミン酸、アルギニン、アラニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり、

X₁₇はグルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、リジン、オルニチン又はグルタミンであり、

X₁₈はメチオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はスレオニンであり、

X₂₁は、アラニン、グリシン、セリン、バリン、スレオニン、イソロイシン、ロイシン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジン、トリプトファン、チロシン、及びメチオニンから成る群から選択され、

30

X₂₅はヒスチジン又はスレオニンであり、

X₂₉はアラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X₃₀はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X₃₃はアスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X₃₄はアラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X₄₁はグルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、

X₄₂はアラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され、

40

X₄₅はチロシン又はフェニルアラニンであり、

R₂₂はAYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、FVKQ（配列番号:8）、PGPE（配列番号:11）、トリペプチドのグリシン-プロリン-グルタミン酸、トリペプチドのバリン-アスパラギン-グルタミン、ジペプチドのプロリン-グルタミン酸、ジペプチドのアスパラギン-グルタミン、グルタミン、グルタミン酸、及びN-末端アミンから成る群から選択され；さらに

R₄₄はCOOH又はCONH₂である。

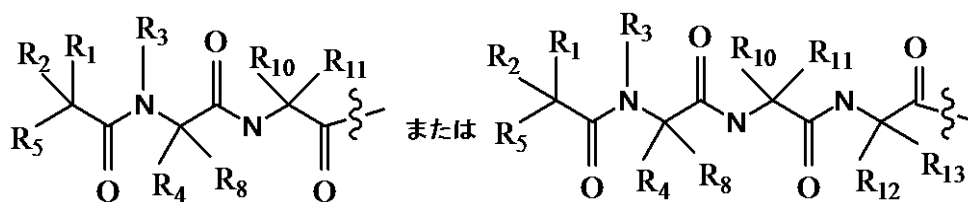
【0066】

ある実施態様にしたがえば、インスリンプロドラッグは構造A-B-C-Q（式中Qはインスリンペプチド）を含み、さらにA-B-Cは下記構造を含み、

50

【 0 0 6 7 】

【 化 1 1 】



【 0 0 6 8 】

式中、

A-B-Cは、A鎖又はB鎖のN-末端アミノ酸又はQのB3、B28若しくはB29アミノ酸の側鎖の脂肪族アミノ基を介してアミド結合によりQに連結され；

R₁は、H、(C₁-C₆アルキル)NH-R₉、(C₁-C₄アルキル)O-S₁-R₉、(C₁-C₄アルキル)S-S₁-R₉、(C₁-C₄アルキル)CONH-S₁-R₉、(C₁-C₄アルキル)COO-S₁-R₉、(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉、(C₁-C₆アルキル)NHR₉、及び(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)-S₁-R₉から成る群から選択され；

R₂及びR₈は独立に、H、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、(C₁-C₄アルキル)OH、(C₁-C₄アルキル)SH、(C₂-C₃アルキル)SCH₃、(C₁-C₄アルキル)CONHH、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NHH、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)、及びC₁-C₁₂アルキル(W₁)C₁-C₁₂アルキル(式中、W₁はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子)から成る群から選択されるか、又はR₁及びR₂はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₁₂シクロアルキル又はアリールを形成し；

R₃は、C₁-C₁₈アルキル、C₃-C₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)(C₄-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)であるか、又はR₄及びR₃はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成し；

R₄は、H、C₁-C₁₈アルキル又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり；

R₅はOH又はNHR₆であり；

R₆はH、C₁-C₈アルキルであり；

R₇はH、OH及びOR₉から成る群から選択され；

R₉はC₁₆-C₃₀アシル及びC₁₆-C₃₀アルキルから成る群から選択され；

R₁₁及びR₁₃は各々Hであり；

R₁₀及びR₁₂は独立に(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；さらに

S₁は結合又は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであるが、ただしR₄がH又はC₁-C₁₈アルキルであるときR₁はH以外であることを条件とする。ある実施態様では、R₁は(C₃-C₅アルキル)NH-S₁-R₉又は(C₃-C₅アルキル)NHR₉であり；R₂、R₄、R₁₁及びR₁₃は各々Hであり；R₅はNH₂であり；R₈はH又はC₁-C₈アルキルであり；R₉はC₁₈-C₃₀アシルであり；R₁₀及びR₁₂は、独立に(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、及び(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂から成る群から選択され；さらにS₁は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。ある実施態様では、R₃はC₁-C₈アルキルであるか、又はR₄及びR₃はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成する。ある実施態様では、R₁は(CH₂)₄NHR₉又は(CH₂)₄NH-S₁-R₉であり、R₃はC₃-C₄アルキルであり、さらにR₉はC₁₈-C₂₈アシルである。

【 0 0 6 9 】

ある実施態様にしたがえば、プロドラッグのジペプチドエレメントの最初のアミノ酸はD-立体空間配置を有する。

ある実施態様にしたがえば、高血糖症又は糖尿病を治療する方法が提供され、前記方法

10

20

30

40

50

は、本明細書に開示するインスリンプロドラッグを含む医薬組成物の有効量を投与する工程を含む。ある実施態様では、インスリンプロドラッグは哺乳動物の血清中で1日より長い半減期を有するように設計される。そのような実施態様では、インスリンプロドラッグは、当該インスリタンパク質の対応する活性な非プロドラッグが投与される場合に投与されるはずの投薬量の一部分である一日の投薬量で投与されうる。ある実施態様では、プロドラッグは、対応する非プロドラッグインスリンペプチドの最適投薬量の一部分、 $1/n$ で毎日投与される（ここで n は生理学的条件下の血清でA-B-CがQから切断される半減期（日数による）を表す）。

ジペプチドプロドラッグエレメントは、生理学的条件下及び酵素活性の非存在下で当該インスリンアナログとのアミド結合を偶発的に切断するように設計される。ある実施態様では、ジペプチド伸長部のN-末端アミノ酸はC-アルキル化アミノ酸（例えばアミノイソ酪酸）を含む。ある実施態様では、ジペプチドのC-末端アミノ酸はN-アルキル化アミノ酸（例えばプロリン又はN-メチルグリシン）を含む。ある実施態様では、ジペプチドは、N-アルキル化アミノ酸がその後に続くN-末端C-アルキル化アミノ酸の配列を含む。

【0070】

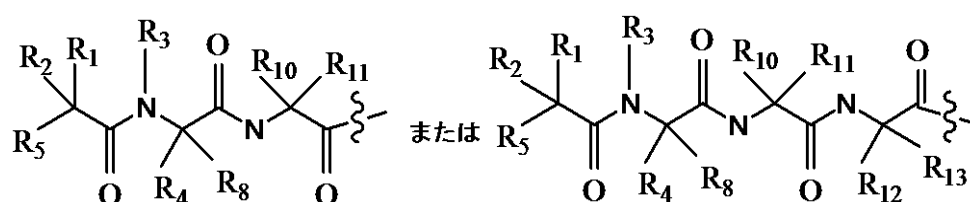
インスリンプロドラッグアナログを含むA鎖及びB鎖は、関連するペプチドの自然のままの配列（例えば配列番号:1及び配列番号:2）を含むか、又は配列番号:1及び/又は配列番号:2の誘導体を含むことができ、この場合、誘導体は、A19位のアミノ酸の4-アミノフェニルアラニンへの改変、及び/又はA5、A8、A9、A10、A14、A15、A17、A18、A19及びA21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B17、B20、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置における1つ以上のアミノ酸置換、又はB1-4及びB26-30位のいずれか又は全ての欠失を含む。ある実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメント、A-B-Cは、インスリンA又はB鎖のN-末端アミノ基に連結され、ここでペプチドプロドラッグエレメントのBアミノ酸はN-アルキル化アミノ酸を含み、さらにペプチドプロドラッグエレメントのAアミノ酸は任意のアミノ酸であるが、ただし、ペプチドプロドラッグエレメントのBアミノ酸がプロリンであるときは、ペプチドプロドラッグエレメントのAアミノ酸はC-アルキル化アミノ酸を含むことを条件とする。

【0071】

ある実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメントは下記の一般構造を有し、

【0072】

【化12】



【0073】

式中、

R_1 及び R_8 は、独立にH、 (C_1-C_6) アルキル) $NH-R_9$ 、 (C_1-C_6) アルキル) $NH-S_1-R_9$ 、 C_1-C_{18} アルキル、 C_2-C_{18} アルケニル、 (C_1-C_{18}) アルキル)OH、 (C_1-C_{18}) アルキル)SH、 (C_2-C_3) アルキル)SCH₃、 (C_1-C_4) アルキル)CONH₂、 (C_1-C_4) アルキル)COOH、 (C_1-C_5) アルキル)NH₂、 (C_1-C_4) アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、 (C_0-C_4) アルキル) (C_3-C_6) シクロアルキル)、 (C_0-C_4) アルキル) (C_2-C_5) 複素環)、 (C_0-C_4) アルキル) (C_6-C_{10}) アリール) R_7 、 (C_1-C_4) アルキル) (C_3-C_9) ヘテロアリール)、及び C_1-C_{12} アルキル(W) C_1-C_{12} アルキル（式中、WはN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子）から成る群から選択されるか、又は R_1 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒に C_3-C_{12} シクロアルキル又はアリールを形成し；

R_2 及び R_4 は、独立にH、 C_1-C_{18} アルキル、 C_2-C_{18} アルケニル、 (C_1-C_{18}) アルキル)OH、 (C_1-C_{18}) アルキル)SH、 (C_2-C_3) アルキル)SCH₃、 (C_1-C_4) アルキル)CONH₂、 (C_1-C_4) アルキル)COOH、 (C_1-C_5) アルキル)NH₂、 (C_1-C_4) アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、 (C_0-C_4) アルキル) (C_3-C_6) シクロアル

キル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)、及びC₁-C₁₂アルキル(W)C₁-C₁₂アルキル(式中、WはN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子)から成る群から選択されるか、又はR₄及びR₈はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₆シクロアルキルを形成し；

R₃は、C₁-C₁₈アルキル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)NH₂、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及び(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択されるか、又はR₄及びR₃はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成し；

R₅はNHR₆又はOHであり；

R₆はH、C₁-C₈アルキルであるか、又はR₆及びR₂はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成し；

R₇はH及びOHから成る群から選択されるが、ただしR₄及びR₃がそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成するとき、R₁及びR₂はともにH以外であることを条件とし；

R₉はC₁₆-C₃₀アシル及びC₁₆-C₃₀アルキルから成る群から選択され；

R₁₁及びR₁₃は各々Hであり；

R₁₀及びR₁₂は、独立に(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；さらに

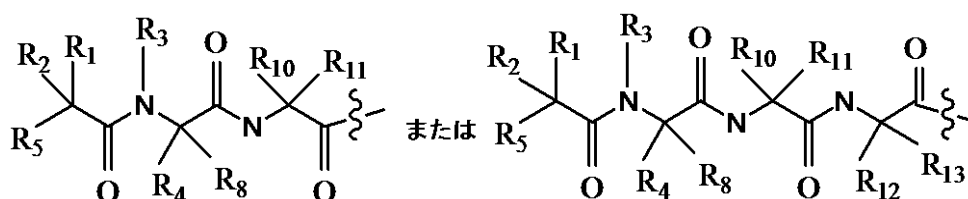
S₁は結合又は1-6ペプチドを含むスペーサーであり、ここで前記1-6ペプチドは、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1、2又は3つの荷電アミノ酸を含むが、ただしR₁又はR₈の一方が(C₁-C₆アルキル)NH-R₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であることを条件とする。ある実施態様では、R₁は(C₁-C₆アルキル)NH-R₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり、R₂及びR₄はHである。

【0074】

別の実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメントは下記の一般構造を含み、

【0075】

【化13】



【0076】

式中、

R₁は(C₁-C₆アルキル)NH-R₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉であり；

R₂及びR₈はH又はC₁-C₈アルキルであり；

R₄は、H、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、(C₁-C₄アルキル)OH、(C₁-C₄アルキル)SH、(C₂-C₃アルキル)SCH₃、(C₁-C₄アルキル)CONH₂、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及びCH₂(C₃-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択され；

R₃は、C₁-C₈アルキル、(C₃-C₆)(C₅-C₆シクロアルキル)から成る群から選択されるか、又はR₄及びR₃はそれらに結合する原子と一緒に5又は6員の複素環式環を形成し；

R₅はNHR₆であり；

R₆はH、C₁-C₈アルキルであり；さらに

R₇は水素、C₁-C₁₈アルキル、(C₀-C₄アルキル)COOH、(C₀-C₄アルキル)NH₂、(C₀-C₄アルキル)OH及びハロゲンから成る群から選択され；

R_9 は C_{16} - C_{30} アシル及び C_{16} - C_{30} アルキルから成る群から選択され；

R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり；

R_{10} 及び R_{12} は、独立に $(C_1-C_4$ アルキル) $COOH$ 、 $(C_1-C_4$ アルキル) NH_2 、 $(C_1-C_4$ アルキル) $NHC(NH_2^+)NH_2$ 、及び $CH_2(C_3-N_2$ 複素環)から成る群から選択され；さらに

S_1 は、結合又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。

【0077】

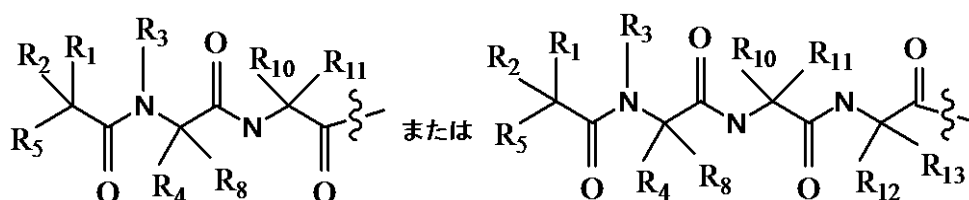
ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントの最初のアミノ酸及び/又は二番目のアミノ酸のどちらかがD立体異性体の立体配置のアミノ酸である。

10

ある実施態様では、下記一般式のプロドラッグエレメントが提供され、

【0078】

【化14】



【0079】

20

式中、

R_1 は $(C_1-C_6$ アルキル) $NH-R_9$ 又は $(C_1-C_6$ アルキル) $NH-S_1-R_9$ であり；

R_2 はHであり；さらに

R_4 は、独立にH、 C_1-C_8 アルキル、 C_2-C_8 アルケニル、 $(C_1-C_4$ アルキル) OH 、 $(C_1-C_4$ アルキル) $COOH$ 、 $(C_1-C_4$ アルキル) NH_2 、 $(C_1-C_4$ アルキル) $NHC(NH_2^+)NH_2$ 、 $(C_0-C_4$ アルキル) $(C_3-C_6$ シクロアルキル)、 $(C_0-C_4$ アルキル) $(C_6-C_{10}$ アリール) R_7 及び $CH_2(C_5-C_9$ ヘテロアリール)から成る群から選択され；

R_3 は、 C_1-C_8 アルキル、 $(C_1-C_4$ アルキル) $(C_6-C_{10}$ アリール) R_7 、 $(C_1-C_4$ アルキル) $(C_5-C_{10}$ シクロアルキル)及び $CH_2(C_5-C_9$ ヘテロアリール)から成る群から選択されるか、又は R_4 及び R_3 はそれらに結合する原子と一緒に5又は6員の複素環式環を形成し；

30

R_5 は NH_2 であり；

R_7 はH及びOHから成る群から選択され；

R_8 はHであり；

R_9 は C_{16} - C_{30} アシル及び C_{16} - C_{30} アルキルから成る群から選択され；

R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり；

R_{10} 及び R_{12} は、独立に $(C_1-C_4$ アルキル) $COOH$ 、 $(C_1-C_4$ アルキル) NH_2 、 $(C_1-C_4$ アルキル) $NHC(NH_2^+)NH_2$ 及び $CH_2(C_3-N_2$ 複素環)から成る群から選択され；さらに

S_1 は、結合又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであるが、ただし R_4 がH又は C_1-C_{18} アルキルであるとき R_1 はH以外であることを条件とする。ある実施態様では、 R_3 は C_1-C_8 アルキルであり、 R_4 はH、 C_1-C_6 アルキル、 $(C_0-C_4$ アルキル) $(C_6-C_{10}$ アリール) R_7 及び $CH_2(C_5-C_9$ ヘテロアリール)から成る群から選択されるか、又は R_4 及び R_3 はそれらに結合する原子と一緒に5又は6員の複素環式環を形成する。

40

【0080】

ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントの最初のアミノ酸及び/又は二番目のアミノ酸のどちらかは非コードアミノ酸であり、ある実施態様では、D立体異性体の立体配置のアミノ酸である。

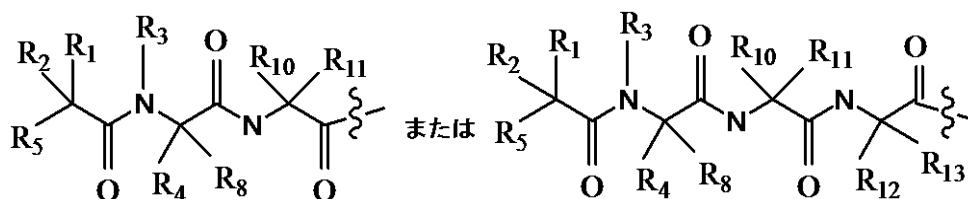
ある実施態様では、一般構造A-B-C-Q (Qはインスリンペプチド)を有するインスリンプロドラッグが提供され、前記インスリンペプチドはA及びB鎖を含み、ここでA鎖は配列GIV

50

EQCCTSIICSLYQLENYCN (配列番号:1) を含み、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号:2)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (配列番号:9)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (配列番号:5)、FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (配列番号:6) から成る群から選択される配列を含み、さらにA-B-Cは下記の構造を有するペプチドプロドラッグエレメントであり、

【 0 0 8 1 】

【 化 1 5 】



10

【 0 0 8 2 】

式中、

R_1 は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-R_9$ 又は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-S_1-R_9$ であり；

R_2 は水素及び C_1-C_8 アルキルから成る群から選択され；

R_3 は C_1-C_8 アルキルであり；

R_4 は H 、 C_1-C_8 アルキル又は $(C_1-C_4 \text{ アルキル})(C_6-C_{10} \text{ アリール})R_7$ であり；

R_5 は NH_2 であり；

20

R_7 は水素、 C_1-C_8 アルキル及び $(C_0-C_4 \text{ アルキル})OH$ から成る群から選択され；

R_8 は水素であり；

R_9 は $C_{16}-C_{30}$ アシル及び $C_{16}-C_{30}$ アルキルから成る群から選択され；

R_{11} 及び R_{13} は各々 H であり；

R_{10} 及び R_{12} は、独立に $(C_1-C_4 \text{ アルキル})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NHC(NH_2^+)NH_2$ 及び $CH_2(C_3-N_2 \text{ 複素環})$ から成る群から選択され；さらに

S_1 はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。さらに別の実施態様では、 R_2 は水素であり； R_3 は C_1-C_{18} アルキルであり； R_4 及び R_8 は各々水素であり； R_5 は NH_2 であり； R_9 は $C_{16}-C_{30}$ アシル及び $C_{16}-C_{30}$ アルキルから成る群から選択され； R_{11} 及び R_{13} は各々 H であり； R_{10} 及び R_{12} は、独立に $(C_1-C_4 \text{ アルキル})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NHC(NH_2^+)NH_2$ から成る群から選択され；さらに S_1 はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。

30

【 0 0 8 3 】

ある実施態様にしたがえば、インスリンペプチド及びアミド連結プロドラッグエレメントを含むインスリンプロドラッグアナログが提供される。より具体的には、インスリンプロドラッグアナログはA鎖及びB鎖配列を含み、ここでA鎖は、配列Z-GIVEQCCX₈SICSLYQLENYCX₂₁R₄₄ (配列番号:3) 又はそのアナログであって配列番号:3とは1から9、1から5又は1から3つのアミノ酸改変(自然のままのインスリンA鎖と対比してA5、A8、A9、A10、A14、A15、A17、A18位から選択される)によって異なる配列を含むものを含み、B鎖は、配列J-R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₄₅ (配列番号:14) 又はそのアナログであって配列番号:14とは1から10、1から5又は1から3つのアミノ酸改変(自然のままのインスリンB鎖(すなわち配列番号:14のアミノ酸X₂₅は自然のままのインスリンのB5位と一致する)と対比してB1、B2、B3、B4、B5、B13、B14、B17、B20、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30位から選択される)によって異なる配列を含むものを含み、式中、

40

X_8 はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され；

X_{21} はアスパラギン、オルニチン、グリシン、アラニン、スレオニン及びセリンから成る群から選択され；

50

X_{25} はヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され；

X_{29} はアラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され；

X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され；

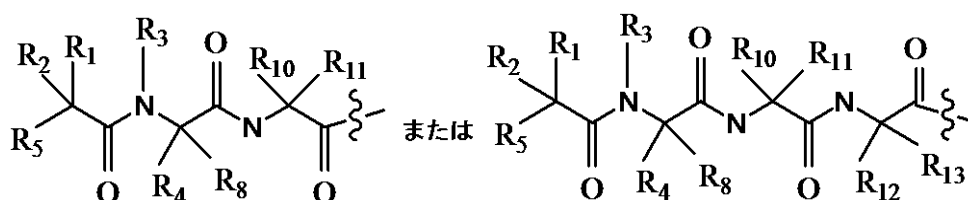
X_{45} はチロシン又はフェニルアラニンであり；

R_{22} は、FVNQ (配列番号:12)、FVKQ (配列番号:8)、トリペプチドのバリン-アスパラギン-グルタミン、ジペプチドのアスパラギン-グルタミン、グルタミン、グルタミン酸、及びN-末端アミンから成る群から選択され；さらに

R_{44} はCOOH又はCONH₂である。Z及びJは、独立にH又は下記の一般構造を含むペプチドプロドラッグエレメントであり、

【0084】

【化16】



【0085】

前記ペプチドプロドラッグエレメントはインスリンA又はB鎖のN-末端アミンに連結され、式中、

R_1 は(C₁-C₆アルキル)NH-R₉及び(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉から成る群から選択され；

R_2 、 R_4 及び R_8 は、独立にH、C₁-C₁₈アルキル、C₂-C₁₈アルケニル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₂-C₃アルキル)SCH₃、(C₁-C₄アルキル)CONH₂、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₆アルキル)NH-R₉、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)、及びC₁-C₁₂アルキル(W)C₁-C₁₂アルキル(式中、WはN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子)から成る群から選択されるか、又は R_1 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₁₂シクロアルキル又はアリールを形成しているか；又は R_4 及び R_8 はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₆シクロアルキルを形成し；

R_3 は、C₁-C₁₈アルキル、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及び(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択されるか、又は R_4 及び R_3 はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成し；

R_5 はNHR₆であり；

R_6 はH、C₁-C₈アルキルであり；

R_7 はH及びOHから成る群から選択され；

R_{13} はCOOH又はCONH₂であり；

R_9 はC₁₆-C₃₀アシル及びC₁₆-C₃₀アルキルから成る群から選択され；

R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり；

R_{10} 及び R_{12} は、独立に(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；さらに

S₁は結合、又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。

【0086】

さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVEQCCX₈SICSLYQLENYCX₂₁R₁₃(配列番号:3)を含み、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT(配列番号:2)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT(配列番号:9)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT(配列番号:5)及びFVKQHLCGS

10

20

30

40

50

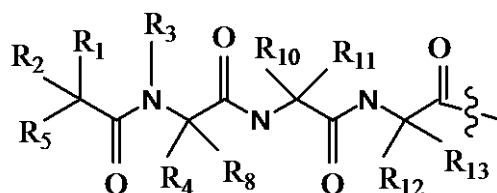
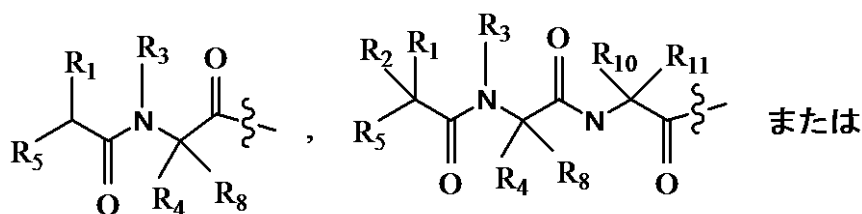
HLVEALYLVCGERGFFYTEKT (配列番号:6) から成る群から選択される配列を含み、式中、 R_{13} はCOOHであり、B鎖のカルボキシ末端アミノ酸は任意的に天然のアルファ炭素カルボキシ基の代わりにアミド (CONH₂) を有してよく、残りの指定は直前のように規定される。ある実施態様では、A鎖は配列GIVEQCCTSICSLYQLENYCN- R_{44} (配列番号:1) を含み、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号:2)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (配列番号:9)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (配列番号:5) 又はFVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (配列番号:6) から成る群から選択される配列を含む。

ある実施態様では、本明細書に開示するインスリンアナログは、A鎖及び/又はB鎖のC-末端カルボキシレートの代わりにC-末端アミド又はエステルを含む。

ある実施態様にしたがえば、下記の一般構造を有する、本明細書に開示するインスリンペプチドプロドラッグエレメントは、

【0087】

【化17】



【0088】

さらに改変されて、インスリン又はIGF-1受容体と相互作用するインスリンアナログの能力に干渉する大きなポリマーを含む。その後のジペプチドの切断はインスリンアナログを当該ジペプチド複合体から遊離させ、遊離されたインスリンアナログは完全に活性を有する。ある実施態様にしたがえば、プロドラッグエレメントはA鎖若しくはB鎖のN-末端アミン又はB3、B27若しくはB28位のリジンの側鎖アミンから選択される脂肪族アミンにアミド結合により連結される (式中の R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} の置換基は本開示を通して規定されている)。ある実施態様では、プロドラッグエレメントは、A鎖若しくはB鎖のN-末端アミンでアミド結合によりインスリンペプチドと共有結合されるか、又は内部アミノ酸のアミン保持側鎖に付着され、この場合プロドラッグエレメントはさらに当該プロドラッグエレメントに連結されたデボポリマーを含む。ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するペプチドプロドラッグエレメントは下記の一般構造を有し、

【0089】

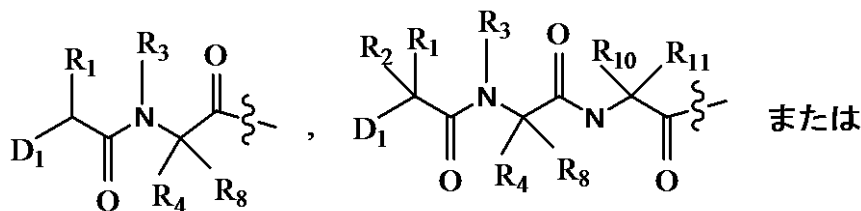
10

20

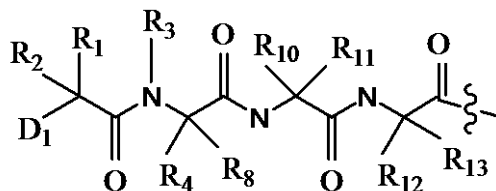
30

40

【化 18】



または



10

【0090】

式中、D₁は、アミド結合を介して共有結合によりペプチドプロドラッグエレメントに連結される血清酵素切断性部分である。ある実施態様では、D₁は、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) によって切断されるペプチドであり、前記ペプチドには例えばArg-Pro、Lys-Pro又はGlu-Proが含まれる。R₁、R₂、R₄、R₈、R₁₀、R₁₁、R₁₂及びR₁₃の置換基は、本開示を通して規定されている。

20

【0091】

ある実施態様では、インスリンペプチドの自然のままのアミノ酸は、本明細書に開示するプロドラッグエレメントとアミド結合を形成するために適切なアミノ酸で置換される。ある実施態様では、プロドラッグエレメントを保持するデボは、A14、A19、B3、B16、B28及びB29から選択される位置で連結される。ある実施態様では、プロドラッグエレメントを保持する2つ以上のデボポリマーがインスリンペプチドに連結され、前記インスリンペプチドでは、プロドラッグエレメントを保持する第一のデボポリマーはB鎖のN-末端アミンに連結され、プロドラッグエレメントを保持する第二のデボポリマーは、A鎖のN-末端アミン又はインスリンのB3、B28若しくはB29位のリジンの側鎖アミンに連結される。ある実施態様では、デボポリマーは哺乳動物の血漿タンパク質と不可逆的に結合する部分であり、ある実施態様では、デボポリマーは哺乳動物の血清アルブミンと不可逆的に結合するために十分なサイズのアシル又はアルキル基である。ある実施態様では、生物適合性であるように、かつ十分なサイズであるように（又は十分なサイズ of 血漿タンパク質と不可逆的に結合できるように）デボポリマーを選択して、プロドラッグエレメントの共有結合付着によって改変されたインスリンペプチドが注射部位で隔離された状態、及び/又は患者への投与に際してその対応する受容体と相互作用できない状態を維持する。その後のプロドラッグエレメントの切断は当該インスリンペプチドを遊離させその意図する標的と相互作用させる。

