

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6387008号
(P6387008)

(45) 発行日 平成30年9月5日 (2018.9.5)

(24) 登録日 平成30年8月17日 (2018.8.17)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/62 (2006.01)

A 6 1 K 38/28 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

C O 7 K 14/62 Z N A

A 6 1 K 38/28

A 6 1 P 3/10

請求項の数 10 (全 136 頁)

(21) 出願番号	特願2015-534623 (P2015-534623)	(73) 特許権者	507277642
(86) (22) 出願日	平成25年9月25日 (2013.9.25)		インディアナ ユニバーシティー リサー
(65) 公表番号	特表2015-532283 (P2015-532283A)		チ アンド テクノロジー コーポレーシ
(43) 公表日	平成27年11月9日 (2015.11.9)		ョン
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/061676		I N D I A N A U N I V E R S I T Y
(87) 国際公開番号	W02014/052451		R E S E A R C H A N D T E C H N O
(87) 国際公開日	平成26年4月3日 (2014.4.3)		L O G Y C O R P O R A T I O N
審査請求日	平成28年9月23日 (2016.9.23)		アメリカ合衆国 4 6 2 0 2 インディア
(31) 優先権主張番号	61/705,834		ナ州 インディアナポリス インディアナ
(32) 優先日	平成24年9月26日 (2012.9.26)		アベニュー 5 1 8
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100092093
			弁理士 辻居 幸一
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリンアナログダイマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含むインスリンアナログダイマーであって、

i) 前記第一及び第二のインスリンポリペプチドはともに単鎖インスリンアナログであり、各々はA鎖、B鎖及び連結部分を含み、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの各々について、前記連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合しており、

前記第一のインスリンポリペプチドは第一の連結部分、第一のA鎖及び第一のB鎖を含み、かつ、前記第二のインスリンポリペプチドは第二の連結部分、第二のA鎖及び第二のB鎖を含み、

前記第一及び第二のA鎖の配列はそれぞれ、GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN (配列番号：1) 及びGIVDECCFRSCDLRRLENYCN (配列番号：11) からなる群より独立して選択される配列を含み、

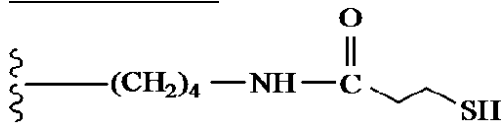
前記第一及び第二のB鎖の配列はそれぞれ、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF (配列番号：23) 及びGPEHLCAELVDALYLVCGRGFY (配列番号：14) からなる群より独立して選択される配列を含み、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一及び第二の連結部分のアミノ酸側鎖間のジスルフィド結合を介して互いに連結されており、前記第一及び第二の連結部

10

20

分はそれぞれ、配列GYGSSSRX_{6,8}APQT（配列番号：9）を含み、X_{6,8}は下記構造の側鎖を含むアミノ酸である



、又は、

ii) 前記第一のインスリンポリペプチドは第一のA鎖及び第一のB鎖を含む二鎖インスリンアナログであり、前記第一のA鎖及び第一のB鎖は鎖間ジスルフィド結合を介して互いに連結されており、

前記第二のインスリンポリペプチドは第二のA鎖、第二のB鎖及び第二の連結部分を含む単鎖インスリンアナログであり、前記第二の連結部分の第一の末端は第二のB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記第二の連結部分の第二の末端は第二のA鎖のアミノ末端と共有結合しており、

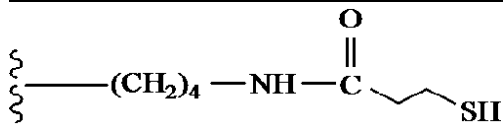
前記第一及び第二のインスリンポリペプチドが、第一のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端システイン側鎖と第二の連結部分の改変リジンの側鎖との間でジスルフィド結合を介して互いに連結されており、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖が、GIVEQCCTSI₁CSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLE₇TYCA（配列番号：7）から独立して選択される配列を含み、

前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖がCFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF₉₄YTPKT（配列番号：94）及びCGPEHL₉₇CGAELVDALYLVCGRG₉₇YFNKPT（配列番号：97）から独立して選択される配列を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドのB鎖がFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）及びGPEHL₁₄CGAELVDALYLVCGRG₁₄YFNKPT（配列番号：14）から独立して選択される配列を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドの第二の連結部分が配列GYGSSSRX_{6,8}APQT（配列番号：9）を含み、X_{6,8}が下記の側鎖を含むアミノ酸である、



、前記インスリンアナログダイマー。

【請求項2】

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドがともに、配列が同一の単鎖インスリンアナログである、請求項1に記載のインスリンアナログダイマー。

【請求項3】

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドがともに単鎖インスリンアナログであり、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖がそれぞれGIVEQCCTSI₁CSLYQLENYCN（配列番号：1）の配列を含み、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのB鎖がそれぞれGPEHL₁₄CGAELVDALYLVCGRG₁₄YFNKPT（配列番号：14）の配列を含み、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一及び第二の連結部分のアミノ酸側鎖間のジスルフィド結合を介して互いに連結されている、請求項1に記載のインスリンアナログダイマー。

【請求項4】

前記第一のインスリンポリペプチドが第一のA鎖及び第一のB鎖を含む二鎖インスリンアナログであり、前記第一のA鎖及び第一のB鎖が鎖間ジスルフィド結合を介して互いに連結されており、

前記第二のインスリンポリペプチドが第二のA鎖、第二のB鎖及び第二の連結部分を含む

10

20

30

40

50

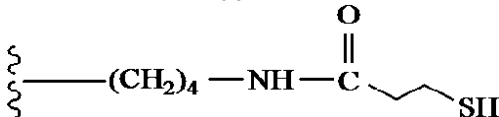
単鎖インスリンアナログであり、前記第二の連結部分の第一の末端が第二のB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記第二の連結部分の第二の末端が第二のA鎖のアミノ末端と共有結合しており、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの第一及び第二のA鎖がそれぞれ、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）の配列を含み、

前記第一のインスリンポリペプチドの第一のB鎖がCGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFYNKPT（配列番号：97）の配列を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドの第二のB鎖がGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：14）の配列を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドの第二の連結部分が配列GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）を含み、X₆₈が下記の側鎖を含むアミノ酸であり、



前記第一及び第二のインスリンポリペプチドが、第一のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端システイン側鎖と第二の連結部分の8位のアミノ酸の側鎖との間でジスルフィド結合を介して互いに連結されている、請求項1に記載のインスリンアナログダイマー。

【請求項5】

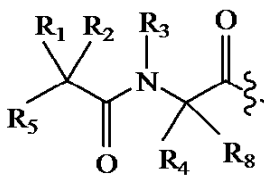
親水性部分が、第一又は第二の連結部分のアミノ酸と、又はA鎖のA9、A14及びA15から成る群から選択される位置又はB鎖のB1、B2、B10、B22、B28若しくはB29位のアミノ酸で共有結合により連結されている、請求項1～4のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

【請求項6】

前記親水性部分がポリエチレングリコール鎖である、請求項5に記載のインスリンアナログダイマー。

【請求項7】

下記式Xの構造のジペプチド成分をさらに含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマーであって、



前記ジペプチド成分は、該ジペプチド成分と第一又は第二のインスリンポリペプチドのアミンとの間で形成されるアミド結合を介して前記インスリンアナログダイマーに連結されており、

R₁、R₂、R₄及びR₈は、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アルキルから成る群から独立して選択され、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り、又は

R₁及びR₂は、それらが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、若しくは

R₄及びR₈はそれらが結合する原子と一緒にC₃-C₆シクロアルキルを形成しており、

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 R_4 及び R_3 はそれらが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ており、

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 はそれらが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ており、且つ

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) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) OH 、及び八口から成る群から選択される、

前記インスリンアナログダイマー。

【請求項 8】

10

第一又は第二のインスリンポリペプチドのアミノ酸側鎖が、アルキルアミン、アミド、エーテル、エステル、チオエーテル、又はチオエステル結合によりアシル基又はアルキル基に共有結合により付着しており、前記アシル基又はアルキル基は天然に存在するアミノ酸にとって本来のものではない、請求項 1 ~ 4 のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー及び医薬的に許容できる担体を含む、医薬組成物。

【請求項 10】

糖尿病の治療に用いるための、請求項 9 に記載の医薬組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互引用

本出願は、米国仮特許出願No.61/705,834 (2012年9月26日出願) (前記の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)の優先権を主張する。

電子提出資料の参照による組み入れ

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ー読み出し可能ヌクレオチド/アミノ酸配列リストは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる：2013年9月25日作成の名称“216463SEQLIST_ST25.txt”の45キロバイトASCII (テキスト) ファイル。

30

【0002】

背景技術

インスリンは二鎖ヘテロダイマーを含むペプチドホルモンであり、効力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介して生合成により誘導される。ヒトインスリンは、ジスルフィド結合によって一緒に結合した2つのペプチド鎖 (“A鎖” (配列番号：1) 及び “B鎖” (配列番号：2)) を含み、合計51アミノ酸を有する。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において共同して、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、実質的に全ての形態の糖尿病でグルコースを低下させる比類のない能力を示す。不幸なことに、その薬理学的反応はグルコース感受性ではなく、したがって生命にかかわる低血糖に至る過剰作用を示し得る。相反する薬理学的反応は、低血糖を生じることなく血中グルコースを正常化することが極めて困難であるというインスリン療法の特徴である。さらにまた、自然のままのインスリンは作用の持続時間が短く、基礎グルコース制御での使用に適切であるように改変を必要とする。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。

40

インスリン様成長因子1及び2は単鎖線形 (linear) ペプチドホルモンであり、前記は、それらのA鎖及びB鎖配列において高度に相同性であって、自然のままのインスリンとほぼ50%の相同性を共有する。IGFのA鎖及びB鎖は “C-ペプチド” によって連結され、ここで2つのIGFのC-ペプチドはサイズ及びアミノ酸配列が異なり、第一のC-ペプチドは長さが12アミノ酸、第二のものは8アミノ酸である。ヒトIGF-1は、配列番号：3に示すタンパク質

50

配列を有する70aaの塩基性ペプチドであり、プロインスリンと43%の相同性を有する(Rinderknecht et al.(1978) J.Biol.Chem.253:2769-2776)。ヒトIGF-2は、配列番号:4に示すタンパク質配列を有する67アミノ酸の塩基性ペプチドである。IGFは、インスリンB受容体アイソフォームでA-受容体アイソフォームよりも顕著に低い活性を示す。

【0003】

出願人らは以前に、インスリン受容体で高い活性を示すIGF-1系インスリンペプチドアナログ(B鎖の本来のGln-PheジペプチドがTyr-Leuに取替えられている)を同定した(PCT/US2009/068713を参照されたい(前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる))。そのようなアナログ(本明細書ではIGF YLアナログペプチドと称される)はインスリンよりも容易に合成され、インスリン及びIGF-1受容体のためのコアゴニストアナログ及び選択的なインスリン受容体特異的アナログの開発を可能にする。その上、これらインスリンアナログはまた、本開示にしたがって使用される単鎖インスリンアナログとして処方できる(PCT/US2001/040699を参照されたい(前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる))。

インスリン及びインスリンアナログのマルチマーを形成し、自然のままのヒトインスリンと同様な態様で糖尿病を治療するために用いることができる。本明細書に開示するように、出願人らは、インスリンアナログダイマーの活性は、サイズ及びダイマー化リンカーが2つのインスリンポリペプチドを継ぎ合わせる位置に大きく左右されることを発見した。本明細書に開示するように、出願人らは、サブタイプBインスリン受容体に対し選択性を有するダイマーと同様、完全な固有の効力を保有するが部分的最大応答性しか示さないインスリンダイマーを発見した。そのようなダイマーは、投与部位から除去され血漿中で平衡化された後で、より厳密に制御されたインスリン作用の開始及び持続時間を提供できる。

【発明の概要】

【0004】

本明細書で開示されるものはインスリン受容体アゴニスト活性を有するインスリンアナログダイマーであり、ここで、該ダイマーのインスリン活性のレベルは、該インスリンポリペプチドの配列、ダイマー化の位置、及び2つのインスリンポリペプチドをつなぐダイマー化リンカーの長さの関数である。該インスリンダイマーは第一及び第二のインスリンポリペプチド間で形成され、各インスリンポリペプチドはA鎖及びB鎖を含む。本明細書で開示されるダイマーの第一及び第二のインスリンポリペプチドは、二鎖インスリンアナログ又は単鎖インスリンアナログから別個に選択でき、第一及び第二のインスリンポリペプチドは共有結合又は二官能性リンカーによって互いに共有結合される。

第一及び第二のインスリンポリペプチドは、当業者に公知の標準的技術を用い、2つの官能基間での共有結合の形成によって互いに共有結合され得る。例えば、2つのインスリンポリペプチドは必要な官能基を含むか又は必要な官能基を含むように改変でき、該官能基は、ジスルフィド結合、アミド結合、チオエーテル結合又はエステル結合を含むダイマー化結合の形成を可能にする。ある種の実施態様では、二官能性リンカーが提供されて第一及び第二のインスリンポリペプチドを連結し、ここで、該二官能性リンカーは、ヒドロキシル基及びカルボキシレート、又はアミン基及びカルボキシレート、又はチオール基及びカルボキシレート、又はチオール基及びチオール基を含む。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドはジスルフィド結合を介して連結され、また別の実施態様では第一及び第二のインスリンポリペプチドはチオエーテル結合を介して連結される。

【0005】

ある実施態様では、インスリンダイマーは、第一及び第二のインスリンポリペプチドを含むインスリンスーパーアゴニスト(すなわち、自然のままのインスリンよりもインスリン受容体でより強力な活性を有する)であり、ここで第一及び第二のインスリンポリペプチドは各々二鎖インスリンである。より具体的には、第一のインスリンポリペプチドは、各B鎖のN-末端アルファアミンを介して、又は第一及び第二のインスリンポリペプチドのB1アミノ酸の側鎖を介して第二のインスリンポリペプチドに連結される。ある実施態様で

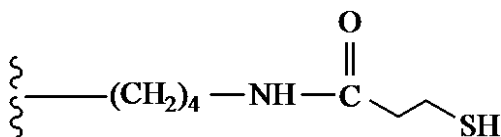
は、第一及び第二のインスリンポリペプチドはジスルフィド結合を介して互いに連結され、該ジスルフィド結合は、第一及び第二のインスリン単鎖ポリペプチドそれぞれの各B鎖のN-末端アルファアミンに位置する。ある実施態様では、該第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖及びB鎖は自然のままのヒトインスリンA鎖及びB鎖である。ある実施態様では、糖尿病を治療する改善された方法が提供され、ここで患者はインスリンスーパーアゴニストを投与される。有利には、スーパーアゴニストの使用は、自然のままのインスリンの標準的用量濃度の33%、30%、25%、20%、又は20%未満を含む、削減濃度のインスリンダイマーの投与を可能にする。加えて、スーパーアゴニストインスリンダイマーを用いて複合物を形成することができ、ここで非インスリン成分のサイズは（インスリンモノマーとともに用いられる場合のものと比較して）半分に削減される。なぜならば、非インスリン成分はダイマーを構成する第一及び第二のインスリンポリペプチドの両方に連結されることになるからである。例えば、第一及び第二のインスリンポリペプチドはPEG化することができ、ここで個々のPEG鎖はサイズが5 - 10又は5 - 20Kdである。分子量が削減された、第一及び第二のインスリンポリペプチドに連結される複合物の部分を含むインスリンスーパーアゴニストは削減濃度で投与でき、このことは、商業上及び治療上の展望から有益な結果を提供すると予想される。

【0006】

ある実施態様では、該インスリンダイマーはインスリンの部分的なアゴニスト活性を示す。出願人らは特定の理論に拘束されることを望まないが、本明細書に開示するインスリンダイマーの部分的アゴニスト活性は、該ダイマーはアゴニスト/アンタゴニスト混合活性を示すという事実に由来すると考えられる。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドを含むインスリン部分的アゴニストダイマーが提供され、ここで、第一及び第二のインスリンポリペプチドは各々二鎖インスリンポリペプチドであり、第一のインスリンポリペプチドは、各B鎖のカルボキシ末端を介して（例えばB26、B27、B28、B29及びB30から別個に選択されるアミノ酸の位置のアミノ酸側鎖を介することを含む）第二のインスリンポリペプチドに連結される。ある実施態様では、インスリン部分的アゴニストは、自然のままのインスリンと比較して当該インスリン受容体において66%、50%、40%、33%、又は20%未満の最大活性を有する。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、B鎖のC-末端アミノ酸（例えばシステイン）のアミノ酸側鎖間のジスルフィド結合を介して、場合によってC-末端アミノ酸（例えばB27 - B30）の側鎖に付加されたリンカーを介して互いに連結される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、該第一及び第二のインスリンポリペプチドのそれぞれのB29アミノ酸のアミノ酸側鎖間で形成されるジスルフィド結合を介して連結される。ある実施態様では、B29アミノ酸は、下記構造Iの側鎖を有する改変リジンであり：

【0007】

【化1】



【0008】

さらに該第一及び第二のインスリンポリペプチドはジスルフィド結合を介して連結される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドのA及びB鎖は自然のままのヒトインスリンA鎖及びB鎖である。

【0009】

また別の実施態様では、インスリン部分的アゴニスト活性を示すインスリンダイマーが提供され、ここで第一及び第二のインスリンポリペプチドの少なくとも一方は単鎖インスリンであり、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドは、該単鎖インスリンポリペプチドの連結部分のアミノ酸側鎖及び第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アルファアミン又はN-末端アミノ酸の側鎖を介して互いに連結される。場合によって、第一及

10

20

30

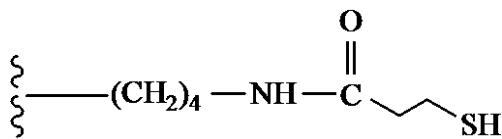
40

50

び第二のインスリンポリペプチドはリンカー（例えばシステイン）を介して継ぎ合わされ、該リンカーは、該単鎖アナログのアミノ酸の側鎖に付加されるか、第一及び第二のインスリンポリペプチドのそれぞれのB鎖のN-末端アルファアミン又はN-末端アミノ酸（例えばB1 - B4）の側鎖に付加される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドは各々下記構造Iの側鎖を有する改変リジンを含み：

【 0 0 1 0 】

【 化 2 】



10

【 0 0 1 1 】

さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドはジスルフィド結合を介して連結される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドがともに、連結部分を介してA鎖に連結されたB鎖を有する単鎖インスリンポリペプチドであり、さらにインスリンダイマーは、該第一及び第二のインスリンポリペプチドのそれぞれの連結部分の各々のアミノ酸側鎖を連結することによって形成される。ある実施態様にしたがえば、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、ヒトインスリン又はそのアナログ若しくは誘導体のB鎖及びA鎖を含む。ある実施態様では、該単鎖インスリンポリペプチドの連結部分の8位のアミノ酸の側鎖が、第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アミノ酸と連結される（すなわちB1 - C8結合）。ある実施態様では、該ダイマーはIGF1又はIGFII又はそのアナログにB1対C8結合を介して連結されたヒトインスリンポリペプチドを含む。

20

【 0 0 1 2 】

ある実施態様では、本明細書に開示のインスリンダイマーのインスリンポリペプチドの一方又は双方が自己切断ジペプチド成分（U-B）を含み、前記は該ダイマーの第一及び第二のインスリンポリペプチドのアミノ酸のN-末端アルファアミン又は側鎖アミンにアミド結合又はエステル結合を介して共有結合される（国際出願WO2009/099763及びPCT/US2009/068713を参照されたい（前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる））。その後の該ジペプチドの除去は、生理学的条件下及び酵素活性の非存在下で生じるであろう。ある実施態様では、該プロドラッグ成分は構造U-Bのジペプチドを含み、式中、Uは

30

【 0 0 1 3 】

基本のインスリンポリペプチドの可溶性を改善する改変を含む、該インスリンアゴニストの追加の誘導体も本開示に包含される。ある実施態様では、インスリンポリペプチドの可溶性は、A若しくはB鎖のN-末端への又は第一及び第二のインスリンポリペプチドの一方又は双方のアミノ酸の側鎖への親水性部分の共有結合（単鎖インスリンポリペプチドの連結部分のアミノ酸の側鎖への結合を含む）によって強化される。ある実施態様では、親水性部分は、A鎖のA9、A14及びA15又はB鎖のB1、B2、B10、B22、B28若しくはB29位から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖に連結される。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鎖、アシル基又はアルキル基である。ある実施態様では、親水性部分はアルブミンであり、前記には例えばヒト血清アルブミン（HSA）又は組換えヒトアルブミン（rHA）のようなアルブミンが含まれる。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、該ポリエチレングリコール鎖は約500から約5000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、該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。

40

アシル化又はアルキル化は循環中のインスリンポリペプチドの半減期を延長することが

50

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／又はインスリン受容体における作用の持続時間を延長する。インスリンアナログは同じアミノ酸の位置でアシル化又はアルキル化させることができ、ここに親水性部分が連結される。前記には例えば連結部分の8位又は自己切断ジペプチド成分を含むアミノ酸の側鎖が含まれる。

【0014】

本開示に包含されるものはまた、本明細書に開示のインスリンダイマー及び医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物である。ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示のインスリンダイマーのいずれか（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）及び医薬的に許容できる希釈剤、担体又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。そのような組成物は、本明細書に開示のインスリンダイマーを、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で又は前記より高い濃度で含むことができる。ある実施態様では、該医薬組成物は、滅菌され場合によって多様な包装容器で保存される水溶液を含む。他の実施態様では、該医薬組成物は凍結乾燥散剤を含む。該医薬組成物はさらに、患者に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包装することができる。該容器又はキットには周囲温度又は冷蔵温度での保存を示す付箋を添付することができる。

【0015】

ある実施態様にしたがえば、インスリン依存患者で血中グルコースレベルを調節する改善方法が提供され、より具体的には、低血糖のリスクが軽減された糖尿病の治療方法が提供される。該方法は、部分的インスリンアゴニストダイマーを糖尿病の制御のために治療的に有効な量で患者に投与する工程を含む。ある実施態様では、該部分的アゴニストインスリンダイマーは、ダイマー化リンカーを介して互いに連結される第一及び第二のインスリンポリペプチドを含み、ここで該第一及び第二のインスリンポリペプチドは各々別個に、i) 鎖間ジスルフィド結合を介して連結されるA鎖及びB鎖を含む二鎖インスリンアナログ、及びii) A鎖、B鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンアナログから成る群から選択されるインスリンポリペプチドを含み、ここで、前記連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合し、前記連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合する。ある実施態様では、A鎖はGIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LEX₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号：70）の配列を含み、B鎖はX₂₅LGGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号：44）の配列を含み、さらに

- a) 第一及び第二のインスリンポリペプチドは、それぞれ第一及び第二のインスリンポリペプチドのB29位のアミノ酸の側鎖を介して互いに連結されるか、
- b) 前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの少なくとも一方が単鎖インスリンポリペプチドであり、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの一方のB1位のアミノ酸の側鎖及び前記連結部分のアミノ酸の側鎖を介して互いに連結されるか、又は
- c) 第一及び第二のインスリンポリペプチドがともに単鎖インスリンポリペプチドであり、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドは、それぞれ第一及び第二のインスリンポリペプチドの連結部分のアミノ酸の側鎖を介して互いに連結される。有利には、該部分的アゴニストダイマーは最大用量応答の低下を示し、したがって出願人らは患者への投与に際して低血糖のリスクが減少するであろうと予想する。