30

【0092】

ある実施態様にしたがえば、デボポリマーは当業者に公知の生物適合性ポリマーから選択される。デボポリマーは、典型的には約20,000から120,000ダルトンの範囲から選択されるサイズを有する。ある実施態様では、デボポリマーは、約40,000から100,000又は約40,000から80,000ダルトンの範囲から選択されるサイズを有する。ある実施態様では、デボポリマーは、約40,000、50,000、60,000、70,000又は80,000ダルトンのサイズを有する。適切なデボポリマーには以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：デキストラン、ポリラクチド、ポリグリコリド、カプロラクトン系ポリマー、ポリ(カプロラクトン)、ポリ酸無水物、ポリアミド、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリジオキサノン、ポリアセタール、ポリケタール、ポリカーボネート、ポリホスホエステル、ポリエステル、ポリブチレンテレフタレート、ポリオルトカーボネート、ポリホスファゼン、コハク酸エステル、ポリ(リンゴ酸)、ポリ(アミノ酸)、ポリビニルピロリドン、ポリエチレ

40

50

ングリコール、ポリヒドロキシセルロース、多糖類、キチン、キトサン、ヒアルロン酸、並びに前記のコポリマー、ターポリマー及び混合物、並びに生物分解性ポリマー及びそれらのコポリマー（カプロラクトン系ポリマー、ポリカプロラクトン、及びポリブチレンテレフタレートを含むコポリマーを含む）。ある実施態様では、デポポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、並びに乳酸及びグリコール酸のコポリマーから成る群から選択され、ある具体的実施態様では、デポポリマーはポリエチレングリコールである。ある実施態様では、デポポリマーはポリエチレングリコールであり、ジペプチドエレメントに連結されるデポポリマーの合計分子量は約40,000から80,000ダルトンである。ある実施態様では、デポポリマーは、哺乳動物の血漿タンパク質と不可逆的に結合する部分であり、ある実施態様では、デポポリマーは、哺乳動物の血清アルブミンと不可逆的に結合するために十分なサイズであるアシル又はアルキル基である。

10

【0093】

ある実施態様にしたがえば、プロドラッグエレメントはさらにポリエチレンオキシド、アルキル又はアシル基を含む。ある実施態様では、1つ以上のポリエチレンオキシド鎖がペプチドプロドラッグエレメントに連結され、ここでポリエチレンオキシド鎖の合計分子量は、約20,000から約80,000ダルトン、又は40,000から80,000ダルトン、又は40,000から60,000ダルトンの範囲である。ある実施態様では、ポリエチレンオキシドはポリエチレングリコールである。ある実施態様では、約40,000ダルトン又は約20,000ダルトンの分子量を有する少なくとも1つのポリエチレングリコール鎖が、プロドラッグエレメントに直接又はリンカー/スペーサーを介して連結される。別の実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメントの自己切断ジペプチドは、血清アルブミンと結合するために十分なサイズのアシル基でアシル化され、したがって投与時のインスリンアナログを不活性化する。アシル基は直鎖状又は分枝状であることができ、ある実施態様では、C16からC30脂肪酸である。例えば、アシル基は、C16脂肪酸、C18脂肪酸、C20脂肪酸、C22脂肪酸、C24脂肪酸、C26脂肪酸、C28脂肪酸、又はC30脂肪酸でありうる。ある実施態様では、アシル基はC16からC20脂肪酸、例えばC18脂肪酸又はC20脂肪酸であるか、又はC18若しくはC30脂肪酸である。

20

【0094】

ジペプチドエレメントの置換基及びジペプチドプロドラッグエレメントの付着部位の選択は、ジペプチドプロドラッグエレメントのインスリンペプチドからの化学的切断の速度に影響を与えることができる。ある実施態様では、A鎖配列及びB鎖配列を含むインスリンプロドラッグが提供され、ここで、A鎖は配列GIVEQCCX₈SICSLYQLENYCX₂₁R₁₃（配列番号:3）を含み、B鎖配列はX₁₄-X₄LCGX₅X₆LVEALYLVCGERGFF（配列番号:4）の配列を含み、式中

30

X₈はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され；

X₂₁はアスパラギン、グリシン、アラニン、スレオニン及びセリンから成る群から選択され；

X₄はヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され；

X₅はアラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され；

40

X₆はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され；さらに

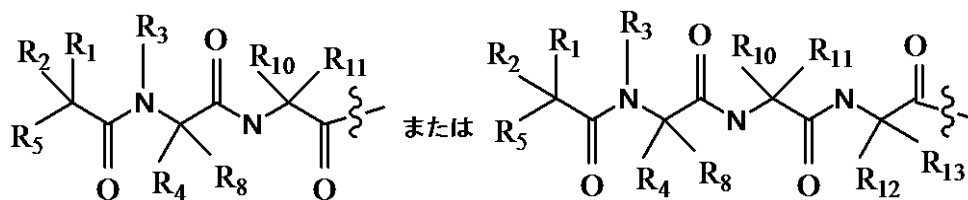
X₁₄は結合、X₉VNQ（配列番号:21）、VNQ、NQ及びQから成る群から選択され；さらに

X₉はフェニルアラニン及びデスアミノ-フェニルアラニンから成る群から選択され、

さらにここで、下記構造を含むペプチドプロドラッグエレメントは、

【0095】

【化 19】



【0096】

配列番号:3又は配列番号:4のペプチドのN-末端アミンに連結され、
式中、

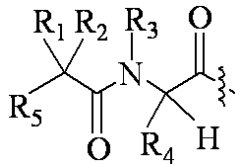
- R_1 は $(C_1-C_6$ アルキル) $NH-R_9$ 、 $(C_1-C_6$ アルキル) $NH-S_1-R_9$ から成る群から選択され；
 R_2 、 R_4 及び R_8 はHであり；
 R_3 は C_1-C_6 アルキルであり；
 R_5 は NH_2 であり；
 R_9 は $C_{16}-C_{30}$ アシル及び $C_{16}-C_{30}$ アルキルから成る群から選択され；
 R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり；
 R_{10} 及び R_{12} は、独立に $(C_1-C_4$ アルキル) $COOH$ 、 $(C_1-C_4$ アルキル) NH_2 、 $(C_1-C_4$ アルキル) $NHC(NH_2^+)NH_2$ 、及び $CH_2(C_3-N_2$ 複素環)から成る群から選択され；さらに
 S_1 は結合、又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。ある実施態様では、A鎖は配列GIVEQCCX₈SICSLYQLENYCX₂₁R₁₃（配列番号:3）を含み、B鎖は配列R₂₂-X₂₅LCGAX₃₀LVDALYLVC GD₄₂GFY（配列番号:65）を含み、ここで、
 X_8 はフェニルアラニン又はヒスチジンであり；
 X_{21} はアラニン又はアスパラギンであり；
 X_{25} はヒスチジン又はスレオニンであり；
 X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され；
 X_{42} はアラニン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され；
 R_{22} は、AYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、FVKQ（配列番号:8）、PGPE（配列番号:11）、トリペプチドのグリシン-プロリン-グルタミン酸、トリペプチドのバリン-アスパラギン-グルタミン、ジペプチドのプロリン-グルタミン酸、ジペプチドのアスパラギン-グルタミン、グルタミン、グルタミン酸及びN-末端アミンから成る群から選択され；さらに
 R_{44} は $COOH$ 又は $CONH_2$ である。さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVEQCCTSLYQLENYCN-R₄₄（配列番号:1）を含み、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号:2）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT（配列番号:9）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT（配列番号:5）、FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT（配列番号:6）から成る群から選択される配列を含む。

【0097】

ある実施態様では、インスリンA又はB鎖ペプチドのN-末端アミノ酸に連結されたジペプチドプロドラッグエレメントを有し、かつ例えば約12から約72時間（又はある実施態様では約12から約48時間）の $t_{1/2}$ を有するプロドラッグは、下記構造のジペプチドプロドラッグエレメントを含み、

【0098】

【化 2 0】



I

【 0 0 9 9 】

式中、

R_1 及び R_2 は、独立に水素、 C_1 - C_8 アルキル及び $(C_1$ - C_4 アルキル) NH_2 から成る群から選択されるか、又は R_1 及び R_2 は $(CH_2)_p$ (式中 p は 2 - 9) を介して連結され；

10

R_3 は C_1 - C_8 アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 はそれらに結合する原子と一緒に 4 - 6 複素環式環を形成し；

R_4 は水素及び C_1 - C_8 アルキルから成る群から選択され；さらに

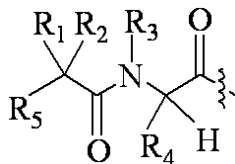
R_5 は NH_2 であるが、ただし R_1 及び R_2 はともに水素ではないことを条件とする。

ある実施態様では、インスリンA又はB鎖ペプチドのN-末端アミノ酸に連結されたジペプチドプロドラッグエレメントを有し、かつ例えば約12から約72時間（又はある実施態様では約12から約48時間）の $t_{1/2}$ を有するプロドラッグは、下記構造のジペプチドプロドラッグエレメントを含み、

【 0 1 0 0 】

20

【化 2 1】



I

【 0 1 0 1 】

式中、

R_1 及び R_2 は、独立に水素、 C_1 - C_8 アルキル及び $(C_1$ - C_4 アルキル) NH_2 から成る群から選択され；

30

R_3 は C_1 - C_6 アルキルであり；

R_4 は水素であり；さらに

R_5 は NH_2 であるが、ただし R_1 及び R_2 はともに水素ではないことを条件とする。

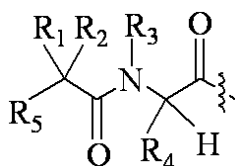
【 0 1 0 2 】

ある実施態様では、インスリンA又はB鎖ペプチドのN-末端アミノ酸に連結されたジペプチドプロドラッグエレメントを有し、かつ例えば約12から約72時間（又はある実施態様では約12から約48時間）の $t_{1/2}$ を有するプロドラッグは、下記構造のジペプチドプロドラッグエレメントを含み、

【 0 1 0 3 】

40

【化 2 2】



I

【 0 1 0 4 】

式中、

R_1 及び R_2 は、独立に水素、 C_1 - C_8 アルキル及び $(C_1$ - C_4 アルキル) NH_2 から成る群から選択さ

50

れるか、又は R_1 及び R_2 は $(CH_2)_p$ （式中 p は2 - 9）を介して連結され；

R_3 は C_1 - C_8 アルキルであり；

R_4 は $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール) R_7 であり；

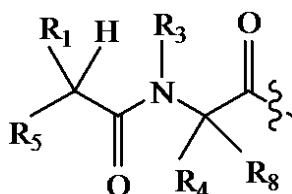
R_5 は NH_2 であり；さらに

R_7 は水素、 C_1 - C_8 アルキル及び $(C_0$ - C_4 アルキル)OHから成る群から選択されるが、ただし R_1 及び R_2 はともに水素ではないことを条件とする。

さらにまた、インスリンA又はB鎖ペプチドのN-末端アルファアミノ酸に連結されたジペプチドプロドラッグエレメントを有し、かつ例えば約72から約168時間の $t_{1/2}$ を有するプロドラッグが提供され、ここでジペプチドプロドラッグエレメントは下記構造を有し、

【0105】

【化23】



【0106】

式中、

R_1 は、水素、 C_1 - C_8 アルキル及び $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール) R_7 から成る群から選択され；

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであり；

R_4 及び R_8 は各々水素であり；

R_5 は NHR_6 又はOHであり；

R_6 はH、 C_1 - C_8 アルキルであるか、又は R_6 及び R_1 はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成し；

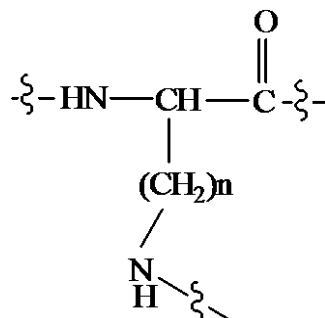
R_7 は、水素、 C_1 - C_{18} アルキル、 C_2 - C_{18} アルケニル、 $(C_0$ - C_4 アルキル)CONH₂、 $(C_0$ - C_4 アルキル)COOH、 $(C_0$ - C_4 アルキル)NH₂、 $(C_0$ - C_4 アルキル)OH、及び八口から成る群から選択されるが、ただし R_1 がアルキル又は $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール) R_7 であるならば、 R_1 及び R_5 はそれらに結合する原子と一緒に4 - 11複素環式環を形成することを条件とする。

【0107】

ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントはインスリンペプチドの内部アミノ酸の側鎖アミンに連結され、ここで、内部アミノ酸は下記式IVの構造を含み、

【0108】

【化24】



【0109】

式中、 n は1から4から選択される整数である。ある実施態様では n は3又は4であり、ある実施態様では、内部アミノ酸はリジンである。ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントは、インスリンペプチドのB鎖の3、28又は29位に位置するアミノ酸の側鎖の第一アミンに連結される。

ある実施態様では、A鎖配列及びB鎖配列を含むインスリンプロドラッグが提供され、こ

10

20

30

40

50

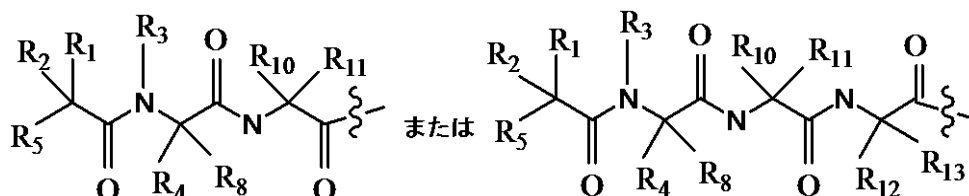
ここで、A鎖は配列GIVEQCCX₁SICSLYQLENYCX₃（配列番号:3）を含み、B鎖配列はX₁₄-X₄LCGX₅X₆LVEALX₇LVCGERGFX₈（配列番号:14）の配列を含み、式中、X₁はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択される。

別の実施態様では、GIVEQCCX₁SICSLYQLENYCX₃（配列番号:3）のA鎖配列及びZ-X₄LCGX₅X₆LVEALYLVCGERGFF（配列番号:4）の配列を含むB鎖配列を含むインスリンプロドラッグが提供され、式中、

Zは下記の一般構造を含むペプチドであり、

【0110】

【化25】



10

【0111】

式中、

X₁はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され；

X₃はアスパラギン、グリシン、アラニン、スレオニン又はセリンから成る群から選択され；

20

X₄はヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され；

X₅はアラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され；

X₆はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され；

ここで、R₁はH、(C₁-C₆アルキル)NH-R₉、(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉及びC₁-C₈アルキルから成る群から選択され；

R₂及びR₈は独立にH又はC₁-C₄アルキルから選択され；

R₄は、H、(C₁-C₆アルキル)NH-R₉、(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、(C₁-C₄アルキル)OH、(C₁-C₄アルキル)SH、(C₂-C₃アルキル)SCH₃、(C₁-C₄アルキル)CONH₂、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₁-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、CH₂(C₅-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択されるか、又はR₁及びR₂はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₆シクロアルキルを形成し；

30

R₃は、C₁-C₈アルキル、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₁-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及び(C₁-C₄アルキル)OHから成る群から選択され；

R₅はNH₂であり；

R₇はH及びOHから成る群から選択され；

R₉はC₁₆-C₃₀アシル及びC₁₆-C₃₀アルキルから成る群から選択され；

R₁₁及びR₁₃は各々Hであり；

R₁₀及びR₁₂は、独立に(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；さらに

40

S₁は、結合又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。

【0112】

ある実施態様では、A鎖はGIVEQCCX₁SICSLYQLENYCX₃（配列番号:3）の配列を含み、B鎖配列は、配列Z-X₉VNQX₄LCGX₅X₆LVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号:10）又はZ-X₉VNQX₄LCGX₅X₆LVEALYLVCGERGFFYTKPT（配列番号:13）を含み、式中、

X₁はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され；

X₃はアスパラギン、グリシン、アラニン、スレオニン又はセリンであり；

50

X₄はヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され；

X₅はアラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され；

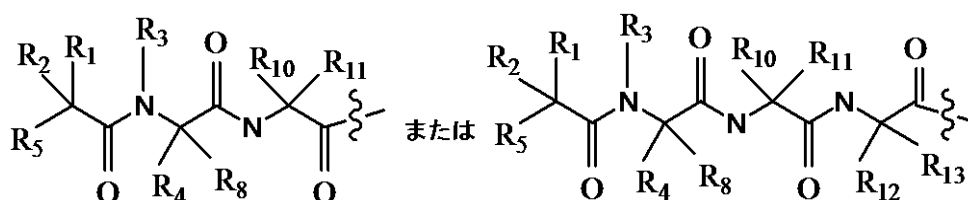
X₆はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され；

X₉はフェニルアラニン及びデスアミノ-フェニルアラニンから成る群から選択される。

ある実施態様にしたがえば、単鎖インスリンプロドラッグアナログが提供され、ここで、ヒトインスリンB鎖又はヒトインスリンB鎖の機能的アナログのカルボキシ末端は、ヒトインスリンA鎖又はヒトインスリンB鎖の機能的アナログのN-末端に共有結合により連結され、さらにここで、下記一般構造を有するペプチドプロドラッグ部分は単鎖インスリンアナログのN-末端アミンにアミド結合により連結され、

【0113】

【化26】



【0114】

式中、

R₁は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-R₉であり；

R₂はH又はC₁-C₆アルキルであり；

R₃は、C₁-C₆アルキル、C₃-C₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)(C₄-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)から成る群から選択されるか、又はR₄及びR₃はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環を形成し；

R₄及びR₈は、独立にH、C₁-C₁₈アルキル、C₂-C₁₈アルケニル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₂-C₃アルキル)SCH₃、(C₁-C₄アルキル)CONH₂、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)、及びC₁-C₁₂アルキル(W₁)C₁-C₁₂アルキル(式中W₁はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子)から成る群から選択されるか、又はR₄及びR₈はそれらに結合する原子と一緒にC₃-C₆シクロアルキルを形成し；

R₁₀、R₁₁、R₁₂及びR₁₃は、独立にH、CH₃、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され；

R₅はNH₂であり；

R₇はH、OH、C₁-C₁₈アルキル、C₂-C₁₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)NH₂及び(C₀-C₄アルキル)OHから成る群から選択され；

R₉はC₁₈-C₃₀アシル及びC₁₆-C₃₀アルキルから成る群から選択され；さらに

S₁は結合又は1つから6つのアミノ酸から成るスペーサーであり、ここで前記スペーサーは、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、アルギニン及びリジンから成る群から選択される1つ以上の荷電アミノ酸を含む。ある実施態様では、R₁は(C₁-C₆アルキル)NH-S₁-R₉又は(C₁-C₆アルキル)NH-R₉であり、R₂及びR₈はともにHであり、R₃は、C₁-C₆アルキルである。さらに別の実施態様では、R₉はC₁₈-C₃₀アシルであり、R₁₁及びR₁₃は各々Hであり、R₁₀及びR₁₂は、独立に(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、及びCH₂(C₃-N₂複素環)から成る群から選択され、さらにS₁は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。ある実施態様では、インスリンペプチドは、GIVEQCCX₈SICSLYQLENYCX₂₁(配列番号:3)のA鎖配列及びR₂₂-HLCGSHLVEALYLVCGERGFX₄₅(配列番号:15)のB鎖配列を含

10

20

30

40

50

み、ここで前記B鎖はジスルフィド結合を介して前記A鎖に連結され、
 $R_{2,2}$ は、アミノ基、又はFVNQ（配列番号:12）、FVKQ（配列番号:8）、VNQ、NQ及びQから成る群から選択される1から4アミノ酸の配列であり、
 X_8 はスレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され、
 $X_{2,1}$ はアスパラギン、リジン、グリシン、アラニンから成る群から選択され、さらに
 $X_{4,5}$ はヒスチジン、チロシン又はフェニルアラニンである。
 さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN- $R_{4,4}$ （配列番号:1）を含み、
 さらに前記B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号:2）、FVNQHLCGSHLVEALYL
 VCGERGFFYTKPT（配列番号:9）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT（配列番号:5）及びFVK
 QHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT（配列番号:6）から成る群から選択される配列を含む。

10

【0115】

ある実施態様にしたがえば、単鎖インスリンアナログは式B-P-Aの化合物を含み、こ
 こで、BはヒトインスリンのB鎖又は本明細書に開示するB鎖の機能的若しくはプロドラッ
 グアナログの1つを表し、AはヒトインスリンのA鎖又は本明細書に開示するA鎖の機能的
 アナログの1つを表し、さらにPは、当該B鎖に当該A鎖を共有結合により結びつけるリン
 カー（ペプチドリンカーを含む）を表す。ある実施態様では、リンカーは、約5から約18
 、又は約10から約14、又は約4から約8、又は約6アミノ酸のペプチドリンカーである。あ
 る実施態様では、B鎖は4 - 12又は4 - 8アミノ酸のペプチドリンカーを介してA鎖に連結さ
 れる。ある実施態様では、単鎖アナログのペプチドリンカーは以下から成る群から選択
 される：GYGSSRRAPQT（配列番号:23）、GYGSSRR（配列番号:61）、GYGSSOR（配列番号
 :63）、GAGSSRR（配列番号:66）若しくはGAGSSRRAPQT（配列番号:64）、又は1つから3
 つのアミノ酸置換、又は1つから2つのアミノ酸置換により配列番号:23若しくは配列番号:
 66と異なる配列。場合によって、単鎖アナログの連結部分はまたペプチドプロドラッグ
 エLEMENTの付着のための部位としても役立ち、ある実施態様では、連結部分は、本発明
 のペプチドプロドラッグELEMENTをアミド結合により付着させるために適切な側鎖基を
 有するアミノ酸を含むペプチドリンカーである。

20

【0116】

ある実施態様にしたがえば、ペプチドリンカーは長さが5から18アミノ酸であり、以下
 から成る群から選択される配列を含む：Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg（配列番号:22）、
 Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr（配列番号:23）、Arg-Arg-Gly-Pro-
 Gly-Gly-Gly（配列番号:32）、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Arg（配列番号:24）、Arg-Arg-
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号:25）、Gly-Gly-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg（配列番
 号:26）、Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly（配列番号:27）、Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly
 -Asp-Val-Lys-Arg（配列番号:28）、Arg-Arg-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly（配列番号:2
 9）、Gly-Gly-His-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg（配列番号:30）及びArg-Arg-His-Pro-Gly-A
 sp-Val-Gly-Gly（配列番号:31）。ある実施態様では、ペプチドリンカーは長さが7から12
 アミノ酸であり、配列Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg（配列番号:22）又はGly-Tyr-Gly-Se
 r-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr（配列番号:23）を含む。

30

さらに別の実施態様では、ペプチドリンカーは以下から成る群から選択される配列を含
 む：AGRGSGK（配列番号:35）、AGLGSGK（配列番号:36）、AGMGSGK（配列番号:37）、ASWG
 SGK（配列番号:38）、TGLGSGQ（配列番号:39）、TGLGRGK（配列番号:40）、TGLGSGK（配
 列番号:41）、HGLYSGK（配列番号:42）、KGLGSGQ（配列番号:43）、VGLMSGK（配列番号:4
 4）、VGLSSGQ（配列番号:45）、VGLYSGK（配列番号:46）、VGLSSGK（配列番号:47）、VGM
 SSGK（配列番号:48）、VWSSSGK（配列番号:49）、VGSSSGK（配列番号:50）、VGMSSGK（配
 列番号:51）、TGLGSGR（配列番号:52）、TGLGKGQ（配列番号:53）、KGLSSGQ（配列番号:5
 4）、VKLSSGQ（配列番号:55）、VGLKSGQ（配列番号:56）、TGLGKGQ（配列番号:57）、SRV
 SRRSR（配列番号:60）、GYGSSRRAPQT（配列番号:23）及びVGLSKGQ（配列番号:58）。あ
 る実施態様では、リンカーはGSSSRRAP（配列番号:62）又はSRVSRRSR（配列番号:60）を含
 む。

40

【0117】

50

ある実施態様では、単鎖インスリンアナログは以下のアミノ酸配列を有する：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-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn（配列番号：33）又は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-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（配列番号：34）。

本明細書に開示するインスリンプロドラッグは、リンカーを介して結合される少なくとも2つ、3つ若しくは4つ以上のペプチドを含むダイマー、トリマー又はより高次のマルチマーの部分であることができ、ここで少なくとも一方又は両方のペプチドはインスリンペプチドに連結されたペプチドプロドラッグエレメントを含む。ダイマーはホモダイマー又はヘテロダイマーであることができ、自然のままのインスリン、自然のままのIGF-1、自然のままのIGF-II及び本明細書に開示のインスリンアナログペプチドから成る群から選択されるペプチドを含む。ある実施態様では、リンカーは、二官能性チオール架橋リンカー及び二官能性アミン架橋リンカーから成る群から選択される。ある種の実施態様では、リンカーはPEG、例えば5kDa PEG、20kDa PEGである。いくつかの実施態様では、リンカーはジスルフィド結合である。

【0118】

例えば、ダイマーの各モノマーはCys残基（例えば末端又は内部に位置するCys）を含むことができ、各Cys残基の硫黄原子はインスリンモノマー間のジスルフィド結合の形成に加わる。ダイマーの各モノマーはA及びB鎖のヘテロダイマーである。A及びB鎖はジスルフィド結合を介して連結されるか、又は単鎖ペプチドとして調製される。本発明のいくつかの特徴では、インスリンペプチドモノマー（各々はインスリンA及びB鎖を含む）は、末端（例えばN-末端又はC-末端）アミノ酸を介して、内部アミノ酸を介して、又は少なくとも1つのモノマーの末端アミノ酸及び少なくとも1つの他のモノマーの内部アミノ酸を介して連結される。具体的な特徴では、モノマーはN-末端アミノ酸を介して連結されない。いくつかの特徴では、マルチマーのモノマーは“尾対尾”の向きで一緒に結合され、この場合には各モノマーのC-末端アミノ酸が一緒に結合される。結合部分は、本明細書に開示のインスリンペプチド（ダイマー、トリマー又はより高次のマルチマーを含む）のいずれかと共有結合により連結されうる。

【0119】

本明細書に開示するプロドラッグをさらに改変して、生理学的pHの水溶液中でのペプチドの溶解性を改善し、一方、当該ペプチドの腎クリアランスを妨げることによってペプチドの有効持続時間を強化することができる。ペプチドは、血漿タンパク質と比較したとき相対的に小さなその分子サイズのために容易に除去される。ペプチドの分子量が40kDaより増加すれば腎閾値を超え、血漿における持続時間は顕著に延長される。したがって、ある実施態様では、ペプチドプロドラッグはさらに改変されて、共有結合により連結された親水性部分を含むことができる。ある実施態様では、親水性部分は血漿タンパク質、ポリエチレンオキシド鎖又は免疫グロブリンのFc部分である。したがって、ある実施態様では、本開示のプロドラッグはさらに改変されて、インスリンペプチドのアミノ酸の側鎖に共有結合により連結された1つ以上の親水基を含む。

ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するインスリンプロドラッグは、B鎖のN-末端アミノ酸又はB鎖のカルボキシ末端に位置するリジンアミノ酸（例えば配列番号：9の28位又は配列番号：2の29位）の側鎖に親水性部分を連結することによってさらに改変される。ある実施態様では、単鎖インスリンプロドラッグアナログが提供され、この場合、ペプチドリンカーのアミノ酸の1つが当該ペプチドリンカーの側鎖に親水性部分を連結することによって改変される。ある実施態様では、改変されるアミノ酸はシステイン、リジン又はアセチルフェニルアラニンである。

【0120】

別の実施態様では、本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログは、当該インスリンプロドラッグのB鎖のカルボキシ末端に改変アミノ酸を付加することによってさらに改変され、この場合、C-末端に付加されるアミノ酸は改変されて当該アミノ酸に連結された親水性部分を含む。ある実施態様では、C-末端に付加されるアミノ酸は、改変システイン、リジン又はアセチルフェニルアラニンである。ある実施態様では、本明細書開示のペプチドプロドラッグエレメントは、B鎖のC-末端に付加されてあるリジン残基の側鎖アミンに連結される。ある実施態様では、親水性部分は、血漿タンパク質、ポリエチレンオキシド鎖又は免疫グロブリンのFc部分から成る群から選択される。

ある実施態様では、親水基はポリエチレンオキシド鎖であり、ある実施態様では、2つ以上のポリエチレンオキシド鎖が当該インスリンプロドラッグアナログの2つ以上のアミノ酸側鎖に共有結合により付着される。ある実施態様にしたがえば、親水性部分は、A9、A14、A15、B3、B22、B28、B29及びB鎖のC-末端又はN-末端から成る群から選択される位置で、本明細書開示のインスリンプロドラッグアナログのアミノ酸側鎖に共有結合により付着される。複数のポリエチレンオキシド鎖を有するインスリンプロドラッグアナログについては、当該ポリエチレンオキシド鎖は、B鎖のN-末端アミノ酸に又はB鎖のカルボキシ末端に位置するリジンアミノ酸の側鎖に付着されるか、又は当該ペプチドのC-末端にただ1つのアミノ酸を付加することによって付着される（前記付加されるアミノ酸はその側鎖に連結されたポリエチレンオキシド鎖を有する）。ある実施態様にしたがえば、ポリエチレンオキシド鎖又は他の親水性部分は、ジペプチドプロドラッグエレメントを構成する2つのアミノ酸の一方の側鎖に連結される。ある実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメントはリジン（D又はL立体配置）を含み、当該リジンの側鎖アミンにポリエチレンオキシド鎖は付着される。

【0121】

親水性部分の連結

ある実施態様では、本明細書に開示するインスリンアナログの可溶性は、親水性部分をペプチドに共有結合により連結することによって強化される。親水性部分は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために用いられる任意の適切な条件下でインスリンアナログに付着させることができる。当業界で公知の任意の手段を用いることができ、前記には以下を介するものが含まれる：アシル化、還元アルキル化、マイケル付加、チオールアルキル化、又はPEG部分の反応基（例えばアルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミド又はヒドラジノ基）を介する標的化合物の反応基（例えばアルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミド又はヒドラジノ基）と他の化学選択的連結/ライゲーション方法。水溶性ポリマーを1つ以上のタンパク質に連結するために用いることができる活性化基にはスルホン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート、アジチリン、オキシラン及び5-ピリジルが含まれるが、ただしこれらに限定されない。還元アルキル化によってペプチドに付着される場合には、選択されるポリマーは、重合化度を制御できるようにただ1つの反応性アルデヒドを有するべきである（例えば以下を参照されたい：Kinstler et al., Adv. Drug Delivery Rev. 54: 477-485, 2002; Roberts et al., Adv. Drug Delivery Rev. 54: 459-476, 2002; 及びZalipsky et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16: 157-182, 1995）。

【0122】

適切な親水性部分には以下が含まれる：ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばPOG）、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール（POG）、ポリオキシアルキレン、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、モノ-(C1-C10)アルコキシ-又はアリールオキシ-ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリアセタール、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン、ポリペプチド-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリ（ベータ-アミノ酸）（ホモポリマー又はランダムコポリマー）、ポリ（

n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー (PPG) 及び他のポリアルキレンオキシド、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、コロン酸又は他の多糖類ポリマー、フィコール又はデキストラン及びその混合物。

ある実施態様にしたがえば、親水性部分 (例えばポリエチレングリコール鎖) は、約500から約40,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。ある実施態様では、親水性部分 (例えばPEG) は、約500から約5,000ダルトン又は約1,000から約5,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。別の実施態様では、親水性部分 (例えばPEG) は、約10,000から約20,000ダルトンの分子量を有する。さらに他の例示的实施態様では、親水性部分 (例えばPEG) は、約20,000から約40,000ダルトンの分子量を有する。

ある実施態様では、デキストランが親水性部分として用いられる。デキストランは、もっぱら 1-6結合によって連結されたグルコースサブユニットの多糖類ポリマーである。デキストランは、多くの分子量範囲 (例えば約1kDaから約100kDa、又は約5、10、15若しくは20kDaから約20、30、40、50、60、70、80若しくは90kDa) で利用できる。

直鎖状又は分枝状ポリマーが考えられる。得られる連結調製物は本質的に単分散又は多分散であることができ、ペプチド当たり約0.5、0.7、1.2、1.5又は2ポリマー部分を有しうる。ある実施態様では、親水性部分は当該ペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸に連結される。

【0123】

ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログはアミノ酸置換によってさらに改変され、この場合、置換アミノ酸は親水性部分 (例えばポリエチレングリコールを含む) との架橋に適切な側鎖を含む。ある実施態様では、インスリンプロドラッグアナログの親水性部分が連結されることになる位置のアミノ酸は、親水性部分の導入又は付着の容易さのために天然又は合成アミノ酸で置換される (又はC-末端に付加される)。例えば、ある実施態様では、A5、A8、A9、A10、A12、A14、A15、A17、A18、B1、B2、B3、B4、B5、B13、B14、B17、B21、B22、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置の自然のままのアミノ酸は、リジン、システイン又はアセチルフェニルアラニン残基で置換され (又はリジン、システイン又はアセチルフェニルアラニン残基がC-末端に付加され)、ポリエチレングリコール鎖の共有結合付着を可能にする。

ある実施態様では、インスリンプロドラッグアナログはB鎖のカルボキシ末端に付加された単一のシステイン残基を有するか、又はインスリンプロドラッグアナログは少なくとも1つのシステイン残基で置換され、この場合、当該システイン残基の側鎖はさらにチオール反応性試薬 (例えばマレイミド、ビニルスルホン、2-ピリジルチオ、ハロアルキル及びハロアシルを含む) で改変される。これらのチオール反応性試薬は、カルボキシ、ケト、ヒドロキシル及びエーテル基を他の親水性部分 (例えばポリエチレングリコールユニット) と同様に含むことができる。また別の実施態様では、インスリンプロドラッグアナログはB鎖のカルボキシ末端に付加された単一のリジン残基を有するか、又はインスリンプロドラッグアナログはリジンで置換され、さらに当該置換リジン残基の側鎖は、アミン反応性試薬 (例えばカルボン酸の活性エステル (スクシンイミド、無水物など)) 又は親水性部分 (例えばポリエチレングリコール) のアルデヒドを用いてさらに改変される。

【0124】

インスリンプロドラッグアナログがポリエチレングリコール鎖を含む実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は直鎖型であっても、又は分枝状であってもよい。ある実施態様にしたがえば、ポリエチレングリコール鎖は、約20,000から約60,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。複数のポリエチレングリコール鎖をインスリンプロドラッグアナログに連結して、最適な可溶性及び血中クリアランス特性を有するインスリンプロドラッグアナログを提供することができる。ある実施態様では、インスリンプロドラッグアナログは、約20,000から約60,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有するただ1つのポリエチレングリコール鎖に連結される。別の実施態様では、インスリンプロドラッグアナログは2つのポリエチレングリコール鎖に連結され、この場合、2

つの鎖の合計平均分子量は約40,000から約80,000ダルトンの範囲から選択される。ある実施態様では、20,000又は60,000ダルトンの平均分子量を有するただ1つのポリエチレングリコール鎖がインスリンプロドラッグアナログに連結される。別の実施態様では、ただ1つのポリエチレングリコール鎖がインスリンプロドラッグアナログに連結され、前記は約40,000から約50,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。ある実施態様では、2つのポリエチレングリコール鎖がインスリンプロドラッグアナログに連結され、この場合、第一及び第二のポリエチレングリコール鎖は各々20,000ダルトンの平均分子量を有する。別の実施態様では、2つのポリエチレングリコール鎖がインスリンプロドラッグアナログに連結され、この場合、第一及び第二のポリエチレングリコール鎖は各々40,000ダルトンの平均分子量を有する。

10

【0125】

さらに別の実施態様では、ペプチドに共有結合された2つ以上のポリエチレングリコール鎖を含むインスリンプロドラッグアナログが提供され、この場合、ポリエチレングリコール鎖の総分子量は約40,000から約60,000ダルトンである。ある実施態様では、PEG化インスリンプロドラッグはポリエチレングリコール鎖を含み、前記鎖は、配列番号:9のB鎖のN-末端及び/又は28位、又は配列番号:2の29位から選択される1つ以上のアミノ酸に連結され、この場合、PEG鎖の合計分子量は約40,000から約80,000ダルトンである。

ある実施態様にしたがえば、インスリンプロドラッグアナログが提供され、この場合、免疫グロブリン分子のFc部分を表す直鎖状アミノ酸配列は、本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログのアミノ酸側鎖に共有結合により連結され、当該インスリンプロドラッグアナログの可溶性、安定性及び/又は薬物動態が改善される。例えば、免疫グロブリン分子のFc部分を表すアミノ酸配列は、B鎖のN-末端又はA若しくはB鎖のC-末端、又は末端が伸長されてあるA若しくはB鎖のC-末端に共有結合できる。例えば、免疫グロブリン分子のFc部分を表すアミノ酸配列はB鎖のC-末端に共有結合することができ、例えば配列番号:9の28位又は配列番号:2の29位に対応するアミノ酸との連結が含まれる。当該Fc部分は典型的にはIgGから単離されたものであるが、任意の免疫グロブリンのFcペプチドフラグメントも同等に機能するはずである。

20

【0126】

本発明の具体的な特徴では、インスリンプロドラッグアナログはアルキル又はアシル基を含むように改変され、前記改変は、インスリンプロドラッグアナログのアミノ酸（例えばペプチドプロドラッグエレメントのA又はBアミノ酸を含む）の側鎖のアミン、ヒドロキシル又はチオールを介して直接的にアシル化される。ある実施態様では、インスリンプロドラッグアナログは、あるアミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して直接的にアシル化される。ある実施態様では、アシル化は、A9、A14、A15、B3、B22、B28若しくはB29又はペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸から選択される1つ以上の位置で生じる。これに関しては、アシル化インスリンプロドラッグアナログは、配列番号:3のA鎖アミノ酸配列及び配列番号:5のB鎖、又は配列番号:3の改変アミノ酸配列及び/又は側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含む任意のアミノ酸に改変されたA9、A14、A15、B22、B28又はB29位の少なくとも1つのアミノ酸を有する配列番号:5を含むことができる。いくつかの具体的な実施態様では、インスリンプロドラッグアナログの直接アシル化は、B28若しくはB29位のアミノ酸又は当該ペプチドプロドラッグエレメントのA若しくはBアミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して生じる。さらに別のある実施態様では、インスリンプロドラッグアナログは、B28若しくはB29位又は当該ペプチドプロドラッグエレメントのA若しくはBアミノ酸に存在するLysのエプシロン-アミノ基に結合した18 - 24個の炭素原子を有するカルボン酸のアシル基を含む。ある実施態様では、単鎖インスリンプロドラッグアナログが提供され、この場合、ペプチドリンカーのアミノ酸の1つが改変され、当該ペプチドリンカーのアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシル又はチオールを介して直接アシル化によってアシル基を含む。ある実施態様にしたがえば、単鎖インスリンアナログのペプチドリンカーは、AGRGSGK（配列番号:35）、AGLGSGK（配列番号:36）、AGMGSGK（配列番号:37）、ASWGSGK（配列番号:38）、TGLGSGQ（配列番

30

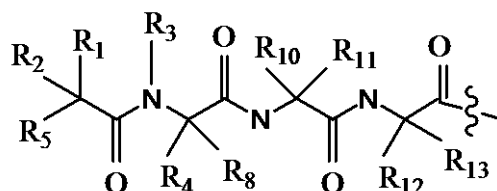
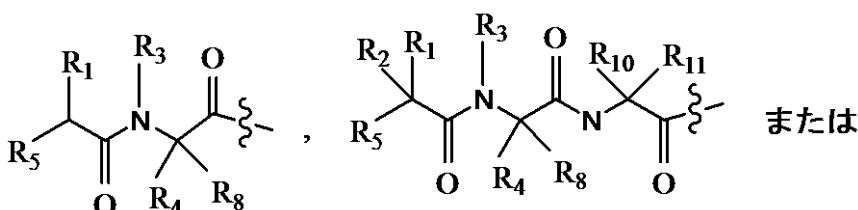
40

50

号:39)、TGLGRGK(配列番号:40)、TGLGSGK(配列番号:41)、HGLYSGK(配列番号:42)、KGLGSGQ(配列番号:43)、VGLMSGK(配列番号:44)、VGLSSGQ(配列番号:45)、VGLYSK(配列番号:46)、VGLSSGK(配列番号:47)、VGMSSGK(配列番号:48)、VWSSSGK(配列番号:49)、VGSSSGK(配列番号:50)、VGMSSGK(配列番号:51)、TGLGSGR(配列番号:52)、TGLGKGQ(配列番号:53)、KGLSSGQ(配列番号:54)、VKLSSGQ(配列番号:55)、VGLKSGQ(配列番号:56)、TGLGKGQ(配列番号:57)及びVGLSKGQ(配列番号:58)(SEQ ID NO:58)から成る群から選択され、ここで、A鎖内、B鎖内又は接続ペプチド内の少なくとも1つのリジン残基がアシル化によって化学的に改変される。ある実施態様では、アシル化基は1-5、10-12又は18-24個の炭素の鎖を含む。ある実施態様では、単鎖インスリンアナログの連結ペプチドの少なくとも1つのリジン残基は、A-B-Cと当該連結ペプチドの側鎖アミンとの間のアミド結合を介して本明細書に開示するペプチドプロドラッグエレメントに連結される。

【0127】

ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログは、追加の化合物を当該アナログのペプチドプロドラッグエレメントに連結するためにさらに改変される。ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメント(A-B又はA-B-C)を構成するアミノ酸の側鎖はPEG化、アシル化又はアルキル化される。ある実施態様では、ジペプチド(A-B)は18-24個の炭素の鎖を含む基でアシル化される。ある実施態様では、ジペプチド(A-B)は40-80kDaのポリエチレングリコール鎖でPEG化される。ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントのジペプチド(A-B)はPEG化され、当該ペプチドプロドラッグエレメントに連結されたインスリンペプチドがアシル化される(例えばB鎖C-末端(B28又はB29)のリジンのアシル化を含む)。ある実施態様にしたがえば、親水性部分又は隔離用巨大分子は、以下の一般構造を含むペプチドプロドラッグエレメントのR₁側鎖に共有結合により連結され、



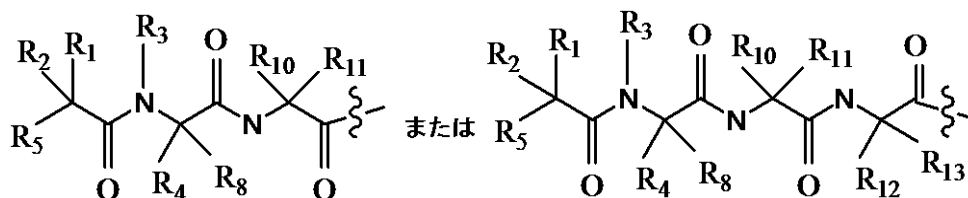
【0129】

式中、R₁は(C₁-C₄アルキル)OH、(C₁-C₄アルキル)SH、及び(C₁-C₄アルキル)NH₂から成る群から選択される。ある実施態様では、R₁は(C₃-C₄アルキル)NH₂である。隔離用巨大分子は当業者には公知であり、デキストラン及び大きな分子量(すなわち80kDa以上)のポリエチレングリコールが含まれる。隔離用巨大分子をジペプチド部分に連結することによって、プロドラッグは隔離されたままで、一方、活性なインスリンペプチドは、ジペプチドのアミド結合の切断の反応速度に基づいてゆっくりと遊離される。ある実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメントはさらに、当該ペプチドプロドラッグエレメントのN-末端アミンに共有結合により連結される第二のペプチドを含み、この場合、第二のペプチドは哺乳動物血清に存在する酵素に暴露されたときにのみ当該ペプチドプロドラッグエレメントから切断される。さらにまた、第二のペプチドは、当該第二のペプチドの切断はペプチド

プロドラッグエレメントをインスリンペプチドに連結されたままにし、かつインスリンペプチドから自発的に化学切断されてジケトピペラジンを形成する能力を維持するように選択され、かつ当該ペプチドプロドラッグエレメントに連結される。ある実施態様では、第二のペプチドはジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) によって切断されるペプチドであり、例えばArg-Pro、Lys-Pro又はGlu-Proが含まれる。ある実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメントは下記構造を含む：

【0130】

【化28】



10

【0131】

本開示はまた他の連結物を包含し、前記では、本発明のインスリンプロドラッグアナログは任意的に共有結合を介して、及び任意的にリンカーを介して連結物に連結される。連結は、化学的共有結合、物理的な力、例えば静電気、水素、イオン、ファンデルワールス又は疎水性若しくは親水性相互作用によって達成されうる。多様な非共有結合性カップリング系を用いることができる。前記には、ビオチン-アビジン、リガンド/受容体、酵素/基質、核酸/核酸結合タンパク質、脂質/脂質結合タンパク質、細胞接着分子パートナー又は任意の結合パートナー、又は互に親和性を有する前記のフラグメントが含まれる。

20

例示的連結物には、異種ペプチド若しくは異種ポリペプチド（例えば血漿タンパク質を含む）、向標物質、免疫グロブリン若しくはそのフラグメント（例えば可変領域、CDR又はFc領域）、診断用標識（例えば放射性同位元素、発蛍光団又は酵素標識）、ポリマー（水溶性ポリマーを含む）、又は他の治療薬若しくは診断薬が含まれるが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様では、本開示のインスリンプロドラッグアナログ及び血漿タンパク質を含む連結物が提供され、この場合、血漿タンパク質はアルブミン、トランスフェリン及びフィブリノゲンから成る群から選択される。ある実施態様では、連結物の血漿タンパク質部分はアルブミン又はトランスフェリンである。ある実施態様では、リンカーは1から約60、又は1から30原子以上、2から5原子、2から10原子、5から10原子、又は10から20原子の長さの原子の鎖を含む。ある実施態様では、鎖の原子は全て炭素原子である。ある実施態様では、リンカー骨格の鎖の原子はC、O、N及びSから成る群から選択される。鎖の原子及びリンカーは、より可溶性の連結物を提供するために期待される可溶性（親水性）にしたがって選択できる。ある実施態様では、リンカーは官能基を提供し、前記官能基は、標的組織若しくは器官若しくは細胞で見出される酵素若しくは他の触媒又は加水分解性条件による切断に付される。ある実施態様では、リンカーの長さは立体障害ゆえにその潜在能力を低下させるために十分に長い。リンカーが共有結合又はペプチジル結合であり、連結物がポリペプチドである場合、完全な連結物は融合タンパク質でありうる。そのようなペプチジルリンカーは任意の長さでありうる。例示的リンカーは、長さが約1

30

40

【0132】

アシル化及びアルキル化

ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するインスリンアナログは改変されてアシル基又はアルキル基を含む。アシル化又はアルキル化は循環中のインスリンアナログの半減期を増加させることができる。アシル化又はアルキル化は、有利には作用の開始を遅らせ、及び/又はインスリン及び/又はIGF-1受容体における作用の持続時間を延長し、及び/又はプロテアーゼ（例えばDPP-IV）に対する耐性を改善し、及び/又は可溶性を改善

50

することができる。インスリンアナログは、親水性部分が連結される同じアミノ酸の位置で、又は異なるアミノ酸の位置でアシル化又はアルキル化されうる。

ある実施態様では、本発明は改変されたインスリンアナログを提供し、前記アナログは、自然のままのインスリンのA10、B28、B29に対応する位置のアミノ酸に又はA若しくはB鎖のC-末端若しくはN-末端に共有結合により連結されたアシル基又はアルキル基を含む。インスリンアナログは、さらにインスリンアナログのアミノ酸とアシル基又はアルキル基との間にスペーサーを含むことができる。ある実施態様では、アシル基は、脂肪酸又は胆汁酸又はその塩、例えばC4からC30脂肪酸、C8からC24脂肪酸、コール酸、C4からC30アルキル、C8からC24アルキル、又は胆汁酸のステロイド部分を含むアルキルである。スペーサーは、アシル又はアルキル基を付着させる適切な反応基を有する任意の部分である。例示的な実施態様では、スペーサーは、アミノ酸、ジペプチド、又はトリペプチド、又は親水性二官能基スペーサーを含む。ある実施態様では、スペーサーは、Trp、Glu、Asp、Cys、及び $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ （式中mは1から6の任意の整数、nは2から12の任意の整数）含有スペーサーから成る群から選択される。そのようなアシル化又はアルキル化インスリンペプチドはさらに親水性部分（任意的にポリエチレングリコール）もまた含むことができる。前述のインスリンはいずれも2つのアシル基又は2つのアルキル基、又はその組合せを含むことができる。

【0133】

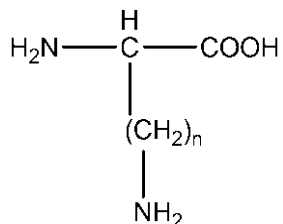
アシル化はインスリンアナログ内の任意の位置で実施できるが、ただしインスリンアナログのインスリンアゴニスト活性が維持されることを条件とする。アシル基はインスリンアナログのアミノ酸に共有結合により直接連結されるか、又はスペーサーを介してインスリンアナログのアミノ酸に間接的に連結することができ、ここでスペーサーはインスリンペプチドとアシル基との間に位置する。本発明の具体的な特徴では、インスリンアナログは、インスリンペプチドのアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシル又はチオールの直接アシル化によってアシル基を含むように改変される。ある実施態様では、インスリンアナログは、アミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して直接的にアシル化される。ある実施態様では、アシル化は、自然のままのインスリンのA10、B28、B29に対応する位置で、又はA若しくはB鎖のC-末端若しくはN-末端で生じる。これに関しては、アシル化インスリンアナログは、配列番号:9及び配列番号:2のアミノ酸配列、又は本明細書に記載のアミノ酸改変の1つ以上を含む改変された配列番号:9及び2のアミノ酸配列を含み、自然のままのインスリンのB3、B28、B29に対応する位置又はA若しくはB鎖のC-末端若しくはN-末端のアミノ酸の少なくとも1つが、側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含む任意のアミノ酸に改変される。いくつかの具体的な実施態様では、インスリンペプチドの直接アシル化は、自然のままのインスリンのB3、B28、B29に対応する位置のアミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して生じる。ある実施態様にしたがえば、ペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸側鎖の1つがアシル化される。

【0134】

ある実施態様では、アシル化されるべきアミノ酸は下記式IVのアミノ酸であり、

【0135】

【化29】



（式IV）

【0136】

式IVでnは1から4である。

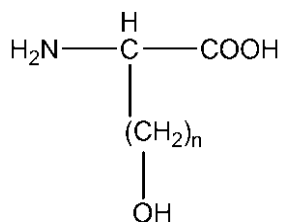
いくつかの例示的な実施態様では、式IVのアミノ酸は、nが4（Lys）であるか、nが3（Orn）

)であるアミノ酸である。

他の実施態様では、側鎖ヒドロキシルを含むアミノ酸は下記式Vのアミノ酸であり、

【0137】

【化30】



(式V)

【0138】

式Vでnは1から4である。

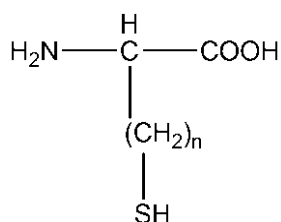
いくつかの例示的实施態様では、式Vのアミノ酸は、nが1 (Ser) であるアミノ酸である。

。

さらに他の実施態様では、側鎖チオールを含むアミノ酸は下記式VIのアミノ酸であり、

【0139】

【化31】



(式VI)

【0140】

式VIでnは1から4である。

いくつかの例示的实施態様では、式VIのアミノ酸は、nが1 (Cys) であるアミノ酸である。

いくつかの例示的实施態様では、インスリンアナログは、スペーサーのアミン、ヒドロキシル又はチオールのアシル化によってアシル基を含むように改変され、当該スペーサーはB3、B28又はB29位 (野生型インスリンのアミノ酸の番号付けにしたがう) のアミノ酸の側鎖に付着されるか、又はペプチドプロドラッグエレメントのA若しくはBアミノ酸に付着される。スペーサーに結合するアミノ酸は、当該スペーサーとの連結を許容する部分を含む任意のアミノ酸でありうる。例えば、側鎖NH₂、-OH又は-COOH (例えばLys、Orn、Ser、Asp又はGlu) を含むアミノ酸が適切である。ある実施態様では、スペーサーは、側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオールを含むアミノ酸、又は側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオールを含むアミノ酸を含むジペプチド若しくはトリペプチドである。

【0141】

アシル化がスペーサーのアミン基を介して生じるとき、アシル化は当該アミノ酸のアルファアミン又は側鎖アミンを介して生じうる。アルファアミンがアシル化される事例では、スペーサーアミノ酸は任意のアミノ酸でありうる。例えば、スペーサーアミノ酸は疎水性アミノ酸 (例えばGly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr) でありうる。また別に、スペーサーアミノ酸は酸性残基 (例えばAsp及びGlu) でありうる。スペーサーアミノ酸の側鎖アミンがアシル化される事例では、スペーサーアミノ酸は側鎖アミンを含むアミノ酸、例えば式Iのアミノ酸 (例えばLys又はOrn) である。この事例では、スペーサーアミノ酸のアルファアミン及び側鎖アミンの両方をアシル化し、インスリンペプチドを二アシル化することが可能である。本開示はさらに二アシル化インスリンアナログを意図する。

アシル化がスペーサーのヒドロキシル基を介して生じるとき、アミノ酸又はジペプチド

10

20

30

40

50

若しくはトリペプチドのアミノ酸の1つは式IIのアミノ酸でありうる。具体的な例示の実施態様では、アミノ酸はSerである。

ある実施態様では、当該スペーサーは親水性の二官能性スペーサーを含む。具体的な実施態様では、スペーサーはアミノポリ(アルキルオキシ)カルボキシレートを含む。これに関して、スペーサーは、例えば $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ (式中 m は1から6の任意の整数で、 n は2から12の任意の整数)を含むことができ、前記は例えば8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ペプチドインターナショナル社(Peptides International, Inc., Louisville, KY)から市場で入手できる)である。

アミン、ヒドロキシル及びチオールを介するペプチドアシル化の適切な方法は当業界で公知である。例えば以下を参照されたい: Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 37 7-382, 1996; Shimohigashi and Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62, 1982; 及びPreviero et al., Biochim Biophys Acta 263: 7-13, 1972 (ヒドロキシルを介するアシル化の方法に関する); 並びにSan and Silvius, J Pept Res 66: 169-180, 2005 (チオールを介するアシル化の方法に関する); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2-12, 1990; Hashimoto et al., Pharmaceutical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol.6, No: 2 pp.171-176, 1989。

【0142】

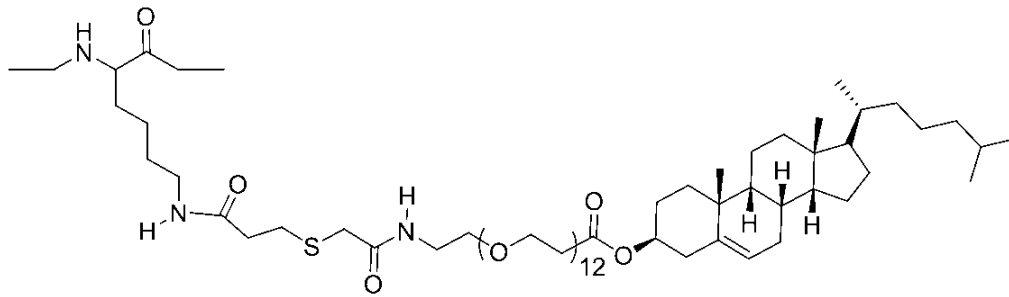
アシル化インスリンペプチドのアシル基は任意のサイズ(例えば任意長の炭素鎖)であることができ、さらに直鎖状でも分枝状でもよい。本発明のいくつかの具体的な実施態様では、アシル基はC4からC30脂肪酸である。例えば、アシル基は、C4脂肪酸、C6脂肪酸、C8脂肪酸、C10脂肪酸、C12脂肪酸、C14脂肪酸、C16脂肪酸、C18脂肪酸、C20脂肪酸、C22脂肪酸、C24脂肪酸、C26脂肪酸、C28脂肪酸、又はC30脂肪酸のいずれかでありうる。ある実施態様では、アシル基はC18からC20脂肪酸、例えばC18脂肪酸、C19脂肪酸又はC20脂肪酸である。

また別の実施態様では、アシル基は胆汁酸である。胆汁酸は任意の適切な胆汁酸であることができ、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リソコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、及びコレステロール酸が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