【0016】

さらに別の実施態様では、サブタイプBインスリン受容体（IR-B）に対して選択性を示すインスリンダイマーが提供される。出願人らは、インスリン系ポリペプチドと自然のままのインスリンと比較してより高いIR-A/IR-B比（すなわちIR-Bと比較してIR-Aに対しより高い親和性）を示すポリペプチド（例えばIGFI又はIGFII）との間で形成されるダイマーは、IR-Aと比較してIR-Bでのより高レベルの最大受容体応答によって示されるようにIR-B活性化に優先性を示すことを発見した。ある実施態様では、サブタイプBインスリン受

10

20

30

40

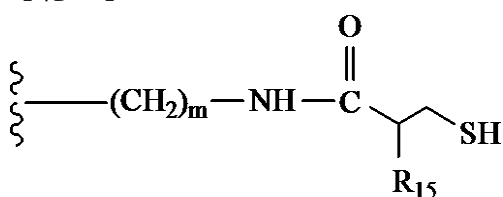
50

容体に対して選択性を示すインスリンダイマーが提供される。ある実施態様では、該ダイマーは第一及び第二のインスリンポリペプチドを含み、それらの各々はA鎖、B鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンポリペプチドであり、ここで、前記連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合し、前記連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合し、ここで該第一のインスリンポリペプチドは、GIVEQCCTSI_{CS}LYQLENYCN（配列番号：1）のA鎖配列、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：2）のB鎖配列、並びにPEG8-K-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含む第一の連結部分を含み、さらに第二のポリペプチドは、TPAX₇₅SEGIVECCFRSCDLALLE_{TY}CA（配列番号：88）又はGIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）のA鎖配列、AYRPSETLCGGELVDTLQFVC GDRGFYFSRPA（配列番号：87）又はGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPT（配列番号：10）のB鎖配列、並びにPEG8-K-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQTから成る群から選択される配列を含む第二の連結部分を含み、

式中X₆₈はアルギニン、オルニチン、リジン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

【0017】

【化3】



【0018】

X₇₅はリジン又はアルギニンであり、mは1-4から選択される整数であり、R₁₅はH又はNH₂であり、

ここで、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、(i)前記第一又は第二のインスリンポリペプチドの一方のN-末端アミン又はN-末端アミノ酸の側鎖及び他方のインスリンポリペプチド連結部分の側鎖を介して、又は(ii)第一及び第二のインスリンポリペプチドのそれぞれの連結部分の各々のアミノ酸の側鎖を介して互いに連結される。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】ヒトインスリン調製のための二工程合成方法の概略図である。該手順の詳細は実施例1で提供される。

【図2】合成ヒトインスリンのインスリン受容体特異的結合を自然のままの精製インスリンと比較したグラフである。合成インスリンは図1に記載のアプローチによって製造された。A⁷-B⁷結合は最初に形成されるジスルフィドである。グラフに提示のデータによって示されるように、2つの分子は類似する結合活性を有する。

【図3】自然のままのインスリン及びIGF1(Y^{B16}L^{B17})アナログの相対的インスリン受容体結合を比較するグラフである。グラフに提示のデータによって示されるように、2つの分子は類似する結合活性を有する。

【図4】ヒトプロインスリン（A鎖、配列番号：1；B鎖、配列番号：2；及びC鎖、配列番号：92）及びインスリン様成長因子I及びII（IGFI、配列番号：3及びIGFII、配列番号：4）のアミノ酸配列のアラインメントである。このアラインメントは、これら3つのペプチドは高レベルの配列同一性を共有することを示している（*は対応するアミノ酸が存在しない空隙を示し、ダッシュ（-）はインスリンに存在するアミノ酸と同一のアミノ酸を指す）。

【図5】5A及び5Bは、プロドラッグdK₁(N-イソブチルG)-IGF1YL（配列番号：86、ジペプチドはA19 4-アミノPheを介して連結される）のin vitro活性を示すグラフである。図5Aは、自然のままのインスリン及びPBS中でインキュベートして時間が経過した（0時間、5時間及び52時間）A19IGFプロドラッグ誘導体（IGF1YL：dK₁(N-イソブチルG)）の相対的インスリン受容体結合を比較したグラフである。図5Bは、自然のままのインスリン及び37の20%血漿/PBS中でインキュベートして時間が経過した（0時間、3.6時間及び24.8時間）

A19IGFプロドラッグ誘導体 (IGF1YL:dK, (N-イソブチルG)) の相対的インスリン受容体結合を比較したグラフである。グラフに提示のデータによって示されるように、プロドラッグ形が活性なIGF1YLペプチドに変換されるにつれて、A19IGFプロドラッグから活性増加が回復する。

【図6】Aサブタイプインスリンにおける単鎖B⁰C¹A⁰インスリンアナログの相対的in vitro結合活性及びリン酸化活性を示す棒グラフである。自然のままのIGF-1Cペプチド (010) の活性をCペプチド連結部分における多様なアミノ酸置換又は欠失に対して比較した。B⁰C¹A⁰インスリンアナログの呼称で、B⁰及びA⁰の表示はA鎖及びB鎖の自然のままのインスリン配列を指し、一方C¹はIGF-1Cペプチドを指す。

【図7】Aサブタイプインスリンにおける単鎖B⁰C¹A⁰インスリンアナログの相対的in vitro結合活性及びリン酸化活性を示す棒グラフで、ここで連結IGF-1Cペプチドの自然のままの配列は、1、2、3、4又は8位で表示のアミノ酸置換によって改変されてある。このデータは図8に提供するデータと連携して、該インスリンアナログの結合活性とリン酸化活性との間の一貫性を示している。

【図8】8A - 8Cは、連結部分としてPEGポリマーを用いる単鎖インスリンアナログに係する。図8Aは、連結部分としてPEGポリマーを用いるIGF-1YL単鎖インスリンアナログの調製を示す模式図である。図8B及び8Cは、自然のままのインスリンヘテロ二重体と対比した4、8又は16モノマーPEG連結部分を介して連結した単鎖インスリンアナログの相対的in vitro結合活性 (図8B) 及びリン酸化活性 (図8C) を示すグラフである。

【図9】9A - 9Dは、3つの異なるアシル化インスリンアナログと対比して低い血中グルコース濃度を軽減及び維持するヒトインスリンの能力を比較する、マウスで実施した比較インスリン耐性試験の結果を示すグラフである。ポリペプチドは2つの異なる濃度 (27nmol/kg及び90nmol/kg) で試験された。アシル化インスリンにはMIU-41、MIU-36及びMIU-37が含まれていた。MIU-41 [B¹(H5,H10,Y16,L17)26A:A¹(H8,rEC16-K14,N18,N21)]は、A14位に位置するリジン残基に添付されたガンマグルタミン酸リンカーによるC16アシル化を有する二鎖インスリンアナログである。MIU-36 [B¹(C16-K0,H5,H10,Y16,L17)26A:A¹(N18,N21)]は、B鎖のN-末端に連結されるC16アシル化を有する二鎖インスリンアナログである。MIU-37 [B¹(H5,H10,Y16,L17,C16rE-K22)26A:A¹(N18,N21)]は、B22位に位置するリジン残基に添付されたガンマグルタミン酸リンカーによるC16アシル化を有する二鎖インスリンアナログである。

【図10】10A - 10Dは、C57/Blkマウスを用いたデテミア (Detemir) 及びMIU-56の比較インスリン耐性試験から得られた結果を示す。MIU-56は、A鎖及びB鎖を継ぎ合わせる連結部分内のただ1つのリジン残基の側鎖に連結された20kDaのPGE (PEG8-K-PEG4) を含むインスリン単鎖アナログB¹(H5,Y16,L17)26A-PEG8-K-PEG4-A¹(N18,21)である。図10A及び10Bは、PEG化単鎖インスリンアナログMIU-56と対比して、低い血中グルコースレベルを軽減及び維持するアシル化インスリンアナログ、デテミアの能力を比較したインスリン耐性試験の結果を示すグラフである。図10C及び10Dは、それぞれデテミア及びMIU-56を投与されたマウスの血中グルコースAUC_{24hrs}を示す。

【図11】11A - 11E。B29-B29'インスリンダイマー (ポリペプチド#51、B鎖のB29リジンの側鎖間でジスルフィド結合によって一緒に連結された、2つの自然のままのインスリンポリペプチドによって形成されたダイマー) の受容体活性をタイプAインスリン受容体 (図11A参照)、タイプB受容体 (図11B参照) 及びIGF-1受容体 (図11C参照) でリン酸化アッセイによって試験し、さらにin vitroでのHMEC増殖アッセイ (図11D参照) によって分裂促進性を試験した。グラフの実線は以下を表す: 表示濃度の自然のままのインスリン (黒四角) 又は#51 (黒ダイヤ) で刺激したタイプA又はタイプB受容体のリン酸化 (それぞれ図11A - 11B)。点線は以下を表す: 6nMのインスリン及び表示の濃度のインスリン (黒四角) 又は#51 (黒ダイヤ) を一緒にインキュベートすることにより刺激したタイプA又はタイプB受容体のリン酸化 (それぞれ図11A - 11B)。B29-B29'インスリンダイマーは、自然のままのインスリンと対比して相当に軽減された (ほぼ60%) 最大用量応答を有する。図11EはB29-B29'の構造を示す。該ダイマーは、A及びB鎖のN-末端がB29位リジンと同

10

20

30

40

50

様にカルバミル化されており、B29位でのジスルフィド結合形成のためにスルフヒドリルリンカーの添付を可能にするという点で、自然のままのインスリンと対比して改変されている。該2つのインスリンポリペプチドは各々自然のままのヒトインスリンA鎖及びB鎖を含み、ここには示されていないが該ダイマー形に存在する自然のままのインスリンジスルフィド (A6-A11、A7-B7、A20-B19) によって互いに連結される。

【図12】12A及び12Bは、自然のままのインスリン (図12A) と対比したB29-B29' インスリンダイマー (図12B) の比較インスリン用量滴定のデータを提供する。自然のままのインスリンは3つの投薬量で (6nmol/kg、18nmol/kg及び72nmol/kg)、B29-B29' インスリンダイマーはより高い3つの投薬量で (18nmol/kg、72nmol/kg及び144nmol/kg) 投与された。自然のままのインスリンと同様に、B29-B29' インスリンダイマーは血中グルコースレベルを低下させるが、B29-B29' インスリンダイマーはより緩やかな勾配の初期グルコース低下を示し、自然のままのグルコースで認められるものよりも平坦なプラトーで血中グルコースレベルを維持する。

【図13】13A - 13CはB1-B1' インスリンダイマーのin vitroインスリン活性を示す。図13Aは、2つの単鎖インスリンアナログがB1アミノ酸側鎖を介してジスルフィド結合により連結されるB1-B1' インスリンダイマーの合成を示す。初期ダイマーは、A鎖がB鎖のカルボキシ末端に直接連結されるので不活性である。しかしながら、単鎖体のトリプシンによる切断時に、該単鎖インスリンアナログは二鎖インスリンアナログに変換され、二鎖インスリンポリペプチドを含むインスリンダイマーが形成され活性が回復する。図13Bは、タイプAインスリン受容体における自然のままのインスリン、B1-B1' インスリンダイマー (トリプシンによる切断後)、及びB29-B29' インスリンダイマーの相対的in vitro活性を示す。B1-B1' インスリンダイマー (トリプシンによる切断後) は、自然のままのインスリンよりも強い効力を有する完全なインスリンアゴニストである。図13Cに示すように、B1-B1' インスリンダイマーはタイプA及びタイプBインスリン受容体の双方で活性を有し、B22位の自然のままのアルギニンによるヒスチジンの取替えは活性に有意な影響を与えない。

【図14】14A - 14Cは、C57/Blkマウスを用いたB1-B1' 及びB29-B29' インスリンダイマーの比較インスリン耐性試験から得られた結果を示す。ヒトインスリンは12又は60nmol/kgの用量で投与され (図14A)、B1-B1' インスリンダイマー及びB29-B29' インスリンダイマーは12、60又は300nmol/kgの用量で投与された (それぞれ図14B及び14C)。in vivo実験の結果は、B1-B1' インスリンダイマーは、自然のままのインスリンよりも約5倍強力のものであることを示している (12nmol/kgのB1-B1' インスリンダイマーのグルコース低下プロフィールは自然のままのインスリンの60nmol/kgと同等とみなされる)。また別に、B29-B29' インスリンダイマーは、自然のままのインスリンの能力のわずかに20%であるように思われる (60nmol/kgの自然のままのインスリンのグルコース低下プロフィールはB29-B29' インスリンダイマーの300nmol/kgと同等とみなされる)。

【図15】15A及び15Bは、IFG1単鎖インスリンアナログのPEG化モノマー及びPEG化B1-B1' ダイマーのインスリン耐性試験から得られたデータを示す。ダイマーは、C¹ペプチド (8位でリジンを含むように改変されたCペプチド) を介して連結されるA鎖及びB鎖を各々が含む2つの単鎖インスリンポリペプチドを含み、2つのインスリンポリペプチドは、当該ポリペプチドのそれぞれのN-末端アミノ酸を継ぎ合わせるPEG20ダイマー化リンカーを介して継ぎ合わされる。ポリペプチド#39 (Gly^{B2}-PEG20Kモノマー; 図15A参照) 及びポリペプチド#57 (Gly^{B2}-PEG20K-Gly^{B2}ダイマー; 図15B参照) の正常マウスへの投与後、血中グルコースレベルの24時間プロフィールを測定した。

【図16】16A - 16Cは、2つの単鎖IGF-1インスリンアゴニストアナログ間で形成されたインスリンアゴニストダイマーのin vitroインスリン活性を示す。ダイマーを構成する前記第一及び第二のインスリンアゴニストアナログポリペプチドは各々A鎖、B鎖及びC-ペプチドを含み、A鎖のN-末端はB鎖のC-末端にC-ペプチドを介して連結され、2つの単鎖IGF-1インスリンアゴニストアナログは、2つのC8アミノ酸の側鎖間のジスルフィド結合を介して互いに連結される。図16AはC8-C8' IGF-1アナログダイマーの一般構造を示す。

図16Bは、サブタイプAインスリン受容体におけるC8-C8' IGF-1アナログダイマーのin vitro活性の結果を示す。C8-C8' IGF-1アナログダイマーは、自然のままのインスリンと対比して相当に軽減された（ほぼ75%）最大用量応答を有する（図16B、黒三角を参照）。さらにまた、より高濃度では（例えば1nmol/kgより高い）、C8-C8' IGF-1アナログダイマーはアンタゴニスト特性を有する（図16B、黒丸を参照）。図16Cは、C8-C8' IGF-1アナログダイマーはIGF-1受容体と対比してインスリン受容体に対する選択性を保持することを示す。

【図17】17A - 17Dは、2つの単鎖IGF-1インスリンアゴニストアナログを含むインスリンダイマーの活性を示す。ここで、A鎖及びB鎖はミニPEG連結部分（PEG₈-K-PEG₄）を介して連結され、2つのインスリンポリペプチドはそれぞれの連結部分のリジン側鎖を介して継ぎ合わされる（B1[¹H5Y16L17]25-PEG8KPEG₄-A1[¹N18,21]のLysC8-LysC8ダイマー；ポリペプチド#53）。活性は、サブタイプAインスリン受容体（図17A参照）、サブタイプBインスリン受容体（図17B参照）及びIGF-1受容体（図17C参照）で、リン酸化アッセイによって、さらにサブタイプAインスリン受容体in vitro結合アッセイ（図17D参照）によって試験される受容体結合アフィニティーによって試験された。グラフの実線は以下を表す：表示の濃度の自然のままのインスリン（黒四角）又は#53（黒丸）によって刺激されるサブタイプA又はサブタイプB受容体のリン酸化（それぞれ図17A - 17B）。点線は以下を表す：6nMのインスリン及び表示の濃度のインスリン（黒四角）又は#53（黒丸）を一緒にインキュベートすることにより刺激されるサブタイプA又はサブタイプB受容体のリン酸化（それぞれ図17A - 17B）。

【図18】18A及び18Bは、2つの単鎖IGF-1インスリンアゴニストアナログを含むインスリンダイマーの活性を示す。ここで、A鎖及びB鎖は、Cペプチドの8位にリジンを含むように改変されたC¹ペプチドを介して連結され、2つのインスリンポリペプチドはそれぞれの連結部分のリジン側鎖を介して継ぎ合わされる（B1[¹H5,10Y16L17]25-C1[K8]-A1[¹H8N18,21]のLysC8-LysC8ダイマー；ポリペプチド#54）。活性は、サブタイプAインスリン受容体（図18A参照）及びサブタイプBインスリン受容体（図18B参照）でin vitroリン酸化アッセイによって試験された。表示の濃度の自然のままのインスリン（黒四角）又は#53（黒丸）によって刺激されるサブタイプA又はサブタイプB受容体のリン酸化（それぞれ図18A - 18B）が示される。

【図19】19A - 19Dは、2つのIGF-1インスリンアゴニストアナログを含むインスリンダイマーの活性を示す。19Aは、第一の不活性化インスリンポリマーのN-末端アミノ酸の側鎖と第二の単鎖IGF-1インスリンアゴニストアナログのC8アミノ酸の側鎖との間で形成されるジスルフィド結合を介する、第一の不活性化インスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリマー間で形成されるインスリンダイマーの構造を提供する。第一のインスリンポリペプチドは、A鎖がB鎖に直接融合されてあるので不活性である。図19Bに提示のデータによって示される通り、このポリペプチドはインスリンアンタゴニストである。しかしながら、2つの活性なインスリンポリペプチド間で同じB0-C8結合を用いて形成されるダイマーは、部分的アゴニスト及びアンタゴニスト活性を示すことが見出されている。図19Cは、単鎖IGF-1インスリンアゴニストと二鎖IGF-1インスリンアゴニストとの間で形成されるダイマーの構造を示し、ここで、2つのインスリンポリペプチドは、第一のインスリンポリペプチドのN-末端アミノ酸の側鎖と第二のインスリンポリペプチドのC8アミノ酸の側鎖との間でジスルフィド結合によって連結される。図19Dに提示のデータによって示される通り、このポリペプチドは部分的アゴニスト及びアンタゴニスト活性を示す。

【図20】20A - 20Dは、2つの異なるインスリンポリペプチドを含むインスリンヘテロダイマーの活性を示す。ポリペプチド#59は、不活性なIGF1アナログ（B¹[¹C1H5Y16L17K29]29-A¹[¹N18,21]；A鎖がB鎖のカルボキシ末端に直接結合しているために不活性である）を含む第一のインスリンポリペプチドと第二の活性な単鎖IGF1アナログ（B¹[¹H5Y16L17]25-PEG₈KPEG₄-A¹[¹N18,21]）との間で形成されたダイマーであり、ここで、A鎖及びB鎖はミニPEG連結部分（PEG₈-K-PEG₄）を介して連結され、2つのインスリンポリペプチドは、連結部分のリジンの側鎖及び不活性インスリンポリペプチドのB1アミノ酸の側鎖を介して継

10

20

30

40

50

ぎ合わされる。ポリペプチド#60はポリペプチド#59と同一であるが、ただし不活性インスリンペプチドはトリプシンにより切断されており、インスリン活性が回復された二鎖IGF1インスリンが生成されるという点を除く。活性は、タイプAインスリン受容体（図20A参照）、タイプBインスリン受容体（図20B参照）及びIGF-1受容体（図20C参照）で、リン酸化アッセイによって、さらにサブタイプAインスリン受容体in vitro結合アッセイ（図20D参照）によって試験される受容体結合アフィニティーによって試験された。グラフの実線は以下を表す：表示の濃度の自然のままのインスリン（黒四角）、#53（黒丸）又は#60（黒三角）によって刺激されるサブタイプA又はサブタイプB受容体のリン酸化（それぞれ図20A - 20B）。点線は以下を表す：6nMのインスリン及び表示の濃度のインスリン（黒四角）又は#53（黒丸）を一緒にインキュベートすることにより刺激されるサブタイプA又はサブタイプB受容体のリン酸化（それぞれ図20A - 20B）。

10

【図21】21A - 21Eは、IGF2ポリペプチドでダイマー化したインスリンポリペプチドを含むインスリンヘテロダイマーの活性を示す。ポリペプチド#61（ $B^0_{25}-C^1-A^0$ を $B^2-C^2-[K8]-A^2-D^2[R4]$ に連結）及びポリペプチド#62（ $B^0_{25}-C^1[K8]-A^0$ を $B^2-C^2-A^2-D^2$ に連結）の受容体活性をサブタイプAインスリン受容体（図21A及び21Cを参照）、サブタイプBインスリン受容体（図21B及び21D参照）、及びIGF-1受容体（図21E参照）でin vitroリン酸化アッセイによって試験した。グラフは、表示の濃度の自然のままのインスリン（黒四角）、#53又は#60（黒丸）によって刺激されるサブタイプA又はサブタイプB受容体のリン酸化を表す。

【図22A】化合物#48（CysB1-CysB1 #2ダイマー；表15 - 17参照）の調製のための合成模式図。

20

【図22B】化合物#49（PheB1-PheB1 #28ダイマー；表15 - 17参照）の調製のための合成模式図。

【図22C】化合物#51（LysB29-LysB29インスリンダイマー；表15 - 17参照）の調製のための合成模式図。

【図22D】化合物#52（LysB29-LysB29 MIU-3⁺ダイマー；表15 - 17参照）の調製のための合成模式図。

【図22E】化合物#53（LysC8-LysC8 #3ダイマー；表15 - 17参照）の調製のための合成模式図。

【図22F】化合物#55（LysB1-LysB1 #20⁺ダイマー；表15 - 17参照）の調製のための合成模式図。

30

【図22G】化合物#56（LysB1-LysB1 #11ダイマー；表15 - 17参照）の調製のための合成模式図。

【図22H】化合物#58（LysC8-PEG20K-LysC8 #3ダイマー；表15 - 17参照）の調製のための合成模式図。

【図23A】化合物B1-チオール-活性化インスリンアナログ#2の調製のための合成模式図。

【図23B】化合物C8-チオール-改変インスリンアナログ#3の調製のための合成模式図。

【図24A】ダイマー#59（化合物の構造に関する表18参照）の調製のための合成模式図。

40

【図24B】ダイマー#60（化合物の構造に関する表18参照）の調製のための合成模式図。

【図25A】B1-チオール-活性化インスリンアナログ#27の調製のための合成模式図。

【図25B】C8-チオール-改変IGF-2アナログ#31の調製のための合成模式図。

【図25C】ダイマー#61（化合物の構造に関する表18参照）の調製のための合成模式図。

【図26A】C8-チオール-活性化インスリンアナログ#27⁺の調製のための合成模式図。

【図26B】B1-チオール-改変IGF-2の調製のための合成模式図。

【図26C】ダイマー#62（化合物の構造に関する表18参照）の調製のための合成模式図。

50

。

【発明を実施するための形態】

【0020】

定義

本発明の開示及び特許請求の範囲の記載に際して、以下の用語体系が下記に示す定義にしたがって用いられるであろう。

本明細書で用いられる“約”という用語は、記述されている値又は値の範囲より10パーセント高いか又は低いことを意味するが、ただし一切の値又は値の範囲をこのより広範囲の定義にのみ指定しようとするものではない。“約”という用語が先行する値又は値の範囲の各々がまた、記述されている絶対的値又は値の範囲の統合体を包含することが意図される。

10

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、その薬理学的作用を示す前に化学的改変を受ける任意の化合物と定義される。

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ル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ル基は同じ炭素（アルファ炭素）に添付される。アルファ炭素は場合によって1つ又は2つのさらに別の有機置換基を有し得る。本開示の目的のためには、その立体化学構造を指定せずにあるアミノ酸を指示する場合は、当該アミノ酸のL若しくはD型のどちらか又はラセミ混合物を包含することが意図される。しかしながら、アミノ酸がその3文字コードで指示されかつ上付き数字を含む場合には、該アミノ酸のD型は3文字コード及び上付き数字の前に小文字dを含むことによって指定され（例えばdLys⁻¹）、ここで小文字dを欠く指示（例えばLys⁻¹）は該アミノ酸の自然のままのL型を指定することが意図される。この命名体系では、上付き数字の組み入れは当該インスリンアナログ配列中の当該アミノ酸の位置を示し、ここで該インスリンアナログ内に配置されるアミノ酸は、N-末端から連続的に付与される正の上付き数字によって指示される。N-末端に又は側鎖を介してインスリンアナログペプチドに連結される追加のアミノ酸は、0から始まり該インスリンアナログ配列からさらに離れるにつれ増大する負の整数値が付与される。例えば、インスリンアナログのN-末端に連結されるジペプチドプロドラッグ内のアミノ酸の位置はaa⁻¹-aa⁰-インスリンアナログと表示され、ここでaa⁰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。

20

30

本明細書で用いられる“ヒドロキシ酸”という用語は、改変されてアルファ炭素のアミノ基がヒドロキシル基に取り替えられてあるアミノ酸を包含する。

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

【0021】

“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とのペプチド結合による連結によって形成される化合物である。

本明細書で用いられるように、さらに別の指示を含まない“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性反応を包含する。

40

“生物活性ポリペプチド”は、生物学的作用をin vitro及び/又はin vivoで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、一般的にペプチド/ポリペプチドというとき、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/ポリペプチドを包含することが意図される。例えば、標準的なアミノ酸を指定するアミノ酸配列は、N-及びC-末端に標準的なアミノ酸とともに、N-末端に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基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。

本明細書で用いられる“アシル化”アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸にとって自然のものではないアシル基を含むアミノ酸であり、それが生成される手段には無関係である。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、

50

ペプチドに組み入れる前にアミノ酸をアシル化するか、又はペプチド合成の後で該ペプチドを化学的にアシル化することを含む。いくつかの実施態様では、アシル基はペプチドに以下の1つ以上の現象を引き起こす：(i) 循環中の半減期の延長、(ii) 作用開始の遅延、(iii) 作用持続時間の延長、(iv) プロテアーゼ（例えばDPP-IV）に対する耐性の改善、及び(v) IGF及び/又はインスリンペプチド受容体での効力の増加。

【0022】

本明細書で用いられるように“アルキル化”アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸にとって自然のものではないアルキル基を含むアミノ酸であり、それが生成される手段には無関係である。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、ペプチドに組み入れる前にアミノ酸をアルキル化するか、又はペプチド合成の後で該ペプチドを化学的にアルキル化することを含む。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類似する（同じではないとしても）作用（例えば、循環中の半減期の延長、作用開始の遅延、作用持続時間の延長、プロテアーゼ（例えばDPP-IV）に対する耐性の改善、及びIGF及び/又はインスリン受容体での効力の増加）を達成するであろう。

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、任意の標準的な医薬担体、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。前記用語はまた、米連邦政府の規制庁に承認された又は動物（ヒトを含む）で使用される米薬局方に列挙された任意の薬剤を包含する。

【0023】

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維持し、さらに生物学的又は他の意味で望ましくないものではない化合物の塩を包含する。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。

本明細書で用いられるように“親水性部分”という用語は、容易に水に溶解又は容易に水を吸収でき、かつ有害作用がなく哺乳動物種がin vivoで耐性を示す（すなわち生物適合性である）任意の化合物を包含する。親水性部分の例には、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸-ポリグリコール酸コポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリメトキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、及び誘導セルロース（例えばヒドロキシメチルセルロース又はヒドロキシエチルセルロース及びそれらのコポリマー）とともに天然のポリマー（例えばアルブミン、ヘパリン及びデキストラン）が含まれる。

【0024】

本明細書で用いられるように“治療する”という用語は、指定の異常若しくは症状の予防、又は指定の異常若しくは症状に付随する諸症候の緩和、及び/又は前記諸症候の予防又は排除を含む。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グルコースの血中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中グルコースレベルを増加又は減少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、インスリンアナログの“有効な”量又は“治療的に有効な量”は、所望の作用を提供するために有害ではないが十分な量のインスリンアナログを指す。例えば、所望されるある作用は高血糖の予防又は治療であろう。“有効”である量は、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”を指定することが常に可能であるとは限らない。しかしながら、任意の個々の事例において適切な“有効”量を日常的な試験を用いて当業者は決定し得る。

“非経口的”という用語は、栄養管を通過しないが何らかの他のルート（例えば鼻内、吸入、皮下、筋肉内、脊髄内又は静脈内）によることを意味する。

【0025】

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位置（例えばA5位）の指示はいずれも、それぞれ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）におけるA鎖（例えばA5位）若しくはB鎖（例えばB5位）の当該位置のアミノ酸の位置、又はその任意のアナログにおける対応するアミノ酸の位置を指す。例えば本明細書で“B28位”という指示（更なる修飾を一切含まない）は、配列番号：2の第一のアミノ酸が欠失されてあ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。同様に、自然のままのB鎖のN-末端に付加されるアミノ酸にはB0で始まる番号が付与され、N-末端にアミノ酸が付加されるにつれ増加する負の値の番号が続く（例えばB-1、B-2...）。また別に、単鎖アナログの連結部分のアミノ酸の位置の指示は、IGF1の自然のままのC鎖（配列番号：17）に対応して為される。例えば、自然のままのC鎖の9位（又は“C9位”）はアラニン残基である。

10

【0026】

本明細書で用いられるように“自然のままのヒトインスリン”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アミノ酸のヘテロ二重体とともに配列番号：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“インスリンポリペプチド”（更なる説明的言葉を含まない）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アミノ酸のヘテロ二重体とともに、その単鎖インスリンアナログ（例えば、国際特許出願公開W096/34882及び米国特許6,630,348号に開示されたもの（前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる））を包含することが意図され、前記には、自然のままのA鎖及び/又はB鎖の改変アナログ及びその誘導体を含むヘテロ二重体並びに単鎖アナログ（前記はインスリン受容体活性を有する）が含まれる。そのような改変アナログは、A19、B16又はB25位アミノ酸から4-アミノフェニルアラニンまでの改変、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の1つ以上のアミノ酸置換、又はB1-4及びB26-30位のいずれか若しくは全部の欠失を含む。本明細書で定義されるインスリンポリペプチドはまた、非ペプチド部分（例えばレトロインベルソフラグメント）の挿入若しくは置換によって、又は非ペプチド結合（例えばアザペプチド結合（NHによるCOの置換）若しくは偽ペプチド結合（例えばNHのCH₂による置換）若しくはエステル結合（例えばデブシペプチド（1つ以上のアミド（-CONHR-）結合がエステル（COOR）結合によって取り換えられる））の取り込みによって、自然に存在するインスリンから誘導されるアナログであり得る。

20

30

【0027】

“A19インスリンアナログ”は、自然のままのA鎖の19位の自然のままのチロシン残基を4-アミノフェニルアラニン又は4-メトキシフェニルアラニンで置換したインスリンペプチドである。

本明細書で用いられる“IGF1アナログ”は、A鎖及びB鎖を含み、当該A鎖及びB鎖配列の各々が自然のままのIGF1 A及びB鎖配列とそれぞれ90%以上の配列同一性を共有するポリペプチドを包含する包括的用语である。前記用語はまたIGF YLアナログを包含する。

本明細書で用いられる“IGF2アナログ”は、A鎖及びB鎖を含み、当該A鎖及びB鎖配列の各々が自然のままのIGF2 A及びB鎖配列とそれぞれ90%以上の配列同一性を共有するポリペプチドを包含する包括的用语である。

40

“IGF YLアナログ”は、配列番号：19のIGF A鎖及び配列番号：51のIGF B鎖を含むペプチドである。

本明細書で用いられるように“単鎖インスリンアナログ”という用語は構造的に関連する一群のタンパク質を包含し、ここで、インスリン又はIGF A及びB鎖、又は前記のアナログ若しくは誘導体は、共有結合により互いに連結されて線状ポリペプチド鎖を形成する。本明細書で開示するように、単鎖インスリンアナログは、B鎖のカルボキシ末端とA鎖のアミノ末端との連結部分を介した共有結合を含む。

【0028】

本明細書で用いられる“インスリンA鎖”という用語（更なる説明的言葉を含まない）

50

は、配列番号：1の21アミノ酸配列とともにその機能的アナログ及び誘導体を包含することが意図され、前記アナログ及び誘導体には、A19インスリンアナログのA鎖及び当業者に公知の他のアナログが含まれ、前記はA4、A5、A8、A9、A10、A12、A14、A15、A17、A18、A21から選択される位置に1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失又は置換を含む。

本明細書で用いられる“インスリンB鎖”という用語（更なる説明的言葉を含まない）は、配列番号：2の30アミノ酸配列とともに自然のままのB鎖の改変された機能的アナログを包含することが意図され、前記アナログは、B16又はB25位のアミノ酸から4-アミノフェニルアラニンまでの改変、又はB1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B17、B20、B21、B22、B23、B25、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置に1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失若しくは置換、又はB1 - 4及びB26 - 30位のいずれか若しくは全ての欠失を含む。

10

本明細書で用いられる“誘導体”という用語は、化合物（例えばアミノ酸）に対する化学的改変を包含することが意図され、前記改変には、例えばポリペプチドの1つ以上の位置の側鎖に基（例えばチロシン残基にニトロ基を又はチロシン残基にヨウ素）を導入することによって、又は遊離カルボキシル基のエステル基若しくはアミド基への変換によって、又はアミノ基のアシル化によるアミドへの変換によって、又はヒドロキシ基をアシル化してエステルにすることによって、又は一級アミンをアルキル化して二級アミンにすることによって、又はアミノ酸側鎖への親水性部分の結合によってin vitroで化学的に改変することが含まれる。他の誘導体は、ポリペプチド内のアミノ酸残基の側鎖の酸化又は還元によって入手される。

20

【0029】

本明細書で用いられる“IGF A鎖”という用語（更なる説明的言葉を含まない）は、自然のままのIGF 1又はIGF 2の21アミノ酸配列（それぞれ配列番号：5及び7）とともに当業者に公知のその機能的アナログを包含することが意図され、前記アナログは、A5、A8、A9、A10、A12、A14、A15、A17、A18、A21から選択される位置における1つ以上のアミノ酸の置換による配列番号：5及び7の配列の改変を含む。

本明細書で用いられる“IGF YL B鎖”という用語（更なる説明的言葉を含まない）は、配列番号：21を含むアミノ酸配列（例えば配列番号：6の配列を含む）とともにIGF YL B鎖のアナログ及びその誘導体を包含することが意図され、前記誘導体は、B16又はB25位のアミノ酸から4-アミノフェニルアラニンまでの改変、又は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つ以上のアミノ酸の置換、又はB1 - 4及びB26 - 30位のいずれか若しくは全ての欠失を含む。

30

【0030】

本明細書で用いられる“同一性”という用語は2つ以上の配列間の類似性と関連する。同一性は、同一残基数を残基総数で割り、結果に100を乗じてパーセンテージを得ることによって測定される。したがって、正確に同じ配列の2つのコピーは100%の同一性を有し、一方、互いに比較してアミノ酸の欠失、付加又は置換を有する2つの配列はより低い同一性の程度を有する。いくつかのコンピュータープログラム（例えばBLST（Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al. (1993) J.Mol.Biol.215:403-410）のようなアルゴリズムを利用するもの）が配列同一性の決定に利用できることを当業者は認識しているであろう。

40

本明細書で用いられるように、第二の受容体と比較した第一の受容体に対する分子の“選択性”という用語は以下の比率を指す：第一の受容体における分子の EC_{50} で割った第二の受容体における分子の EC_{50} 。例えば、第一の受容体で1nMの EC_{50} 及び第二の受容体で100nMの EC_{50} を有する分子は、第二の受容体と比較して第一の受容体に対して100倍の選択性を有する。

【0031】

本明細書で用いられるように、アミノ酸“改変”は、アミノ酸の置換、又は付加によるアミノ酸の誘導、及び/又はアミノ酸からの（への）化学基の移動を指し、ヒトタンパク

50

質で一般的に見出される20アミノ酸とともに非定型的又は天然に存在しないアミノ酸のいずれかによる置換を含む。非定型的アミノ酸の市場の供給源にはシグマ-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ズ (Genzyme Pharmaceuticals, Cambridge, MA) が含まれる。非定型的アミノ酸は、市場の供給業者から購入するか、新規に合成するか、又は天然に存在するアミノ酸から化学的に改変するか若しくは誘導することができる。

本明細書で用いられる、アミノ酸の“置換”は、あるアミノ酸残基の異なるアミノ酸残基による取替えを指す。

本明細書で用いられる、“保存的アミノ酸置換”という用語は、以下の5つのグループの1つの中での変更と定義される：

- I. 小さな脂肪族で、非極性又はわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；
- II. 極性で負に荷電した残基及びそれらのアミド：Asp、Asn、Glu、Gln、システイン酸及びホモシステイン酸；
- III. 極性で正に荷電した残基；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。

【0032】

本明細書で用いられる一般的用語“ポリエチレングリコール鎖”又は“PEG鎖”は、エチレンオキシド及び水の縮合ポリマーの混合物を包含し、前記ポリマーは一般式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ (式中nは少なくとも2) で表される分枝又は直鎖状である。“ポリエチレングリコール鎖”又は“PEG鎖”は、そのほぼ平均の分子量を示すために数字の接尾辞と一緒に用いられる。例えばPEG-5,000は、約5,000ダルトンの総分子量平均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“PEG化”などの用語は、ポリエチレングリコール鎖を任意の化合物に連結することによってその自然の状態から改変されてある化合物を含む。“PEG化ポリペプチド”は、当該ポリペプチドと共有結合されたPEG鎖を有するポリペプチドである。

本明細書で用いられる“リンカー”は、2つの別々の実体を互いに結合させる結合、分子又は分子の基である。リンカーは2つの実体の最適な間隙を提供するか、さらにまた2つの物体が互いに分離状態にあることを可能にする不安定な結合を提供できる。不安定な結合には、光切断可能基、易酸性部分、易塩基性部分及び酵素切断可能基が含まれる。

本明細書で用いられる“インスリンダイマー”は、リンカーにより互いに共有結合された2つのインスリンポリ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は、何らの修飾の言葉を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つの同一のインスリンポリペプチドを含み、一方、インスリンヘテロダイマーは異なる2つのインスリンポリペプチドを含む。

【0033】

本明細書で用いられるように、“ $C_1 - C_n$ アルキル” (式中nは1から6であり得る) という用語は、1から指定の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ない。

“ $C_2 - C_n$ アルケニル” (式中nは2から6であり得る) という用語は、2から指定の数の炭素原子及び少なくとも1つの二重結合を有する、オレフィン系不飽和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” (式中nは2から6であり得る) という用語は、2からn個の炭素原

10

20

30

40

50

子及び少なくとも1つの三重結合有する不飽和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。

【0034】

本明細書で用いられる“アリール”という用語は、1つ又は2つの芳香環を含む単環又は二環炭素環式環系を指し、前記にはフェニル、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、存在する炭素数を指示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、1から3員のアルキル鎖を介して親部分に添付される5から10員のアリールを指す。

10

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1つの芳香環内に少なくとも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を指す。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、存在する炭素数を指示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、1から“n”員のアルキル鎖を介して親部分に添付される5から6員のヘテロアリールを指す。

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、臭素及びヨウ素から成る、当該基の1つ以上のメンバーを指す。

【0035】

本明細書で用いられる“患者”(更なる指示を含まない)という用語は、任意の温血脊椎家畜化動物(例えば家畜類、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)及びヒトを包含することが意図される。

20

本明細書で用いられる“単離された”という用語は、その天然の環境から移動されてあることを意味する。いくつかの実施態様では、アナログは組換え方法を介して作製され、該アナログは宿主細胞から単離される。

本明細書で用いられる“精製される”という用語は、自然のままの又は天然の環境においてある分子又は化合物に通常付随する夾雑物を実質的に含まない形態で該分子又は化合物を単離することを包含し、本来の組成物の他の成分から分離された結果として純度が高められてあることを意味する。“精製されたポリペプチド”という用語は、他の化合物(核酸分子、脂質及び炭水化物を含むが、ただしこれらに限定されない)から分離されてあるポリペプチドを指すために本明細書では用いられる。

30

【0036】

“ペプチド模倣体”は、既存のペプチドの一般構造と相違する構造を有するが、該既存のペプチドの生物学的活性を模倣することによって当該ペプチドと同様な態様で機能する化学的合成物を指す。ペプチド模倣体は、典型的には天然に存在するアミノ酸及び/又は非天然のアミノ酸を含むが、ペプチド骨格の改変もまた含むことができる。例えば、ペプチド模倣体は、典型的には非ペプチド部分(例えばレトロインベルソフラグメント)の挿入若しくは置換、又は非ペプチド結合(例えばアザペプチド結合(NHによるCOの置換)若しくは偽ペプチド結合(例えばNHのCH₂による置換)若しくはエステル結合(例えばデブシペプチド(1つ以上のアミド(-CONHR-)結合がエステル(COOR)結合によって取り換えられる))の取り入れを有する自然に存在するアミノ酸を含む。また別にペプチド模倣体は天然に存在するアミノ酸を全く欠くことができる。

40

本明細書で用いられる“荷電アミノ酸”又は“荷電残基”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)又は陽性に荷電する(すなわちプロトン化)側鎖を含むアミノ酸を指す。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。荷電アミノ酸には、ヒトタンパク質で一般的に見出される20アミノ酸中の荷電アミノ酸とともに、非定型的又は天然に存在しないアミノ酸が含まれる。

本明細書で用いられる“酸性アミノ酸”は、第二の酸性部分(アミノ酸のアルファカル

50

ボン酸以外、例えば側鎖のカルボン酸又はスルホン酸)を含むアミノ酸を指す。

本明細書で用いられる“ミニPEGリンカー”(更なる説明的言葉を含まない)という用語は、エチレングリコール(4-16エチレングリコールユニットを含む)の直鎖ポリマーであり、前記はポリペプチドを第二のポリマー(典型的には第二のポリペプチド)に連結する。場合によって、ミニPEGはアミノ酸を含むことができる。

【0037】

略称

インスリンアナログは以下のように略称される：

インスリンA及びB鎖は、A鎖については大文字AでB鎖については大文字Bで示され、ここで、上付き数字0(例えばA⁰又はB⁰)は基本配列がインスリン配列であること(A鎖は配列番号：1、B鎖は配列番号：2)、上付き数字1(例えばA¹又はB¹)は基本配列がIGF-1配列であること(A鎖は配列番号：5、B鎖は配列番号：87)を示す。自然のままのインスリン配列及びIGF配列から外れる改変は、A又はB鎖の指定に続くカッコ内に示され(例えば[B¹(H5,H10,Y16,L17)：A¹(H8,N18,N21)])、置換を示す一文字アミノ酸略称及びそれぞれA又はB鎖内の置換位置(自然のままのインスリン番号付けを用いる)が付随する。A鎖とB鎖の間のコロンは二鎖インスリンを示し、一方、ダッシュは共有結合(したがって単鎖アナログ)を示す。単鎖アナログでは、連結部分はA鎖とB鎖の間に含まれ、C¹の表示は自然のままのIGF1 Cペプチド(配列番号：17)を指す。連結部分に関して“C8位”の表示は、配列番号：17の8番目のアミノ酸に対応する位置に存在するアミノ酸を指す。

実施態様

本明細書に開示されるものは、インスリン受容体アゴニスト活性を有するインスリンアナログダイマーである。該ダイマーのインスリン活性のレベルは、ダイマー構造、並びに特にインスリンアナログの配列、ダイマーリンカーの長さ、及び2つのインスリンポリペプチドをつなぐダイマー化の位置の関数である。本明細書に開示するインスリンダイマーは第一及び第二のインスリンポリペプチド間で形成され、各インスリンポリペプチドはA鎖及びB鎖を含む。第一及び第二のインスリンポリペプチドは、二鎖インスリンアナログ(すなわち、前記ではA及びB鎖は内部システイン残基間の鎖間ジスルフィド結合だけで連結される)、及び単鎖インスリンアナログ(すなわち、前記ではA及びB鎖は直線鎖として共有結合により互いに連結され、鎖間ジスルフィド結合もまた含まれる)から別個に選択することができ、第一及び第二のインスリンポリペプチドは互いに連結されて共有結合又は二官能性リンカーによりダイマーを形成する。ある実施態様にしたがえば、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、

A) 第一のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アルファアミン又はN-末端アミノ酸側鎖を、

i) 第二のインスリンポリペプチドのN-末端アルファアミン又はN-末端アミノ酸側鎖に、若しくは

ii) 第二のインスリンポリペプチドが単鎖インスリンアナログであるときは、前記B鎖を第二のインスリンポリペプチドのA鎖に継ぎ合わせる連結部分のアミノ酸の側鎖に、

B) 第一のインスリンポリペプチドのB鎖のB29アミノ酸の側鎖を

i) 第二のインスリンポリペプチドのB鎖のB29アミノ酸の側鎖に、若しくは

ii) 前記B鎖を第二のインスリンポリペプチドのA鎖に継ぎ合わせる連結部分のアミノ酸の側鎖に、又は

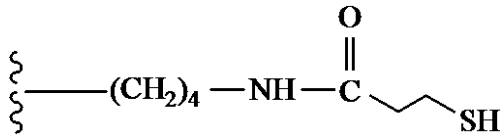
C) 第一のインスリンポリペプチドが単鎖インスリンアナログであるときは、前記B鎖を第一のインスリンポリペプチドのA鎖に継ぎ合わせる第一の連結部分のアミノ酸の側鎖を、前記B鎖を第二のインスリンポリペプチドのA鎖に継ぎ合わせる第二の連結部分のアミノ酸の側鎖に継ぎ合わせて、ジスルフィド結合又は二官能性リンカーによって互いに連結される。ある実施態様では、ダイマー化リンカーが連結部分のアミノ酸の側鎖を介して第一及び第二のインスリンポリペプチドを継ぎ合わせるときは、連結は該連結部分のC8位のアミノ酸を介して生じる。

【0038】

ある実施態様では、単鎖アナログの連結部分はミニPEGリンカー（約8 - 16のエチレングリコールユニット及び場合によって1つ又は2つのアミノ酸の短い直鎖状ポリマー）を含む。ある実施態様では、ミニPEGリンカーは構造(PEG)₆₋₈-K-PEG₄₋₆を含み、前記には例えばPEG8-K-PEG4が含まれる。ある実施態様では、ミニPEG連結部分を含む単鎖インスリンポリペプチド間で形成されるダイマーは、ダイマー化結合又は二官能性リンカー（場合によってミニPEGリンカーのアミノ酸（例えばリジン）の側鎖に添付される）によって一緒に連結される。例えば、ある実施態様では、ミニPEGリンカー-PEG8-K-PEG4のリジンの側鎖はさらに改変されて下記構造を提供し：

【0039】

【化4】

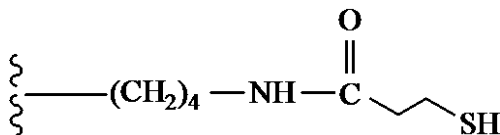


【0040】

側鎖をジスルフィド結合に参加させることができる。別の実施態様では、連結部分はペプチドリinkerであり、例えばIGF1 C¹又はIGF2 C²ペプチドが含まれる。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、12アミノ酸のペプチドリinkerの8番目のアミノ酸の側鎖に添付された結合又は二官能性リンカーによって一緒に連結される。ある実施態様では、単鎖インスリンアナログのC¹又はC²ペプチド連結部分は、場合によって8位の置換により改変されて、下記構造の側鎖を含むアミノ酸を含み、