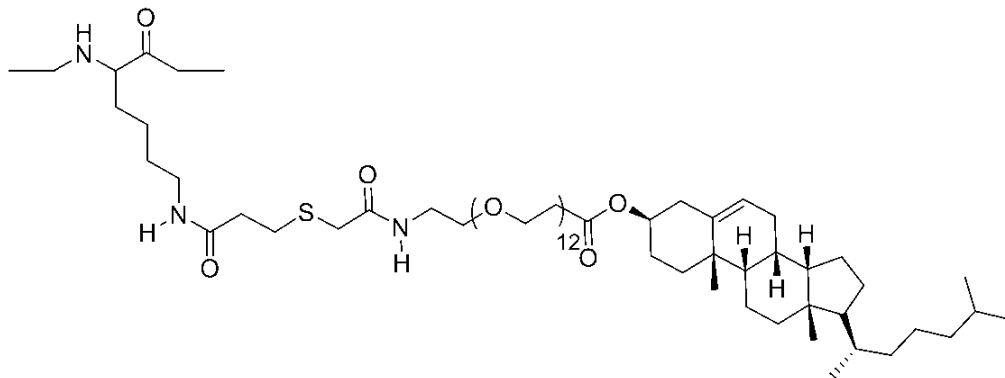
具体的な実施態様では、インスリンアナログはコレステロール酸を含み、前記は当該インスリンアナログのLys残基に、アルキル化デスアミノCysスペーサー(すなわちアルキル化3-メルカプトプロピオン酸スペーサー)を介して連結される。アルキル化デスアミノCysスペーサーは、例えばドデカエチレングリコール部分を含むデスアミノCysスペーサーでありうる。ある実施態様では、インスリンアナログは下記の構造を含む:

【0143】

【化 3 2】



または



【 0 1 4 4 】

本明細書に記載するアシル化インスリンアナログはさらに改変されて親水性部分を含むことができる。いくつかの具体的な実施態様では、親水性部分はポリエチレングリコール（PEG）鎖を含むことができる。親水性部分の取り込みは、任意の適切な手段、例えば本明細書に記載の方法により達成できる。

また別には、アシル化インスリンペプチドはスペーサーを含むことができ、この場合、スペーサーはアシル化され、かつ親水性部分を含むように改変される。適切なスペーサーの非限定的な例には、Cys、Lys、Orn、ホモ-Cys及びAc-Pheから成る群から選択される1つ以上のアミノ酸を含むスペーサーが含まれる。

ある実施態様にしたがえば、インスリンアナログは改変されてアルキル基を含み、前記アルキル基は、エステル、エーテル、チオエーテル、アミド又はアルキルアミン結合を介してインスリンアナログに付着され、アルキル基付着の目的は、循環中での半減期の延長及び/又は作用の開始の延期及び/又は作用持続時間の延長及び/又はプロテアーゼ（例えばDPP-IV）に対する耐性の改善である。

アルキル化インスリンペプチドのアルキル基は任意のサイズ（例えば任意長の炭素鎖）であることができ、さらに直鎖状でも分枝状でもよい。本発明のある実施態様では、アルキル基はC1からC30アルキル基である。例えば、アルキル基はC1アルキル、C2アルキル、C3アルキル、C4アルキル、C6アルキル、C8アルキル、C10アルキル、C12アルキル、C14アルキル、C16アルキル、C18アルキル、C20アルキル、C22アルキル、C24アルキル、C26アルキル、C28アルキル、C30アルキルである。ある実施態様では、アルキル基はC18からC20アルキル、例えばC18アルキル、C19アルキル又はC20アルキルである。

いくつかの具体的な実施態様では、アルキル基は胆汁酸（例えばコール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リソコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、及びコレステロール酸）のステロイド部分を含む。

【 0 1 4 5 】

いくつかの実施態様にしたがえば、ペプチドプロドラッグエレメントはさらに改変されて親水性部分を含むことができる。いくつかの実施態様では、親水性部分はポリエチレングリコール鎖である。いくつかの実施態様にしたがえば、40k以上のポリエチレングリコール鎖が、ペプチドプロドラッグエレメントのA又はBアミノ酸の側鎖に共有結合される。別の実施態様では、ペプチドプロドラッグエレメントのジペプチド（A-B）は、さらに加

10

20

30

40

50

えて或いはまた別に脂肪酸若しくは胆汁酸又はその塩（例えばC4からC30脂肪酸、C18からC24脂肪酸、コール酸、C18からC30アルキル、C18からC24アルキル、または胆汁酸のステロイド部分を含むアルキル）でアシル化又はアルキル化される。ジペプチドプロドラッグエレメントの「A」アミノ酸には、例えばその側鎖アミノ基を介してアシル又はアルキル基に共有結合されるd-リジン、又はその側鎖スルフヒドリル基を介してPEGに共有結合されるd-システインが含まれる。ジペプチドプロドラッグエレメントは、親水性部分、アシル基、若しくはアルキル基に直接結合されるか、又は本明細書に記載のスペーサーを介して親水性部分、アシル基若しくはアルキル基に結合される。また別には、ジペプチドプロドラッグエレメントは、デポタンパク質（例えばデキストラン又は大きなPEG分子（80,000ダルトン以上））に連結される（デポタンパク質は、ジペプチドの切断が活性なインスリンペプチド（Q）を遊離させるまで、当該プロドラッグを注射部位に隔離するために役立つ）。

【0146】

ジペプチドプロドラッグエレメント構造の切断速度における影響

本明細書に先きに記載したように、ジペプチドプロドラッグエレメントA-Bの生物活性ペプチドからの切断速度（したがってプロドラッグ活性化速度）は、構造（N-アルキル化、置換基の数、長さ又はかさ高性を含む）、及びジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸の立体空間配置に左右される。ジペプチドプロドラッグエレメントA-Bの（例えばインスリンペプチド（Q）からの）切断速度はまた、ジケトピペラジン形成時のQの脱離基の立体障害、求核性及び安定性に左右される。これらの構造的特色的いくつかは、下記の

カテゴリーI、カテゴリーII、及びカテゴリーIII（前記は本発明の部分を形成する）に記載される。これらカテゴリーI、II及びIIIのいずれから、国際出願PCT/US2009/68745（2009年12月18日出願）又はその配列表に開示されたペプチド配列、並びに国際出願PCT/US2009/68745（2009年12月18日出願）に開示された（1）ジペプチドプロドラッグエレメント、（2）Aアミノ酸、及び/又は（3）Bアミノ酸のサブカテゴリーは、それらが本明細書に記載のサブカテゴリーのいずれかに完全に収まるか及び/又はその一部分とオーバーラップするかぎり、さらには、もっぱら特許請求の範囲の主題の新規性付与に必要である場合にかぎり明確に除外される。

ある実施態様にしたがえば、自己切断ジペプチドエレメント（A-B）は、A-B-Cとインスリンペプチド（Q）の脂肪族アミノ基との間のアミド結合を介してQと共有結合により連結される。例えば、脂肪族アミノ基は、A鎖又はB鎖のN-末端アミノ酸の脂肪族アミノ基でありうる。また別には、脂肪族アミノ基は、Qの側鎖の脂肪族アミノ基でありうる。ある実施態様では、A-B-Cはリジン（例えば、B鎖配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：2）のB29位又はB鎖配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT（配列番号：9）のB28位を含む）の側鎖アミンに連結される。

ある実施態様では、QはA鎖及びB鎖を含むインスリンペプチドであり、この場合、A鎖は配列GIVEQCCX₁SICSLYQLENYCX₃（配列番号：3）を含み、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：2）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT（配列番号：9）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT（配列番号：5）及びFVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT（配列番号：6）から成る群から選択される配列を含む。

【0147】

カテゴリーI：ジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸Bの組成

いくつかの実施態様では、プロドラッグの半減期（例えば、生理学的条件下のPBS中で少なくとも約1時間から約1週間である、A-B-CのQからの化学切断半減期（ $t_{1/2}$ ））は、Bアミノ酸におけるN-アルキル置換基の存在及び長さによって左右される。例えば、Bアミノ酸により短いN-アルキル置換基（例えばGly(N-メチル)）を有するプロドラッグは、より長いN-アルキル置換基（例えばGly(N-ヘキシル)）をBアミノ酸に有するプロドラッグより遅い速度でA-B-Cが切断され、より長い半減期を有するであろう。

いくつかの実施態様では、プロドラッグの半減期は、ジペプチドプロドラッグエレメントのBアミノ酸のアルキル側鎖の有無及びアルキル側鎖のベータ位の置換度に左右される

10

20

30

40

50

。例えば、ベータ位で二置換されるN-アルキル化Bアミノ酸（例えばN-アルキル化イソロイシン）を有するプロドラッグは、ベータ位で一置換されるN-アルキル化Bアミノ酸（例えばN-アルキル化ロイシン）を有するプロドラッグよりも長い半減期を有する。さらにまた、ベータ位で一置換されるN-アルキル化Bアミノ酸（例えばN-アルキル化ロイシン）を有するプロドラッグは、ベータ位で置換されていないN-アルキル化Bアミノ酸（例えばN-アルキル化アラニン）を有するプロドラッグよりもA-B-Cがよりゆっくりと切断され、より長い半減期を有するであろう。さらにまた、置換されていないベータ位を有するN-アルキル化Bアミノ酸（例えばN-アルキル化アラニン）は、Bアミノ酸としてグリシン又はN-アルキル化グリシンを有するプロドラッグよりもA-B-Cがよりゆっくりと切断され、より長い半減期を有するであろう。

10

いくつかの実施態様では、プロドラッグの半減期はBアミノ酸の側鎖のかさ高性に左右される。例えば、Bアミノ酸の側鎖がかさ高い（例えばN-アルキル化フェニルアラニン）プロドラッグは、Bアミノ酸の側鎖のかさ高性が小さい（例えばN-アルキル化アラニン）プロドラッグよりもA-B-Cがよりゆっくりと切断され、より長い半減期を有するであろう。ジペプチドの切断速度は、当該ジペプチドに付着する薬剤（例えばインスリン）のアミンによってさらに差別化されうる。より具体的には、同じペプチドが、芳香族アミンに連結されるときN-末端アミンと比べてより速い速度で切断され、この場合、N-末端アミンに連結されたジペプチドは、リジン残基の側鎖アミンにペプチドが連結されるときと比べてより速い速度で切断されるであろう。

ジペプチドプロドラッグエレメントのBアミノ酸の組成は、下記のサブカテゴリーIA、IB及びICに分類することができる。概して、サブカテゴリーIAのジペプチドプロドラッグエレメントは最も速く切断され、サブカテゴリーICのジペプチドプロドラッグエレメントは最もゆっくりと切断される。

20

【0148】

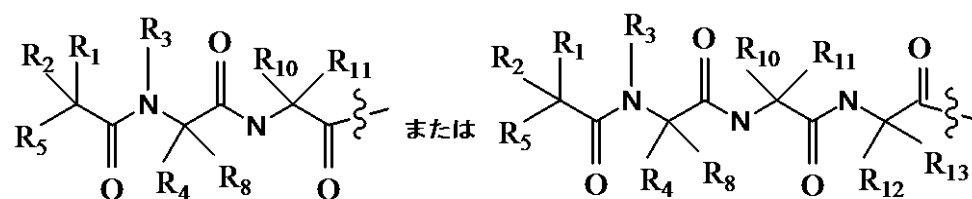
サブカテゴリーIA：ジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸BはN-アルキル化グリシンである

いくつかの実施態様では、インスリンプロドラッグは構造A-B-C-Qを含み、式中、Qはインスリンペプチドであり、A-B-Cは下記構造を含み、

【0149】

【化33】

30



【0150】

ここで、

40

R_1 は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-R_9$ 又は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-S_1-R_9$ であり；

R_2 は、H、 C_1-C_{18} アルキル、 C_2-C_{18} アルケニル、 $(C_1-C_{18} \text{ アルキル})OH$ 、 $(C_1-C_{18} \text{ アルキル})SH$ 、 $(C_2-C_3 \text{ アルキル})SCH_3$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})CONH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NHC(NH_2^+)NH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_3-C_6 \text{ シクロアルキル})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_2-C_5 \text{ 複素環})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_6-C_{10} \text{ アリール})R_7$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})(C_3-C_9 \text{ ヘテロアリール})$ 、及び C_1-C_{12} アルキル (W_1) C_1-C_{12} アルキル（式中、 W_1 はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子である）から成る群から選択されるか、又は R_1 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒に C_3-C_{12} シクロアルキルを形成し；

R_3 は C_1-C_{18} アルキルであり；

R_4 及び R_8 は各々Hであり；

50

R_5 は NHR_6 であり ;

R_6 は H 又は C_1 - C_4 アルキルであるか、又は R_5 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員の複素環式環であり ;

R_7 は H、OH から成る群から選択され ;

R_9 は C_{16} - C_{30} アシル及び C_{16} - C_{30} アルキルから成る群から選択され ;

R_{11} 及び R_{13} は 各々 H であり ;

R_{10} 及び R_{12} は 独立に (C_1 - C_4 アルキル) COOH 、(C_1 - C_4 アルキル) NH_2 、(C_1 - C_4 アルキル) $\text{NHC}(\text{NH}_2^+) \text{NH}_2$ 及び $\text{CH}_2(\text{C}_3\text{-N}_2\text{複素環})$ から成る群から選択され ; さらに

S_1 は、結合、又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。

10

いくつかの実施態様では、Bアミノ酸は、グリシン(N-メチル)、グリシン(N-エチル)、グリシン(N-プロピル)、グリシン(N-ブチル)、グリシン(N-ペンチル)、グリシン(N-ヘキシル)、グリシン(N-ヘプチル)、及びグリシン(N-オクチル)から成る群から選択される。例えば、Bアミノ酸はグリシン(N-メチル)又はグリシン(N-ヘキシル)でありうる。

いくつかの実施態様では、 R_2 は水素であり、 R_3 は C_1 - C_4 アルキルである。

【0151】

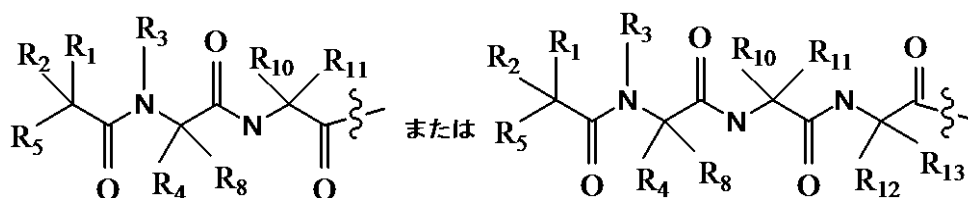
サブカテゴリーIB：ジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸Bはベータ位で非置換又は一置換されている

いくつかの実施態様では、インスリンプロドラッグは構造A-B-C-Qを含み、式中、Qはインスリンペプチドであり、A-B-Cは下記構造を含み、

20

【0152】

【化34】



30

【0153】

ここで、

R_1 は H、(C_1 - C_6 アルキル) NH-R_9 、(C_1 - C_6 アルキル) $\text{NH-S}_1\text{-R}_9$ から成る群から選択され ;

R_2 は、H、 C_1 - C_{18} アルキル、 C_2 - C_{18} アルケニル、(C_1 - C_{18} アルキル) OH、(C_1 - C_{18} アルキル) SH、(C_2 - C_3 アルキル) SCH_3 、(C_1 - C_4 アルキル) CONH_2 、(C_1 - C_4 アルキル) COOH 、(C_1 - C_4 アルキル) NH_2 、(C_1 - C_4 アルキル) $\text{NHC}(\text{NH}_2^+) \text{NH}_2$ 、(C_0 - C_4 アルキル) (C_3 - C_6 シクロアルキル)、(C_0 - C_4 アルキル) (C_2 - C_5 複素環)、(C_0 - C_4 アルキル) (C_6 - C_{10} アリール) R_7 、(C_1 - C_4 アルキル) (C_3 - C_9 ヘテロアリール)、及び C_1 - C_{12} アルキル (W_1) C_1 - C_{12} アルキル (式中、 W_1 は N、S 及び O から成る群から選択されるヘテロ原子である) から成る群から選択されるか、又は R_1 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒に C_3 - C_{12} シクロアルキルを形成し ;

40

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであり ;

R_4 は、 CH_3 、 $\text{CH}_2(\text{C}_1$ - C_{10} アルキル)、 $\text{CH}_2(\text{C}_2$ - C_{10} アルケニル)、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_{10} アルキル) OH、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_{10} アルキル) SH、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_3 アルキル) SCH_3 、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_3 アルキル) CONH_2 、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_3 アルキル) COOH 、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_3 アルキル) NH_2 、(C_1 - C_6 アルキル) NH-R_9 、(C_1 - C_6 アルキル) $\text{NH-S}_1\text{-R}_9$ 、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_3 アルキル) $\text{NHC}(\text{NH}_2^+) \text{NH}_2$ 、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_3 アルキル) (C_3 - C_6 シクロアルキル)、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_3 アルキル) (C_2 - C_5 複素環)、 $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_3 アルキル) (C_6 - C_{10} アリール) R_7 、 $\text{CH}_2(\text{C}_1$ - C_3 アルキル) (C_3 - C_9 ヘテロアリール)、及び $\text{CH}_2(\text{C}_0$ - C_{12} アルキル) (W_1) C_1 - C_{12} アルキル (式中 W_1 は N、S 及び O から成る群から選択されるヘテロ原子) から成る群から選択されるか、又は R_4 及び R_3 はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員複素環式環を形成し ;

50

R_8 はHであり；

R_5 は NHR_6 であるか、又は R_5 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員複素環式環を形成し；

R_6 はH又は C_1 - C_4 アルキルであり；

R_7 はH及びOHから成る群から選択され；

R_9 は C_{16} - C_{30} アシル及び C_{16} - C_{30} アルキルから成る群から選択され；

R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり；

R_{10} 及び R_{12} は独立に(C_1 - C_4 アルキル) $COOH$ 、(C_1 - C_4 アルキル) NH_2 、(C_1 - C_4 アルキル) $NHC(NH_2^+)$ NH_2 及び $CH_2(C_3-N_2$ 複素環)から成る群から選択され；さらに

S_1 は、結合、又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーであるが、ただし R_4 が(C_1 - C_6 アルキル) $NH-R_9$ 又は(C_1 - C_6 アルキル) $NH-S_1-R_9$ であるときは、 R_1 はHであることを条件とする。

いくつかの実施態様では、 R_1 は、(C_1 - C_6 アルキル) $NH-R_9$ 又は(C_1 - C_6 アルキル) $NH-S_1-R_9$ であり、さらに R_4 は、 CH_3 、 $CH_2(C_1-C_4$ アルキル)、 $CH_2(C_1-C_4$ アルケニル)、 $CH_2(C_0-C_4$ アルキル) OH 、 $CH_2(C_0-C_4$ アルキル) SH 、 $CH_2(C_0-C_3$ アルキル) SCH_3 、 $CH_2(C_0-C_3$ アルキル) $CONH_2$ 、 $CH_2(C_0-C_3$ アルキル) $COOH$ 、 $CH_2(C_0-C_4$ アルキル) NH_2 及び $CH_2(C_0-C_3$ アルキル) $NHC(NH_2^+)$ NH_2 から成る群から選択される。

【0154】

これらの実施態様におけるBアミノ酸の非限定的な例には、アラニン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、ロイシン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、メチオニン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、アスパラギン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、グルタミン酸($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、アスパラギン酸($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、グルタミン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、ヒスチジン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、リジン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、アルギニン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、セリン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、及びシステイン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)が含まれる。

いくつかの実施態様では、 R_1 は(C_1 - C_6 アルキル) $NH-R_9$ 又は(C_1 - C_6 アルキル) $NH-S_1-R_9$ であり、さらにBアミノ酸は、アラニン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、ロイシン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、メチオニン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、アスパラギン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、グルタミン酸($N-C_1$ - C_6 アルキル)、アスパラギン酸($N-C_1$ - C_6 アルキル)、グルタミン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、ヒスチジン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、リジン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、アルギニン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、セリン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、及びシステイン($N-C_1$ - C_6 アルキル)から成る群から選択される。

例えば、Bアミノ酸にはアラニン(N -メチル)、ロイシン(N -メチル)、メチオニン(N -メチル)、アスパラギン(N -メチル)、グルタミン酸(N -メチル)、アスパラギン酸(N -メチル)、グルタミン(N -メチル)、ヒスチジン(N -メチル)、リジン(N -メチル)、アルギニン(N -メチル)、セリン(N -メチル)、及びシステイン(N -メチル)が含まれうる。

いくつかの実施態様では、 R_1 は(C_1 - C_6 アルキル) $NH-R_9$ 又は(C_1 - C_6 アルキル) $NH-S_1-R_9$ であり、さらに R_4 は、 $CH_2(C_0-C_3$ アルキル)(C_3 - C_6 シクロアルキル)、 $CH_2(C_0-C_3$ アルキル)(C_2 - C_5 複素環)、 $CH_2(C_0-C_3$ アルキル)(C_6 - C_{10} アリール) R_7 、 $CH_2(C_1-C_3$ アルキル)(C_3 - C_9 ヘテロアリール)、及び $CH_2(C_0-C_{12}$ アルキル)(W_1) C_1 - C_{12} アルキル(式中 W_1 はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子)から成る群から選択され、ここで R_7 はH及びOHから成る群から選択される。

これらの実施態様におけるBアミノ酸の非限定的な例には、フェニルアラニン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)、チロシン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)及びトリプトファン($N-C_1$ - C_{10} アルキル)が含まれる。いくつかの実施態様では、Bアミノ酸は、フェニルアラニン($N-C_1$ - C_6 アルキル)、チロシン($N-C_1$ - C_6 アルキル)及びトリプトファン($N-C_1$ - C_6 アルキル)から成る群から選択される。例えば、Bアミノ酸には、フェニルアラニン(N -メチル)、チロシン(N -メチル)及びトリプトファン(N -メチル)が含まれうる。

いくつかの実施態様では、Bアミノ酸はプロリンである。いくつかの実施態様では、プロリンはサブカテゴリーIBから除外される。

【0155】

10

20

30

40

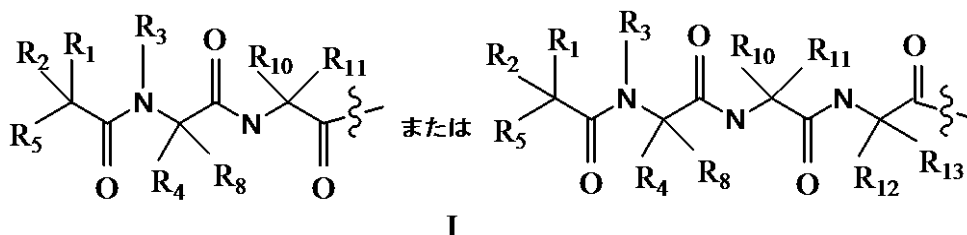
50

サブカテゴリーIC：ベータ位で二置換されるジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸B

いくつかの実施態様では、インスリンプロドラッグは構造A-B-C-Qを含み、式中、Qはインスリンペプチドであり、A-B-Cは下記構造を含み、

【0156】

【化35】



10

【0157】

ここで、

R_1 は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-R_9$ 又は $(C_1-C_6 \text{ アルキル})NH-S_1-R_9$ であり；

R_2 は、H、 C_1-C_{18} アルキル、 C_2-C_{18} アルケニル、 $(C_1-C_{18} \text{ アルキル})OH$ 、 $(C_1-C_{18} \text{ アルキル})SH$ 、 $(C_2-C_3 \text{ アルキル})SCH_3$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})CONH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NHC(NH_2^+)NH_2$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_3-C_6 \text{ シクロアルキル})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_2-C_5 \text{ 複素環})$ 、 $(C_0-C_4 \text{ アルキル})(C_6-C_{10} \text{ アリール})R_7$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})(C_3-C_9 \text{ ヘテロアリール})$ 、及び C_1-C_{12} アルキル (W_1) C_1-C_{12} アルキル (式中、 W_1 はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子) から成る群から選択されるか、又は R_1 及び R_2 がそれらに結合する原子と一緒に C_3-C_{12} シクロアルキルを形成するか、又は R_1 及び R_2 がそれらに結合する原子と一緒に C_3-C_{12} シクロアルキルを形成し；

20

R_3 は C_1-C_{18} アルキルであり；

R_4 は、独立に $CH(C_1-C_8 \text{ アルキル})_2$ 、 $CH(C_2-C_8 \text{ アルケニル})_2$ 、 $CH(C_1-C_8 \text{ アルキル})(OH)$ 、 $CH(C_1-C_8 \text{ アルキル})((C_1-C_8 \text{ アルキル})SH)$ 、 $CH(C_1-C_3 \text{ アルキル})((C_1-C_8 \text{ アルキル})NH_2)$ から成る群から選択され；

R_8 はH又は C_1-C_{18} アルキルであり；

R_5 は NHR_6 であるか、又は R_5 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒に4、5又は6員複素環式環を形成し；

30

R_6 はH又は C_1-C_4 アルキルであり；

R_7 はH及びOHから成る群から選択され；

R_9 は $C_{16}-C_{30}$ アシル及び $C_{16}-C_{30}$ アルキルから成る群から選択され；

R_{11} 及び R_{13} は各々Hであり；

R_{10} 及び R_{12} は独立に $(C_1-C_4 \text{ アルキル})COOH$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NH_2$ 、 $(C_1-C_4 \text{ アルキル})NHC(NH_2^+)NH_2$ 及び $CH_2(C_3-N_2 \text{ 複素環})$ から成る群から選択され；さらに

S_1 は、結合、又はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸、アルギニン、リジン及びヒスチジンから成る群から選択される1つ又は2つの荷電アミノ酸から成るスペーサーである。

40

いくつかの実施態様では、 R_4 は $CH(C_1-C_8 \text{ アルキル})_2$ 又は $CH(C_1-C_8 \text{ アルキル})OH$ である。

Bアミノ酸の非限定的な例には、イソロイシン(N- C_1-C_{10} アルキル)、バリン(N- C_1-C_{10} アルキル)及びスレオニン(N- C_1-C_{10} アルキル)が含まれる。いくつかの実施態様では、Bアミノ酸は、イソロイシン(N- C_1-C_6 アルキル)、バリン(N- C_1-C_6 アルキル)及びスレオニン(N- C_1-C_6 アルキル)から成る群から選択される。例えば、Bアミノ酸には、イソロイシン(N-メチル)、バリン(N-メチル)及びスレオニン(N-メチル)が含まれる。

【0158】

カテゴリーII：ジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸Aの組成

いくつかの実施態様では、プロドラッグの半減期はAアミノ酸のアルファ位の置換基の数に左右される。例えば、 α -置換アミノ酸(例えばAla)であるAアミノ酸を含むプロ

50

ドラッグは、 α -二置換アミノ酸（例えばAib）であるAアミノ酸を含むプロドラッグよりもゆっくりと切断され、より長い半減期を有するであろう。

いくつかの実施態様では、プロドラッグの半減期は、Aアミノ酸のアルファアミノ基におけるアルキル化度に左右される。概して、アルキル化度が高ければ高いほど、切断速度は遅くプロドラッグの半減期は長い。例えば、N-アルキル化Alaを有するジペプチドプロドラッグエレメントは、Alaよりも遅い速度で分離し、より長い半減期を有するであろう。

ジペプチドプロドラッグエレメントのAアミノ酸の組成は下記のサブカテゴリーIIA及びIIBに分類できる。概して、サブカテゴリーIIAのジペプチドプロドラッグエレメントは、サブカテゴリーIIBのジペプチドプロドラッグエレメントよりも速く分離する。

【0159】

サブカテゴリーIIA：ジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸Aはアルファ位で二置換される

いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントのAアミノ酸はアルファ位で二置換される。これらの実施態様では、サブカテゴリーIA、IB及びICに記載された構造の R_1 及び R_2 は、独立に C_1 - C_{10} アルキル、 C_2 - C_{10} アルケニル、 $(C_1$ - C_{10} アルキル)OH、 $(C_1$ - C_{10} アルキル)SH、 $(C_2$ - C_3 アルキル)SCH₃、 $(C_1$ - C_4 アルキル)CONH₂、 $(C_1$ - C_4 アルキル)COOH、 $(C_1$ - C_4 アルキル)NH₂、 $(C_1$ - C_4 アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、 $(C_0$ - C_4 アルキル)(C_3 - C_6 シクロアルキル)、 $(C_0$ - C_4 アルキル)(C_2 - C_5 複素環)、 $(C_0$ - C_4 アルキル)(C_6 - C_{10} アリール) R_7 、 $(C_1$ - C_4 アルキル)(C_3 - C_9 ヘテロアリール)、及び C_1 - C_{12} アルキル(W_1) C_1 - C_{12} アルキル（式中、 W_1 はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子）から成る群から選択されるか、又は R_1 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒に C_3 - C_{12} シクロアルキルを形成し、さらに R_7 はH及びOHから成る群から選択される。

例えば、Aアミノ酸にはアミノイソ酪酸（Aib）が含まれる。

【0160】

サブカテゴリーIIB：ジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸Aはアルファ位で置換されていないか又は一置換される

いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントのAアミノ酸はアルファ位で置換されていないか又は一置換される。これらの実施態様では、サブカテゴリーIA、IB及びICに記載された構造の R_1 はHであり、サブカテゴリーIA、IB及びICに記載された構造の R_2 は、H、 C_1 - C_{10} アルキル、 C_2 - C_{10} アルケニル、 $(C_1$ - C_{10} アルキル)OH、 $(C_1$ - C_{10} アルキル)SH、 $(C_2$ - C_3 アルキル)SCH₃、 $(C_1$ - C_4 アルキル)CONH₂、 $(C_1$ - C_4 アルキル)COOH、 $(C_1$ - C_4 アルキル)NH₂、 $(C_1$ - C_4 アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、 $(C_0$ - C_4 アルキル)(C_3 - C_6 シクロアルキル)、 $(C_0$ - C_4 アルキル)(C_2 - C_5 複素環)、 $(C_0$ - C_4 アルキル)(C_6 - C_{10} アリール) R_7 、 $(C_1$ - C_4 アルキル)(C_3 - C_9 ヘテロアリール)、及び C_1 - C_{12} アルキル(W_1) C_1 - C_{12} アルキルから成る群から選択されるか（ここで R_7 はH及びOHから成る群から選択され、 W_1 はN、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子である）、又は R_1 及び R_2 はそれらに結合する原子と一緒に C_3 - C_{12} シクロアルキルを形成するか、又は R_2 及び R_5 は、それらに結合する原子と一緒に4、5又は6員複素環式環を形成する。

いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントのAアミノ酸は‘D’立体空間配置を有する。これらの実施態様のAアミノ酸の非制限的な例にはリジン、システイン及びアラニン、例えばd-リジン、d-システイン及びd-アラニンが含まれる。いくつかの実施態様では、d-立体空間配置は、プロドラッグペプチドのタンパク分解性分解を低下させることにより半減期を延長することができる。

いくつかの実施態様では、Aアミノ酸は、1から4つの炭素原子を有する基でN-アルキル化され、例えばAla(N- C_1 - C_4 アルキル)、Lys(N- C_1 - C_4 アルキル)、及びCys(N- C_1 - C_4 アルキル)である。例えば、Aアミノ酸は、Ala(N-メチル)、Lys(N-メチル)、及びCys(N-メチル)でありうる。Aアミノ酸のN-アルキル化はジペプチドプロドラッグエレメントのQからの切断速度を低下させ、より長い半減期を提供する。

【0161】

10

20

30

40

50

カテゴリーIII：ジペプチドプロドラッグエレメント(A-B)とペプチドドラッグ(Q)との連結部位

いくつかの実施態様では、プロドラッグの半減期は、ジケトピペラジン形成時の脱離基の立体障害、求核性及び安定性に左右される。脱離基の立体障害が少ないほど、脱離基の求核性が低いほど、又は切断後の脱離基が安定であればあるほど、プロドラッグの半減期は短い。Qの脱離基のタイプは、下記のサブカテゴリーIIIA及びIIIBに記載するように、A-B-CとQのアミノ基との間の連結のタイプによって決定できる。概して、サブカテゴリーIIIBのジペプチドプロドラッグエレメントは、サブカテゴリーIIIAのジペプチドプロドラッグエレメントより速くQから分離し、より短い半減期を有する。

サブカテゴリーIIIA：Qの脂肪族アミノ基に連結されるA-B

10

いくつかの実施態様では、A-B-Cは、A-B-CとQの脂肪族アミノ基との間でアミド結合によりQに連結され、本明細書で先きに記載したように、生理学的条件下のPBSにおいて少なくとも約1時間から約1週間のA-BのQからの化学的切断半減期($t_{1/2}$)を有するプロドラッグが得られる。

いくつかの実施態様では、A-B-Cは、A-B-CとQのN-末端アミノ酸のアルファアミノ基との間でアミド結合によりQに連結される。例えば、サブカテゴリーIA、IB及びICのいずれかのBアミノ酸並びにサブカテゴリーIIA及びIIIBのいずれかのAアミノ酸を有するジペプチドプロドラッグエレメントをQのN-末端アミノ酸に、より具体的にはインスリンA又はB鎖のN-末端アミンに連結し、生理学的条件下のPBSにおいて少なくとも約1時間から約1週間のA-BのQからの化学的切断半減期($t_{1/2}$)を有するプロドラッグを得ることができる。

20

いくつかの実施態様では、A-B-Cは、A-B-CとQのアミノ酸の側鎖の脂肪族アミノ基との間でアミド結合によりQに連結される。例えば、サブカテゴリーIA、IB及びICのいずれかのBアミノ酸並びにサブカテゴリーIIA及びIIIBのいずれかのAアミノ酸を有するジペプチドプロドラッグエレメントをQのアミノ酸の側鎖の脂肪族アミノ基に連結し、生理学的条件下のPBSにおいて少なくとも約1時間から約1週間のA-BのQからの化学的切断半減期($t_{1/2}$)を有するプロドラッグを得ることができる。

いくつかの実施態様では、A-B-Cが、A-B-CとQの脂肪族アミノ基との間でアミド結合によりQに連結されるとき、Aは、 α -二置換アミノ酸(サブカテゴリーIIA)であるか又はBはN-アルキル化(サブカテゴリーIA、IB又はIC)されるべきであるか又はその両方である。例えば、Aが α -置換アミノ酸(例えばAla)であり、BがN-アルキル化されず、さらにA-B-CがQの脂肪族アミノ基を介してQに結合するとき、A-Bの有意な切断はないであろう。

30

他の実施態様では、A-B-Cが、A-B-CとQの脂肪族アミノ基との間でアミド結合によりQに連結され、さらにAがアルファ位で非置換であり(例えばグリシン)かつBがサブカテゴリーIAのアミノ酸(N-アルキル化グリシン)であるとき、Bアミノ酸のN-アルキル置換基は少なくとも5つの炭素原子の長さを有する(例えばN-C₅-C₈アルキル)。

さらに他の実施態様では、A-B-Cが、A-B-CとQの脂肪族アミノ基との間でアミド結合によりQに連結され、さらにAアミノ酸がアルファ位で非置換又は一置換(サブカテゴリーII B)であるとき、Bアミノ酸はプロリンではない。

【0162】

サブカテゴリーIIIB：Qの芳香族アミノ基に連結されるA-B

40

いくつかの実施態様では、A-B-Cは、A-B-CとQのアミノ酸の側鎖の芳香族アミノ基との間でアミド結合によりQに連結され、本明細書で先きに記載したように、生理学的条件下のPBSにおいて少なくとも約1時間から約1週間のA-BのQからの化学的切断半減期($t_{1/2}$)を有するプロドラッグが得られる。例えば、サブカテゴリーIA、IB及びICのいずれかのBアミノ酸並びにサブカテゴリーIIA及びIIIBのいずれかのAアミノ酸を有するジペプチドプロドラッグエレメントをQのアミノ酸の側鎖の芳香族アミノ基に連結し、生理学的条件下のPBSにおいて少なくとも約1時間から約1週間のA-BのQからの化学的切断半減期($t_{1/2}$)を有するプロドラッグを得ることができる。

カテゴリーIによって規定されるBアミノ酸のいずれかをカテゴリーIIによって規定されるAアミノ酸のいずれかと結合させてジペプチドプロドラッグエレメントを形成できる。

50

このジペプチドをカテゴリーIIIで述べた位置のいずれかに連結することができる。プロドラッグの半減期は以下の選択により調整することができる：

- (i) Aアミノ酸のアルファ位の置換基の数；
- (ii) A及びBアミノ酸のN-アルキル化度；
- (iii) Bアミノ酸のベータ位の置換基の数；
- (iv) Bアミノ酸の側鎖のかさ高性；
- (v) ジケトピペラジン形成時のQの脱離基の立体障害、求核性及び安定性。

【 0 1 6 3 】

ジペプチドプロドラッグエレメントA-Bの改変

上記に記載のジペプチドプロドラッグエレメントは、本明細書で先きに記載したように、親水性部分、アシル基又はアルキル基を含むようにさらに改変できる。いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントはリジンを含み、前記リジンはその側鎖アミノ基を介してアシル基又はアルキル基に連結される。いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントはシステインを含み、前記システインは側鎖スルフヒドリル基を介して親水性部分（例えば40kDのPEG）に連結される。親水性部分、アシル基又はアルキル基はジペプチドプロドラッグエレメントに直接又はスペーサーを介して連結される。いくつかの例示的实施態様では、親水基、アルキル基及び/又はアシル基は、ジペプチドプロドラッグエレメントのAアミノ酸に連結される。

いくつかの実施態様では、以下のジペプチドプロドラッグエレメントはPEG化される：d Cys-Gly(N-ヘキシル)、dCys-Gly(N-メチル)、及びdCys-Phe(N-メチル)。いくつかの実施態様では、以下のジペプチドプロドラッグエレメントはアシル基を含む：dLys-Gly(N-ヘキシル)、dLys-Gly(N-メチル)、及びdLys-Phe(N-メチル)。いくつかの実施態様では、以下のジペプチドプロドラッグエレメントはアルキル基を含む：dLys-Gly(N-ヘキシル)、dLys-Gly(N-メチル)、及びdLys-Phe(N-メチル)。

【 0 1 6 4 】

例示的实施態様

本発明のジペプチドプロドラッグエレメントは、カテゴリーIのBアミノ酸のいずれかとカテゴリーIIのAアミノ酸のいずれかとの組み合わせを含むことができる。ジペプチドプロドラッグエレメントのAアミノ酸として及びBアミノ酸として適切なアミノ酸の非限定的な例は下記の表に列挙される。

アミノ酸番号	‘A’アミノ酸	‘B’アミノ酸
1	Aib	Gly(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
2	Gly	Ala(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
3	Ala	Leu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
4	Leu	Met(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
5	Met	Asn(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
6	Asn	Glu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
7	Glu	Asp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
8	Asp	Gln(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
9	Gln	His(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
10	His	Lys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
11	Lys	Arg(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
12	Arg	Ser(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
13	Ser	Cys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
14	Cys	Pro
15	Pro	Phe(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
16	Phe	Tyr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
17	Tyr	Trp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
18	Trp	Ile(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
19	Ile	Val(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
20	Val	Thr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
21	Thr	d-Ala(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
22	d-Ala	d-Leu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
23	d-Leu	d-Met(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
24	d-Met	d-Asn(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
25	d-Asn	d-Glu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
26	d-Glu	d-Asp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
27	d-Asp	d-Gln(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
28	d-Gln	d-His(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
29	d-His	d-Lys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
30	d-Lys	d-Arg(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
31	d-Arg	d-Ser(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
32	d-Ser	d-Cys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
33	d-Cys	d-Pro
34	d-Pro	d-Phe(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
35	d-Phe	d-Tyr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
36	d-Tyr	d-Trp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
37	d-Trp	d-Ile(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
38	d-Ile	d-Val(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
39	d-Val	d-Thr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
40	d-Thr	Gly(N-メチル)
41	Gly(N-メチル)	Ala(N-メチル)
42	Ala(N-メチル)	Leu(N-メチル)

10

20

30

40

43	Leu(N-メチル)	Met(N-メチル)
44	Met(N-メチル)	Asn(N-メチル)
45	Asn(N-メチル)	Glu(N-メチル)
46	Glu(N-メチル)	Asp(N-メチル)
47	Asp(N-メチル)	Gln(N-メチル)
48	Gln(N-メチル)	His(N-メチル)
49	His(N-メチル)	Lys(N-メチル)
50	Lys(N-メチル)	Arg(N-メチル)
51	Arg(N-メチル)	Ser(N-メチル)
52	Ser(N-メチル)	Cys(N-メチル)
53	Cys(N-メチル)	Phe(N-メチル)
54	Phe(N-メチル)	Tyr(N-メチル)
55	Tyr(N-メチル)	Trp(N-メチル)
56	Trp(N-メチル)	Ile(N-メチル)
57	Ile(N-メチル)	Val(N-メチル)
58	Val(N-メチル)	Thr(N-メチル)
59	Thr(N-メチル)	d-Ala(N-メチル)
60	d-Ala(N-メチル)	d-Leu(N-メチル)
61	d-Leu(N-メチル)	d-Met(N-メチル)
62	d-Met(N-メチル)	d-Asn(N-メチル)
63	d-Asn(N-メチル)	d-Glu(N-メチル)
64	d-Glu(N-メチル)	d-Asp(N-メチル)
65	d-Asp(N-メチル)	d-Gln(N-メチル)
66	d-Gln(N-メチル)	d-His(N-メチル)
67	d-His(N-メチル)	d-Lys(N-メチル)
68	d-Lys(N-メチル)	d-Arg(N-メチル)
69	d-Arg(N-メチル)	d-Ser(N-メチル)
70	d-Ser(N-メチル)	d-Cys(N-メチル)
71	d-Cys(N-メチル)	d-Phe(N-メチル)
72	d-Phe(N-メチル)	d-Tyr(N-メチル)
73	d-Tyr(N-メチル)	d-Trp(N-メチル)
74	d-Trp(N-メチル)	d-Ile(N-メチル)
75	d-Ile(N-メチル)	d-Val(N-メチル)
76	d-Val(N-メチル)	d-Thr(N-メチル)
77	d-Thr(N-メチル)	Gly(N-ヘキシル)
78		Ala(N-ヘキシル)
79		Leu(N-ヘキシル)
80		Met(N-ヘキシル)
81		Asn(N-ヘキシル)
82		Glu(N-ヘキシル)
83		Asp(N-ヘキシル)
84		Gln(N-ヘキシル)
85		His(N-ヘキシル)

10

20

30

40

86		Lys(N-ヘキシル)
87		Arg(N-ヘキシル)
88		Ser(N-ヘキシル)
89		Cys(N-ヘキシル)
90		Phe(N-ヘキシル)
91		Tyr(N-ヘキシル)
92		Trp(N-ヘキシル)
93		Ile(N-ヘキシル)
94		Val(N-ヘキシル)
95		Thr(N-ヘキシル)
96		d-Ala(N-ヘキシル)
97		d-Leu(N-ヘキシル)
98		d-Met(N-ヘキシル)
99		d-Asn(N-ヘキシル)
100		d-Glu(N-ヘキシル)
101		d-Asp(N-ヘキシル)
102		d-Gln(N-ヘキシル)
103		d-His(N-ヘキシル)
104		d-Lys(N-ヘキシル)
105		d-Arg(N-ヘキシル)
106		d-Ser(N-ヘキシル)
107		d-Cys(N-ヘキシル)
108		d-Phe(N-ヘキシル)
109		d-Tyr(N-ヘキシル)
110		d-Trp(N-ヘキシル)
111		d-Ile(N-ヘキシル)
112		d-Val(N-ヘキシル)
113		d-Thr(N-ヘキシル)

10

20

【 0 1 6 5 】

30

サブカテゴリーIA：ジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸BはN-アルキル化グリシンである

いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントのBアミノ酸はN-アルキル化グリシンである。Bアミノ酸としてN-アルキル化グリシンを有するジペプチドプロドラッグエレメントの非限定的な例は下記の表に示される。

ジペプチドプロドラッグ エレメント番号	‘A’ アミノ酸	‘B’ アミノ酸
1	Aib	Gly(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
2	d-Ala	Gly(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
3	d-Lys	Gly(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
4	d-Cys	Gly(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
5	Aib	Gly(N-メチル)
6	d-Ala	Gly(N-メチル)
7	d-Lys	Gly(N-メチル)
8	d-Cys	Gly(N-メチル)
9	Aib	Gly(N-ヘキシル)
10	d-Ala	Gly(N-ヘキシル)
11	d-Lys	Gly(N-ヘキシル)
12	d-Cys	Gly(N-ヘキシル)

40

50

【 0 1 6 6 】

サブカテゴリーIB：ジペプチドプロドラッグエレメントの**アミノ酸B**はベータ位で置換されていないか又は一置換される

いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントの**Bアミノ酸**はベータ位で置換されていないか又は一置換され、相対的にかさ高くない側鎖を有する。ベータ位で置換されず又は一置換され、かつ側鎖が相対的にかさ高くない**Bアミノ酸**を有するジペプチドプロドラッグエレメントの非限定的な例は下記の表に示される。

ジペプチドプロドラッグ エレメント番号	‘A’ アミノ酸	‘B’ アミノ酸
13	Aib	Ala(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
14	d-Ala	Ala(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
15	d-Lys	Ala(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
16	d-Cys	Ala(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
17	Aib	Leu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
18	d-Ala	Leu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
19	d-Lys	Leu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
20	d-Cys	Leu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
21	Aib	Met(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
22	d-Ala	Met(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
23	d-Lys	Met(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
24	d-Cys	Met(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
25	Aib	Asn(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
26	d-Ala	Asn(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
27	d-Lys	Asn(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
28	d-Cys	Asn(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
29	Aib	Glu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
30	d-Ala	Glu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
31	d-Lys	Glu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
32	d-Cys	Glu(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
33	Aib	Asp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)

10

20

30

34	d-Ala	Asp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
35	d-Lys	Asp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
36	d-Cys	Asp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
37	Aib	Gln(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
38	d-Ala	Gln(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
39	d-Lys	Gln(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
40	d-Cys	Gln(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
41	Aib	His(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
42	d-Ala	His(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
43	d-Lys	His(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
44	d-Cys	His(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
45	Aib	Lys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
46	d-Ala	Lys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
47	d-Lys	Lys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
48	d-Cys	Lys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
49	Aib	Arg(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
50	d-Ala	Arg(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
51	d-Lys	Arg(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
52	d-Cys	Arg(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
53	Aib	Ser(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
54	d-Ala	Ser(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
55	d-Lys	Ser(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
56	d-Cys	Ser(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
57	Aib	Cys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
58	d-Ala	Cys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
59	d-Lys	Cys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
60	d-Cys	Cys(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
61	Aib	Pro
62	d-Ala	Pro
63	d-Lys	Pro
64	d-Cys	Pro
65	Aib	Ala(N-メチル)
66	d-Ala	Ala(N-メチル)
67	d-Lys	Ala(N-メチル)
68	d-Cys	Ala(N-メチル)
69	Aib	Leu(N-メチル)
70	d-Ala	Leu(N-メチル)
71	d-Lys	Leu(N-メチル)
72	d-Cys	Leu(N-メチル)
73	Aib	Met(N-メチル)
74	d-Ala	Met(N-メチル)
75	d-Lys	Met(N-メチル)

10

20

30

40

76	d-Cys	Met(N-メチル)
77	Aib	Asn(N-メチル)
78	d-Ala	Asn(N-メチル)
79	d-Lys	Asn(N-メチル)
80	d-Cys	Asn(N-メチル)
81	Aib	Glu(N-メチル)
82	d-Ala	Glu(N-メチル)
83	d-Lys	Glu(N-メチル)
84	d-Cys	Glu(N-メチル)
85	Aib	Asp(N-メチル)
86	d-Ala	Asp(N-メチル)
87	d-Lys	Asp(N-メチル)
88	d-Cys	Asp(N-メチル)
89	Aib	Gln(N-メチル)
90	d-Ala	Gln(N-メチル)
91	d-Lys	Gln(N-メチル)
92	d-Cys	Gln(N-メチル)
93	Aib	His(N-メチル)
94	d-Ala	His(N-メチル)
95	d-Lys	His(N-メチル)
96	d-Cys	His(N-メチル)
97	Aib	Lys(N-メチル)
98	d-Ala	Lys(N-メチル)
99	d-Lys	Lys(N-メチル)
100	d-Cys	Lys(N-メチル)
101	Aib	Arg(N-メチル)
102	d-Ala	Arg(N-メチル)
103	d-Lys	Arg(N-メチル)
104	d-Cys	Arg(N-メチル)
105	Aib	Ser(N-メチル)
106	d-Ala	Ser(N-メチル)
107	d-Lys	Ser(N-メチル)
108	d-Cys	Ser(N-メチル)
109	Aib	Cys(N-メチル)
110	d-Ala	Cys(N-メチル)
111	d-Lys	Cys(N-メチル)
112	d-Cys	Cys(N-メチル)
113	Aib	Ala(N-ヘキシル)
114	d-Ala	Ala(N-ヘキシル)
115	d-Lys	Ala(N-ヘキシル)

10

20

30

40

116	d-Cys	Ala(N-ヘキシル)
117	Aib	Leu(N-ヘキシル)
118	d-Ala	Leu(N-ヘキシル)
119	d-Lys	Leu(N-ヘキシル)
120	d-Cys	Leu(N-ヘキシル)
121	Aib	Met(N-ヘキシル)
122	d-Ala	Met(N-ヘキシル)
123	d-Lys	Met(N-ヘキシル)
124	d-Cys	Met(N-ヘキシル)
125	Aib	Asn(N-ヘキシル)
126	d-Ala	Asn(N-ヘキシル)
127	d-Lys	Asn(N-ヘキシル)
128	d-Cys	Asn(N-ヘキシル)
129	Aib	Glu(N-ヘキシル)
130	d-Ala	Glu(N-ヘキシル)
131	d-Lys	Glu(N-ヘキシル)
132	d-Cys	Glu(N-ヘキシル)
133	Aib	Asp(N-ヘキシル)
134	d-Ala	Asp(N-ヘキシル)
135	d-Lys	Asp(N-ヘキシル)
136	d-Cys	Asp(N-ヘキシル)
137	Aib	Gln(N-ヘキシル)
138	d-Ala	Gln(N-ヘキシル)
139	d-Lys	Gln(N-ヘキシル)
140	d-Cys	Gln(N-ヘキシル)
141	Aib	His(N-ヘキシル)
142	d-Ala	His(N-ヘキシル)
143	d-Lys	His(N-ヘキシル)
144	d-Cys	His(N-ヘキシル)
145	Aib	Lys(N-ヘキシル)
146	d-Ala	Lys(N-ヘキシル)
147	d-Lys	Lys(N-ヘキシル)
148	d-Cys	Lys(N-ヘキシル)
149	Aib	Arg(N-ヘキシル)
150	d-Ala	Arg(N-ヘキシル)
151	d-Lys	Arg(N-ヘキシル)
152	d-Cys	Arg(N-ヘキシル)
153	Aib	Ser(N-ヘキシル)
154	d-Ala	Ser(N-ヘキシル)
155	d-Lys	Ser(N-ヘキシル)

10

20

30

40

156	d-Cys	Ser(N-ヘキシル)
157	Aib	Cys(N-ヘキシル)
158	d-Ala	Cys(N-ヘキシル)
159	d-Lys	Cys(N-ヘキシル)
160	d-Cys	Cys(N-ヘキシル)

【 0 1 6 7 】

いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントのBアミノ酸は、下記表に示されるように、ベータ位で一置換され、かつ相対的にかさ高い側鎖を有する。

ジペプチドプロドラッグ エレメント番号	‘A’ アミノ酸	‘B’ アミノ酸
161	Aib	Phe(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
162	d-Ala	Phe(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
163	d-Lys	Phe(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
164	d-Cys	Phe(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
165	Aib	Tyr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
166	d-Ala	Tyr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
167	d-Lys	Tyr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
168	d-Cys	Tyr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
169	Aib	Trp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
170	d-Ala	Trp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
171	d-Lys	Trp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
172	d-Cys	Trp(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
173	Aib	Phe(N-メチル)
174	d-Ala	Phe(N-メチル)
175	d-Lys	Phe(N-メチル)
176	d-Cys	Phe(N-メチル)
177	Aib	Tyr(N-メチル)
178	d-Ala	Tyr(N-メチル)
179	d-Lys	Tyr(N-メチル)
180	d-Cys	Tyr(N-メチル)
181	Aib	Trp(N-メチル)
182	d-Ala	Trp(N-メチル)
183	d-Lys	Trp(N-メチル)
184	d-Cys	Trp(N-メチル)
185	Aib	Phe(N-ヘキシル)
186	d-Ala	Phe(N-ヘキシル)
187	d-Lys	Phe(N-ヘキシル)
188	d-Cys	Phe(N-ヘキシル)
189	Aib	Tyr(N-ヘキシル)
190	d-Ala	Tyr(N-ヘキシル)

10

20

30

40

191	d-Lys	Tyr(N-ヘキシル)
192	d-Cys	Tyr(N-ヘキシル)
193	Aib	Trp(N-ヘキシル)
194	d-Ala	Trp(N-ヘキシル)
195	d-Lys	Trp(N-ヘキシル)
196	d-Cys	Trp(N-ヘキシル)

【 0 1 6 8 】

サブカテゴリーIC：ベータ位で二置換されるジペプチドプロドラッグエレメントのアミノ酸B

10

いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグエレメントのBアミノ酸はベータ位で二置換される。ベータ位で二置換されるBアミノ酸を有するジペプチドプロドラッグエレメントの非限定的な例は下記の表に示される。

ジペプチドプロドラッグ エレメント番号	‘A’ アミノ酸	‘B’ アミノ酸
197	Aib	Ile(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
198	d-Ala	Ile(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
199	d-Lys	Ile(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
200	d-Cys	Ile(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
201	Aib	Val(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
202	d-Ala	Val(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
203	d-Lys	Val(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
204	d-Cys	Val(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
205	Aib	Thr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
206	d-Ala	Thr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
207	d-Lys	Thr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
208	d-Cys	Thr(N-C ₁ -C ₈ アルキル)
209	Aib	Ile(N-メチル)
210	d-Ala	Ile(N-メチル)
211	d-Lys	Ile(N-メチル)
212	d-Cys	Ile(N-メチル)
213	Aib	Val(N-メチル)
214	d-Ala	Val(N-メチル)
215	d-Lys	Val(N-メチル)
216	d-Cys	Val(N-メチル)
217	Aib	Thr(N-メチル)
218	d-Ala	Thr(N-メチル)
219	d-Lys	Thr(N-メチル)
220	d-Cys	Thr(N-メチル)
221	Aib	Ile(N-ヘキシル)
222	d-Ala	Ile(N-ヘキシル)
223	d-Lys	Ile(N-ヘキシル)

20

30

40

224	d-Cys	Ile(N-ヘキシル)
225	Aib	Val(N-ヘキシル)
226	d-Ala	Val(N-ヘキシル)
227	d-Lys	Val(N-ヘキシル)
228	d-Cys	Val(N-ヘキシル)
229	Aib	Thr(N-ヘキシル)
230	d-Ala	Thr(N-ヘキシル)
231	d-Lys	Thr(N-ヘキシル)
232	d-Cys	Thr(N-ヘキシル)

10

【 0 1 6 9 】

いくつかの例示的实施態様では、Aib-Gly(N-ヘキシル)、dLys-Gly(N-ヘキシル)、dCys-Gly(N-ヘキシル)、dAla-Gly(N-ヘキシル)、Aib-Gly(N-メチル)、dLys-Gly(N-メチル)、dCys-Gly(N-メチル)、dAla-Gly(N-ヘキシル)、Aib-Phe(N-メチル)、dLys-Phe(N-メチル)、dCys-Phe(N-メチル)、又はdAla-Phe(N-メチル)が、構造A-B-Cを介してインスリンペプチドのN-末端アルファアミノ基に連結される。

ある実施態様にしたがえば、ジペプチドエレメントは、A-BジペプチドのBに以下の3つのアミノ酸の1つを含む：Gly(N-ヘキシル)、Gly(N-メチル)、又はPhe(N-メチル)。ジペプチドのこれら3つのグループの1つから選択されるジペプチドは、他の全ての要件が同等であるならばGly(N-ヘキシル) > Gly(N-メチル) > Phe(N-メチル)の相対的切断速度を有する。ある実施態様では、Cys又はLysが第一位（すなわちAアミノ酸）に提供され、アシル化又はPEG化の場所を与える。ある実施態様では、AlaがAアミノ酸として用いられ、この場合にはアシル化又はPEG化は所望されない。ある実施態様では、第一位（すなわちAアミノ酸）のAibは、天然のアミノ酸（例えばAla、Cys及びLys）と比較して切断速度を高める。例示的ジペプチドには以下が含まれる：dAla-Phe(N-メチル)、dCys-Phe(N-メチル)、dLys-Phe(N-メチル)、Aib-Phe(N-メチル)、dAla-Gly(N-メチル)、dCys-Gly(N-メチル)、dLys-Gly(N-メチル)、Aib-Gly(N-メチル)、dAla-Gly(N-ヘキシル)、dCys-Gly(N-ヘキシル)、dLys-Gly(N-ヘキシル)、Aib-Gly(N-ヘキシル)。