【0041】

【化5】



【0042】

側鎖をジスルフィド結合に参加させることができる。

【0043】

本明細書に開示するインスリンダイマーは、インスリン受容体で活性を有することが知られている自然のままのヒトインスリンの誘導体のいずれかを含むことができる。ある実施態様では、該ダイマーの第一及び第二のインスリンポリペプチドは、GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LEX₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号：70）のA鎖アミノ酸配列及びX₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号：44）のB鎖アミノ酸配列を含み、式中、X₄はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、X₅はグルタミン酸又はグルタミンであり、X₈はスレオニン、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、X₉はセリン、アルギニン、オルニチン又はアラニンであり、X₁₀はセリン又はイソロイシンであり、X₁₂はセリン又はアスパラギン酸であり、X₁₄はアルギニン、チロシン、オルニチン又はアラニンであり、X₁₅はグルタミン、アルギニン、アラニン、オルニチン又はロイシンであり、X₁₈はメチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、X₁₉はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、X₂₁はアラニン、グリシン又はアスパラギンであり、X₂₅はヒスチジン又はスレオニンであり、X₂₉はアラニン、グリシン又はセリンであり、X₃₀はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸又はシステイン酸であり、X₃₃はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、X₃₄はアラニン又はスレオニンであり、X₄₁はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、X₄₂はアラニン、オルニチン又はアルギニンであり、X₄₅はチロシン又はフェニルアラニンであり、さらにR₁₃はCOOH又はCONH₂である。ある実施態様では、2つのA鎖は同一であり、B鎖は同一又は異なっている。別の実施態様では、2つのB鎖は同一で2つのA鎖は同一又は異なり、別の実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドは配列が同一である。ある実施態様では、A鎖は、GIVEQCCTSI CSL

10

20

30

40

50

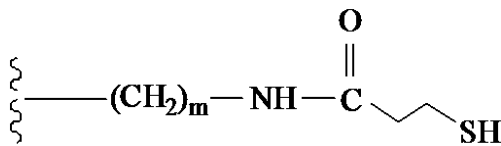
YQLENYCN (配列番号: 1)、GIVECCFRSCDLALLENYCN (配列番号: 12) 及びGIVDECCFRSCDLRLENYCN (配列番号: 11) から別個に選択される配列を含み、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号: 2)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPR (配列番号: 13) 及びGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFY (配列番号: 14) から別個に選択される配列を含む。

【0044】

ある実施態様では、ダイマーのインスリンポリペプチドの一方又は双方が単鎖インスリンアナログであり、ここでB鎖のカルボキシ末端は連結ペプチドを介してA鎖のアミノ末端に連結される。ある実施態様では、インスリンポリペプチドの連結ペプチドは、8から17アミノ酸のペプチドを含み、より具体的にはある実施態様では、該ペプチドはIGF-1Cペプチド又はそのアナログである。ある実施態様では、インスリンポリペプチドの連結ペプチドは、GYGSSSRX₆₈APQT (配列番号: 9)、GAGSSSRX₆₈APQT (配列番号: 15)、SRVSRX₆₈SR (配列番号: 98)、X₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₆₈APQT (配列番号: 17)、X₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₆₈APQT (配列番号: 16)、(SSSSX₅₉APPPSLPSPSRPLPGPSDTPILPQX₆₀)_n (配列番号: 18) 及びMGSSSX₅₉APPPSLPSPSRPLPGPSDTPILPQEEEEEX₆₀ (配列番号: 19) から成る群から選択される配列を含み、式中、nは1、2又は3から成る群から選択される整数であり、X₅₁は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、X₅₂はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、X₅₇及びX₅₈は、別個にアルギニン、リジン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、

【0045】

【化6】

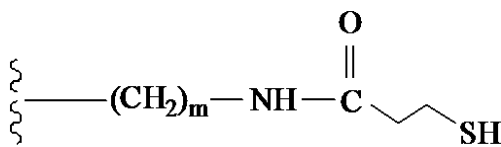


【0046】

さらにX₆₈はリジン、オルニチン、アルギニン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、

【0047】

【化7】

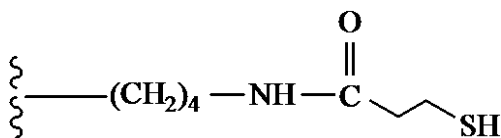


【0048】

式中、mは1、2、3又は4であり、ある実施態様では、mは4である。ある実施態様では、A鎖は、別個にGIVEQCCTSIICSLYQLENYCN (配列番号: 1)、GIVECCFRSCDLALLENYCN (配列番号: 12) 及びGIVDECCFRSCDLRLENYCN (配列番号: 11) から選択され、B鎖はFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号: 2) 又はGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFY (配列番号: 14) を含み、さらにA鎖及びB鎖を継ぎ合わせる連結ペプチドはGYGSSSRX₆₈APQT (配列番号: 9) の配列から成り、式中、X₆₈は、下記構造の側鎖を含むアミノ酸である：

【0049】

【化8】



【0050】

ある実施態様では、インスリンダイマーは、インスリンスーパーアゴニストである（すなわち、自然のままのインスリンよりも強力な活性を有する）。ある実施態様では、第一のインスリンポリペプチドは、第一及び第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端ア

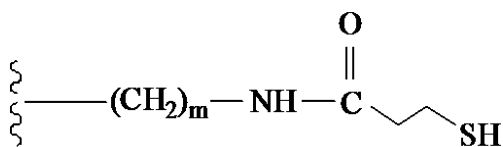
ルファアミン又はN末端アミノ酸の側鎖を介して第二のインスリンポリペプチドと連結され（すなわち頭対頭の態様）、該ダイマーは自然のままのインスリンと対比して2倍又は5倍増加効力を示す。ある実施態様では、スーパーアゴニストインスリンダイマーは、第一及び第二のインスリンポリペプチドが各々二鎖インスリンアナログである、第一及び第二のインスリンポリペプチドを含む。より具体的には、第一のインスリンポリペプチドは、第一及び第二のインスリンポリペプチドの各B鎖の2つのN末端アルファアミンの間でジスルフィド結合又は他の連結部分を介して第二のインスリンポリペプチドと連結される（すなわち頭対頭の態様）。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドの双方のA鎖が自然のままのヒトインスリン配列（GIVEQCCTSI_{CS}LYQLENYCN；配列番号：1）を含み、B鎖の少なくとも一方が配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGEHGFYTPKT（配列番号：20）を含む。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドが各々自然のままのヒトインスリンであり、当該2つのインスリンポリペプチドは、各インスリンポリペプチドのN-末端アミノ基を連結するジスルフィド結合を介して互いに連結される。

【0051】

ある実施態様では、インスリンダイマーは、第一及び第二のインスリンポリペプチド間で形成されるダイマーを含むインスリン部分的アゴニストであり、当該2つのインスリンポリペプチドはB鎖のC-末端アミノ酸のアミノ酸側鎖を継ぎ合わせる連結部分を介して互いに連結され、該C-末端アミノ酸は、それぞれ第一及び第二のインスリンポリペプチドのB26、B27、B28、B29及びB30位から別個に選択される。ある実施態様では、インスリンダイマーは、第一及び第二のインスリンポリペプチド間で形成されるダイマーを含むインスリン部分的アゴニストであり、当該2つのインスリンポリペプチドはB鎖のC-末端アミノ酸のアミノ酸側鎖を継ぎ合わせる連結部分を介して互いに連結され、該C-末端アミノ酸は、それぞれ第一及び第二のインスリンポリペプチドのB28、B29及びB30位から別個に選択される。ある実施態様では、該連結は以下から成る群から選択される：B26-B26'、B26-B27'、B26-B28'、B26-B29'、B26-B30'、B27-B26'、B27-B27'、B27-B28'、B27-B29'、B27-B30'、B28-B26'、B28-B27'、B28-B28'、B28-B29'、B28-B30'、B29-B26'、B29-B27'、B29-B28'、B29-B29'、B29-B30'、B30-B26'、B30-B27'、B30-B28'、B30-B29'及びB30-B30'。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドのB26、B27、B28、B29及びB30位から選択されるアミノ酸は下記構造Iの側鎖を含み：

【0052】

【化9】

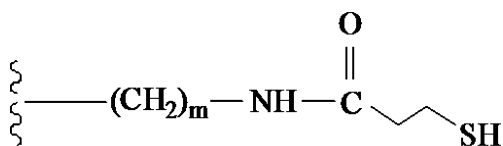


【0053】

式中、mは1から4から選択される整数であり、2つのC-末端アミノ酸の間でジスルフィド結合によるダイマーの形成を可能にする。ある実施態様では、インスリン部分的アゴニストダイマーは、第一及び第二のインスリンポリペプチド間で形成されるダイマーを含み、ここで2つのインスリンポリペプチドは、第一及び第二のインスリンポリペプチドのそれぞれのB29アミノ酸のアミノ酸側鎖を継ぎ合わせる連結部分を介して互いに連結される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドのB29アミノ酸は下記構造Iの側鎖を含み：

【0054】

【化10】



【0055】

式中、 m は1から4から選択される整数で、場合によって m は4であり、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドは、B29及びB29'アミノ酸側鎖間でジスルフィド結合を介して連結される。ある実施態様では、インスリン部分的アゴニストは、自然のままのインスリンと対比してインスリン受容体で66%、50%、40%、33%又は20%未満の活性を有する。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、GIVEQCCTSICSLYQLENYCN（配列番号：1）及びGIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）から別個に選択され、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：2）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGEHGGFFYTPR（配列番号：13）、GPEHLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：14）及びGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFYFNKPT（配列番号：22）から別個に選択される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドの双方のA鎖が、自然のままのヒトインスリン配列GIVEQCCTSICSLYQLENYCN（配列番号：1）を含み、B鎖の少なくとも一方は配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGEHGGFFYTPKT（配列番号：20）を含む。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドはヒトの自然のままのインスリンA及びB鎖配列を含む。

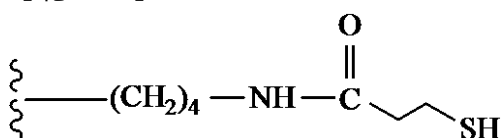
【0056】

ある実施態様では、インスリンダイマーは第一の濃度でインスリン重要体アゴニスト活性を有するが、しかしながら二番目に高い濃度でインスリン受容体アンタゴニスト活性を有する（すなわち部分的アゴニスト/アンタゴニストインスリンアナログ）。ある実施態様では、第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドの間で形成されるダイマーを含む部分的アゴニスト/アンタゴニストインスリンアナログが提供され、ここで、第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドはともに二鎖インスリンアナログで、各々が鎖間ジスルフィド結合を介して互いに連結されるA鎖及びB鎖を含む。この実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、2つのそれぞれのB鎖のカルボキシ末端アミノ酸の側鎖を継ぎ合わせるダイマー化リンカーを介して互いに連結され、第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、GIVEQCCTSICSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLEYCA（配列番号：7）から成る群から別個に選択され、第一及び第二のインスリンのB鎖はFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPX₆₈T（配列番号：2）及びGPETLCGAELVDALYLVCGRGFYFNX₆₈PT（配列番号：99）から成る群から別個に選択され、

式中、X₆₈は下記構造の側鎖を含むアミノ酸であり、

【0057】

【化11】

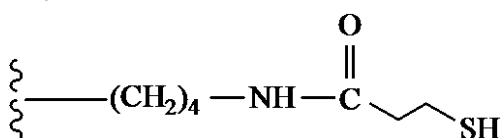


【0058】

該側鎖がジスルフィド結合に参加することを可能にする。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドは自然のままのインスリン配列を含み、B29及びB29'のリジンは改変されてあって下記構造の側鎖を含み、

【0059】

【化12】



【0060】

該ダイマーはB29及びB29'の間のジスルフィド結合によって形成される。

ある実施態様では、2つのインスリンポリペプチドを含む部分的アゴニスト/アンタゴニストインスリンアナログが提供され、ここで、インスリンポリペプチドの少なくとも一方は単鎖インスリンであり、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、該単鎖インスリ

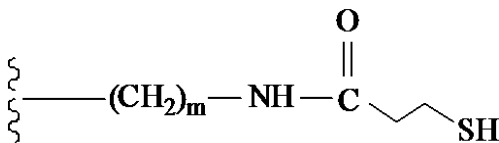
ンポリペプチドの連結ペプチド内に含まれるアミノ酸のアミノ酸側鎖、及び第二のインスリンポリペプチドのN-末端アルファアミン又はN-末端アミノ酸の側鎖を介して互いに連結される。ある実施態様にしたがえば、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、ヒトインスリンのB鎖及びA鎖、又はそのアナログ若しくは誘導体を含む。

【0061】

ある実施態様では、ダイマーのインスリンポリペプチドの一方又は双方がインスリン単鎖アナログで、該B鎖のカルボキシ末端は、GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）、GYGSSSRKAPQT（配列番号：21）、SRVSRX₆₈SR（配列番号：98）又はX₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₅₈APQT（配列番号：16）から成る群から選択される配列を含むペプチドを介してA鎖のアミン末端に連結され、式中、X₅₁はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、X₅₂はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、X₅₇及びX₅₈は別個に、アルギニン、リジン、システイン、ホモシステイン、アセチル-フェニルアラニン、オルニチン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

【0062】

【化13】

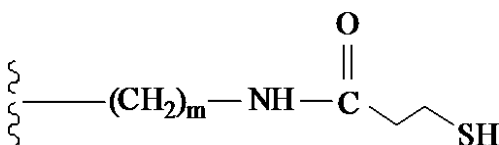


【0063】

X₆₈はリジン、アルギニン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

【0064】

【化14】



【0065】

式中、mは1から4から選択される整数である。さらに別の実施態様では、第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含む部分的インスリンアゴニスト/アンタゴニストが提供され、ここで、前記第一のインスリンポリペプチドは、第一のA鎖配列、第一のB鎖配列及び第一の連結ペプチドを含む単鎖インスリンアナログであり、前記第一の連結ペプチドの第一の末端は第一のB鎖のC-末端に共有結合され、前記第一の連結ペプチドの第二の末端は第一のA鎖のアミノ末端に共有結合される。第二のインスリンポリペプチドは場合によって、第二のA鎖配列及び第二のB鎖配列を含む単鎖インスリンアナログ又は二鎖インスリンアナログを含むが、ただし前記第二のインスリンポリペプチドが単鎖インスリンアナログであるときは、前記第二のインスリンポリペプチドはさらに第二の連結部分を含むことを条件とし、ここで前記第二の連結ペプチドの第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合し、前記第二の連結ペプチドの第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合する。該第一及び第二のインスリンポリペプチドは結合又は二官能性連結部分を介して互いに連結され、前記結合又は二官能性連結部分は、前記第一の連結ペプチドのアミノ酸（場合によって8位のアミノ酸）の側鎖を、a) 第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アルファアミン又はN-末端アミノ酸の側鎖に、又はb) 第二の連結ペプチドのアミノ酸の、ある実施態様では第二の連結ペプチドの8位のアミノ酸のアミノ酸側鎖に共有結合により連結する。

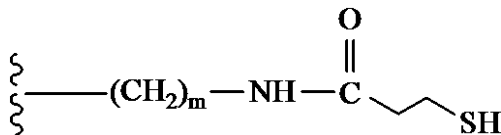
【0066】

ある実施態様では、部分的アゴニストダイマーのA鎖は配列GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LEX₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号：70）を含み、該ダイマーのB鎖は配列X₂₅LCGX₂₉X₃₀LX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号：44）を含み、式中、X₄はグルタミン酸又はアスパラギン

ン酸であり、 X_5 はグルタミン酸又はグルタミンであり、 X_8 はスレオニン、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、 X_9 はセリン、アルギニン、オルニチン又はアラニンであり、 X_{10} はセリン又はイソロイシンであり、 X_{12} はセリン又はアスパラギン酸であり、 X_{14} はアルギニン、チロシン、オルニチン又はアラニンであり、 X_{15} は、グルタミン、アルギニン、アラニン、オルニチン又はロイシンであり、 X_{18} はメチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、 X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、 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、グリシン又はセリンであり、 X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸又はシステイン酸であり、 X_{33} はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、 X_{34} はアラニン又はスレオニンであり、 X_{41} はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、 X_{42} はアラニン、オルニチン又はアルギニンであり、 X_{45} はチロシン又はフェニルアラニンであり、さらに R_{13} は COOH 又は CONH_2 である。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は、 $\text{GYGSSSRX}_{68}\text{APQT}$ (配列番号：9)、 $\text{SRVSRX}_{68}\text{SR}$ (配列番号：98)、 GYGSSSRKAPQT (配列番号：21) 及び $X_{51}X_{52}\text{GSSSX}_{57}X_{58}\text{APQT}$ (配列番号：16) から成る群から選択され、式中 X_{51} は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、 X_{52} はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、 X_{57} 及び X_{58} は別個にアルギニン、リジン、システイ、ホモシステイン、アセチル-フェニルアラニン又はオルニチンであり、さらに X_{68} は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

【0067】

【化15】



【0068】

式中、 m 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、単鎖インスリンアナログの連結ペプチドは $\text{GYGSSSRX}_{68}\text{APQT}$ (配列番号：9)、 $\text{SRVSRX}_{68}\text{SR}$ (配列番号：98) 及び $\text{PEG8-X}_{68}\text{-PEG4}$ から成る群から選択され、さらにある実施態様では、単鎖インスリンアナログの連結ペプチドは $\text{GYGSSSRX}_{68}\text{APQT}$ (配列番号：9) 又は $\text{PEG8-X}_{68}\text{-PEG4}$ である。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は $\text{GYGSSSRX}_{68}\text{APQT}$ (配列番号：9) である。

【0069】

ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドは配列が同一である。ある実施態様では、部分的アゴニストダイマーは同一の2つのA鎖を含み、ここでB鎖は同一又は異なり、別の実施態様では、2つのB鎖は同一でA鎖は同一又は異なっている。ある実施態様では、A鎖は、 $\text{GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN}$ (配列番号：1) 及び $\text{GIVDECCFRSCDLRRLENYCN}$ (配列番号：11) から別個に選択される配列を含み、B鎖は、 $\text{FVNQHL CGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT}$ (配列番号：2)、 $\text{FVNQHL CGSHLVEALYLVCGEHGFYTPR}$ (配列番号：13) 及び $\text{GPEHL CGAELVDALYLVCGRGFY}$ (配列番号：14) から別個に選択される配列を含む。ある実施態様では、A鎖は各々配列 $\text{GIVDECCFRSCDLRRLENYCN}$ (配列番号：11) を含み、B鎖は各々配列 $\text{GPEHL CGAELVDALYLVCGRGFY}$ (配列番号：14) を含む。別の実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドはともに単鎖アナログであり、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、該第一及び第二のインスリンポリペプチドの各々の連結ペプチドのアミノ酸のアミノ酸側鎖を介して互いに連結される。

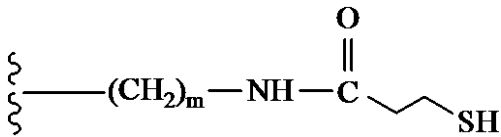
【0070】

ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、 $\text{GIVDECCX}_8\text{X}_9\text{SCDLRRLEX}_{18}\text{YCX}_{21}\text{-R}_{13}$ (配列番号：81) から別個に選択される配列を含み、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのB鎖は $\text{X}_{25}\text{L CGAELVDALYLVC GDX}_{42}\text{GFY}$ (配列番号：82) から別個に選択される配列を含み、式中、 X_8 はヒスチジン又はフェニルアラニンであり、 X_9 はアル

ギニン、オルニチン又はアラニンであり、 X_{18} はメチオニン又はアスパラギンであり、 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_{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、さらに R_{13} はCOOHである。ある実施態様では、A鎖は各々GIVDECCFRSCDLRRLNYCN（配列番号：11）であり、B鎖は配列FVNQHLCSHLEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：2）又はGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：14）を含み、さらにA鎖及びB鎖を継ぎ合わせる連結ペプチドは、配列GYGSSSRKAPQT（配列番号：21）又はGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）から成る。ある実施態様では、部分的インスリンアゴニスト/アンタゴニストは、A及びB鎖が配列GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）を介して連結される第一の単鎖インスリンポリペプチドを含み、式中 X_{68} は下記構造Iの側鎖を有するアミノ酸であり、

【0071】

【化16】

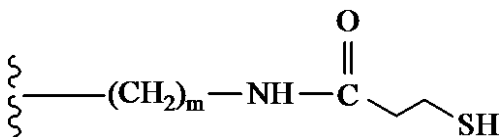


【0072】

（式中 m は1 - 4から選択される整数）、さらに該ダイマーは、該第一のインスリンポリペプチドの連結ペプチドの8位のアミノ酸の側鎖と該第二のインスリンポリペプチドのN-末端アミノ基との間でジスルフィド結合によって形成される。ある実施態様では、 m は4である。ある実施態様では、部分的インスリンアゴニストは、B1-C8ダイマー化リンカー又はC8-C8ダイマー化リンカーを介して連結される第一及び第二の単鎖インスリンポリペプチドを含み、ここで、該第一及び第二のインスリンポリペプチドの双方のA及びB鎖は、配列GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）を有する連結部分を介して連結される単鎖インスリンアナログであり、式中、 X_{68} はリジン又は下記構造Iの側鎖を有するアミノ酸であり：

【0073】

【化17】



【0074】

（式中 m は1 - 4から選択される整数）、さらに該ダイマーは、該B鎖のN-末端アミノ酸の側鎖と該連結部分の8位のアミノ酸の側鎖との間（B1-C8結合）、又は該第一及び第二のインスリンポリペプチドのそれぞれの連結ペプチドの8位のアミノ酸の2つの側鎖間（C8-C8結合）のジスルフィド結合によって形成される。ある実施態様では、部分的インスリンアゴニストは、B1-C8ダイマー化リンカーを介して連結される第一及び第二の単鎖インスリンポリペプチドを含み、ここでは第一及び第二の両インスリンポリペプチドのA鎖及びB鎖は、例えばPEG8-K-PEG4を含むミニPEGリンカーを介して連結される。ある実施態様では、インスリンダイマーは、2つのインスリンポリペプチドが連結部分を介して互いに連結される、第一及び第二のインスリンポリペプチド間で形成されるダイマーを含むインスリン部分的アゴニストであり、前記連結部分は、第一及び第二のインスリンポリペプチドの一方のB鎖のN-末端アミノ酸（例えばB0、B1及びB2を含む）のアミノ酸側鎖を、他方のインスリンポリペプチドの連結部分のアミノ酸側鎖（例えばIGF1 CペプチドのC6、C7、C8及びC9に対応する位置を含む）に継ぎ合わせる。ある実施態様では、該連結は、B0-C6、B0-C7、B0-C8、B0-C9、B1-C6、B1-C7、B1-C8、B1-C9、B2-C6、B2-C7、B2-C8、B2-C9から成る群から選択される。

【0075】

ある実施態様にしたがえば、部分的アゴニスト及び部分的アンタゴニスト活性を示すインスリンアナログダイマーが提供される。ある実施態様では、該ダイマーはi) 第一の

10

20

30

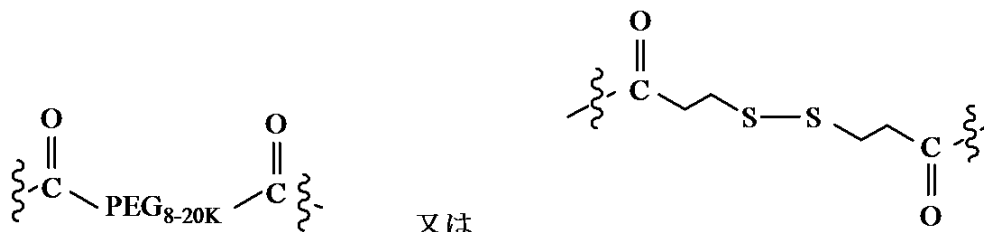
40

50

インスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドはともに単鎖インスリンアナログであって、A鎖、B鎖及び連結部分を含み、前記連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合し、前記連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合する。該第一及び第二のインスリンポリペプチドは、PEG又はジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結され、前記は、第一及び第二のインスリンポリペプチドのそれぞれの連結部分のリジンの側鎖を共有結合により連結する。ある実施態様では、ダイマー化リンカーは、