20

【 0 1 7 0 】

ある実施態様にしたがえば、医薬組成物が提供され、前記組成物は、本明細書に開示の新規なインスリンプロドラッグアナログ（好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度レベルにある）及び医薬的に許容できる希釈剤、担体又は賦形剤を含む。そのような組成物は、本明細書に開示するA19インスリンアナログを、少なくとも0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL、9mg/mL、10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL、15mg/mL、16mg/mL、17mg/mL、18mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、21mg/mL、22mg/mL、23mg/mL、24mg/mL、25mg/mL又はそれより高い濃度で含むことができる。ある実施態様では、医薬組成物は、滅菌され、さらに任意的に多様な梱包容器内に収められた水溶液を含む。他の実施態様では、医薬組成物は凍結乾燥散剤を含む。医薬組成物はさらに、患者に当該組成物を投与するための使い捨て装置を含むキットの部分として梱包されうる。容器又はキットには、周囲室温又は冷蔵温度での保温のために付箋を付けることができる。

30

40

ある実施態様では、第一及び第二のインスリンプロドラッグアナログの混合物を含む組成物が提供され、この場合、第一及び第二のインスリンプロドラッグアナログは、プロドラッグエレメントの構造を基準にして互に相違する。より具体的には、第一のインスリンプロドラッグアナログは、第二のインスリンプロドラッグアナログのジペプチドプロドラッグエレメントとは実質的に異なる半減期を有するジペプチドプロドラッグエレメントを含むことができる。したがって、ジペプチドエレメントの置換基の種々の組み合わせを選択して、所望の時間枠にわたってかつ所定の時間的間隔において制御された態様で活性化されるインスリンプロドラッグアナログの混合物を含む組成物を調製することができる。例えば、食事時間に活性なインスリンを放出し、その後、活性化の時間に基づ

50

いて放出される適切な投薬により夜間にインスリンを活性化するように組成物を調合することができる。別の実施態様では、医薬組成物は、本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログ及び自然のままのインスリン又は公知の生物活性インスリン誘導体の混合物を含む。

【0171】

開示のインスリンプロドラッグアナログは、インスリンペプチドについて以前に記載された使用のいずれに対しても適切であると考えられる。したがって、本明細書に開示のインスリンプロドラッグアナログを用いて、高血糖症を治療するか、又は高血糖レベルに起因する他の代謝性疾患を治療することができる。したがって、本発明は、高血糖レベルを患う患者の治療に使用される、本開示のインスリンプロドラッグアナログ及び医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物を包含する。ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログを用いて治療される患者は家畜化動物であり、別の実施態様では、治療される患者は人間である。

10

本開示にしたがって高血糖症を治療する1つの方法は、本開示のインスリンプロドラッグアナログを患者に標準的な投与ルート（非経口（例えば静脈内、腹腔内、皮下又は筋肉内、髄腔内、経皮、経直腸）、経口、経鼻又は吸入を含む）を用いて投与する工程を含む。ある実施態様では、組成物は皮下又は筋肉内に投与される。ある実施態様では、組成物は非経口的に投与され、インスリンプロドラッグアナログ組成物は注射器に予め梱包される。

【0172】

20

本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログは、単独で又は他の抗糖尿病薬剤と併用して投与することができる。当業界で公知の又は研究中の抗糖尿病薬剤には以下が含まれる：自然のままのインスリン、自然のままのグルカゴン及びその機能的誘導体、スルホニルウレア、例えばトルブタミド（Orinase(商標)）、アセトヘキサミド（DymelorTM）、トラザミド（TolinaseTM）、クロルプロバミド（Diabinese(商標)）、グリピジド（Glucotrol(商標)）、グリブリド（Diabeta(商標)、Micronase(商標)、Glynase(商標)）、グルメピリド（Amaryl(商標)）、又はグリクラジド（Diamicron(商標)）；メグリチニド、例えばレパグリニド（Prandin(商標)）又はナテグリニド（Starlix(商標)）；ピグアニド、例えばメトフォルミン（Glucophage(商標)）又はフェンフォルミン；チアゾリジンジオン、例えばロシグリタゾン（Avandia(商標)）、ピオグリタゾン（Actos(商標)）、又はトログリタゾン（RezulinTM）、又は他のPPAR 阻害剤；炭水化物消化を阻害するアルファグルコシダーゼ阻害剤、例えばミグリトール（Glyset(商標)）、アカルボース（Precose/Glucobay）；エキセナチド（(商標)）又はプラムリンチド；ジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）阻害剤、例えばビルダグリプチン又はシタグリプチン；SGLT（ナトリウム依存グルコーストランスポーター1）阻害剤；又はFBPase（フルクトース1,6-ビスホスファターゼ）阻害剤。

30

【0173】

本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログを含む医薬組成物は、標準的で医薬的に許容できる担体及び当業者に公知の投与ルートを用いて処方及び投与することができる。したがって、本開示はまた、本明細書に開示する1つ以上のインスリンプロドラッグアナログ又は医薬的に許容できるその塩を医薬的に許容できる担体と一緒に含む医薬組成物を包含する。ある実施態様では、医薬組成物は、リン酸緩衝系で約4.0から約7.0のpHでインスリンプロドラッグアナログを1mg/mLの濃度で含む。医薬組成物はインスリンプロドラッグアナログを単独の医薬的に活性な成分として含むことができ、或いはインスリンプロドラッグアナログは1つ以上の追加の活性薬剤と組み合わせることができる。ある実施態様にしたがえば、医薬組成物が提供され、前記は、本明細書に開示するインスリンプロドラッグアナログの1つ（好ましくは無菌的かつ好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度レベル）及び医薬的に許容できる希釈剤、担体又は賦形剤を含む。そのような組成物はインスリンプロドラッグアナログを含むことができ、この場合、生じる活性ペプチドは、少なくとも0.5mg/mL、1mg/mL

40

50

、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL、9mg/mL、10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL、15mg/mL、16mg/mL、17mg/mL、18mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、21mg/mL、22mg/mL、23mg/mL、24mg/mL、25mg/mL又はそれより高い濃度で存在する。ある実施態様では、医薬組成物は、滅菌され、任意的に多様な容器に保存される水溶液を含んでよい。ある実施態様にしたがえば、本発明の化合物を用いて、すぐに注射できるように予め処方された溶液を調製することができる。他の実施態様では、医薬組成物は凍結乾燥散剤を含む。医薬組成物はさらに、当該組成物を患者に投与するための使い捨て装置を含むキットの部分として梱包することができる。容器又はキットには、周囲室温又は冷蔵温度での保存のために付箋を付けることができる。

【0174】

本明細書に記載する全ての治療方法、医薬組成物、キット及び他の同様な実施態様は、インスリンプロドラッグアナログには全ての医薬的に許容できるその塩が含まれることを意図する。

ある実施態様では、キットは、インスリンプロドラッグアナログ組成物を患者に投与するための装置とともに提供される。キットはさらに多様な容器（例えばバイアル、チューブ、ピンなど）を含むことができる。好ましくは、キットはまた使用のための指示を含むであろう。ある実施態様にしたがえば、キットの装置はエロゾル分配装置であり、組成物はエロゾル装置内に予め梱包される。別の実施態様では、キットは注射器及び針を含み、ある実施態様では、インスリンアナログ組成物は注射器内に予め梱包される。

本発明の化合物は、標準的な合成方法、組換えDNA技術、又はペプチド及び融合タンパク質を調製する任意の他の方法によって調製できる。ある種の非天然アミノ酸は標準的な組み換え技術では発現させることはできないが、それらの調製のための技術は当業界では公知である。非ペプチド部分を含む本発明の化合物は、適用可能な場合には、標準的なペプチド化学反応に加えて標準的な有機化学反応によって合成することができる。

【実施例1】

【0175】

インスリンA及びB鎖の合成

インスリンA及びB鎖は、Boc化学反応を用いて、4-メチルベンゾヒドリルアミン（MBHA）樹脂又は4-ヒドロキシメチル-フェニルアセトアミドメチル（PAM）樹脂で合成した。ペプチドは、HF/p-クレゾール（95：5）を0 で1時間用いて樹脂から切断した。HF除去及びエーテル沈殿の後で、ペプチドを50%酢酸水に溶解し凍結乾燥させた。また別には、ペプチドはFmoc化学反応を用いて合成した。ペプチドは、トリフルオロ酢酸（TFA）/トリイソプロピルシラン（TIS）/H₂O（95：2.5：2.5）を室温で2時間用いて樹脂から切断した。過剰量のジエチルエーテルの添加によりペプチドを沈殿させ、ペレットを酸性緩衝水に溶解した。ペプチドの品質はRP-HPLCでモニターし、質量分析法で確認した（ESI又はMALDI）。

インスリンA鎖はアミノ酸7位にただ1つの遊離システインを有し、他の全てのシステインはアセトアミドメチルA-(SH)⁷(Acm)^{6,11,20}として保護されるように合成した。インスリンB鎖は7位にただ1つの遊離システインを有し、他のシステインはアセトアミドメチルB-(SH)⁷(Acm)¹⁹として保護されるように合成した。粗ペプチドは通常のRP-HPLCによって精製した。

合成A及びB鎖は、US-2011-0257076（その開示は参照により本明細書に含まれる）で以前に開示されたように、それらの自然のままのジスルフィド結合により連結された。対応するB鎖をDMF又はDMSOに溶解してCys⁷-Npys誘導体に活性化させ、2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン)(Npys)と1：1のモル比により室温で反応させた。活性化はRP-HPLCによりモニターし、生成物をESI-MSで確認した。

最初のB7-A7ジスルフィド結合は、対応するA-(SH)⁷(Acm)^{6,11,20}及びB-(Npys)⁷(Acm)¹⁹（1：1モル比）を合計ペプチド濃度10mg/mLで溶解することによって形成させた。鎖の結合反応が完了したとき、混合物を50%酢酸水濃度に希釈した。最後の2つのジスルフィド結合は、ヨウ素の添加により同時に形成させた。40倍モル過剰のヨウ素を溶液に添加し、混合物を室温でさらに1時間撹拌した。反応はアスコルビン酸水溶液の添加により終了させ

10

20

30

40

50

た。混合物をRP-HPLCにより精製し、最終化合物をMALDI-MSにより確認した。表1のデータで示すように、この手順にしたがって調製した合成インスリンはインスリン受容体結合について精製インスリンと良好な類似を示す。

改変アミノ酸（例えばA19位の4-アミノフェニルアラニン）を含むインスリンペプチドもまた、非コードアミノ酸のタンパク質への取り込みを可能にする系を用いてin vivoで合成することができる（前記系には、例えば米国特許7,045,337号及び7,083,970号に教示された系が含まれる）。

表1：自然のままのインスリンと対比した合成インスリンの活性

	インスリン標準物		A7-B7インスリン	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
IC ₅₀ (nM)	0.24	0.07	0.13	0.08
インスリン活性%	100		176.9	

10

【実施例2】

【0176】

還元アルキル化によるアミン基（N-末端及びリジン）のPEG化

a. 合成

インスリン（又はインスリンアナログ）、mPEG20k-アルデヒド、及びNaBH₃CN（モル比1：2：30）を酢酸緩衝液（pH4.1 - 4.4）に溶解した。反応溶液は、0.1N NaCl、0.2N酢酸及び0.1N Na₂CO₃から構成された。インスリンペプチド濃度は約0.5mg/mLであった。反応は室温で6時間に及んだ。反応の程度をRP-HPLCによりモニターし、反応収率は約50%であった。

20

b. 精製

反応混合物を0.1% TFAで2 - 5倍に希釈し、調製用RP-HPLCカラムに適用した。HPLC条件：C4カラム；流速10mL/分；A緩衝液は10% ACN及び0.1% TFA水溶液；B緩衝液はACN中0.1% TFA、0 - 40%（0 - 80分）のB%直線勾配；PEG-インスリン又はアナログは約35%B緩衝液で収集された。所望の化合物はMALDI-TOFで確認し、続いて亜硫酸分解又はトリプシン分解により化学的に改変した。

【0177】

30

N-ヒドロキシスクシンイミドによるアミン基（N-末端およびリジン）のPEG化

a. 合成

インスリン（又はインスリンアナログ）をmPEG20k-NHSと共に、0.1Nのピシンバッファ（pH8.0）に1：1のモル比で溶解した。インスリンペプチド濃度は反応の進行をRP-HPLCによりモニターした。反応収率は室温2時間後に約90%であった。

b. 精製

反応混合物を2 - 5倍に希釈し、RP-HPLCにロードした。HPLC条件：C4カラム；流速10mL/分；A緩衝液は10% ACN及び0.1% TFA水溶液；B緩衝液はACN中0.1% TFA；0 - 40%（0 - 80分）のB%直線勾配；PEG-インスリン又はアナログは約35%Bで収集された。所望の化合物はMALDI-TOFで確認し、続いて亜硫酸分解又はトリプシン分解により化学的に改変した。

40

【0178】

フェニルアラニンの芳香環のアシル基の還元アミノ化PEG化

a. 合成

インスリン（又はインスリンアナログ）、mPEG20k-ヒドラジド、及びNaBH₃CN（モル比1：2：20）を酢酸緩衝液（pH4.1から4.4）に溶解した。反応溶液は、0.1N NaCl、0.2N酢酸及び0.1N Na₂CO₃から構成された。インスリン又はインスリンアナログ濃度は室温で24時間に約0.5mg/mLであった。反応プロセスをRP-HPLCによりモニターした。変換反応は約50%であった（HPLCにより計算）。

b. 精製

反応混合物を2 - 5倍に希釈し、RP-HPLCにロードした。HPLC条件：C4カラム；流速10mL/

50

分；A緩衝液は10% ACN及び0.1% TFA水溶液；B緩衝液はACN中に0.1% TFA；0 - 40%（0 - 80分）のB%直線勾配；PEG-インスリン又はPEG-インスリンアナログは約35%B緩衝液で収集された。所望の化合物はMALDI-TOEで確認し、続いて亜硫酸分解又はトリプシン分解により化学的に改変した。

【実施例 3】

【0179】

インスリン受容体結合アッセイ：

インスリン又はIGF-1受容体に対する各ペプチドの親和性を、シンチレーション近接技術を利用する競合結合アッセイで測定した。トリス-HCl緩衝液（0.05Mトリス-HCl（pH7.5）、0.15M NaCl、0.1% w/vウシ血清アルブミン）でペプチドの3倍連続希釈物を作成し、0.05nM（3- 125 I]-ヨードチロシル）A TyrA14インスリン又は（3- 125 I]-ヨードチロシル）IGF-1（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）と96ウェルプレート（Corning Inc., Acton, MA）で混合した。ヒトインスリン又はIGF-1受容体を過剰発現する細胞から調製した形質膜フラグメントの1 - 6マイクログラムアリコートを各ウェルに提供し、ポリエチレンイミン処理コムギ胚芽アグルチニンA型シンチレーション近接アッセイビーズ（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）を0.25mg/ウェルで添加した。800rpmで5分振盪後、プレートを室温で12時間インキュベートし、MicroBeta1450液体シンチレーションカウンター（Perkin-Elmer, Wellesley, MA）で放射能を測定した。非特異的結合（NSB）放射能は、試験サンプルの最高濃度よりも4倍過剰濃度の“コールド”の自然のままのリガンドを含むウェルで測定した。全結合放射能は競合物を含まないウェルで検出した。パーセント特異的結合は以下のように計算した： $\% \text{特異的結合} = (\text{結合} - \text{NSB} / \text{総結合} - \text{NSB}) \times 100$ 。IC₅₀値はOriginソフトウェア（OriginLab, Northampton, MA）を用いることによって決定した。

【実施例 4】

【0180】

インスリン受容体リン酸化アッセイ：

インスリン又はインスリンアナログの受容体リン酸化を測定するために、受容体をトランスフェクトしたHEK293細胞を96ウェルの組織培養プレート（Costar #3596, Cambridge, MA）に播種し、以下を補充したダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM）で、37℃、5% CO₂及び90%湿度で16 - 20時間培養した：100IU/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシン、10mM HEPES及び0.25%ウシ成長血清（HyClone SH30541, Logan, UT）。0.5%ウシ血清アルブミン（Roche Applied Science #100350, Indianapolis, IN）を補充したDMEMでインスリン又はインスリンアナログの連続希釈物を調製し、付着細胞を含むウェルに添加した。5% CO₂を含む37℃の湿潤雰囲気中で15分間インキュベートした後、細胞を室温で20分間パラホルムアルデヒドにより固定し、リン酸緩衝食塩水（pH7.4）で2回洗浄し、さらにPBSに2%のウシ血清アルブミンで1時間ブロックした。続いてプレートを3回洗浄し、製造業者の推奨により2%のウシ血清アルブミンを含むPBSで再構成した、ホスホチロシンに対するセイヨウワサビエルオキシダーゼ結合抗体（Upstate biotechnology #16-105, Temecula, CA）を満たした。室温で3時間インキュベートした後、4回洗浄し、0.1mLのTMB単溶液基質（Invitrogen, #00-2023, Carlsbad, CA）を各ウェルに添加した。発色は0.05mLの1N HCLの添加により5分後に停止させた。450nmの吸収をTitertek Multiscan MCC340（ThermoFisher, Pittsburgh, PA）で測定した。吸収対ペプチド濃度の用量応答曲線をプロットし、EC₅₀値をOriginソフトウェア（OriginLab, Northampton, MA）を用いて決定した。

【実施例 5】

【0181】

モデルジペプチドの切断速度の決定（PBS中）

ジペプチドN-末端伸長部の切断速度を調べることができる、特定のヘキサペプチド（HSRGTF-NH₂（配列番号：17））をモデルペプチドとして用いた。ジペプチド伸長モデルペプチドをBoc保護サルコシンで調製し、続けてリジンモデルペプチド結合樹脂に付加して

ペプチドA (Lys-Sar-HSRGTF-NH₂ (配列番号:18)) を生成した。ペプチドAをHFで切断し、調製用HPLCで精製した。

対応するプロペプチドの切断速度を決定した。プロペプチド及びモデル親ペプチドの濃度をそれらの対応するピーク面積によって決定した。種々の時間間隔におけるプロドラッグの濃度の対数をプロットすることによって、プロドラッグの一次解離速度定数を決定した。この図の勾配は速度定数 'k' を提供する。多様なプロドラッグの切断半減期を以下の式を用いて計算した： $t_{1/2} = .693/k$ 。このモデルペプチドHSRGTF-NH₂ (配列番号:17) のLys-Sar伸長部分の半減期は14.0時間と決定された。

【実施例 6】

【0182】

全てがd-アイソフォームのモデルペプチドで決定されるジペプチド血中切断速度半減期
また別のモデルヘキサペプチド (dHdTdRGdTdF-NH₂ (配列番号:21)) を用いてジペプチド血中切断速度を決定した。各アミノ酸のd-異性体を用いて、プロドラッグ伸長部分を除きモデルペプチドの酵素的切断を防いだ。このモデルd-異性体ヘキサペプチドはl-異性体と同様な態様で合成された。ペプチドAについて先きに報告したように、サルコシン及びリジンを連続的にN-末端に付加して、ペプチドB (dLys-dSar-dHdTdRGdTdF-NH₂ (配列番号:59)) を調製した。

対応するプロペプチドの切断速度を決定した。プロペプチド及びモデル親ペプチドの濃度をそれらの対応するピーク面積によって決定した。種々の時間間隔におけるプロドラッグの濃度の対数をプロットすることによって、プロドラッグの一次解離速度定数を決定した。この図の勾配は速度定数 'k' を提供する。このモデルペプチドdHdTdRGdTdF-NH₂ (配列番号:21) のLys-Sar伸長部分の半減期は18.6時間と決定された。

【実施例 7】

【0183】

実施例5に記載した手順を用いて、モデルヘキサペプチド (HSRGTF-NH₂ (配列番号:17)) に連結された別のジペプチドの切断速度を決定した。これらの実験で得られた結果は表2及び3に提示されている。

【0184】

表2：N-末端パラ-アミノ-Pheの側鎖に連結されるジペプチドO-UのPBS中でのモデルヘキサペプチド (HSRGTF-NH₂ (配列番号:17)) からの切断

【0185】

10

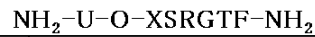
20

30

化合物	U (アミノ酸)	O (アミノ酸)	$t_{1/2}$
1	F	P	58時間
2	ヒドロキシル-F	P	327時間
3	d-F	P	20時間
4	d-F	d-P	39時間
5	G	P	72時間
6	ヒドロキシル-G	P	603時間
7	L	P	62時間
8	tert-L	P	200時間
9	S	P	34時間
10	P	P	97時間
11	K	P	33時間
12	dK	P	11時間
13	E	P	85時間
14	Sar	P	約1000時間
15	Aib	P	69分
16	ヒドロキシル-Aib	P	33時間
17	シクロヘキサン	P	6分
18	G	G	切断無し
19	ヒドロキシル-G	G	切断無し
20	S	N-メチル-Gly	4.3時間
21	K	N-メチル-Gly	5.2時間
22	Aib	N-メチル-Gly	7.1分
23	ヒドロキシル-Aib	N-メチル-Gly	1.0時間

【 0 1 8 6 】

表3：1位 (X) でヒスチジン (又はヒスチジン誘導体) に連結されたジペプチドU-OのPBS
中でのモデルヘキサペプチド (XSRGTF-NH₂ (配列番号:17)) からの切断



Cmp	U (アミノ酸)	O (アミノ酸)	X (アミノ酸)	t _{1/2}
1	F	P	H	切断無し
2	ヒドロキシル-F	P	H	切断無し
3	G	P	H	切断無し
4	ヒドロキシル-G	P	H	切断無し
5	A	P	H	切断無し
6	C	P	H	切断無し
7	S	P	H	切断無し
8	P	P	H	切断無し
9	K	P	H	切断無し
10	E	P	H	切断無し
11	デヒドロV	P	H	切断無し
12	P	d-P	H	切断無し
13	d-P	P	H	切断無し
14	Aib	P	H	32時間
15	Aib	d-P	H	20時間
16	Aib	P	d-H	16時間
17	シクロヘキシル-	P	H	5時間
18	シクロヘキシル-	P	H	10時間
19	N-Me-Aib	P	H	> 500時間
20	α, α -ジエチル-Gly	P	H	46時間
21	ヒドロキシル-Aib	P	H	61
22	Aib	P	A	58
23	Aib	P	N-メチル-His	30時間
24	Aib	N-メチル-Gly	H	49分
25	Aib	N-ヘキシル-Gly	H	10分
26	Aib	アゼチジン-2-カルボン酸	H	> 500時間
27	G	N-メチル-Gly	H	104時間
28	ヒドロキシル-G	N-メチル-Gly	H	149時間
29	G	N-ヘキシル-Gly	H	70時間
30	dK	N-メチル-Gly	H	27時間
31	dK	N-メチル-Ala	H	14時間
32	dK	N-メチル-Phe	H	57時間
33	K	N-メチル-Gly	H	14時間
34	F	N-メチル-Gly	H	29時間
35	S	N-メチル-Gly	H	17時間
36	P	N-メチル-Gly	H	181時間

【 0 1 8 7 】

加えて、IGF1 YLインスリンアナログの多様なプロドラッグ誘導体を調製した。この場合、ジペプチドエレメントは、IGF1 YLの19位に存在する4-アミノ-フェニルアラニン残基を介してアミド結合により連結されている。実施例5の手順を用いたこれらの化合物の *in vitro* 分析は、これらの化合物の活性は、PBS緩衝液又は20%血漿中でインキュベートされる時間とともに増加することを明らかにした。加えて、IGFアナログプロドラッグMIU 30 : A1(aF19-dLys(Ac),Sar) (A19 4-アミノPheを介しかつそれとのアミド結合により連結されたジペプチド) の *in vitro* 活性を、インスリン受容体結合について20%血漿中でのインキュベーションの時間経過にしたがい(1時間、3時間、6時間、9時間及び10.5時間) 自然のままのインスリンと対比して測定した。表3Aは、37 °Cの20%血漿/PBSでのインキュベーションにおける相対的インスリン受容体結合の時間経過を比較する。 *in vitro* 結合アッ

セイ（表3A参照）及びin vitroリン酸化アッセイ（表3B参照）で提供されるデータが示すように、プロドラッグ型が活性なIGF1 YLペプチドに変換されるので、時間の経過とともにA19 IGFプロドラッグ誘導体サンプルから活性の増加が回復する。

【 0 1 8 8 】

表3A

時間(hr)	% インスリン活性
0	34.44%
9	100.09%
95	115.42%

10

表3B

時間(hr)	% インスリン活性
1	23.0
3	26.8
6	32.5
9	41.1
10.5	43.2

20

インスリンアナログMIU-30a : B¹(Y16,L17,Y25)29a:A¹(dLys(Ac),Sar-aF19) (A19 4-アミノPheを介しかつそれとのアミド結合により連結されたジペプチド)、20%血漿を含むPBS (pH7.4) に溶解し37℃で48時間インキュベートしたMIU30 (“ MIU-30c ” を生じる) を投与されたC57/Blkマウスを用いるin vivo耐糖試験。0時間 (MIU30a) 及び48時間 (MIU30c) インキュベートしたサンプルを取り出し、C57ブラックマウスに90nmol/kg及び270nmol/kgで注射し、糖低下を測定した (インスリン耐性試験) 。図1Aでは、8時間の間の種々の時点におけるMIU30a及びMIU30cの糖低下プロフィールが示されている。親化合物は低い効能を有するが、20%血漿で48時間インキュベートした後では (“ MIU30c ” を生じる) 効能は増加する (図1A参照) 。図1Bでは、ピヒクルと比較したMIU30a及びMIU30cの総血糖は弁別的な曲線下面積 (AUC) として示されている。90nmol/kgでは、MIU30aは糖変化をほとんど示さないが、MIU30cは相当な低下を引き起こす。270nmol/kgでは、MIU30a及びMIU30cはともに糖低下を示すが、後者のサンプルははるかに強い低血糖効能を有する。要約すれば、インスリンアナログMIU30のプロドラッグ型は、生理学的条件下での親インスリンアナログへのex vivo変換前に注射したときには相当に弱い糖低下効能を示す。これらのin vivoの結果はin vitro分析と一致する。プロドラッグの半減期は約20時間と概算される。

30

【実施例 8】

【 0 1 8 9 】

インスリンプロドラッグアナログの比較インスリン耐性

正常マウスにインスリンヘテロダイマーアナログ [B¹(Y16,L17,Y25)29a:A¹(aF19-NH₂)]又はそのプロドラッグ誘導体を投与した。プロドラッグ誘導体MIU-29 : [B¹(Y16,L17,Y25)29a:A¹(aF19-dLys(Ac),NLeu)]は4-アミノ-フェニルアラニン置換基をA19位に含み、ここでジペプチドdLys(Ac),NLeuはA19残基の4-アミノの位置に共有結合で連結されている。このジペプチドは生理学的条件下で約4.4時間の半減期で自己切断するであろう。プロドラッグ誘導体 [B¹(Y16,L17,Y25)29a:A¹(aF19-dLys(Ac),NLeu)]をex vivoで24時間インキュベートした後、生じた化合物をマウスに投与し、その血糖低下能力を親化合物と比較した。2つの化合物はほぼ同一の性能を示した。

40

インスリンプロドラッグアナログのアシル化を精査し、in vivo保持時間が強化されるか否かを決定した。MIU42 [B¹(Y16,L17,Y25)29a:A¹(dLys(rE-C14),Sar-aF19)](アシル化ジペプチドプロドラッグエレメントを有する)のin vitro活性は、非アシル化プロドラ

50

ッグと比較して、30%のACN/PBS中でのex vivoインキュベーション (pH7.4、37) 時間 (プロドラッグ変換の時間を提供する) とともに増加する (図2参照)。予備インキュベーション工程無しに投与されるMIU42プロドラッグを用いて実施した比較インスリン効能試験は、このプロドラッグは非プロドラッグ親化合物 (MIU-27) と比較してあまり強力ではないことを示した。このことはまた、アシル化インスリンアナログMIU-46 [B¹(H5,10 Y 16,L17,Y25, K29-C14)28a:A¹(N18,21, aF19NH2)] (B29位にアシル化を有する) に関して、その通りであることが見出された。この化合物は、マウスでin vivo試験を実施したときに所望のin vivo効能又は基礎プロフィールを示さなかった。したがって、少なくともマウスではアシル化は所望のプロフィールをもたらさない。

【実施例 9】

【0190】

PEG化インスリンプロドラッグアナログの生合成及び精製

固相Boc化学反応を用いて、IGF1 B鎖(2-25) H^{5,10} Y¹⁶ L¹⁷ SH⁷ AcM¹⁹アミドをMBHA樹脂で合成した。このペプチドをアミノ酸側鎖保護の同時除去により樹脂から切断した後、粗B鎖をDMSO中で2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン)と混合してCys⁷のシステイン-NpyS誘導体を得た。Boc-アミノオキサセチル (Aoa) のB鎖N-末端への添加は、B鎖とBoc-Aoa-OSuとの間の反応を介して達成された。US-2011-0257076 (その開示は参照により本明細書に含まれる) に記載された“1+2”の方法を用いて、精製IGF1 B鎖(2-25)(BocAoa)⁰ H^{5,10} Y¹⁶ L¹⁷ SH⁷ AcM¹⁹アミドをIGF1 A鎖AcM^{6,7,11} N^{18,21} (aa1aa2)-pNH-F19酸と結合させて、B鎖のN-末端にBoc-Aoaを有するインスリンアナログを生成した。スカベンジャとしてO-(カルボキシメチル)ヒドロキシルアミンヘミヒドロクロリドの存在下での6N HClによる簡単な処理により前記ペプチドを処理してBocを除去した。Boc除去及び精製の後で、前記ペプチドを3mg/mLの濃度で1%アミン/30% ACN/0.2M NaOAc (pH4.6) に溶解した。2倍過剰量の20KD PEG-プロピオンアルデヒドを前記溶液に添加し、反応物を室温で1時間攪拌し、続いて最終的な精製を実施してPEG化インスリンアナログを得た。

二鎖インスリンアナログのアミノ末端への20kDa PEGの添加はインスリンアナログの効能を低下させる。自己切断性ジペプチドプロドラッグエレメント (dLys(rE-C14),Nleu) のA19位への添加は当該化合物の効能を約100倍さらに低下させる。しかしながら、このプロドラッグのPBS中での37 で78時間 (ジペプチドは約4.4時間の半減期を有する) の予備インキュベーションは親のPEG化された化合物に近い値にその効能を回復させる。表4を参照されたい (表4は、in vitroリン酸化アッセイで測定したときのインスリン受容体A及びBサブタイプにおける当該アナログのEC50を列挙する)。

表4：PEG化インスリンプロドラッグの活性

		インスリン	非PEG化 pNH ₂ F	PEG- pNH ₂ F	PEG-dKAcNleu 0時間	PEG-dKAcNleu 78時間
IR-A	EC50	0.17	0.21	0.94	15.49	2.06
	%		81%	18%	1.1%	8.3%
IR-B	EC50	0.24	0.50	3.72	20.0	3.8
	%		48%	6.5%	1.2%	6.3%

【実施例 10】

【0191】

単鎖インスリンアナログの生合成及び精製

IGF-I C鎖を介して自然のままのインスリンB及びA鎖を含む (B⁰-C¹-A⁰) インスリンIGF-Iミニジーンを、酵母ピキア・パストリス (Pichia pastoris) での構成的発現及び組換えタンパク質の精製のために、GAPプロモーター (グリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) のプロモーター) 下にて発現ベクターpGAPZ A (Invitrogenから購入) でクローニングした。ミニジーンを、サッカロミセス・セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae) の -接合因子リーダーシグナルをコードするN-末端ペプチドに当該

10

20

30

40

50

組換えタンパク質の培養液への分泌のために融合させた。ミニジーンと先導 - 接合因子配列との間のKex2切断部位を用いて、自然のままのアミノ末端を有するミニジーンの分泌のためにリーダー配列を切断した。B⁰-C¹-A⁰ミニジーンのCペプチドの1位 (G1A)、2位 (Y2A)、3位 (G3A)、4位 (S4A)、5位 (S5A)、6位 (S6A)、7位 (R7A)、8位 (R8A)、10位 (P10A)、11位 (Q11A) 及び12位 (T12A) に単部位アラニン変異を導入した。

エレクトロポレーションによって、B⁰-C¹-A⁰ミニジーンを含むミニジーン、11のアラニン変異体、及び他の選別誘導体を酵母ピキア・パストリスに形質導入した。陽性形質転換体を最少メタノールプレートで選別し、各ピキア単離株のゲノム調製を実施し、さらに酵母ゲノムへの構築物の組み込みをPCRによって確認した。833塩基対のPCR生成物がアガロースDNAゲルで可視化された。インスリンアナログは対応する酵母株の発酵によって生成された。酵母細胞を20分間5Kの遠心分離によって500mLのベックマン (Beckman) 遠心分離管でベレットにし、培養液をその後のタンパク質精製のために維持した。

【 0 1 9 2 】

増殖培養液上清を0.2 µmミリポアフィルターでろ過した。当該上清にアセトニトリル (ACN) を20%の最終体積で添加した。20% ACN水で予め平衡化したアンバーライト (Amberlite) XAD7HP樹脂 (Sigma) で、前記上清を精製した。続いて、樹脂を30mLの20% ACN水で2回洗浄し、さらに0.1%のTFAを含む30% ACN水で夾雑物を除去した。0.1% TFAを含む54%のACN水で部分精製インスリンアナログをカラムから溶出し、凍結乾燥させた。凍結乾燥サンプルを0.025M NH₃HCO₃ (pH8) に再懸濁し、Luna C18カラム (粒子サイズ10 µm、ポアサイズ300) で精製した。タンパク質はACN水の20 - 60%の直線勾配を用いてカラムから溶出させた。MALDI-MS陽性分画をプールし、使い捨てシンチレーションバイアルにその後の凍結乾燥のために移した。続いて、凍結乾燥サンプルを0.1% TFA含有20% ACN水に再懸濁し、Luna C18カラム (粒子サイズ10 µm、ポアサイズ300) で精製した。タンパク質をACN水の18 - 54%の直線勾配を用いてカラムから溶出させた。タンパク質溶出を280nmの吸収でモニターした。MALDI-TOF MS陽性分画をC8分析用カラムで分析して純度を担保した。

B⁰-C¹-A⁰アナログは、インスリン受容体アイソフォーム及びIGF-1受容体の両方で等しく有効であることを示した。2位のチロシンのアラニンへの変異又はC9-12の欠失によるCペプチドの8アミノ酸への短縮は、IGF-1受容体活性の顕著な低下によってインスリン作用の特異性で選択的強化を提供した。表5A及び5Bに提供されるデータを参照されたい。

表5A：インスリン結合及びリン酸化分析 (B⁰C¹A⁰)

ペプチド	インスリン結合		インスリンリン酸化	
	IC ₅₀ , nM	N	EC ₅₀ , nM	n
インスリン	0.54+/-0.02	4	1.67+/-0.13	1
IGF-1	18.81+/-1.77	3	29.20+/-8.41	1
010 (B ⁰ C ¹ A ⁰)	2.83+/-0.52	2	1.93+/-0.43	1
G1A	1.21+/-0.15	1	2.4+/-0.24	1
Y2A	1.95+/-0.28	3	1.86+/-0.42	1
G3A	1.41+/-0.05	2	2.13+/-0.02	1
S4A	0.84+/-0.47	2	0.76+/-0.35	1
S5A	0.93+/-0.44	1	2.23+/-1.27	1
S6A	1.15+/-0.24	1	2.33+/-1.65	2
R7A	6.04+/-0.82	1	5.21+/-4.14	1
R8A	0.63+/-0.09	1	2.03+/-0.06	2
P10A	2.86+/-0.93	1	2.59+/-1.2	1
Q11A	1.79+/-0.47	1	2.58+/-0.83	1
T12A	1.2+/-0.18	1	2.81+/-1.31	1

表5B：IGF-1結合及びリン酸化分析 (B⁰C¹A⁰)

ペプチド	IGF-1結合		IGF-1 リン酸化	
	IC ₅₀ , nM	N	EC ₅₀ , nM	n
インスリン	60.63+/-4.43	1	48.66+/-1.59	1
IGF-1	0.38+/-0.07	1	0.88+/-0.41	1
010 (B ⁰ C ¹ A ⁰)	4.49+/-1.04	1	1.29+/-2.28	1
G1A	42.36+/-16.24	1	1.4+/-0.62	1
Y2A	257.9+/-29.59	1	35.6+/-14.55	1
G3A	34.02+/-16.09	1	7.85+/-0.78	1
S4A	15.30+/-3.10	1	1.64+/-1.65	1
S5A	13.06+/-3.01	1	2.63+/-1.88	1
S6A	2.44+/-0.79	1	1.54+/-0.62	2
R7	43.86+/-8.72	1	1.26+/-1.55	1
R8	10.85+/-1.47	1	0.50+/-0.23	2
P10A	6.42+/-0.47	1	2.79+/-1.12	1
Q11A	4.23+/-0.43	1	0.41+/-0.69	1
T12A	9.15+/-0.83	1	1.44+/-1.36	1

10

【 0 1 9 3 】

Cペプチドの2及び3位はIGF-1受容体で改変にもっとも鋭敏であるが、インスリン受容体では改変に対して比較的免疫性を提供する。アナログの全てが単一単位のナノモル活性を維持するが、ある種の特異的アナログは効能のわずかな強化を提供した（低い単一単位ナノモル）。大半のインスリン選択性アナログは、Cペプチドの最後の4残基を欠きC-ペプチドの2位のアラニン変異又は前記2つの変異の組み合わせを有するものであった。

20

インスリン/IGFキメラの安定性を、インスリンアナログをインスリン特異的分解酵素（IDE）に暴露し活性をアッセイすることによって精査した。

インスリン分解アッセイ：rDNAラットIDEはEMDケミカルズ社から入手した。ペプチドは重炭酸アンモニウム緩衝液中の15mMアリコットとして調製した。初期濃度は276nmでのUV吸収を基準に概算し、さらに内部標準物とのHPLC分析によって確認した。溶液のpHは7.8 - 8.4に維持した。IDEを添加し、消化は時間経過の間37℃で実施した（12から48時間）。実験にしたがって1：350 - 450の酵素：基質比を用いた。HPLC分析のために、時間間隔にしたがってアリコットをTFA緩衝溶液（参照ペプチドを含む）に取り出した。活性の評価のために、別のアリコットをDMEMアッセイ培養液に取り出した。全てのアリコットは直ちにドライアイス上で凍結され、分析まで-55℃で維持された。

30

HPLC分析：被験ペプチドの分解プロファイルをHPLCアッセイで評価した。TFA緩衝液を用いるベックマンコールター系に接続したAgilent Zorbax C8カラムで各アリコットについて2回の試験を実施した（10分の間に20から60% Bの勾配、ここでB = 90% AcN）。

生物活性：IDEとのインキュベーション後のアナログの残留効能を、インスリン受容体リン酸化ELISAアッセイの50%有効濃度（EC50）として決定した。酵素分解時に調製されたペプチドをインスリン受容体リン酸化による生物活性アッセイに付したとき、我々は、全てのインスリン及びIGF-2 A-鎖アナログは実質的に全ての活性を失うが、IGF-1 A-鎖アナログはいずれも活性を維持することに気付いた。インスリンアナログのインスリン特異的分解酵素（IDE）による切断は極端に激しく、A鎖が自然のままのインスリン配列から誘導されるインスリンでは容易に検出される。対照的に、A鎖がIGF-1の配列から誘導されるアナログはタンパク質分解に極端に耐性であるように思われる。

40

安定性の増加が分裂促進性の増加を生じるかもしれないという予想は、しかしながらより高インスリン効能アナログと増殖増加との相関性であるとは思われなかった。さらにまた、かつタンパク質分解安定性にとって特に重要であるが、IDEに対しより耐性であるアナログがより強い分裂促進性潜在能力を有するとは思われなかった。

一連のインスリンアナログを正常マウス（Melior Research Labs）でのin vivo試験に付した。標準的インスリン治療と比較したとき、問題のペプチドは全て同様な又は強化

50

されたブドウ糖低下効能を示した。しかしながら、同じB鎖を有するインスリンA鎖のアナログとIGF1 A鎖のアナログを比較したとき、効能に顕著な相違は観察されなかった。このことは、インスリンのIDE分解及びクリアランスは主要な又は生理的に関係のあるメカニズムではないという結論を支持する。

【実施例 11】

【0194】

N-アルキル化及び脂質化インスリンプロドラッグの合成及び精製

1. 図14Aで概略したトリペプチドの液相合成

Ugi反応の一般的手順(8a、8b)

第一アミンの溶液及びMeOH中のアルデヒドを室温で1時間攪拌し、続いてt-Boc-D-Lys(Fmoc)又はFmoc-D-Lys(t-Boc)及びメチルイソシアノアセテートを添加した。反応混合物を室温で10時間攪拌し、減圧下で濃縮した。残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製して生成物を得た。

10

脂肪酸アシル化のための一般的手順(9a、9b)

リジン側鎖の保護基を、1% ピペリジン/1% 1,8-ジアザビシクロウンデカ-7-エン(DBU)/ジクロロメタン(8aのため)又は50% TFA/DCM(8bのため)を用いて除去した。遊離アミンを適切な脂肪酸により、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミドヒドロクロリド/DCN中の6-クロロ-1-ヒドロキシベンゾトリアゾール脱水物の存在下でアシル化し、得られた生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した。

メチルエステルの加水分解のための一般的手順(10a、10b)

20

メチルエステルを、塩基性条件下で水酸化リチウムのTHF/水の溶液で加水分解した。続いてHCl溶液の添加により反応物をpH2に調整し、反応混合物をDCMで抽出し、フラッシュカラムクロマトグラフィーによって生成物を回収した。

カルボン酸活性化のための一般的手順(11a、11b)

カルボン酸をNMP中のDIC/NHSを用いてNMP活性化するか、又はDIC/NHS/NMPによって活性化して次の工程で用いた。

【0195】

2. トリペプチドの固相合成(図14B)

Fmoc保護アミノ酸のローディングのための一般的手順(1)

1.0g(1.1mmol)の2-クロロトリチルクロリド樹脂(100-200メッシュ; 1% DVB; ローディング1.1mmol/g)、Fmoc保護アミノ酸(2.2mmol、2eq.)及び350 µLのN,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.2mmol、2eq.)をDCM(10mL)中に懸濁し、室温で一晩振盪した。樹脂を水切りし、DMF(10mL)で3回、DCM(10mL)で3回洗浄し、続いてDCM(10mL)、MeOH(2mL)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(1mL)の溶液で処理して未反応の2-クロロトリチルクロリドを脱活性化した。最後に、樹脂をDMF(10mL)で3回、及びDCM(10mL)で3回洗浄し、真空乾燥させた。

30

樹脂結合 α-プロモアシル-Gly-アミノ酸のための一般的手順(2)

樹脂結合1をDMF中の20%ピペリジンで15分間2回処理し、この樹脂をDMF(10mL)、DCM(10mL)及びDMF(10mL)で再び繰り返し洗浄した。樹脂の0.2g(0.22mmol)部分を、146mgのα-プロモ酢酸(1.1mmol、5eq.)、187mgの6-クロロ-1-ヒドロキシベンゾトリアゾール脱水物(1.1mmol、5eq.)及び154 µLのN,N-ジイソプロピルカルボジイミド(1.1mmol、5eq.)でDMF(3mL)中にて室温で処理した。2時間後、樹脂の水を切り、DMF(10mL)及びDCM(10mL)で3回洗浄した。

40

樹脂結合α-N-(R1)-Glyのための一般的手順(3)

0.2gの樹脂を3.0mmolの第一アミン及び525 µL(3mmol)のDIEAと3mLのDMSO中で室温で一晩処理した。続いて樹脂の水を切り、DMF及びDCMで洗浄した。

樹脂結合t-Boc-D-Lys(Fmoc)-N-(R1)-Gly(4)

0.2g(0.22mmol)の樹脂3をDMF(10mL)中の20%ピペリジンで処理し、この樹脂をDMF(10mL)、DCM(10mL)及びDMF(10mL)で再び洗浄し、続いて515mgのt-Boc-D-Lys(Fmoc)-OH(1.1mmol、5eq.)、330mgの3-(ジエトキシホスホリルオキシ)-1,2,3-ベンゾトリアジ

50

ン-4(3H)-オン (DEPBT) (1.1mmol, 5eq.) 及び192 μ LのDIEA (1.1mmol, 5eq.) とDMF (3 mL) 中で一晩室温にて混合した。樹脂の水を切り、DMF (10mL) 及びDCM (10mL) で洗浄した。

樹脂結合 t-Boc-D-Lys(脂肪酸)-N-R1-Gly-アミノ酸 (5)

樹脂結合4をDMF中の20%ピペリジンで脱保護し、この樹脂をDMF (10mL)、DCM (10mL) 及びDMF (10mL) で再び洗浄した。樹脂の0.2g (0.22mmol) 部分を、長鎖脂肪酸 (1.1mmol, 5eq.)、399mgの1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート (HATU) (1.05mmol, 4.75eq.) 及び193 μ LのDIEA (1.05mmol, 4.75eq.) とDCM (2mL) 及びDMF (2mL) 中にて室温で一晩処理した。樹脂の水を切り、DMF (10mL) 及びDCM (10mL) で洗浄し、真空化で乾燥させた。

10

t-Boc-D-Lys(脂肪酸)-N-R1-Gly-アミノ酸 (6)

樹脂結合5をDCM中の0.1% TFA、20%トリフルオロエタノール (TFE) の10mLで切断した。1時間後、ろ液を収集し、樹脂を5mLのDCMで洗浄した。ろ液とDCM洗浄物を一緒にまとめ、減圧下で蒸発させた。この粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液としてDCM中の4% - 12% MeOH) で精製し、白色固体又は黄色油として生成物を得た。

t-Boc-D-Lys(脂肪アシル)-N-R1-Gly-アミノ酸-NHSエステル (7)

12.8mgの遊離酸6 (0.02mmol) を、4.6mg NHS (0.04mmol, 2eq.) 及び5.6 μ LのDIC (0.04mmol, 2eq.) を用い1mLのNMP中で一晩活性化し、さらに精製することなく用いた。

【 0 1 9 6 】

3. 脂肪化トリペプチドとインスリンの連結 (図14C及び14Dを参照)

20

A1,B29-ジ-tBoc-インスリンを用いる脂質化インスリンプロドラッグの合成 (図14C)

A1,B29-ジ-tBoc-インスリンの調製 (12)

インスリン (150 mg, 0.026mmol) を、2% DIEA/DMF (15mL) に懸濁し、12.7mgの2-(tert-ブチルオキシカルボニル-オキシイミノ)-2-フェニルアセトニトリル (0.052 mmol, 2eq.) を加えて白濁溶液とし、室温で4時間攪拌した。4時間後に溶液は透明になり、続いて反応を1% AcOH及び20% ACN緩衝液の135mLで停止させた。調製用HPLCにより所望の生成物を白色粉末として得ることができた (60.2mg, 38.5%収量)。

トリペプチドとA1, B29-ジ-tBoc-インスリンとのカップリングのための一般的手順 (14)

30

NMP/ピシン緩衝液混合物 (pH8.2) (3:1) 中のA1,B29-ジ-tBoc-インスリンの溶液に、NMP中のトリペプチドスクシネートエステル (2eq.) の2当量を加えた。反応の進行はLC-MSでモニターした。室温で4時間後に反応混合物を過剰な85%リン酸で処理し、水で希釈して反応を停止させ、調製用HPLCで精製して生成物を得た。

A1, B29-ジ-(Fmoc)-インスリンを用いる脂質化インスリンプロドラッグの合成 (図14D)

A1, B29-ジ-(Fmoc)-インスリン (15)

インスリン (116mg, 0.02mmol) をNMP (4mL) 及びピシン緩衝液 (pH8.2) (1mL) の5mL混合物に溶解した。得られた溶液にFmoc-NHSエステル (13.5mg, 0.04mmol, 2eq.) をゆっくりと添加し、反応混合物を室温で攪拌し、LC-MSでモニターした。完了後、1% AcOHと20% ACN緩衝液の135mLを用いて反応を停止させた。調製用HPLCは所望の生成物を白色粉末として提供した (25.2mg, 20.5%収量)。

40

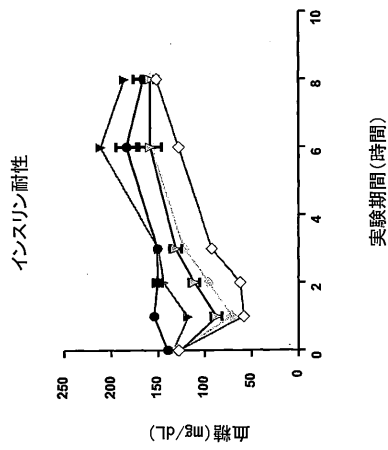
トリペプチド部分とA1, B29-ジ-(Fmoc)-インスリンのカップリングのための一般的手順 (17)

NMP/ピシン緩衝液混合物 (pH8.2) (3:1) 中のA1,B29-ジ-tBoc-インスリンの溶液をNMP中のトリペプチドスクシネートエステル (2eq.) で処理し、反応をLC-MSでモニターした。室温で4時間後に反応混合物をDMF中の20%ピペリジンで処理し、0.1Nの塩酸溶液の添加によって反応を停止させ、調製用HPLCで精製して最終生成物を得た。

【 図 1 A 】

MIU 30A,Cの比較インスリン耐性試験

Fig 1A

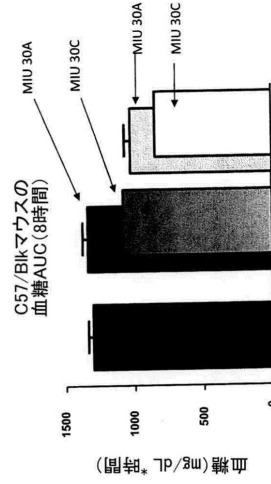


MIU-30a: B¹(Y16,L17,Y25)29a : A¹(dLys(Ac),Sar-aF19)

【 図 1 B 】

MIU 30A,Cの比較インスリン耐性試験

Fig 1B



【 図 2 】

MIU 42 B¹(Y16,L17,Y25)29a : A¹(dLys(rE-C14),Sar-aF19)

pH7.4, 37°C (30% ACN/PBS) でインキュベーション

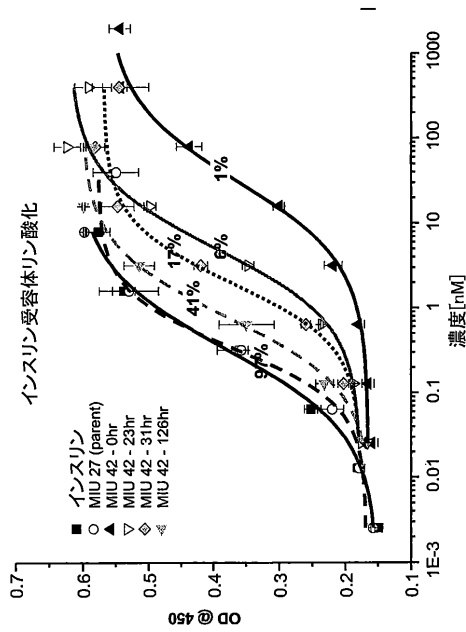
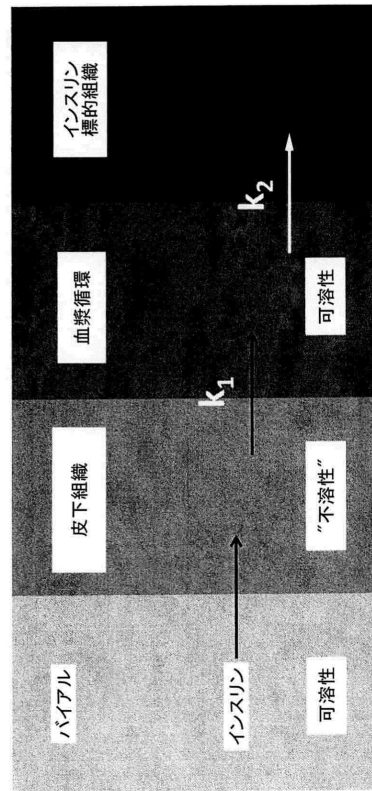


Fig. 2

【 図 3 】

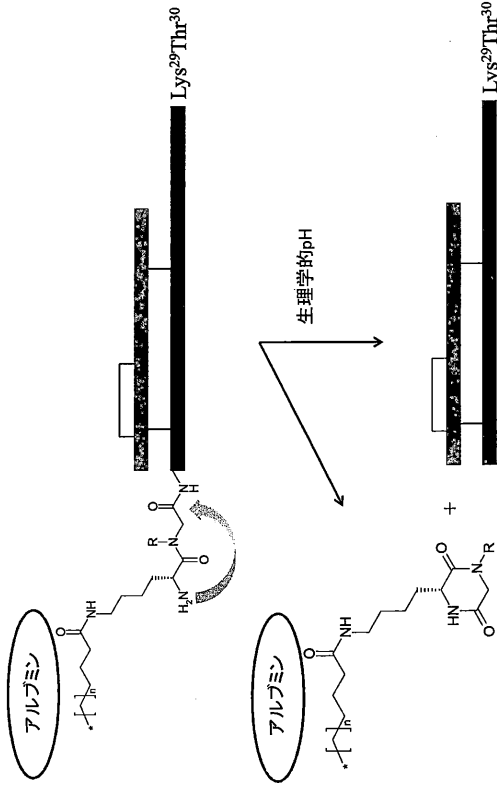
超基礎/基礎/ポラスインスリン療法

Fig. 3



【 図 4 】

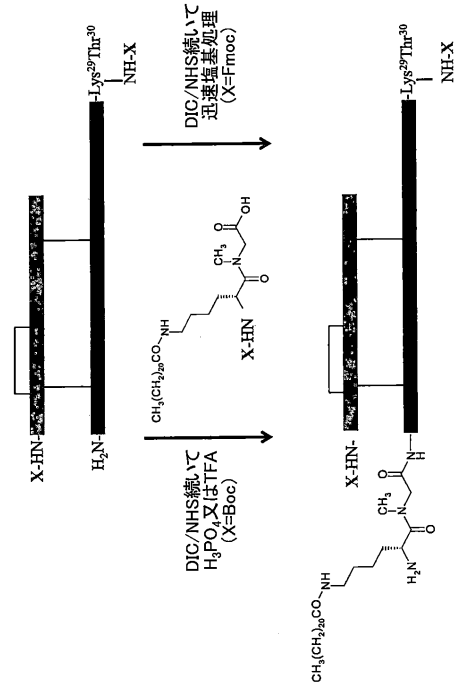
Fig. 4 “不可逆性”脂質化インスリンプロドラッグの概念



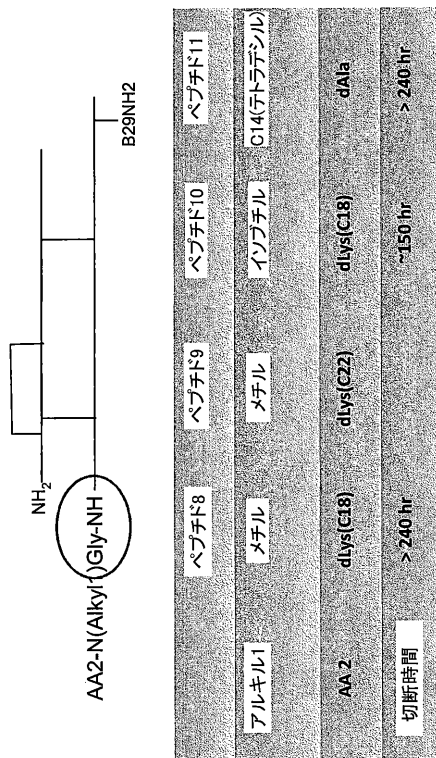
【 図 5 】

アミドプロドラッグへの合成中間体としての
A1,B29 ジーBoc又はジ-Fmocインスリン

Fig. 5



【 図 6 】

Fig. 6 Phe^{B1}-インスリンプロドラッグの安定性

【 図 7 - 1 】

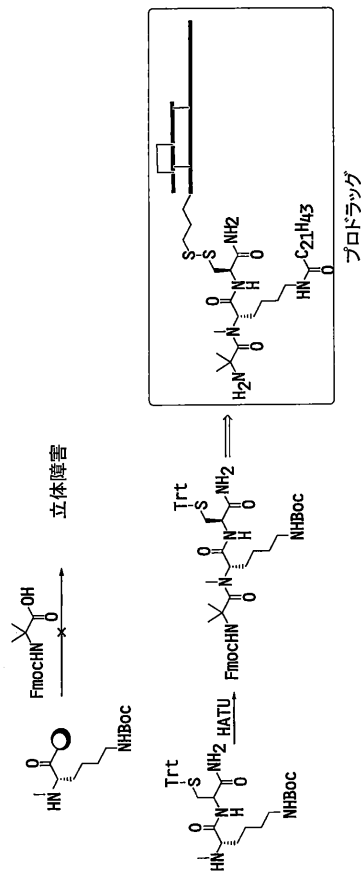
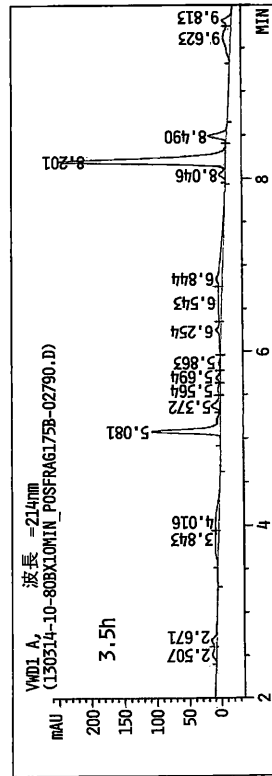
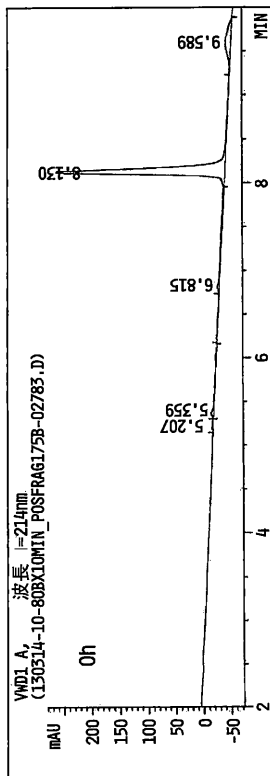
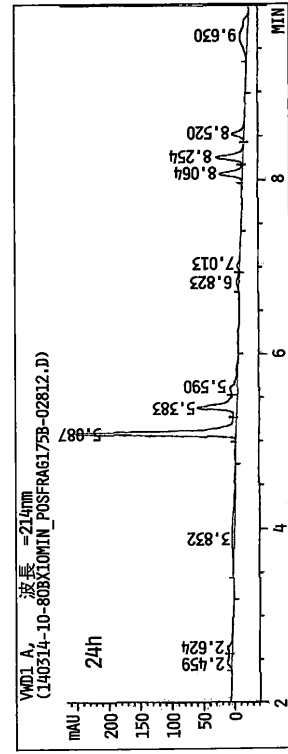
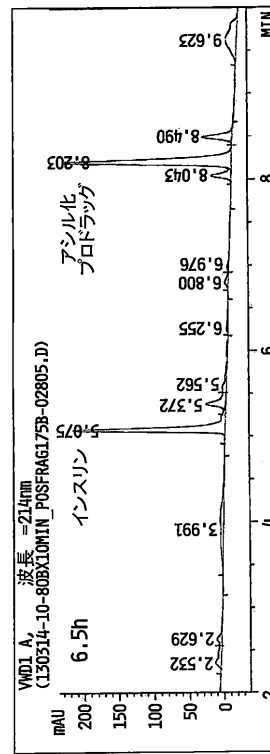


FIG. 7

【図 7 - 2】

FIG. 7
CONT.