【 0 0 7 6 】

【 化 1 8 】



10

【 0 0 7 7 】

から成る群から選択され、側鎖脂肪族アミン（例えばリジン）に連結される。

【 0 0 7 8 】

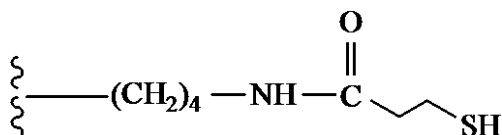
この実施態様では、第一及び第二のインスリンのA鎖は、GIVEQCCTSICSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：7）から別個に選択される配列を含み、第一及び第二のインスリンのB鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）、GPETLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：77）、GPETLCGAELVDALQFVCGRGFY（配列番号：89）、GPEHLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：14）、AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGRGFY（配列番号：90）及びAYRPSETLCGGELVDTLYLVCGRGFY（配列番号：92）から別個に選択される配列を含み、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの連結部分は、GYGSSSRX₆APQT（配列番号：9）、X₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₅₈APQT（配列番号：16）及びPEG8-X68-PEG4から別個に選択される配列を含み、式中、X₅₁はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、X₅₂はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、X₅₇及びX₅₈の一方はアルギニンで、他方は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

20

30

【 0 0 7 9 】

【 化 1 9 】



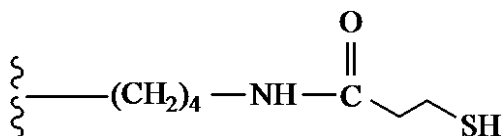
【 0 0 8 0 】

さらにX₆₈は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である：

40

【 0 0 8 1 】

【 化 2 0 】



【 0 0 8 2 】

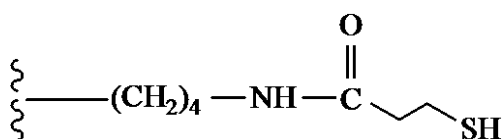
ある実施態様にしたがえば、部分的アゴニスト及び部分的アンタゴニスト活性を示すインスリンアゴニストダイマーが提供される。ある実施態様では、ダイマーは第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、前記第一のインスリンポリ

50

ペプチドは第一のA鎖及び第一のB鎖を含む二鎖インスリンアナログであり、前記第一のA鎖及び第一のB鎖は鎖間ジスルフィド結合を介して互いに連結され、前記第二のインスリンポリペプチドは、第二のA鎖、第二のB鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンアナログであり、ここで、前記連結部分の第一の末端は第二のB鎖のカルボキシ末端に共有結合され、前記連結部分の第二の末端は第二のA鎖のアミノ末端に共有結合され、第一及び第二のインスリンポリペプチドはジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結され、ここで、ダイマー化リンカーの第一の末端は、前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アミノ酸の側鎖又はN-末端アミンと共有結合により連結され、ダイマー化リンカーの第二の末端は、第二のインスリンポリペプチドの連結部分のリジンの側鎖と共有結合により連結され、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、GIVEQCCTSIC
 SLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLR
 RLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：7）から別個に選択され
 る配列を含み、前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖は、CFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGF
 FYTPKT（配列番号：94）、CGPETLCGAELVDALYLVCGRGFGFYFNKPT（配列番号：95）、CGPETLCG
 AELVDALQFVCGDRGFGFYFNKPT（配列番号：96）、CGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFGFYFNKPT（配列番号
 ：9796）、CAYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFGFY（配列番号：91）及びCAYRPSETLCGGELVDTLYLVC
 GDRGFGFY（配列番号：93）から別個に選択される配列を含み、前記第二のインスリンポリペ
 プチドのB鎖はFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）、GPETLCGAELVDALYLVCGRGFGFY
 （配列番号：77）、GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFGFY（配列番号：89）、GPEHLCGAELVDALYLVCGRD
 RGFGFY（配列番号：14）、AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFGFY（配列番号：90）及びAYRPSETLCGG
 ELVDTLYLVCGRGFGFY（配列番号：92）から別個に選択される配列を含み、前記第二のインス
 リンポリペプチドの連結部分は、GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）、X₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₅₈APQ
 T（配列番号：16）及びPEG8-X₆₈-PEG4から別個に選択される配列を含み、式中、X₅₁はグ
 リシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、
 X₅₂はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、X₅₇及びX₅₈の一方はアルギニンで、他方は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

【0083】

【化21】

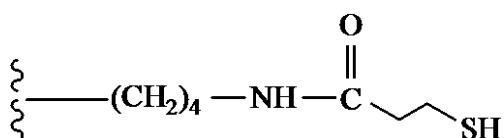


【0084】

X₆₈は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である：

【0085】

【化22】



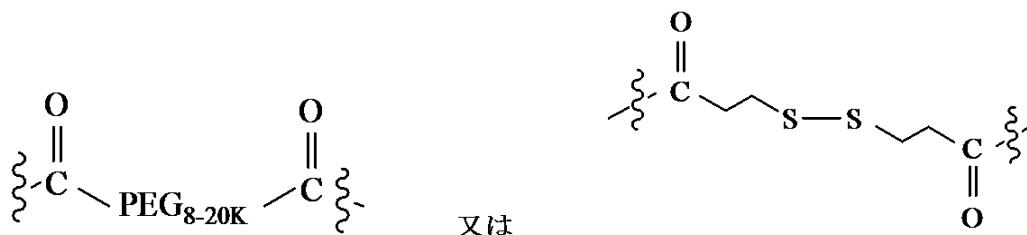
【0086】

ある実施態様にしたがえば、部分的アゴニスト及び部分的アンタゴニスト活性を示すインスリンアナログダイマーが提供される。ある実施態様では、ダイマーは第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドはともに単鎖インスリンアナログでA鎖、B鎖及び連結部分を含み、前記連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合により連結され、前記連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合により連結され、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドはPEG又はジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結され、ここでダイマー化リンカーの第一の末端は、第一又は第二のインスリンポリペプチドの一方の連結部分のリジンの側鎖と共有結合により連結され、該ダイマ

ー化リンカーの第二の末端は、他方の第一又は第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アミンと共有結合により連結される。ある実施態様では、ダイマー化リンカーは、

【 0 0 8 7 】

【 化 2 3 】



10

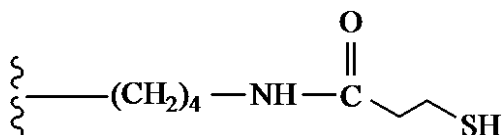
【 0 0 8 8 】

から成る群から選択され、該インスリンB鎖の側鎖脂肪族アミン（例えばリジン）又はN-末端アミンに連結される。この実施態様では、第一のインスリンポリペプチドのA鎖は配列TPAKSEGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：103）を含み、第一のインスリンポリペプチドのB鎖は、配列AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFY（配列番号：90）又はAYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFY（配列番号：92）を含み、第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、配列GIVEQCCTISCSLYQLENYCN（配列番号：1）を含み、第二のインスリンポリペプチドのB鎖は、FVNQHLCSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）及びGPEHLCSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：14）から別個に選択される配列を含む。第一及び第二のインスリンポリペプチドの連結部分は、GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）、SRVSRX₆₈SR（配列番号：98）及びPEG8-X₆₈-PEG4から別個に選択される配列を含み、式中、X₆₈はアルギニン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である：

20

【 0 0 8 9 】

【 化 2 4 】



【 0 0 9 0 】

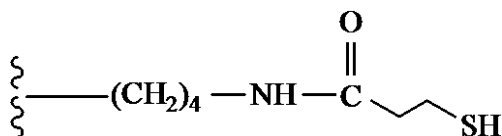
ある実施態様にしたがえば、部分的アゴニスト及び部分的アンタゴニスト活性を示すインスリンアナログダイマーが提供される。ある実施態様では、ダイマーは第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドはともに単鎖インスリンアナログでA鎖、B鎖及び連結部分を含み、前記連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合により連結され、前記連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合により連結され、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドはPEG又はジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結され、前記リンカーは、それぞれ第一及び第二のインスリンポリペプチドの連結部分のリジンの側鎖に共有結合により連結され、前記第一及び第二のインスリンのA鎖は、GIVEQCCTISCSLYQLENYCN（配列番号：1）及びGIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）から別個に選択される配列を含み、前記第一及び第二のインスリンのB鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）及びGPEHLCSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：14）から別個に選択される配列を含み、前記ダイマー化リンカーはGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）及びPEG8-X₆₈-PEG4から別個に選択される配列を含み、式中、X₆₈は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である：

30

40

【 0 0 9 1 】

【化 2 5】

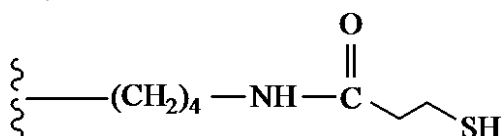


【0092】

ある実施態様にしたがえば、部分的アゴニスト及び部分的アンタゴニスト活性を示すインスリンアナログダイマーが提供される。ある実施態様では、ダイマーは第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、前記第一のインスリンポリペプチドは第一のA鎖及び第一のB鎖を含む二鎖インスリンアナログで、前記第一のA鎖及び第一のB鎖は鎖間ジスルフィド結合を介して互いに連結され、前記第二のインスリンポリペプチドは第二のA鎖、第二のB鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンアナログで、前記連結部分の第一の末端は第二のB鎖のカルボキシ末端に共有結合され、前記連結部分の第二の末端は第二のA鎖のアミノ末端に共有結合され、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、第一のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端システイン側鎖と第二のインスリンポリペプチドの連結部分の改変リジンの側鎖との間でジスルフィド結合を介して互いに連結され、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、GIVEQCCTSICSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：7）から別個に選択される配列を含み、前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖はCFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：94）及びCGPEHLCGAELVDALYLVCGRGDFYFNKPT（配列番号：97）から別個に選択される配列を含み、前記第二のインスリンポリペプチドのB鎖はFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）及びGPEHLCGAELVDALYLVCGRGDFY（配列番号：14）から別個に選択される配列を含み、前記第二のインスリンポリペプチドの連結部分は配列GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）を含み、式中X₆₈は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である：

【0093】

【化 2 6】



【0094】

受容体サブタイプ選択性

さらに別の実施態様では、サブタイプBインスリン受容体（IR-B）に対して選択性を示すインスリンダイマーが提供される。出願人は、インスリン系ポリペプチドとより高いIR-A/IR-B比を示す（すなわちIR-Bと対比してIR-Aにより高い親和性を示す）ペプチドとの間で形成されるヘテロダイマーは、IR-Aと比べてIR-Bでのより高レベルの最大受容体応答によって示されるようにIR-B活性化に優先性を示すことを発見した。ある実施態様では、サブタイプAインスリン受容体と比べてIR-B活性化に優先性を示すインスリンヘテロダイマーが提供される。

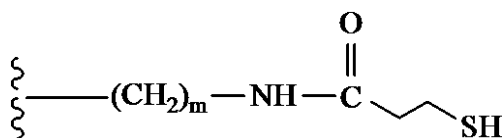
ある実施態様では、第一のインスリンポリペプチドは、GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LX₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号：70）のA鎖アミノ酸配列及びX₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号：44）のB鎖アミノ酸配列を含み、さらに第二のポリペプチドは、GIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：7）、TPAX₇₅SEGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：88）又はGIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）のA鎖酸配列、AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA（配列番号：87）又はGPETLCGAELVDALQFVCGDRGDFYFNKPT（配列番号：10）のB鎖配列並びにPEG8-X₆₈-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含む連結部分を含み、式中、X₄はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、X₅はグルタミン酸又はグルタミンであり、X₈はスレオニン、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、X₉はセリン、アルギニン、オルニチン又はアラニンあり、X₁₀はセリン又はイソロイ

シンであり、 X_{12} はセリン又はアスパラギン酸であり、 X_{14} はアルギニン、チロシン、オルニチン又はアラニンであり、 X_{15} はグルタミン、アルギニン、アラニン、オルニチン又はロイシンであり、 X_{18} はメチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、 X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、 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} アラニン、グリシン又はセリンであり、 X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸又はシステイン酸であり、 X_{33} はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、 X_{34} はアラニン又はスレオニンであり、 X_{41} はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、 X_{42} はアラニン、オルニチン又はアルギニンであり、 X_{45} はチロシン又はフェニルアラニンであり、 R_{13} はCOOH又はCONH₂であり、 X_{68} はアルギニン、リジン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

10

【0095】

【化27】



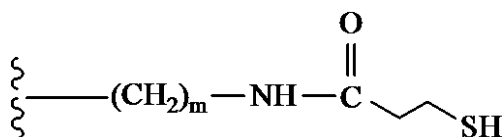
【0096】

X_{75} はリジン又はアルギニンである。ある実施態様では、ヘテロダイマーのインスリンポリペプチドは二鎖インスリンポリペプチドである。また別の実施態様では、ヘテロダイマーの第一及び第二のポリペプチドはともに単鎖インスリンポリペプチドであり、GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）、 $X_{51}X_{52}$ GSSSX₅₇ X_{58} APQT（配列番号：16）（SSSSX₅₉APPPSLPSPSRPLGPSDTPILPQX₆₀）_n（配列番号：18）、MGSSSSX₅₉APPPSLPSPSRPLGPSDTPILPQEEEEEX₆₀（配列番号：19）及びW₂-Z₂-Y₂から成る群から別個に選択される連結部分を有し、式中W₂はPEG6、PEG7又はPEG8であり、Y₂はPEG4、PEG5又はPEG6であり、さらにZ₂はリジン、システイン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

20

【0097】

【化28】



30

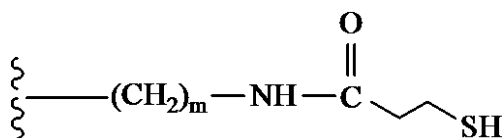
【0098】

式中、nは1、2又は3から成る群から選択される整数で、 X_{51} はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、 X_{52} はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、 X_{57} 及び X_{58} は別個に、アルギニン、リジン、システイン、ホモシステイン、アセチル-フェニルアラニン又はオルニチンであり、 X_{59} 及び X_{60} は別個にアルギニン又はリジンであり、さらに X_{68} は、アルギニン、リジン、システイン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

40

【0099】

【化29】



【0100】

式中、mは1から4から選択される整数である。

【0101】

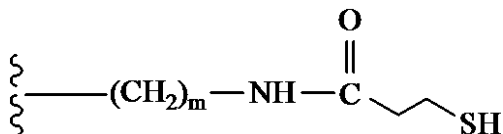
ある実施態様では、ダイマーは第一及び第二のインスリン様ポリペプチドを含み、その少なくとも1つは単鎖インスリン様ポリペプチドであり、ここで、第一のインスリンポリ

50

ペプチドは、GIVEQCCTSI_{CS}LYQLENYCN（配列番号：1）のA鎖配列、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）のB鎖配列及び場合によって第一の連結部分を含み、前記連結部分はPEG8-X₆₈-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含み、式中、X₆₈はアルギニン、リジン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

【0102】

【化30】



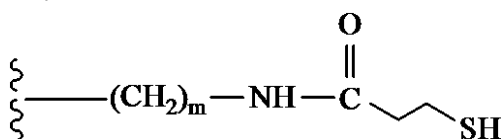
10

【0103】

さらに第二の配列は、TPAX₇₅SEGIVEECCFRSCDLALLE_{TY}CA（配列番号：88）又はGIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）のA鎖配列、AYRPSETLCGGELVD_{TL}QFVCGDRGFYFSRPA（配列番号：87）又はGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPT（配列番号：10）のB鎖配列及び場合によって第一の連結部分を含み、前記連結部分は、PEG8-X₆₈-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含み、式中、X₆₈はアルギニン、リジン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

【0104】

【化31】



20

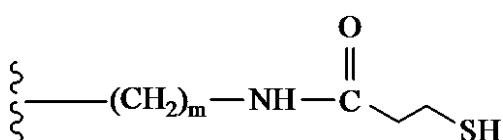
【0105】

さらにX₇₅はリジン又はアルギニンであり、さらにここで、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの一方のN-末端アミン又はN-末端アミノ酸のアミノ酸側鎖、及び他方のインスリンポリペプチドの連結部分のリジン（場合によって該連結部分の8位のリジン）側鎖を介して互いに連結される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドはともに単鎖インスリンポリペプチドである。ある実施態様では、第一又は第二のポリペプチドの一方は、鎖間ジスルフィド結合を介して連結されるA鎖及びB鎖を含む二鎖ヘテロ二重体で、他方のインスリンポリペプチドは、A鎖、B鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンポリペプチドであり、前記連結部分はPEG8-X₆₈-PEG4又はGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）であり、式中、X₆₈はリジン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

30

【0106】

【化32】



40

【0107】

mは4であり、さらに前記第一及び第二のインスリンポリペプチドは、該二鎖インスリンポリペプチドのB1位のアミノ酸の側鎖及び単鎖インスリンポリペプチドのGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）の8位のアミノ酸の側鎖又はPEG8-X₆₈-PEG4のリジンの側鎖を介して互いに連結される。

【0108】

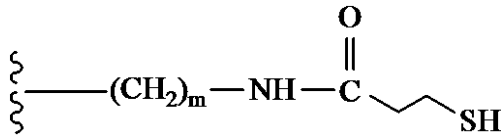
ある実施態様では、ヘテロダイマーの第一及び第二のポリペプチドは各々単鎖インスリンポリペプチドであり、ここで、第一のインスリンポリペプチドは、GIVEQCCTSI_{CS}LYQLENYCN（配列番号：1）のA鎖、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）のB鎖、並びにPEG8-X₆₈-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含む第

50

一の連結部分を含み、さらに第二のIGFポリペプチドは、TPAX₇₅SEGIVECCFRSCDLALLETYCA (配列番号：88) 又はGIVDECCFRSCDLRRLEMYCA (配列番号：5) のA鎖、AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA (配列番号：87) 又はGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPT (配列番号：10) のB鎖、並びにPEG8-K-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQT (配列番号：9) から成る群から選択される配列を含む第二の連結部分を含み、式中、X₆₈は、リジン、アルギニン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

【0109】

【化33】



10

【0110】

X₇₅はリジン又はアルギニンであり、さらにここで、第一及び第二の連結部分は、それぞれB鎖のカルボキシ末端とA鎖を継ぎ合わせ、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一又は第二のポリペプチドの一方のN-末端アミン又はB1位のアミノ酸の側鎖、及び他方のポリペプチドの連結部分のリジン側鎖を介して互いに連結される。

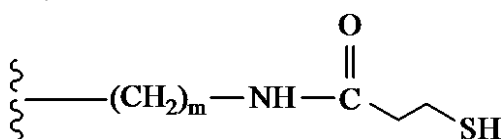
【0111】

ある実施態様では、ヘテロダイマーの第一及び第二のポリペプチドは各々単鎖インスリンポリペプチドであり、ここで、第一のインスリンポリペプチドは、GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (配列番号：1) のA鎖配列、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF (配列番号：23) のB鎖配列、並びにPEG8-K-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQT (配列番号：9) から成る群から選択される配列を含む第一の連結部分を含み、さらに第二のIGFポリペプチドは、TPAX₇₅SEGIVECCFRSCDLALLETYCA (配列番号：88) のA鎖配列、AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA (配列番号：87) のB鎖配列、並びにPEG8-X₆₈-PEG4及びGYGSSSRX₆₈APQT (配列番号：9) から成る群から選択される配列を含む第二の連結部分を含み、式中、X₆₈は、アルギニン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり：

20

【0112】

【化34】



30

【0113】

X₇₅はリジン又はアルギニンであり、さらにここで、第一及び第二の連結部分は、それぞれB鎖のカルボキシ末端とA鎖を継ぎ合わせ、第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一又は第二のポリペプチドの一方のN-末端アミン又はB1位のアミノ酸の側鎖、及び他方のポリペプチドの連結部分のリジン側鎖を介して互いに連結される。

【0114】

ある実施態様にしたがえば、部分的アゴニスト及び部分的アンタゴニスト活性並びにサブタイプB受容体に対する選択性を示すインスリンアナログダイマーが提供される。ある実施態様では、該ダイマーは第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、ここで、前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドはともにA鎖、B鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンアナログであり、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの各々について、それらの対応する連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合により連結され、それらの対応する連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合により連結され、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドは、ジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結され、該ダイマー化リンカーの第一の末端は、第一又は第二のインスリンポリペプチドの一方の連結部分のリジンの側鎖と共有結合により連結され、該ダイマー化リンカーの第二の末端は、他方の第一

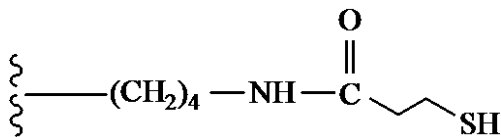
40

50

又は第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アミンと共有結合により連結される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドはジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結され、ここで、該ダイマー化リンカーの第一の末端は、第一のインスリンポリペプチドの連結部分のリジンの側鎖と共有結合により連結され、該ダイマー化リンカーの第二の末端は、第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アミンと共有結合により連結される。ある実施態様では、第一及び第二のインスリンポリペプチドはジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結され、該ダイマー化リンカーの第一の末端は、第二のインスリンポリペプチドの1つの連結部分のリジンの側鎖と共有結合により連結され、該ダイマー化リンカーの第二の末端は、第一のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アミンと共有結合により連結される。この実施態様では、第一のインスリンポリペプチドのA鎖は配列TPAKSEGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：103）を含み、第一のインスリンポリペプチドのB鎖は配列AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFY（配列番号：90）を含み、前記第一のインスリンポリペプチドのための連結部分は配列SRVSRX₆₈SR（配列番号：98）を含む。該第二のインスリンポリペプチドのA鎖は配列GIVEQCCTSIICSLYQLENYCN（配列番号：1）を含み、該第二のインスリンポリペプチドのB鎖は配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）を含み、前記第二のインスリンポリペプチドのための連結部分は配列GYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）を含み、式中、X₆₈は、アルギニン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である：

【0115】

【化35】



【0116】

単鎖インスリンアナログのペプチドリンカー

ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示する単鎖インスリンアナログの連結部分は、IGF1 C鎖配列（GYGSSSRAPQT；配列番号：24）又はその誘導体である。ある実施態様では、該誘導体は、リジン、システイン、オルニチン、ホモシステイン又はアセチル-フェニルアラニン残基による一アミノ酸置換だけ配列番号：24と相違するペプチドであり、さらに別の実施態様では、リジン、システイン、オルニチン、ホモシステイン又はアセチル-フェニルアラニンアミノ酸はPEG化されるか又は脂肪アシル化される。さらに別の実施態様では、連結部分は一リジン置換だけ配列番号：24と相違するペプチドである。ある具体的な実施態様では、置換は配列番号：24の8位で実施される。

出願人らは、IGF1 C鎖配列及びそのアナログの連結部分としての使用は、野生型に近いインスリン活性を有する単鎖インスリンアナログを生じることを見出した。さらにまた、IGF1 C鎖配列の2位が改変されているか、又はカルボキシ末端の4アミノ酸がIGF1 C鎖配列から欠失しているIGF1 C鎖配列アナログの連結部分としての使用は、インスリンに対して選択性を有する（すなわちIGF-1受容体と比較してインスリン受容体でより強い結合及び/又は活性を有する）単鎖インスリンポリペプチドを生成する。ある実施態様では、該単鎖インスリンポリペプチドは、IGF-1受容体と対比してインスリン受容体で5x、10x、20x、30x、40x又は50x高い親和性又は活性を有する。