【図 7 - 3】

FIG. 7
CONT.

【図 8 - 1】

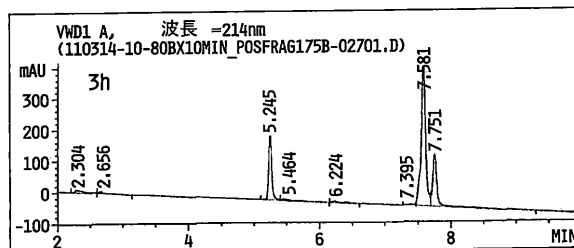
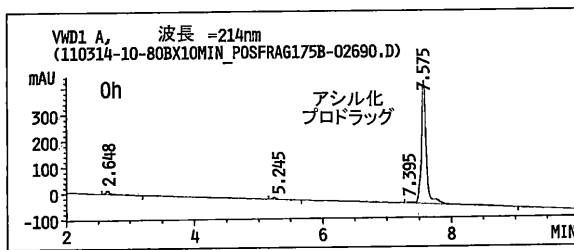
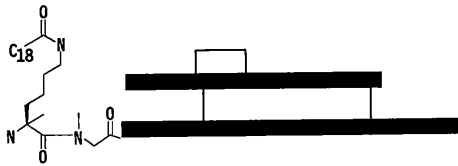


FIG. 8

【図 8 - 2】

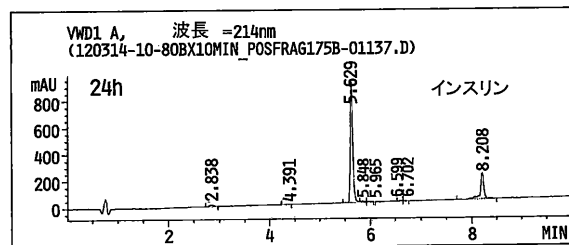
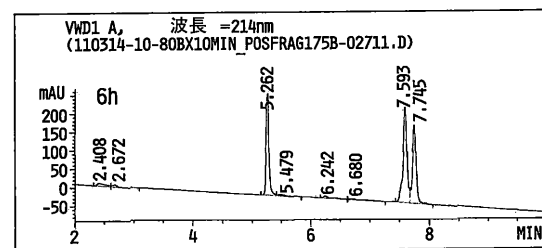


FIG. 8 CONT.

【図 9 - 1】

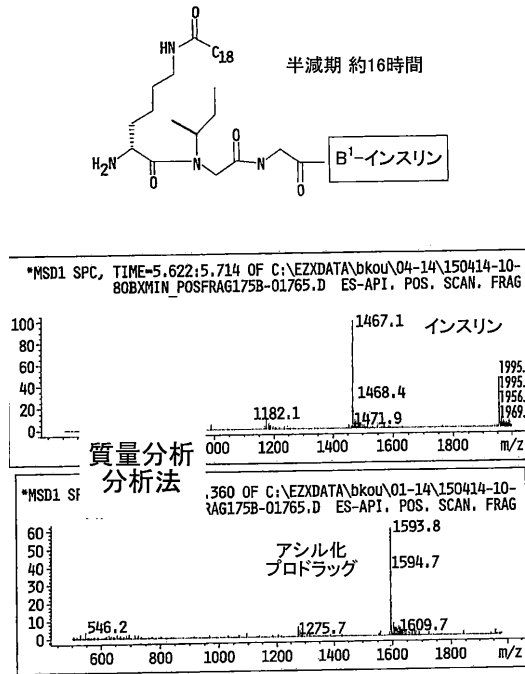


FIG. 9

【図 9 - 2】

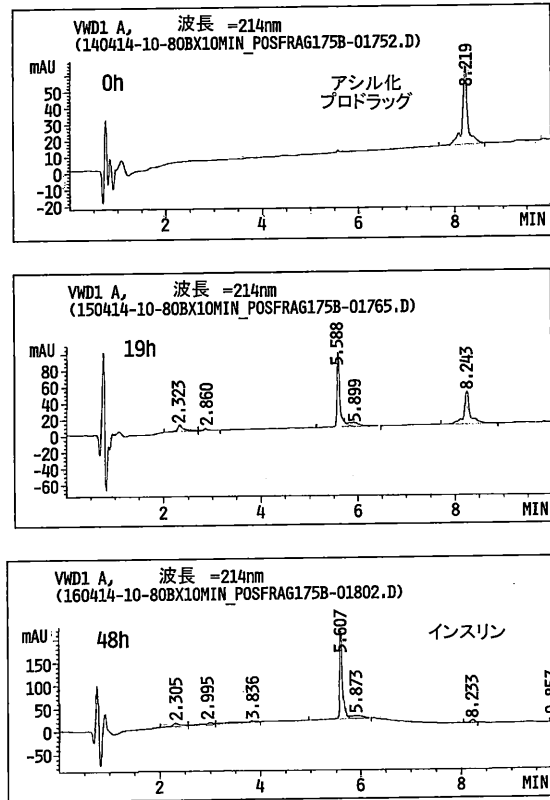


FIG. 9 CONT.

【図 10】

DKPに対する立体適合による作用時間の制御

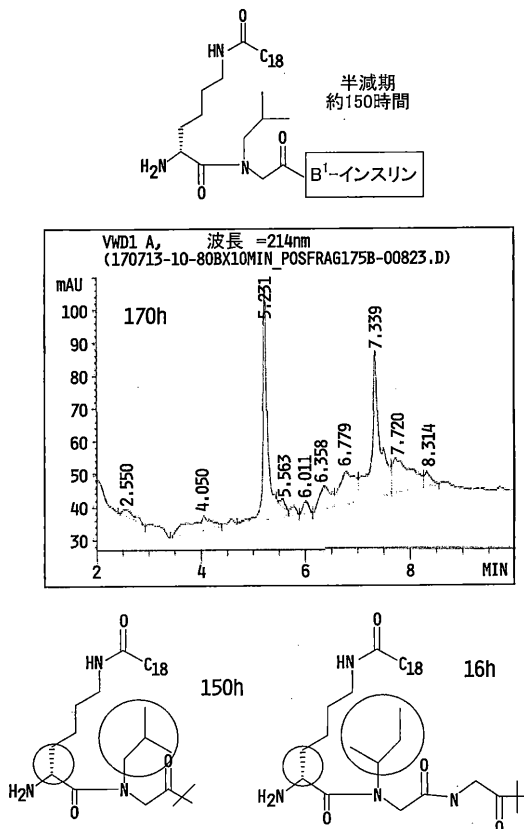


FIG. 10

【図 11】

作用時間を制御するSARの継続

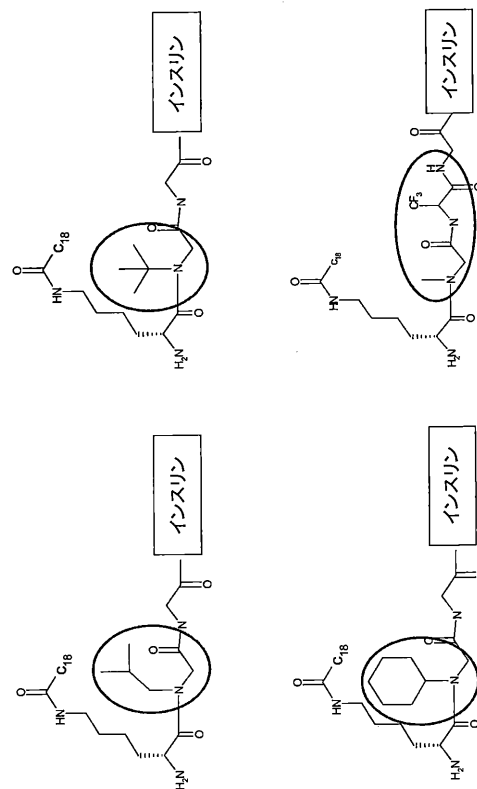


Fig. 11

【図 12】

合成方法の開発

1: 2-ブロモカルボン酸によるN-アルキル基の導入

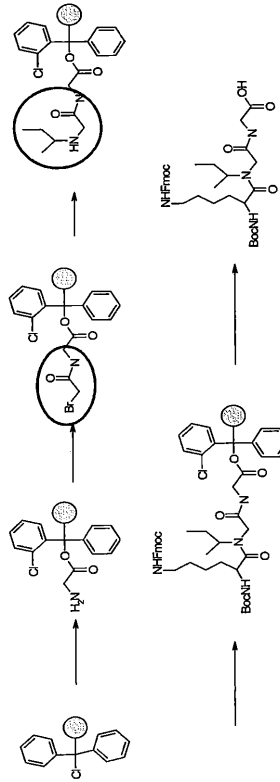


Fig. 12

【図 13】

合成方法の開発

2: 光延反応によるN-アルキル基及びα-置換の導入

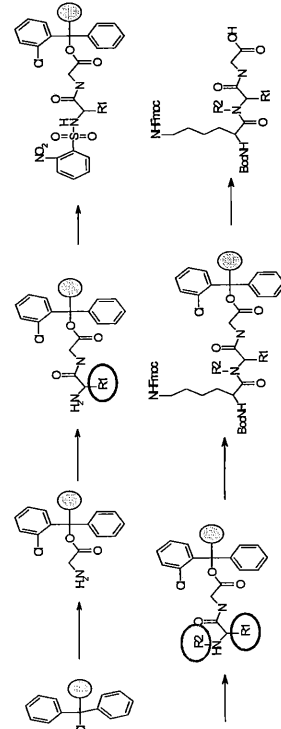
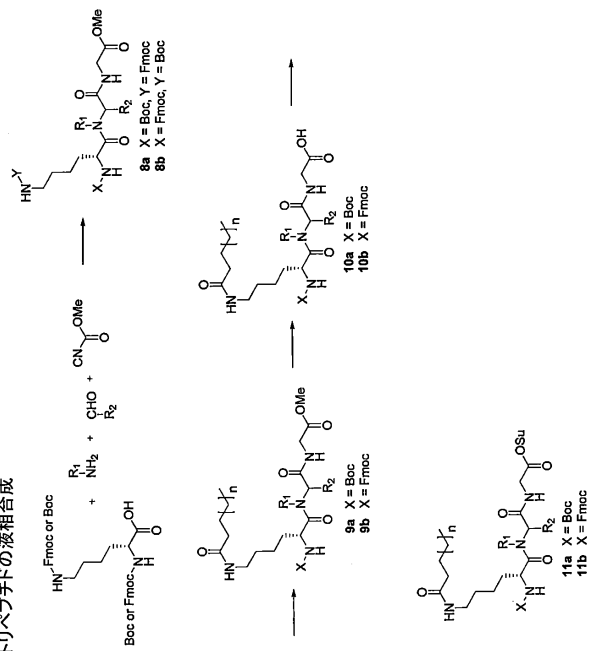


Fig. 13

【図 14 A】

Fig. 14A: トリペプチドの液相合成



【図 14 B】

Fig. 14B: トリペプチドの固相合成

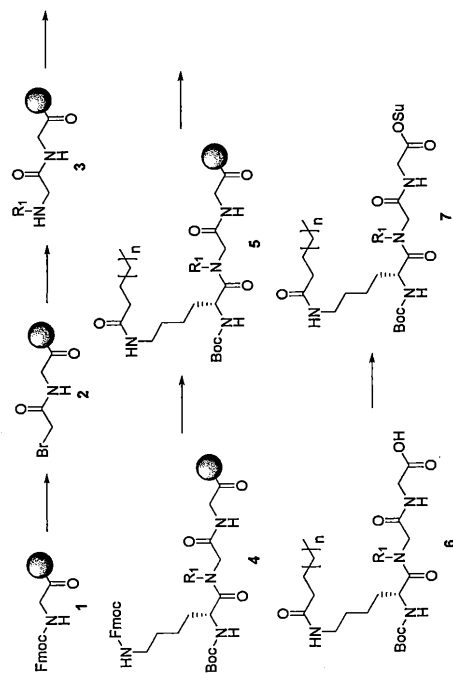
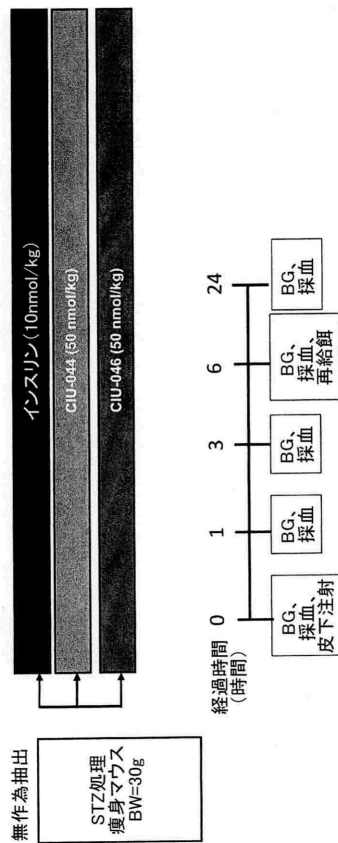
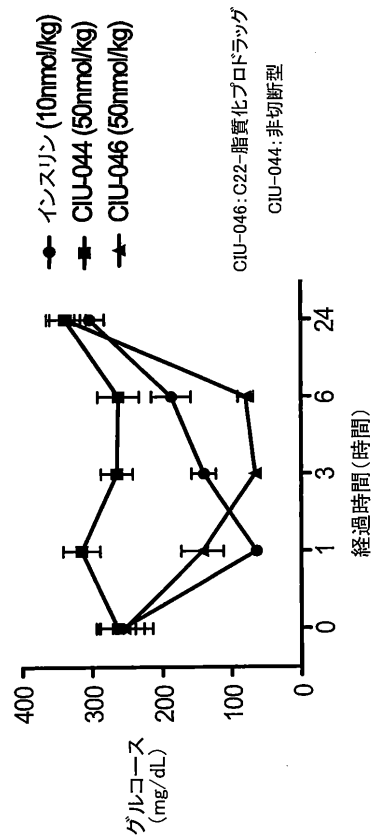


Fig. 15A

脂質化プロドドラッグ: $T_{1/2}$ 8時間

- ・ 午前12-3時間マウス絶食
- ・ 0時に化合物を注射 (先の25nmol/kgインスリン注射後約72時間)
- ・ 6時間後にマウスに再給餌
- ・ 血漿でインスリンELISAを実施

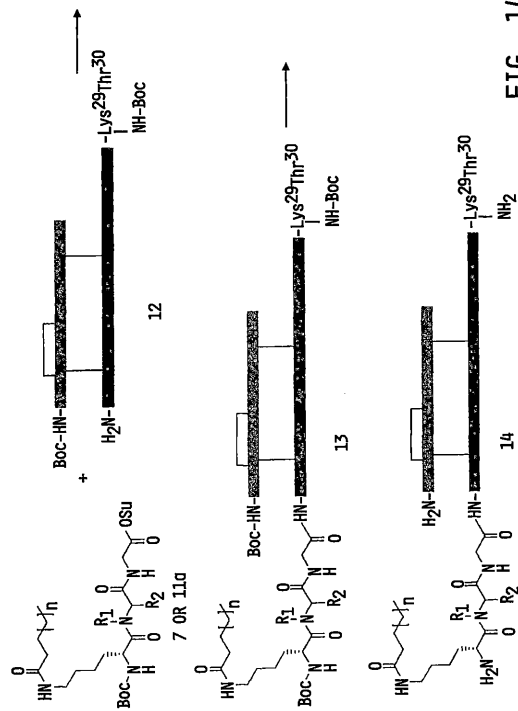
Exp. I-37 ITT



CIU-044 dLys(C22)-Gly-Gly.B1-インスリン
 CIU-046 dLys(C22)-(N-tert-Bu)Gly-Gly.B1-インスリン ($t_{1/2}$ 約8時間)
 (陰性コントロール)

Fig. 15B

【図 14C】

A1,B29-ジ-*t*-Boc-インスリンを用いる脂質化インスリンプロドドラッグの合成

【図 14D】

A1,B29-ジ-(Fmoc)-インスリンを用いる脂質化インスリンプロドドラッグの合成

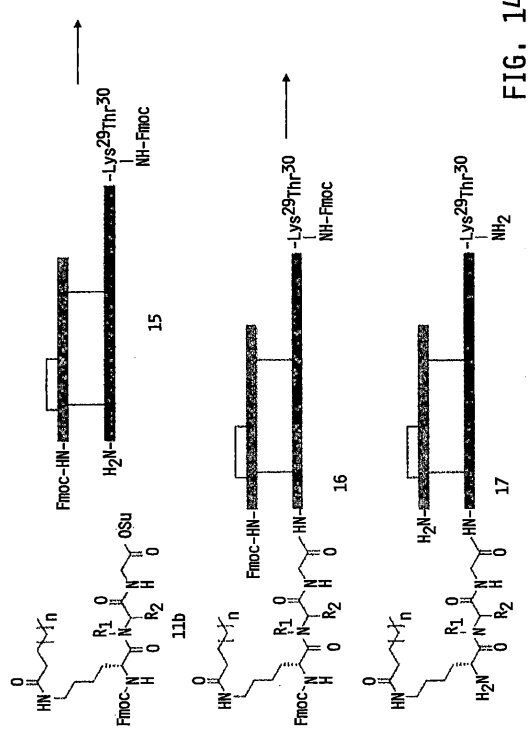
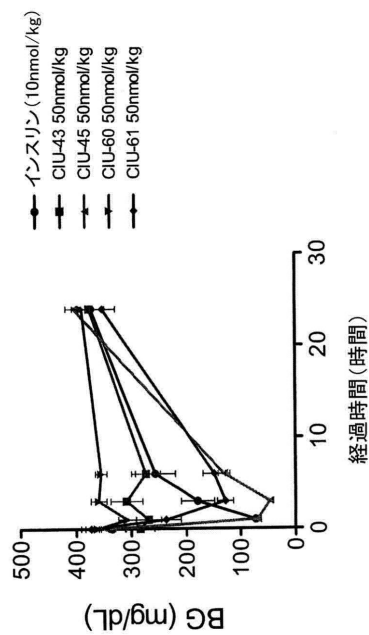


Fig. 16B

【図 16 B】

絶食正常STZマウスにおけるI-43プロドドラッグの評価

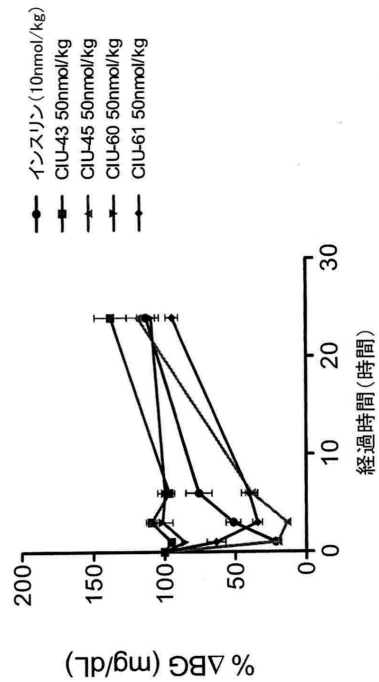


CIU-043 陰性コントロール
 CIU-045 dLys(C18)-(N-tBu)Gly-B1-インスリン ($t_{1/2}$ 約8時間)
 CIU-060 dLys(C18)-(N-sBu)Gly-B1-インスリン ($t_{1/2}$ 約16時間)
 CIU-061 dLys(C18)-(N-iPro)Gly-B1-インスリン ($t_{1/2}$ 約21時間)

Fig. 16C

【図 16 C】

絶食正常STZマウスにおけるI-43プロドドラッグの評価



CIU-043 陰性コントロール
 CIU-045 dLys(C18)-(N-tBu)Gly-B1-インスリン ($t_{1/2}$ 約8時間)
 CIU-060 dLys(C18)-(N-sBu)Gly-B1-インスリン ($t_{1/2}$ 約16時間)
 CIU-061 dLys(C18)-(N-iPro)Gly-B1-インスリン ($t_{1/2}$ 約21時間)

Fig. 15C

【図 15 C】

Exp. I-37 ITT

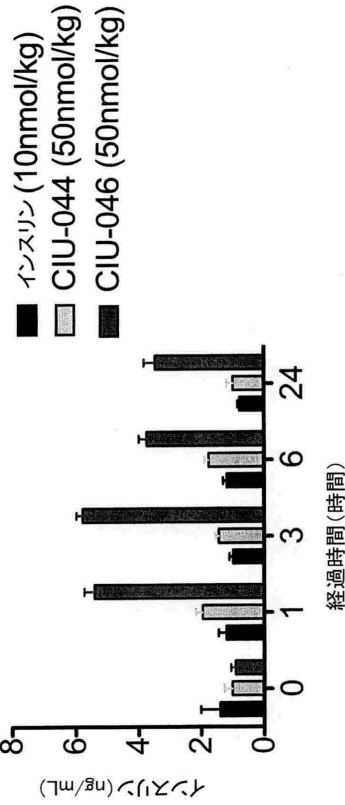
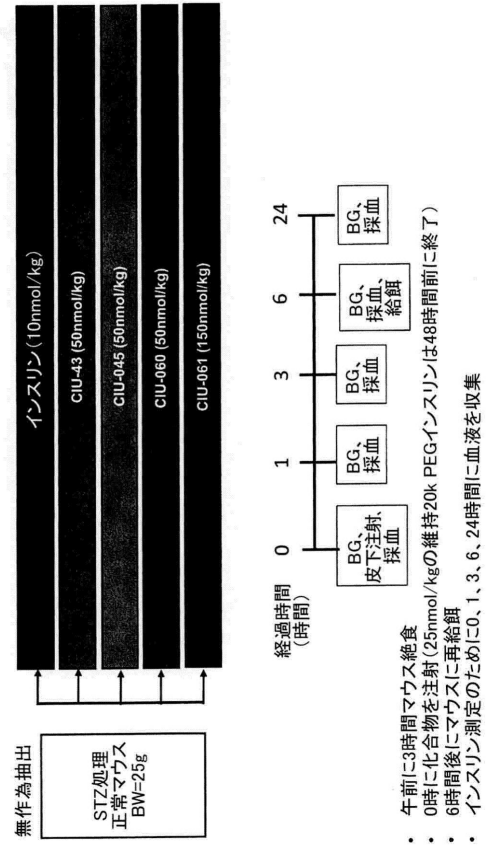
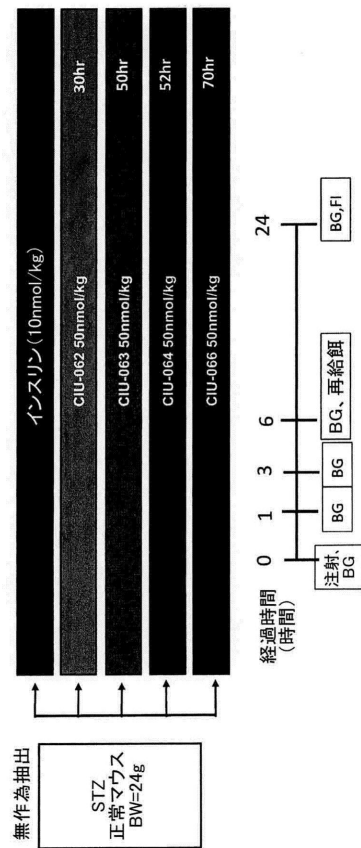


Fig. 16A

脂質化プロドドラッグ: $T_{1/2}$ 8、16、24時間

午前3時間マウス絶食
 0時に化合物を注射 (25nmol/kgの維持20k PEGインスリンは48時間前に終了)
 6時間後にマウスに再給餌
 インスリン測定のために0、1、3、6、24時間に血液を収集

【図 17 A】

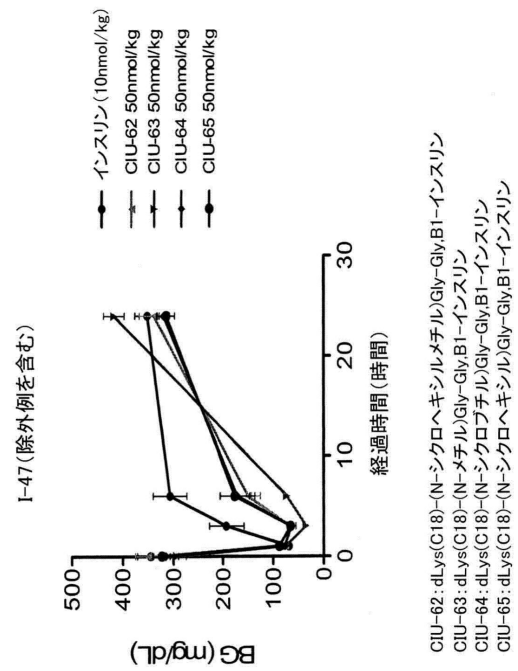
Fig. 17A脂質化プロドラッグ: $T_{1/2}$ の変動

- ・ 3時間絶食
- ・ 0時間にSC注射
- ・ 25nmol/kgの維持PEG-インスリンは注射の72時間前に終了

【配列表】

0006701208000001.app

【図 17 B】

Fig. 17B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
C 1 2 N	15/17	(2006.01)	C 1 2 N 15/17
C 1 2 N	15/81	(2006.01)	C 1 2 N 15/81 1 0 0 Z

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ディマーチ リチャード ディー
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 3 3 カーメル ウィルミントン ドライヴ 1 0 8 9
0

(72)発明者 コウ ビンビン
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 7 4 0 1 ブルーミントン サウス サザン オークス ド
ライヴ 3 2 0 1

(72)発明者 チャン ファ
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 7 4 0 3 ブルーミントン サウス パーシモン ツリー
サークル 9 0 6

(72)発明者 マイヤー ジョン ピー
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 2 0 インディアナポリス ワシントン ブールヴァー
ード 5 8 3 9

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表2 0 1 3 - 5 3 1 6 6 0 (J P , A)
特表2 0 0 5 - 5 2 4 6 7 7 (J P , A)
特表2 0 0 6 - 5 2 5 2 3 5 (J P , A)
特表2 0 1 2 - 5 1 2 9 0 1 (J P , A)
Bioconjugate Chem., 2005, Vol.16, p.913-920
Pharmaceutical Research (2004) Vol.21, No.8, pp.1498-1504
Biochemistry (2000) Vol.39, pp.11893-11900
Biochemistry (2004) Vol.43, pp.5987-5995
Int. J. Peptide Protein Res. (1987) Vol.30, pp.460-473

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 K 1 4 / 0 0
A 6 1 K 3 8 / 0 0
P u b M e d
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S / W P I X (S T N
)