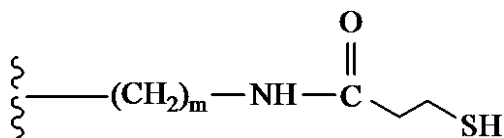
【0117】

ある実施態様にしたがえば、連結部分は、IGF1 C鎖配列（GYGSSSRAPQT；配列番号：24）の誘導体であり、1から3アミノ酸置換又は1から2アミノ酸置換だけGYGSSSR（配列番号：25）又はGAGSSSRAPQT（配列番号：26）と相違する自然のままではない配列を含む。ある実施態様では、アミノ酸置換の少なくとも1つはリジン又はシステイン置換であり、さらにある実施態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。ある実施態様では、連結部分は8から17アミノ酸のペプチド（又はペプチド模倣体）であり、前記は、GYGSSSR（配列番号：25）又はGAGSSSRAPQT（配列番号：26）と1アミノ酸置換だけ相違する（例

えばリジン又はシステインによる置換を含む)、自然のままではないアミノ酸配列を含む。ある実施態様では、連結部分は配列GYGSSSR (配列番号: 25) 又はGAGSSSRAPQT (配列番号: 26) を含む。ある実施態様では、連結部分は、配列GAGSSSRX₆₈APQT (配列番号: 15)、GYGSSSX₅₇X₆₈APQT (配列番号: 37)、又は一アミノ酸置換だけ配列番号: 15と相違するアミノ酸を含み、式中、X₅₇はアルギニンで、X₆₈は下記構造Iの側鎖を有するアミノ酸であり:

【0118】

【化36】



10

【0119】

式中、mは1から4から選択される整数である。

【0120】

さらに別の実施態様では、前記連結部分の8位のアミノ酸の側鎖にポリエチレングリコール鎖が連結される。別の実施態様では、連結部分は配列GX₅₂GSSSRX₅₈APQT (配列番号: 38) を含み、式中、X₅₂は任意の非芳香族アミノ酸 (例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンを含む) であり、X₅₈はその側鎖に共有結合により連結されるポリエチレン鎖を有するアミノ酸を表す。ある実施態様では、X₅₈はPEG化リジンである。ある実施態様では、連結部分は、配列GYGSSSRX₅₈ (配列番号: 100) 又はGAGSSSRX₅₈APQT (配列番号: 15) を含み、式中、X₅₈はその側鎖に共有結合により連結されるポリエチレン鎖を有するアミノ酸を表す。

20

ある実施態様では、連結部分は8から17アミノ酸配列であり、前記は、配列X₅₁X₅₂GSSSR (配列番号: 27)、配列番号: 27のペプチド模倣体、又は配列番号: 27の3 - 8位の1つにおける1、2又は3アミノ酸置換だけ配列番号: 27と相違するアミノ酸配列から成り、式中、X₅₁は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びメチオニンから成る群から選択され、X₅₂は任意のアミノ酸である。ある実施態様では、連結部分は長さが8アミノ酸のペプチドであり、配列GYGSSSR (配列番号: 25)、又は一アミノ酸置換だけ配列番号: 18と相違するアミノ酸配列、又は前記の誘導体を含む。

30

別の実施態様では、連結部分は8から17アミノ酸配列であり、前記は、配列GX₅₂GSSSR (配列番号: 31) (式中X₅₂は任意のアミノ酸)、配列番号: 31のペプチド模倣体、又はそのアナログを含み、前記アナログは、配列番号: 31の1、3、4、5、6、7又は8位のいずれかにおける一アミノ酸置換だけ配列番号: 31と相違するが、ただし、連結ペプチドが8アミノ酸より長いときX₅₂はチロシン以外であることを条件とする。ある実施態様にしたがえば、連結部分は8 - 17アミノ酸配列を含み、前記配列は、GYGSSSR (配列番号: 25)、GAGSSSR (配列番号: 27)、GAGSSSRA (配列番号: 28)、GAGSSSRAP (配列番号: 29)、GAGSSSRAPQ (配列番号: 30)、GAGSSSRAPQT (配列番号: 26)、PYGSSSR (配列番号: 31)、PAGSSSR (配列番号: 32)、PAGSSSRA (配列番号: 33)、PAGSSSRAP (配列番号: 34)、PAGSSSRAPQ (配列番号: 35)、PAGSSSRAPQT (配列番号: 36) から成る群から選択される。

40

【0121】

非ペプチド連結部分

ある実施態様では、本明細書に開示する単鎖インスリンポリペプチドの連結部分は相対的に短い二官能性非ペプチドポリマーリンカーであり、長さがほぼ8 - 16アミノ酸の配列である。ある実施態様にしたがえば、非ペプチド連結部分は、4から20、8から18、8から16、8から14、10から14、10から12又は11から13のモノマーである。ある実施態様では、自然のままのB鎖の最後の5カルボキシアミノ酸が欠失してB25アミノ酸が共有結合によって連結部分に直接連結される、単鎖インスリンアゴニストが提供される。連結部分の第二の末端はA鎖のA1アミノ酸と共有結合し、したがって連結部分を介してB及びA鎖を連結する

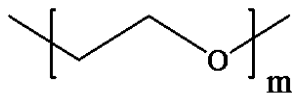
50

。ある実施態様では、連結部分は、16を超えないが少なくとも10のモノマーユニットを含む直鎖ポリエチレングリコールの連結部分であり、別の実施態様では、ポリエチレングリコール連結部分は16を超えないが少なくとも12のモノマーユニットを含み、さらに別の実施態様では、ポリエチレングリコール連結部分は14を超えないが少なくとも10のモノマーユニットを含む。

ある実施態様にしたがえば、ポリエチレングリコール連結部分は下記構造を含み：

【0122】

【化37】



10

【0123】

式中、mは、6から18、8から16、10から14又は11から13の範囲の整数である。ある実施態様では、mは10、11、12、13又は14から選択される整数である。ある実施態様では、mは12である。

ある実施態様では、単鎖インスリンアゴニストが提供されここでは、自然のままのB鎖の最後の5カルボキシアミノ酸が欠失し、B25アミノ酸がA鎖のA1アミノ酸に連結部分を介して連結され、該連結部分は、16を超えないが少なくとも8モノマーユニットのポリエチレングリコール及び1から4アミノ酸のアミノ酸配列を含む。ある実施態様にしたがえば、連結部分は、1 - 4アミノ酸の配列及び前記1 - 4アミノ酸の配列に共有結合した長さが14未満少なくとも8モノマーユニットの直鎖ポリエチレングリコールを含むが、ただし該アミノ酸配列はYTPK（配列番号：37）又はFNKP（配列番号：38）ではないことを条件とする。別の実施態様では、単鎖インスリンアナログが提供され、ここでは、自然のままのB鎖の最後の5カルボキシアミノ酸が欠失し、B25アミノ酸がA鎖のA1アミノ酸に連結部分を介して連結され、該連結部分は、長さが少なくとも8（ただし16未満）モノマーユニットのポリエチレングリコール及び2 - 5アミノ酸のアミノ酸配列を含む。該2 - 5アミノ酸の配列は、B鎖とポリエチレングリコール鎖との間、又はA鎖とポリエチレングリコール鎖との間に位置し得る。しかしながら、2 - 5アミノ酸配列がB鎖とポリエチレングリコール鎖との間に位置するときは、該アミノ酸配列はYTPKT（配列番号：39）でもFNKPT（配列番号：40）でもない。

20

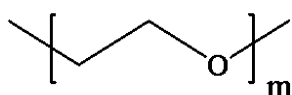
30

【0124】

ある実施態様では、連結部分は、1、2、3又は4アミノ酸によって分離された2つのポリエチレン鎖を含む。この実施態様では、連結部分は一般構造 $W_2-Z_2-Y_2$ を含み、式中、 W_2 及び Y_2 は、別個に下記一般構造のポリエチレングリコールであり：

【0125】

【化38】



【0126】

Z_2 は1 - 3アミノ酸の配列であり、mは3 - 7の範囲の整数である。ある実施態様では、 W_2 はPEG6、PEG7又はPEG8であり、 Y_2 はPEG4、PEG5又はPEG6であり、 Z_2 は一アミノ酸である。ある実施態様では、 Z_2 はLys又はCysである。ある実施態様では、 Z_2 は、PEG化Lys又はCysアミノ酸である。ある実施態様では、連結部分は、合計8 - 12又は10 - 14又は12エチレングリコールモノマーユニットである2つのポリエチレン鎖を含み、前記は一アミノ酸によって分離されている。ある実施態様では、該一アミノ酸はリジン又はシステインである。ある実施態様では、 W_2 はPEG8であり、 Y_2 はPEG4であり、 Z_2 はリジンである。

40

【0127】

インスリンA及びB鎖

本発明のインスリンポリペプチドは、ヒトインスリンの自然のままのB及びA鎖（それぞ

50

れ配列番号：1及び2）、又はその公知のアナログ若しくは誘導体のいずれかを含み、それらは、ヘテロ二重体として互いに連結されたときインスリンアゴニスト活性を示す。そのようなアナログは、当該インスリンアナログのインスリン活性を破壊しない1つ以上のアミノ酸欠失、1つ以上のアミノ酸置換、1つ以上のアミノ酸の挿入を有することによって、ヒトインスリンのA鎖及びB鎖と相違するA鎖及びB鎖を有するタンパク質を含む。

インスリンアナログのタイプ、“モノマーインスリンアナログ”は当業界では周知である。これらはヒトインスリンの急速作用性アナログであり、例えば以下のようなインスリンアナログが含まれる：

(a) B28位のアミノアシル残基はAsp、Lys、Leu、Val又はAlaにより置換され、さらにB29位のアミノアシル基はLys又はProである；

(b) B27、B28、B29及びB30位のいずれかのアミノアシル残基は欠失するか、又は自然のままのものではないアミノ酸により置換される。

ある実施態様では、B28位のAsp置換又はB28位のLys置換及びB29位のプロリン置換を含むインスリンアナログが提供される。また別のモノマーインスリンアナログが以下に開示されている：Chance, et al., U.S.Pat.No.5,514,646；Chance, et al., 米国特許出願 Ser.No.08/255,297；Brems, et al., Protein Engineering, 5:527-533, 1992；Brange, et al., 欧州特許公開公報No.214,826（1987年3月18日公開）；及び Brange, et al., Current Opinion in Structural Biology, 1:934-940, 1991。前記文献は、モノマーインスリンアナログを説明するために、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0128】

インスリンアナログはまたアミド化アミノ酸を酸性形に取り替えることができる。例えば、AsnをAsp又はGluに取り替えることができる。同様にGlnはAsp又はGluに取り替えることができる。特にAsn(A18)、Asn(A21)若しくはAsp(B3)、又はそれら残基の任意の組み合わせをAsp又はGluによって取り換えることができる。Gln(A15)若しくはGln(B4)、又はその両方もまたAsp又はGluのどちらかに取り替えることができる。

本明細書で開示するように、B鎖のカルボキシ末端が連結部分を介してA鎖のアミノ末端に連結される、ヒトインスリンのB鎖及びA鎖又はそのアナログ若しくは誘導体を含むインスリン単鎖アナログが提供される。ある実施態様では、該A鎖は、GIVEQCCTSICSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）又はGIVEECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：7）から成る群から選択されるアミノ酸配列であり、B鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：2）、GPEHLCSGAEALVDALYLVCGRGFY（配列番号：14）及びGPETLCGX₂₆ELVDX₂₇LYLVCGDX₄₂GFYFNKPT-R₁₄（配列番号：41）（式中X₂₆及びX₂₇は各々アラニンでありX₄₂はアルギニンである）、又は前記のカルボキシ短縮配列（B26、B27、B28、B29及びB30に対応する1から5つのアミノ酸が欠失されている）、及び前記の配列のアナログ（各配列は、A5、A8、A9、A10、A14、A15、A17、A18、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B20、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される自然のままのインスリンの位置（図4の示すペプチドアラインメント参照）と対応する位置における1から5つのアミノ酸置換を含むように改変されている）から選択される配列を含む。ある実施態様では、該アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。インスリンの所望の活性に有害な影響を与えないそれらの位置における適切なアミノ酸置換は当業者に公知であり、例えば以下の文献に示されている：Mayer, et al., Insulin Structure and Function, Biopolymers.2007;88(5):687-713（前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

【0129】

ある実施態様にしたがえば、インスリンアナログペプチドは、インスリンA鎖及びB鎖又はそのアナログを含むことができ、ここで、該A鎖は、GIVEQCCTSICSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）又はGIVEECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：7）の少なくとも1つに関して、自然のままのペプチドの全長にわたって少なくとも70%の配列同一性（例えば70%、75%、80%、85%、90%、95%）を共有するアミノ酸配列を含み、さらにB鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：2）、GPETLCGX₂₆EL

10

20

30

40

50

VDX₂₇LYLVCGDX₄₂GFYFNKPT-R₁₄ (配列番号: 41) (式中X₂₆及びX₂₇は各々アラニンでありX₄₂はアルギニンである)、又は前記のカルボキシ短縮配列(B27、B28、B29及びB30に対応する1から4つのアミノ酸が欠失されている)の少なくとも1つに関して、自然のままのペプチドの全長にわたって少なくとも60%の配列同一性(例えば60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%)を共有するアミノ酸配列を含む。

追加のアミノ酸配列が、本発明のインスリンポリペプチドのB鎖のアミノ末端又はA鎖のカルボキシ末端に付加され得る。例えば、一連の陰性荷電アミノ酸をB鎖のアミノ末端に付加でき、前記には、長さが例えば1から12、1から10、1から8又は1から6アミノ酸が含まれ、1つ以上の陰性荷電アミノ酸(例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸を含む)を含む。ある実施態様では、B鎖アミノ末端伸長部は1から6の荷電アミノ酸を含む。ある実施態様では、B鎖は、配列GEEEEWFVNQHLCSHLVEALYLVCGERGFFYTPR (配列番号: 42) 又はGEEEEEKGPEHLCSGALVDALYLVCADX₄₂GFY (配列番号: 43) (式中、X₄₂はアラニン、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択される)を含む。ある実施態様にしたがえば、開示のインスリンポリペプチドは、A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。

【0130】

高効力インスリンポリペプチドもまた、国際特許出願PCT/2009/068713(その開示内容は参照により本明細書に組み入れられる)に記載のように、改変IGFI及びIGFIIを土台にして調製することができる。より具体的には、自然のままのインスリンのB16及びB17に対応する位置に自然のままのIGFアミノ酸に代わるチロシンロイシンジペプチドによる置換を含むIGFI及びIGFIIのアナログは、インスリン受容体で10倍の効力増加を示す。したがって、本明細書に開示するインスリンポリペプチドは、IGFI (配列番号: 5) 又はIGFII (配列番号: 7) のA鎖及びIGFI YL (配列番号: 6) 若しくはIGFII YL (配列番号: 8) のB鎖又は自然のままのインスリンのB鎖(配列番号: 2)を含むことができる。さらにまた、本明細書に開示するインスリンポリペプチドは、自然のままのインスリンA鎖又はそのアナログ、及びIGFI YL (配列番号: 6) 又はIGFII YL (配列番号: 8) のB鎖を前記B鎖のアナログと同様に含むことができる。ある実施態様では、インスリンポリペプチドは、IGFI (配列番号: 5) A鎖又はそのアナログ若しくは誘導体、及びIGFI YL (配列番号: 6)、IGFII YL (配列番号: 8) 又は自然のままのインスリン(配列番号: 2) 又は前記のアナログ若しくは誘導体のB鎖を含む。

単鎖IGF又はインスリンA鎖及びB鎖へのさらに別の改変には、例えばA19、B16又はB25位の1つ以上におけるアミノ酸の4-アミノフェニルアラニンへの改変、又はA5、A8、A9、A10、A14、A15、A17、A18、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B20、B21、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30(自然のままのインスリンのA及びB鎖と対比して)から選択される位置の1つ以上のアミノ酸の置換、又はB1-4及びB26-30位のいずれか又は全部の欠失が含まれる。ある実施態様では、A5、A8、A9、A10、A14、A15、A17、A18、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B20、B21、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置における置換は、自然のままのインスリン配列と対比して保守的アミノ酸置換である。

【0131】

ある実施態様にしたがえば、B鎖は配列R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅ (配列番号: 44) を含み、A鎖は配列GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃ (配列番号: 45) を含み、式中、

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あり、

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、

X_{15} 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、

X_{17} 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、

X_{18} 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、

X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{21} 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、

10

X_{25} はヒスチジン又はスレオニンであり、

X_{29} 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、ホモシステイン酸又は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、グルタミン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、リジン、オルニチ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：46)、FVNQ (配列番号：47)、PGPE (配列番号：48)、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-末端アルファアミンから成る群から選択され、さらに R_{13} はCOOH又はCONH₂である。ある実施態様では、 X_8 、 X_{25} 及び X_{30} は各々ヒスチジンである。さらに別の実施態様では、インスリンポリペプチドは、配列番号：68のA鎖ペプチド配列のアナログ及び/又は配列番号：69のB鎖ペプチド配列のアナログを含み、該A鎖及びB鎖のアナログは各々1-3のさらに別のアミノ酸置換を含む。

20

【0132】

ある実施態様にしたがえば、インスリンペプチドのA鎖が配列GIVEQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (配列番号：49)を含み、B鎖が配列X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFF (配列番号：65)を含むインスリンアナログが提供され、式中、

30

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_{17} はグルタミン酸又はグルタミンであり、

X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{23} はアスパラギン又はグリシンであり、

X_{25} はヒスチジン又はスレオニンから成る群から選択され、

X_{29} 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る。

さらに別の実施態様では、B鎖は配列X₂₂VNQX₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFFYT-Z₁-B₁ (配列番号：66)を含み、式中、

40

X_{22} 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、

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} 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、ホモシステイン酸又はシステイン酸から成る群から選択され、

Z₁は、アスパルテート-リジン、リジン-プロリン、及びプロリン-リジンから成る群から選択されるジペプチドであり、さらに

B₁は、スレオニン、アラニン又はスレオニン-アルギニン-アルギニントリペプチドから成る群から選択される。

50

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施態様にしたがえば、インスリンポリペプチドは、配列 $R_{23}-R_{24}-X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVX_{33}X_{34}LYLVCGX_{41}X_{42}GFX_{45}$ （配列番号：44）又は $R_{23}-R_{22}-HLCGSX_{30}LVEALYLVCGERGFF$ （配列番号：67）を有するB鎖、及び配列 $GIVX_4ECCX_8X_9SCDLX_{14}X_{15}LX_{17}X_{18}X_{19}CX_{21}-R_{13}$ （配列番号：68）を有するA鎖を含み、式中、

X_4 はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、

X_8 はヒスチジン、スレオニン又はフェニルアラニンであり、

X_9 はアルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンあり、

X_{14} はアルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X_{15} 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、

X_{17} はグルタミン又はグルタミン酸であり、

X_{18} 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、

X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{21} 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、

X_{22} 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、

X_{25} はヒスチジン又はスレオニンであり、

X_{29} アラニン及びグリシ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、グルタミン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、リジン、オルニチ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、 $X_{22}VNQ$ （配列番号：101）、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、グルタミン及び結合から成る群から選択され、

R_{23} は、N-末端アルファアミン又は $X_{60}(X_{61}X_{62})dX_{63}K$ （配列番号：102）であり、式中、 X_{60} は、グリシン、グルタミン酸及びアスパラギン酸から成る群から選択され、 X_{61} 及び X_{62} は別個に、グルタミン酸及びアスパラギン酸から成る群から選択され、 X_{63} はアルギニン、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、 d は1-3から選択される整数であり、 R_{24} は、AYRPSE（配列番号：46）、PGPE（配列番号：48）、トリペプチドのグリシン-プロリン-グルタミン酸、ジペプチドのプロリン-グルタミン酸、グルタミン、グルタミン酸及び結合から成る群から選択され、さらに R_{13} は $COOH$ 又は $CONH_2$ である。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施態様にしたがえば、A鎖は、配列 $GIVEQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ （配列番号：49）又は $GIVDECCX_8X_9SCDLX_{14}X_{15}LX_{17}X_{18}X_{19}CX_{21}-R_{13}$ （配列番号：50）を含み、B鎖は、配列 $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVX_{33}X_{34}LYLVCGDX_{42}GFX_{45}$ （配列番号：51）を含み、式中、

X_8 はヒスチジン又はフェニルアラニンであり、

X_9 及び X_{14} は別個に、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンから選択され、

X_{15} はアルギニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり、

X_{17} はグルタミン酸又はグルタミンであり、

X_{18} はメチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、

X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X_{23} はアスパラギン又はグリシンであり、

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} 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、ホモシステイン酸又は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_{42} はアラニン、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され、
 X_{45} はチロシンであり、さらに
 R_{13} はCOOH又はCONH₂である。ある実施態様では、n及びkの少なくとも一方は1である。

【 0 1 3 5 】

さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVDECCHX₉SCDLX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈ X₁₉CX₂₁-R₁₃ (配列番号：50)を含み、B鎖は配列X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGDX₄₂GFX₄₅ (配列番号：51)を含み、式中、

X_9 及び X_{14} は別個に、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンから選択され、
 X_{15} はアルギニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり、
 X_{17} 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、

X_{18} はメチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、
 X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、
 X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、
 X_{23} はアスパラギン又はグリシンであり、

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} 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、ホモシステイン酸又は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_{42} はアラニン、リジン、オルニチ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、さらに

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVDECCHX₉SCDLX₁₄X₁₅LX₁₇MX₁₉CX₂₁-R₁₃ (配列番号：52)を含み、B鎖は配列X₂₅LCGAX₃₀LVDALYLVC GD X₄₂GFX₄₅ (配列番号：53)を含み、式中

X_9 、 X_{14} 及び X_{15} は別個にオルニチン、リジン又はアルギニンであり、
 X_{17} はグルタミン酸又はグルタミンであり、
 X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、
 X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X_{25} はヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、
 X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、
 X_{42} はアラニン、リジン、オルニチ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、さらに

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

ある実施態様では、B鎖は、HLCGAELVDALYLVC GD X₄₂GFY (配列番号：54)、GPEHLCAELVDALYLVC GD X₄₂GFY (配列番号：55)、GPEHLCAELVDALYLVC GD X₄₂GFYFNPKT (配列番号：57)及びGPEHLCAELVDALYLVC GD X₄₂GFYFNPKT (配列番号：57)から成る群から選択され、式中、 X_{42} はオルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択される。

さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVDECCHX₉SCDLX₁₄X₁₅LQMYCN-R₁₃ (配列番号：18)を含み、式中 X_9 、 X_{14} 及び X_{15} は別個にオルニチン、リジン又はアルギニンである。

【 0 1 3 6 】

ある実施態様では、一般式IB-LM-IAを含むインスリン単鎖アナログが提供され、式中、IBは、HLCGAELVDALYLVC GD X₄₂GFY (配列番号：54)、GPEHLCAELVDALYLVC GD X₄₂GFY (配

列番号：55）、GPEHLCGAELVDALYLVC GD₄₂GFYFNPKT（配列番号：56）及びGPEHLCGAELVDALYLVC GD₄₂GFYFNPKT（配列番号：57）から成る群から選択され、LMは、GAGSSSX₅₇RAPQT（配列番号：18）、GYGSSSX₅₇R（配列番号：58）から成る群から選択される連結部分であり、IAはアミノ酸配列GIVDECCHX₉SCDLX₁₄X₁₅LQMYCN-R₁₃（配列番号：18）であり、式中、X₉、X₁₄、X₁₅、X₄₂及びX₅₇は別個にオルニチン、リジン又はアルギニンである。さらに別の実施態様では、連結部分はGYGSSSOR（配列番号：59）である。

ある実施態様では、B鎖は、HLCGAELVDALYLVC GD₆₀GFY（配列番号：60）、GPEHLCGAELVDALYLVC GD₆₀GFY（配列番号：61）、GPEHLCGAELVDALYLVC GD₆₀GFYFNPKT（配列番号：62）及びGPEHLCGAELVDALYLVC GD₆₀GFYFNPKT（配列番号：63）から成る群から選択され、A鎖はGIVDECCHX₉SCDLX₁₄X₁₅LQMYCN-R₁₃（配列番号：64）であり、式中、X₁₉はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンである。

10

【0137】

インスリンポリペプチドのPEG化

驚くべきことに、出願人らは、親水性部分を本明細書に開示するインスリン単鎖アナログに共有結合により連結することによって、活性のより遅い開始、持続時間の延長を有しさらに基本的活性プロフィールを示すアナログが提供されることを見出した。ある実施態様では、本明細書に開示するインスリンポリペプチド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み、前記親水性部分は、A鎖のA9、A14及びA15から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖、又はB鎖のN-末端アルファアミン（例えばインスリン系B鎖のためのB1位又はIGF-1系B鎖のためのB2位）、又はB鎖のB1、B2、B10、B22、B28若しくはB29位のアミノ酸の側鎖、又は単鎖アナログのA鎖及びB鎖を連結する連結部分の任意の位置に連結される。例示的实施態様では、この親水性部分は、これらの位置のいずれかのLys、Cys、Orn、ホモシステイン又はアセチル-フェニルアラニン残基に共有結合により連結される。ある実施態様では、親水性部分は連結部分のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結される。

20

【0138】

例示的な親水性部分には、ポリエチレングリコール（PEG）、例えば分子量が約1,000ダルトンから約40,000ダルトン、又は約20,000ダルトンから約40,000ダルトンのものが含まれる。追加される適切な親水性部分には、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-又はアリーロキシ-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-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、プロプロピレングリコールホモポリマー（PEG）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（Ficoll）又はデキストラン並びに前記の混合物が含まれる。

30

40

【0139】

親水性部分、例えばいくつかの実施態様にしたがえばポリエチレングリコールは、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。さらに他の例示的な実施態様では、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、親水性部分、例えばPEGは約20,000ダルトンの分子量を有する。ある実施態様では、1つ以上のアミノ酸がPEG化され、共有結合により連結されるPEG鎖の合計分子量が約20,000ダルトンであるインスリンポリペプチドが提供される。

50

ある実施態様では、親水性部分としてデキストランが用いられる。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1kDから約100kD、又は約5、10、15若しくは20kDから約20、30、40、50、60、70、80若しくは90kD）で入手できる。

直鎖又は分枝ポリマーが意図される。複合物の生成調製物は本質的に単分散又は多分散が可能で、ペプチド当たり約0.5、0.7、1、1.2、1.5又は2ポリマーを有し得る。

【0140】

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、前記は場合によって、A鎖のA9、A14及びA15から成る群から選択される位置、B鎖のB1、B2、B10、B22、B28若しくはB29位のアミノ酸の側鎖、B鎖のN-末端アルファアミン、又はA鎖及びB鎖を連結する連結部分の任意の位置（例えば単鎖アナログのC8位を含む）に連結される。ある実施態様では、インスリン単鎖アナログは8から12アミノ酸のペプチド連結部分を含み、該連結部分のアミノ酸の1つがその側鎖に共有結合したポリエチレン鎖を有する。ある実施態様では、インスリン単鎖アナログは8から12アミノ酸のペプチド連結部分を含み、該連結部分のアミノ酸はPEG化され、A鎖のA9、A14及びA15から成る群から選択される位置、B鎖のB1、B2、B10、B22、B28又はB29位の1つ以上のアミノ酸もまたPEG化される。ある実施態様では、共有結合により連結されるPEG鎖の全分子量は約20,000ダルトンである。

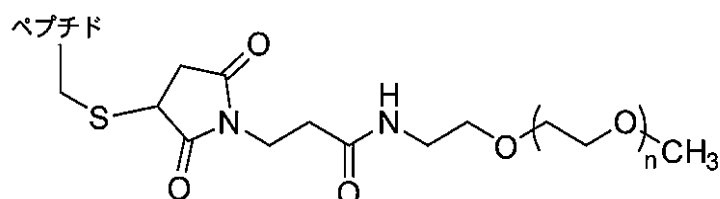
【0141】

親水性部分（例えばポリエチレングリコール）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ポリペプチドに添付することができる。当業界で公知の任意の手段を用いることができ、前記手段には、アシル化、還元アルキル化、ミカエル添加、チオールアルキル化又は他の化学選択的共役/結合方法（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）から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）を介する）が含まれる。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、アジジリン、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添付される場合は、選択されるポリマーは、ポリマー化度を制御できるように単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。

本発明の具体的な特徴では、チオールを有するインスリンポリペプチドのアミノ酸残基が親水性部分（例えばPEG）により改変される。いくつかの実施態様では、チオールはミカエル添加反応でマレイミド活性化PEGにより改変されて、下記に示すチオエーテル結合を含むPEG化ペプチドを生じる：

【0142】

【化39】

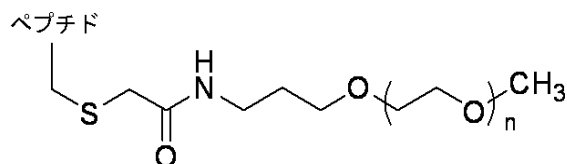


【0143】

いくつかの実施態様では、チオールはハロアセチル-活性化PEGにより求核置換反応で改変されて、下記に示すチオエーテル結合を含むPEG化ペプチドを生じる：

【 0 1 4 4 】

【 化 4 0 】



10

【 0 1 4 5 】

インスリンポリペプチドのアシル化

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドは改変されてアシル基を含む。アシル基は、インスリンポリペプチドのアミノ酸に直接的に、又はインスリンポリペプチドのアミノ酸にスペーサーを介して間接的に共有結合により連結でき、該スペーサーはインスリンポリペプチドのアミノ酸とアシル基との間に存在する。インスリンポリペプチドは、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できる。例えば、アシル化は、A又はB鎖の任意のアミノ酸を含む任意の位置とともに連結部分内の位置でも生じ得るが、ただし非アシル化インスリンポリペプチドによって示される活性がアシル化時に維持されることを条件とする。非限定例には、A鎖のA14及びA15位、インスリン系B鎖のB1位、又はIGF-1系B鎖のB2位、B鎖のB10、B22、B28若しくはB29位、又は単鎖インスリンアナログの連結部分の任意の位置におけるアシル化が含まれる。

20

【 0 1 4 6 】

本発明のある具体的な特徴では、インスリンポリペプチド（又はその誘導体若しくは複合物）は改変され、当該ポリ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を介して直接アシル化によってアシル基を含む。いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドは、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アシル化される。いくつかの実施態様では、アシル化は、B28又はB29位（自然のままのインスリンA及びB鎖配列のアミノ酸番号付けにしたがう）で生じる。これに関しては、A又はB鎖配列の1つ以上のアミノ酸置換によって改変されてあるインスリンポリペプチドを提供することができ、前記には、例えばA14、A15、B1、B2、B10、B22、B28若しくはB29位（自然のままのインスリンA及びB鎖配列のアミノ酸番号付けにしたがう）、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有する連結部分の任意の位置の置換が含まれる。本発明のいくつかの具体的な実施態様では、インスリンポリペプチドの直接アシル化は、B28又はB29位（自然のままのインスリンA及びB鎖配列のアミノ酸番号付けにしたがう）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。

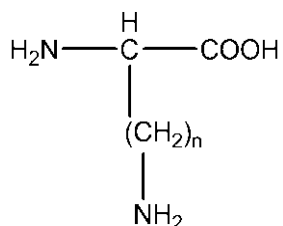
30

【 0 1 4 7 】

ある実施態様では、インスリンポリペプチドは下記式Iのアミノ酸を含み：

【 0 1 4 8 】

【 化 4 1 】



40

【 0 1 4 9 】

式中、n = 1から4である。

[式 I]

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

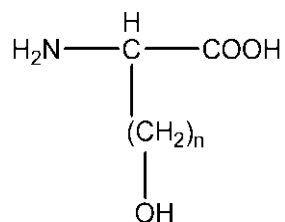
50

アミノ酸である。

別の実施態様では、インスリンポリペプチドは下記式IIのアミノ酸を含み：

【0150】

【化42】



10

【0151】

式中、 $n=1$ から4である。

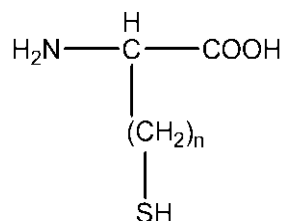
[式II]

いくつかの例示的な実施態様では、式IIのアミノ酸は、 n が1 (Ser) のアミノ酸である。

さらに別の実施態様では、インスリンポリペプチドは下記式IIIのアミノ酸の側鎖チオールを含み：

【0152】

【化43】



20

【0153】

式中、 $n=1$ から4である。

[式III]

いくつかの例示的な実施態様では、式IIIのアミノ酸は、 n が1 (Cys) のアミノ酸である。

30

【0154】

さらにまた別の実施態様では、インスリンポリペプチドは二置換アミノ酸を含み、前記アミノ酸は、式I、式II又は式IIIと同じ構造を含むが、ただし、式I、式II又は式IIIのアミノ酸のアルファ炭素と結合する水素は第二の側鎖に取り替えられている。

ある実施態様にしたがえば、アシル化インスリンポリペプチドは当該ペプチドとアシル基との間にスペーサーを含む。いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドはスペーサーと共有結合し、スペーサーはアシル基と共有結合する。いくつかの例示的な実施態様では、インスリンポリペプチドは改変され、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み、前記スペーサーは、B28又はB29位（自然のままのインスリンA及びB鎖配列のアミノ酸番号付けにしたがう）又はスペーサー部分の任意の位置のアミノ酸の側鎖に添付される。スペーサーが添付されるインスリンポリペプチドのアミノ酸は、スペーサーとの結合を許容する部分を含む任意のアミノ酸であり得る。例えば、側鎖-NH₂、-OH又は-COOHを含むアミノ酸（例えばLys、Orn、Ser、Asp又はGlu）が適切である。

40

【0155】

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドとアシル基との間のスペーサーは、側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含むアミノ酸（又は側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含むアミノ酸を含むジペプチド又はトリペプチド）である。いくつかの実施態様では、スペーサーは親水性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

50

サーは、例えば $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ を含むことができる。式中、 m は1から6の任意の整数で、 n は2から12の任意の整数であり、スペーサーは例えば8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸で、前記は、ペプチドインターナショナルズ社 (Peptides International, Inc., Louisville, KY) から市場で入手できる。ある実施態様では、親水性二官能性スペーサーは、2つ以上の反応基 (例えばアミン、ヒドロキシル、チオール及びカルボキシ基又は前記の任意の組み合わせ) を含む。ある種の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはアミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはチオール基及びカルボキシレートを含む。

【0156】

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドとアシル基との間のスペーサーは疎水性二官能性スペーサーである。疎水性二官能性スペーサーは当業界では公知である。例えば以下を参照されたい: Bioconjugate Techniques, G.T.Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996) (前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)。ある種の実施態様では、疎水性二官能性スペーサーは、2つ以上の反応基 (例えばアミン、ヒドロキシル、チオール及びカルボキシ基又は前記の任意の組み合わせ) を含む。ある種の実施態様では、疎水性二官能性スペーサーはヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、疎水性二官能性スペーサーはアミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、疎水性二官能性スペーサーはチオール基及びカルボキシレートを含む。カルボキシレート及びヒドロキシル基又はチオール基を含む適切な疎水性二官能性スペーサーは当業界で公知であり、例えば8-ヒドロキシオクタン酸及び8-メルカプトオクタン酸が含まれる。

【0157】

ある種の実施態様にしたがえば、二官能性スペーサーは合成又は天然に存在するアミノ酸であり、前記アミノ酸は、長さが3から10原子のアミノ酸骨格を含む (例えば6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸及び8-アミノオクタン酸)。また別には、スペーサーは、長さが3から10原子 (例えば6から10原子) のペプチド骨格を有するジペプチド又はトリペプチドであり得る。インスリンポリペプチドに添付されるジペプチド又はトリペプチドの各アミノ酸は、以下から成る群から別個に選択できる: 天然に存在するアミノ酸及び/又は天然に存在しないアミノ酸で、例えば以下を含む: 天然に存在するアミノ酸 (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr) のD若しくはL異性体、又は以下から成る群から選択される天然に存在しないアミノ酸のD若しくはL異性体: -アラニン (-Ala)、N-メチルアラニン (Me-Ala)、アミノ酪酸 (Abu)、-アミノ酪酸 (-Abu)、アミノヘキサン酸 (-Ahx)、アミノイソ酪酸 (Aib)、アミノメチルピロールカルボン酸、アミノピペリジンカルボン酸、アミノセリン (Ams)、アミノテトラヒドロピラン-4-カルボン酸、アルギニンN-メトキシ-N-メチルアミド、-アスパラギン酸 (-Asp)、アゼチジンカルボン酸、3-(2-ベンゾチアゾリル)アラニン、-tert-ブチルグリシン、2-アミノ-5-ウレイド-n-吉草酸 (シトルリン、Cit)、-シクロヘキシルアラニン (Cha)、アセトアミドメチルシステイン、ジアミノブタン酸 (Dab)、ジアミノプロピオン酸 (Dpr)、ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)、ジメチルチアゾリジン (DMTA)、-グルタミン酸 (-Glu)、ホモセリン (Hse)、ヒドロキシプロリン (Hyp)、イソロイシンN-メトキシ-N-メチルアミド、メチル-イソロイシン (MeIle)、イソニペコチン酸 (Isn)、メチル-ロイシン (MeLeu)、メチル-リジン、ジメチル-リジン、トリメチル-リジン、メタノプロリン、メチオニン-スルホキシド (Met(O))、メチオニン-スルホン (Met(O₂))、ノルロイシン (Nle)、メチル-ノルロイシン (Me-Nle)、ノルバリン (Nva)、オルニチン (Orn)、パラ-アミノ安息香酸 (PABA)、ペニシラミン (Pen)、メチルフェニルアラニン (MePhe)、4-クロロフェニルアラニン (Phe(4-Cl))、4-フルオロフェニルアラニン (Phe(4-F))、4-ニトロフェニルアラニン (Phe(4-NO₂))、4-シアノフェニルアラニン (Phe(4-CN))、フェニルグリシン (Phg)、ピペリジニルアラニン、ピペリジニルグリシン、3,4-ジヒドロブ

10

20

30

40

50

ロリン、ピロリジニルアラニン、サルコシン (Sar)、セレノシステイン (Sec)、U-ベンジル-ホスホセリン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸 (Sta)、4-アミノ-5-シクロヘキシル-3-ヒドロキシペンタン酸 (ACHPA)、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸 (AHPPA)、1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボン酸 (Tic)、テトラヒドロピラングリシン、チエニルアラニン (Thi)、U-ベンジル-ホスホチロシン、O-ホスホチロシン、メトキシチロシン、エトキシチロシン、O-(ビス-ジメチルアミノ-ホスホノ)-チロシン、チロシンスルフェートテトラブチルアミン、メチル-バリン (MeVal)、1-アミノ-1-シクロヘキサカルボン酸 (Acx)、アミノ吉草酸、ベータ-シクロプロピルアラニン (Cpa)、プロパルギルグリシン (Prg)、アリルグリシン (Alg)、2-アミノ-2-シクロヘキシル-プロパン酸 (2-Cha)、タルトブチルグリシン (Tbg)、ビニルグリシン (Vg)、1-アミノ-1-シクロプロパンカルボン酸 (Acp)、1-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸 (Acpe)、アルキル化3-メルカプトプロピオン酸、1-アミノ-1-シクロブタンカルボン酸 (Acb)。いくつかの実施態様では、ジペプチドスペーサーは、Ala-Ala、-Ala - -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、アミノ酪酸 - -アミノ酪酸、及び -Glu- -Gluから成る群から選択される。

【0158】

インスリンポリペプチドは改変され、長鎖アルカンのアシル化によってアシル基を含むことができる。具体的な特徴では、長鎖アルカンはアミン、ヒドロキシル又はチオール基 (例えばオクタデシルアミン、テトラデカノール及びヘキサデカンチオール) を含み、前記はインスリンポリペプチドのカルボキシル基又はその活性化型と反応する。インスリンポリペプチドのカルボキシル基又はその活性化型は、インスリンポリペプチドのアミノ酸 (例えばグルタミン酸、アスパラギン酸) の側鎖の部分であるか、又はペプチド骨格の部分であり得る。

ある種の実施態様では、インスリンポリペプチドに添付されるスペーサーによる長鎖アルカンのアシル化によってアシル基を含むように、インスリンポリペプチドは改変される。具体的な特徴では、長鎖アルカンは、スペーサーのカルボキシル基又はその活性化型と反応するアミン、ヒドロキシル又はチオール基を含む。カルボキシル基又はその活性化型を含む適切なスペーサーは本明細書に記載され、前記には、例えば二官能性スペーサー、例えばアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能性スペーサー及び疎水性二官能性スペーサーが含まれる。本明細書で用いられるように、“カルボキシル基の活性化型” という用語は、一般式 $R(C=O)X$ を有するカルボキシル基を指す (式中、Xは脱離基であり、Rはインスリンポリペプチド又はスペーサーである)。例えば、カルボキシル基の活性化型には、アシルクロリド、無水物及びエステルが含まれるが、ただしこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、活性化カルボキシル基はN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 脱離基を有するエステルである。

【0159】

本発明のこれらの特徴 (長鎖アルカンがインスリンポリペプチドのペプチド又はスペーサーによってアシル化される) に関して、長鎖アルカンは任意のサイズで、任意の長さの炭素鎖を含み得る。長鎖アルカンは直鎖でも分枝鎖でもよい。ある種の特徴では、長鎖アルカンは C_4 から C_{30} アルカンである。例えば長鎖アルカンは、 C_4 アルカン、 C_6 アルカン、 C_8 アルカン、 C_{10} アルカン、 C_{12} アルカン、 C_{14} アルカン、 C_{16} アルカン、 C_{18} アルカン、 C_{20} アルカン、 C_{22} アルカン、 C_{24} アルカン、 C_{26} アルカン、 C_{28} アルカン又は C_{30} アルカンのいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、長鎖アルカンは C_8 から C_{20} アルカン、例えば C_{14} アルカン、 C_{16} アルカン又は C_{18} アルカンを含む。

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドのアミン、ヒドロキシル又はチオール基はコレステロール酸でアシル化される。具体的な実施態様では、ペプチドは、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) を介してコレステロール酸に連結される。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: 377-382, 1996; Shimohigashi and Stammer, I

10

20

30

40

50

nt J Pept Protein Res 19: 54-62, 1982 ; 及びPreviero et al., Biochim Biophys Acta 263: 7-13, 1972 (ヒドロキシル介するアシル化の方法) ; 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) ; Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pp.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.

【 0 1 6 0 】

インスリンポリペプチドのアシル化ペプチドのアシル基は任意のサイズ、例えば任意の長さの炭素鎖が可能であり、直鎖でも分枝鎖でもよい。本発明のいくつかの具体的な実施態様では、アシル基は C_4 から C_{30} 脂肪酸である。例えばアシル基は C_4 脂肪酸、 C_6 脂肪酸、 C_8 脂肪酸、 C_{10} 脂肪酸、 C_{12} 脂肪酸、 C_{14} 脂肪酸、 C_{16} 脂肪酸、 C_{18} 脂肪酸、 C_{20} 脂肪酸、 C_{22} 脂肪酸、 C_{24} 脂肪酸、 C_{26} 脂肪酸、 C_{28} 脂肪酸又は C_{30} 脂肪酸のいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、アシル基は C_8 から C_{20} 脂肪酸、例えば C_{14} 脂肪酸又は C_{16} 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。該胆汁酸は任意の適切な胆汁酸でよい。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。

本明細書に記載するアシル化インスリンポリペプチドはさらに改変され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する方法のいずれか) によって達成できる。いくつかの実施態様では、アシル化単鎖アナログはCys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheから成る群から選択されるアミノ酸を含み、前記アミノ酸の側鎖が親水性部分 (例えばPEG) と共有結合される。ある実施態様では、アシル基は、A14、A15、B1位 (インスリン系B鎖のため) 、B2位 (IGF-1系B鎖のため) 、B10、B22、B28又はB29 (自然のままのインスリンのA及びB鎖の番号付けにしたがう) に、場合によってCys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheを含むスペーサーを介して添付される。

また別には、アシル化インスリンポリペプチドは、アシル化されかつ親水性部分を含むように改変されたスペーサーを含む。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。

【 0 1 6 1 】

インスリンポリペプチドのアルキル化

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドは改変されてアルキル基を含む。アルキル基は、インスリンポリペプチドのアミノ酸に直接的に、又はインスリンポリペプチドのアミノ酸にスペーサーを介して間接的に共有結合により連結でき、該スペーサーはインスリンポリペプチドのアミノ酸とアルキル基との間に存在する。アルキル基は、エーテル、チオエーテル又はアミノ結合を介してインスリンポリペプチドに添付できる。例えば、インスリンポリペプチドは、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ルキル化できる。アルキル化はインスリンポリペプチド内の任意の位置で実施でき、前記には例えばB鎖のC-末端領域又は連結部分内の位置が含まれるが、ただしインスリン活性が維持されることを条件とする。本発明の具体的な特徴では、インスリンポリペプチドは、当該ポリ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ルキル化によりアルキル基を含むように改変される。いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドは、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ルキル化される。本発明のいくつかの具体的な実施態様では、インスリンポリペプチドの直接アルキル化は、A14、A15、B1位 (インスリン系B鎖のため) 、B2位 (IGF-1系B鎖のため) 、B10、B22、B28又はB29位 (自然のままのインスリンのA及びB鎖の番号付けにしたがう) 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。

【0162】

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドのアミノ酸は、式I、式II及び式IIIから選択されるアミノ酸を含み、アルキル基は、それぞれ式I、式II及び式IIIに含まれるアミノ、ヒドロキシル又はチオール基を介して連結される。いくつかの例示的实施態様では、式Iのアミノ酸は、 n が4 (Lys) 又は n が3 (Orn) のアミノ酸である。いくつかの例示的实施態様では、式IIのアミノ酸は、 n が1 (Ser) のアミノ酸である。いくつかの例示的实施態様では、式IIのアミノ酸は、 n が1 (Cys) のアミノ酸である。さらにまた他の実施態様では、側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含むインスリンポリペプチドのペプチドのアミノ酸は式I、式II又は式IIIと同じ構造を含む二置換アミノ酸であるが、ただし式I、式II又は式IIIのアミノ酸のアルファ炭素と結合する水素は第二の側鎖に取り替

10

【0163】

本発明のいくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドは当該ペプチドとアルキル基との間にスペーサーを含む。いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドはスペーサーと共有結合し、スペーサーはアルキル基と共有結合する。

いくつかの例示的实施態様では、インスリンポリペプチドは改変され、スペーサーのアミン、ヒドロキシル又はチオールのアルキル化によってアルキル基を含み、前記スペーサーは、A14、A15、B1位 (インスリン系B鎖のため)、B2位 (IGF-1系B鎖のため)、B10、B22、B28又はB29位 (自然のままのインスリンのA及びB鎖の番号付けにしたがう) のアミノ酸の側鎖に添付される。スペーサーが添付されるインスリンポリペプチドのアミノ酸は、スペーサーとの結合を許容する部分を含む任意のアミノ酸 (例えば、 α -置換アミノ酸又は β -置換アミノ酸) であり得る。側鎖-NH₂、-OH又は-COOHを含むインスリンポリペプチドのアミノ酸 (例えばLys、Orn、Ser、Asp又はGlu) が適切である。いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドのペプチドとアルキル基との間のスペーサーは、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又はトリペプチドである。

20

【0164】

アルファアミンがアルキ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得る。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であり得る。また別には、スペーサーアミノ酸は酸性残基 (例えばAsp及びGlu) であり得る。例示的な実施態様では、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、6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノオクタン酸であり得る。また別には、スペーサーアミノ酸は酸性残基、例えばAsp、Gluであり得るが、ただしアルキル化は酸性残基のアルファアミンで生じることを条件とする。スペーサーアミノ酸の側鎖アミンがアルキ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、スペーサーのアルファアミン及び側鎖アミンの双方がアルキル化され、したがってペプチドは二アルキル化され得る。本発明の実施態様はそのような二アルキル化分子を含む。

30

アルキル化がスペーサーのアミノ酸のヒドロキシル基を介して生じるとき、スペーサーのアミノ酸又はスペーサーの複数のアミノ酸の1つは式IIのアミノ酸であり得る。具体的な例示的实施態様では、アミノ酸はSerである。アルキル化がスペーサーのアミノ酸のチオール基を介して生じるとき、スペーサーのアミノ酸又はスペーサーの複数のアミノ酸の1つは式IIIのアミノ酸であり得る。具体的な例示的实施態様では、アミノ酸はCysである。

40

【0165】

いくつかの実施態様では、スペーサーは親水性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NH₂(CH₂CH₂O) _{n} (CH₂) _{m} COOHを含むことができる。式中、 m は1から6の任意の整数で、 n は2から12の任意の整数であり、スペーサーは例えば8-アミノ-3

50

,6-ジオキサオクタン酸で、前記は、ペプチドインターナショナルズ社 (Louisville, KY) から市場で入手できる。いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドのペプチドとアルキル基との間のスペーサーは親水性二官能性スペーサーである。ある種の実施態様では、親水性二官能性スペーサーは、2つ以上の反応基（例えばアミン、ヒドロキシル、チオール及びカルボキシ基又は前記の任意の組み合わせ）を含む。ある種の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはアミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはチオール基及びカルボキシレートを含む。

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドとアシル基との間のスペーサーは疎水性二官能性スペーサーである。ある種の実施態様では、疎水性二官能性スペーサーは、2つ以上の反応基（例えばアミン、ヒドロキシル、チオール及びカルボキシ基又は前記の任意の組み合わせ）を含む。ある種の実施態様では、疎水性二官能性スペーサーはヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、疎水性二官能性スペーサーはアミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、疎水性二官能性スペーサーはチオール基及びカルボキシレートを含む。カルボキシレート及びヒドロキシル基又はチオール基を含む適切な疎水性二官能性スペーサーは当業界で公知であり、例えば8-ヒドロキシオクタン酸及び8-メルカプトオクタン酸が含まれる。

【0166】

スペーサー（例えばアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能性スペーサー又は疎水性二官能性スペーサー）は、長さが3から10原子である（例えば6から10原子、例えば6、7、8、9又は10原子）。より具体的な実施態様では、スペーサーは長さが約3から10原子（例えば6から10原子）であり、アルキルは C_{12} から C_{18} アルキル基、例えば C_{14} アルキル基、 C_{16} アルキル基であり、したがってスペーサーとアルキル基の全長は14から28原子、例えば約14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27又は28原子である。いくつかの実施態様では、スペーサーとアルキル基の長さは17から28（例えば19から26、19から21）原子である。

ある実施態様にしたがえば、二官能性スペーサーは合成又は天然に存在するアミノ酸であり、長さが3から10原子のアミノ酸骨格を含む（例えば6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸及び8-アミノオクタン酸）。また別には、スペーサーは、長さが3から10原子（例えば6から10原子）のペプチド骨格を有するジペプチド又はトリペプチドであり得る。インスリンポリペプチドに添付されるジペプチド又はトリペプチドは、天然に存在するアミノ酸及び/又は天然に存在しないアミノ酸を含むことができ、前記には例えば本明細書に教示するアミノ酸のいずれかが含まれる。いくつかの実施態様では、スペーサーは全体的に陰性荷電を含み、例えば1つ以上の陰性荷電アミノ酸を含む。いくつかの実施態様では、ジペプチドスペーサーは、Ala-Ala、-Ala- -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、アミノ酪酸- -アミノ酪酸、及び -Glu- -Gluから成る群から選択される。ある実施態様では、ジペプチドスペーサーは -Glu- -Gluである。

【0167】

アミン、ヒドロキシル及びチオールを介するペプチドアルキル化の適切な方法は当業界で公知である。例えばウィリアムソンエーテル合成を用いて、インスリンペプチドとアルキル基の間でエーテル結合を形成できる。アルキルハライドによるペプチドの求核置換反応もまたエーテル、チオエーテル又はアミノ結合のいずれかをもたらす得る。インスリンポリペプチドのアルキル化ペプチドのアルキル基は任意のサイズ、例えば任意の長さの炭素鎖が可能で、直鎖でも分枝鎖でもよい。本発明のいくつかの実施態様では、アルキル基は C_4 から C_{30} アルキルである。例えばアルキル基は、 C_4 アルキル、 C_6 アルキル、 C_8 アルキル、 C_{10} アルキル、 C_{12} アルキル、 C_{16} アルキル、 C_{18} アルキル、 C_{20} アルキル、 C_{22} アルキル、 C_{24} アルキル、 C_{26} アルキル、 C_{28} アルキル又は C_{30} アルキルのいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、アルキル基は C_8 から C_{20} アルキル、例えば C_{14} アルキル又は C_{16} 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、胆汁酸のステロイド部分、例えばコ

10

20

30

40

50

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を含む。

【0168】

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドは、求核性長鎖アルカンをインスリンポリペプチドと反応させることによってアルキル基を含むように改変され、ここでインスリンポリペプチドは求核置換に適切な脱離基を含む。具体的な特徴では、長鎖アルカンの求核基は、アミン、ヒドロキシル又はチオール基（例えばオクタデシルアミン、テトラデカノール及びヘキサデカンチオール）を含む。インスリンポリペプチドの脱離基はアミノ酸の側鎖の部分であるか、又はペプチド骨格の部分であり得る。適切な脱離基には、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド、ハロゲン及びスルホネートエステルが含まれる。

10

ある種の実施態様では、インスリンポリペプチドは、求核性長鎖アルカンをインスリンポリペプチドに添付されたスペーサーと反応させることによってアルキル基を含むように改変され、ここでスペーサーは脱離基を含む。具体的な特徴では、長鎖アルカンはアミン、ヒドロキシル又はチオール基を含む。ある種の実施態様では、脱離基を含むスペーサーは本明細書で考察される任意のスペーサー、例えばアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能性スペーサー及び疎水性二官能性スペーサーであってさらに適切な脱離基を含む。

長鎖アルカンがインスリンポリペプチド又はスペーサーによってアルキル化されるとき、該長鎖アルカンは任意のサイズであり、任意の長さの炭素鎖を含むことができる。長鎖アルカンは直鎖又は分枝鎖であり得る。ある種の特徴では、長鎖アルカンはC₄からC₃₀アルカンである。例えば長鎖アルカンは、C₄アルカン、C₆アルカン、C₈アルカン、C₁₀アルカン、C₁₂アルカン、C₁₄アルカン、C₁₆アルカン、C₁₈アルカン、C₂₀アルカン、C₂₂アルカン、C₂₄アルカン、C₂₆アルカン、C₂₈アルカン又はC₃₀アルカンのいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、長鎖アルカンはC₈からC₂₀アルカン、例えばC₁₄アルカン、C₁₆アルカン又はC₁₈アルカンを含む。

20

【0169】

いくつかの実施態様では、アルキル化はまたインスリンポリペプチドとコレステロール部分との間で生じ得る。例えば、コレステロールのヒドロキシル基は長鎖アルカンの脱離基を追い出してコレステロール-インスリンペプチド生成物を形成する。本明細書に記載のアルキル化インスリンポリペプチド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する方法のいずれか）によって達成できる。いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドはCys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheから選択されるアミノ酸を含むことができ、前記アミノ酸の側鎖が親水性部分（例えばPEG）と共有結合される。ある実施態様では、アルキル基は、A14、A15、B1位（インスリン系B鎖のため）、B2位（IGF-1系B鎖のため）、B10、B22、B28又はB29（自然のままのインスリンのA又はB鎖の番号付けにしたがう）に、場合によってCys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheを含むスペーサーを介して添付され、さらに場合によって別のアミノ酸の側鎖に連結される親水性部分を含む。また別には、アルキル化インスリンポリペプチドは、アルキル化されかつ親水性部分を含むように改変されたスペーサーを含むことができる。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。

30

40

【0170】

複合物

いくつかの実施態様では、本明細書に記載するインスリンポリペプチドはグリコシル化され、アミド化され、カルボキシル化され、リン酸化され、エステル化され、N-アセチル化され、環化され（例えばジスルフィド架橋による）、又は塩（例えば酸付加塩、塩基付加塩）に変換され、及び/又は場合によって複合物化される。本開示はまた、インスリンポリペプチドが異種部分と連結されている複合物を包含する。インスリンポリペプチドと

50

異種部分との複合物化は、共有結合、非共有結合（例えば静電的相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、塩架橋、疎水性相互作用など）、又は両結合タイプにより生じ得る。多様な非共有結合的結合系を用いることができ、前記には以下が含まれる：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、又は互いに親和性を有する任意の結合パートナー若しくはそのフラグメント。いくつかの特徴では、共有結合はペプチド結合である。インスリンポリペプチドと異種部分との複合物化は間接的又は直接的複合物化が可能であり、前者はリンカー又はスペーサーを伴うことができる。適切なリンカー及びスペーサーは当業界では公知であり、記載されている任意のリンカー又はスペーサーが含まれる（ただしこれらに限定されない）。

10

【0171】

本明細書に用いられるように、“異種部分”という用語は“複合物の部分”という用語と同義語であり、前記部分が添付されるインスリンポリペプチドとは異なる任意の部分（化学的若しくは生化学的分子、天然に存在するか又は非コードの分子）を指す。インスリンポリペプチドと連結させ得る例示的な複合物の部分には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：異種ペプチド若しくはポリペプチド（例えば血漿タンパク質を含む）、標的照準薬剤、免疫グロブリン若しくはその部分（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、蛍光発光団若しくは酵素標識）、ポリマー（水溶性ポリマーを含む）、又は他の治療用若しくは診断用薬剤。いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチド及び血漿タンパク質を含む複合物が提供され、ここで血漿タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、フィブリノゲン及びグロブリンから成る群から選択される。いくつかの実施態様では、複合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、異種部分はアルブミンであり、前記には、例えばヒト血清アルブミン（HSA）及び組換えヒトアルブミン（rHA）のようなアルブミンが含まれる。いくつかの実施態様では、複合物は、インスリンポリペプチド及び以下の1つ以上を含む：ポリペプチド、核酸分子、抗体若しくはそのフラグメント、ポリマー、インスリンポリペプチド量子ドット、小分子、毒素、診断薬、炭水化物、アミノ酸。

20

【0172】

ポリマー異種部分

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドと複合物化される異種部分はポリマーである。いくつかの実施態様では、ポリマーは以下から成る群から選択される：ポリアミド、ポリカルボネート、ポリアルキレン及びその誘導体（ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレートを含む）、アクリル及びメタクリルエステルのポリマー（ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)及びポリ(オクタデシルアクリレート)を含む）、ポリビニルポリマー（ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリ(ビニルアセテート)及びポリビニルピロリドンを含む）、ポリグリ

コリド、ポリシロキサン、ポリウレタン及びそのコポリマー、セルロース（アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシエチルセルロース、セルローストリアセテート、セルローススルフェートナトリウム塩を含む）ポリプロピレン、ポリエチレン（ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、及びポリ(エチレンテレフタレート)を含む）並びにポリスチレン。

30

40

【0173】

50

いくつかの特徴では、ポリマーは、以下を含む生物分解性ポリマーである：合成の生物分解性ポリマー（例えば乳酸及びグリコール酸のポリマー、ポリ酸無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)及びポリ(ラクチド-コカプロラクトン)）、及び天然の生物分解性ポリマー、例えばアルギネート並びにデキストラン及びセルロースを含む他の多糖類、コラーゲン、前記の化学的誘導体(置換、化学基(例えばアルキル、アルキレン)の付加、ヒドロキシ化、酸化及び当業者によって日常的に実施される他の改変)、アルブミン及び他の親水性タンパク質(例えばゼイン及び他のプロラミン並びに疎水性タンパク質)、或いは前記の任意のコポリマー及び混合物。一般的に、これらの物質は、酵素的加水分解又はin vivoでの水への曝露によって表面又は全体の腐食により分解される。

10

いくつかの特徴では、ポリマーは、生物接着性ポリマー、例えば生物腐食性ヒドロゲル(下記文献に記載されている：H.S.Sawhney, C.P.Pathak and J.A.Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587(前記文献の教示は本明細書に含まれる))、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ酸無水物、ポリアクリル酸、アルギネート、キトサン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)及びポリ(オクタデシルアクリレート)である。

【0174】

20

いくつかの実施態様では、ポリマーは水溶性ポリマー又は親水性ポリマーである。親水性ポリマーは、本明細書で“親水性異種部分”の項目の下にさらに説明される。適切な水溶性ポリマーは当業界で公知であり、例えば以下が含まれる：ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC; Klucel)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC; Methocel)、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシプロピルブチルセルロース、ヒドロキシプロピルペンチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース(Ethocel)、ヒドロキシエチルセルロース、多様なアルキルセルロース及びヒドロキシアルキルセルロース、多様なセルロースエーテル、セルロースアセテート、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ビニルアセテート/クロトン酸コポリマー、ポリ-ヒドロキシアルキルメタクリレート、ヒドロキシメチルメタクリレート、メタクリル酸コポリマー、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、無水マレイン酸/メチルビニルエーテルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム及びカルシウム、ポリアクリル酸、酸性カルボキシポリマー、カルボキシポリメチレン、カルボキシビニルポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポリメチルビニルエーテルコ-マレイン酸無水物、カルボキシメチルアミド、メタクリル酸カリウムジビニルベンゼンコポリマー、ポリオキシエチレングリコール、ポリエチレングリコール並びにその誘導体、塩及び組合せ。

30

【0175】

ある実施態様では、ポリマーはポリアルキレングリコールであり、例えばポリエチレングリコール(PEG)が含まれる。いくつかの実施態様では、異種部分は炭水化物である。いくつかの実施態様では、炭水化物は、単糖類(例えばグルコース、ガラクトース、フラクトース)、二糖類(例えばシュクロース、ラクトース、マルトース)、オリゴ糖(例えばラフィノース、スタキオース)、多糖類(デンプン、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナン)である。

40

いくつかの実施態様では、異種部分は脂質である。脂質は、いくつかの実施態様では、脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミン、グリセロリピド(例えば、一、二、三置換グリセロール)、グリセロホスホリピド(例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホス

50

ファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン)、スフィンゴリピド(例えばスフィンゴシン、セラミド)、ステロールリピド(例えば、ステロイド、コレステロール)、プレノールリピド、サッカロリピド、又はポリケチド、油、ロウ、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質である。

【0176】

制御放出処方物

また別には、インスリンポリペプチドはデポー型に改変でき、したがって本開示の複合物が投与された体内に前記複合物が放出される態様を時間及び体内の位置について制御することができる(例えば米国特許4,450,150号を参照されたい)。本開示の複合物のデポー型は、例えば本開示の複合物及び多孔性又は無孔性物質(例えばポリマー)を含む移植可能な組成物であり、ここで、本開示の複合物は、該物質によって被包化されるか若しくは当該物質全体に拡散されるか、及び/又は該無孔物質の分解によって拡散される。該デポーは体内の所望の位置に移植され、本開示の複合物は該移植植物から予め定められた速度で放出される。

また別には、大きなデポーポリマーを、本明細書に記載のインスリンポリペプチドに共有結合させた自己切断ジペプチド成分に連結することができる。この実施態様では、該デポーポリマーは、その後で当該インスリンポリペプチドが非酵素反応を介して予め定めた速度で該単鎖アナログから切断されるまで該インスリンポリペプチドをその投与部位に効果的に隔離する。自己切断ジペプチドを用いるインスリンアナログのデポー処方物はPCT/US2009/068713に記載されている(前記文献の開示は参照により本明細書に含まれる)。ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグ成分を含むインスリンアナログが提供され、ここで、該ジペプチドプロドラッグ成分は大きなポリマー(例えばPEG又はデキストラン)に連結されるか、又はC18-C25炭化水素でアシル化される。ある実施態様では、大きなデポーポリマー(例えばPEGを含む)を含む自己切断ジペプチド成分は、インスリン単鎖アナログの連結部分のアミノ酸(例えば連結部分のC8位のアミノ酸を含む)の側鎖に連結される。

【0177】

単鎖アナログを含み、所望のin vivo放出プロフィールを有するように処方された医薬組成物を調製することができる。いくつかの特徴では、医薬組成物は即時放出、制御放出、持続放出、長期放出、遅延放出又は二相性放出処方物である。制御放出のためのペプチド又は複合物を処方する方法は当業界では公知である。例えば以下を参照されたい: J Pharm 374: 46-52, 2009; 及び国際特許出願公開WO 2008/130158; WO2004/033036; WO2000/032218; 及び1999/040942。本組成物はさらに、例えばミセル若しくはリポソーム又は他のいくつかの被包化形を含むことができ、また長期放出形で投与して延長貯蔵及び/又は延長デリバリー作用を提供することができる。本開示の医薬処方物は、例えば以下を含む任意のレジメンにしたがって投与できる: 毎日(1日1回、1日2回、1日3回、1日4回、1日5回、1日6回)、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月又は2カ月毎。

【0178】

インスリンポリペプチドのプロドラッグ誘導体

本開示はまた、本明細書に開示するインスリンポリペプチドのプロドラッグアナログを包含する。有利には、プロドラッグ処方物は、基礎ペプチドの治療インデックスを改善し、作用の開始を遅らせ、当該インスリンポリペプチドの半減期を高める。本開示のプロドラッグの化学反応は活性部位アミンとの化学的複合物化を生じてアミドを形成し、前記アミドは、ジケトピペラジン形成及びプロドラッグ成分の放出に際して親アミンに復帰することができる(国際特許出願PCT/US2009/068713を参照されたい(前記文献の開示は参照により本明細書に含まれる))。この新規な生物学的に好ましいプロドラッグ化学反応は、生理学的条件(例えば水性環境のpH約7、37)下で偶発的分解をもたらし、酵素分解に依存しない。プロドラッグアナログの持続時間はジペプチドプロドラッグ配列の選

折によって決定され、したがってプロドラッグ処方の融通性を高める。

ある実施態様では、非酵素性活性化の半減期 ($t_{1/2}$) が生理学的条件下で1から100時間であるプロドラッグが提供される。本明細書に開示の生理学的条件は、水性環境で約35から40 の温度及び約7.0から約7.4のpHを含み、より典型的にはpH7.2から7.4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、ジペプチド (生理学的条件下でジケトピペラジン形成を経ることができる) は、アミド又はエステル結合を介してインスリンポリペプチドと共有結合により連結される (国際出願WO2009/099763及びPCT/US2009/068713を参照されたい (前記文献の開示は参照により本明細書に含まれる))。

有利には、切断 (したがってプロドラッグの活性化) の速度は、ジペプチド前駆部分の構造及び立体化学とともに求核強度に左右される。本明細書に開示するプロドラッグは、最終的にはインスリン/IGF受容体によって認識され得る構造に化学的に変換され、この化学的変換速度は、*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。本出願に開示するプロドラッグの化学反応は、付け加えられる化学的添加剤又は酵素に左右されない分子内化学反応を必要とするであろう。変換速度は、ジペプチド置換基の化学的性質及び生理学的条件下での前記の切断によって制御される。生理学的な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、プロドラッグから薬剤への変換速度は高い患者内及び患者間再現性を示すであろう。

【0179】

本明細書に開示するように、インスリンポリペプチドが、少なくとも1時間、より典型的には20時間を超えるが100時間未満の延長半減期を有し、さらに固有の化学的不安定性によって駆動される非酵素性反応により生理学的条件で活性形に変換される、プロドラッグが提供される。ある実施態様では、プロドラッグの非酵素性活性化の $t_{1/2}$ 時間は、1 - 100時間、より典型的には12から72時間であり、ある実施態様では、リン酸緩衝溶液 (例えばPBS) にて37 及びpH7.2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、 $t_{1/2}$ は24 - 48時間である。ある実施態様では、プロドラッグの半減期は約1、8、12、20、24、48又は72時間である。ある実施態様では、プロドラッグの半減期は約100時間以上で、約168、336、504、672又は720時間までの半減期を含み、固有の化学的不安定性によって駆動される非酵素性反応により生理学的条件で活性形に変換される。多様なプロドラッグの半減期は、式 $t_{1/2} = 0.693/k$ (式中、 k は当該プロドラッグの分解に関する一次速度定数である) を用いて計算される。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フォリン及び活性インスリンポリペプチドの形成後に生じる。

【0180】

別の実施態様では、ジペプチドプロドラッグ成分はアミド結合を介してインスリンポリペプチドに共有結合され、該ジペプチドはさらにジペプチドに連結されたデポーポリマーを含む。ある実施態様では、2つ以上のデポーポリマーがジペプチド成分に連結される。ある実施態様では、デポーポリマーは、ジペプチドプロドラッグ成分を含むアミノ酸の1つの側鎖に連結される。デポーポリマーは、生物適合性であるように、さらにジペプチドの共有結合による添付によって改変されたインスリンポリペプチドが注射部位に隔離され続け、及び/又は患者への投与時にその対応する受容体と相互作用できないように十分なサイズを有するように選択される。その後のジペプチドの切断によって、インスリンポリペプチドは放出されその目的とする標的と相互作用する。ジペプチド成分保持デポーは、そのインスリンポリペプチドの都合のよい任意のアミン基によるアミド結合を介して当該インスリンポリペプチドに連結され得る。前記アミンには、インスリンポリペプチドのN-末端アミン又は内部の天然若しくは合成アミノ酸のアミン保持側鎖が含まれる。ある実施態様では、ジペプチド成分保持デポーは、当該単鎖アナログのN-末端アルファアミン又はA19位に存在する4-アミノフェニルアラニンのアミノ基に連結される。

【0181】

ある実施態様にたとえば、デポーポリマーは当業者に公知の生物適合ポリマーから選択される。該デポーポリマーは、典型的には約20,000から120,000ダルトンの範囲から選

10

20

30

40

50

扱われるサイズを有する。ある実施態様では、デポーポリマーは、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、デポーポリマーは、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。適切なデポー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、ポリアミン、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、スクシネート、ポリ(マレイン酸)、ポリ(アミノ酸)、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、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含有コポリマーを含む）。ある実施態様では、デポーポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ酪酸、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、ある具体的な実施態様では、デポー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、デポーポリマーはポリエチレングリコールであり、ジペプチド成分に連結されるデポー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。

【0182】

生理学的条件下で分子内分解を促進して活性なインスリンポリペプチドを放出する、天然又は合成アミノ酸を含む具体的なジペプチドが確認された。該ジペプチドは、当該インスリンポリペプチドに存在するアミノ基に、又は当該インスリンポリペプチドにペプチド配列の改変によって導入されたアミノ基に（アミド結合を介して）連結できる。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（PP-IV）を含む）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、プロテアーゼの非存在下で切断反応を実施する場合と比較して、血清プロテアーゼの存在下で生理的条件を用いて該反応を実施するとき、生物活性ペプチドからのジペプチドプロドラッグ成分の切断速度は実質的には強化されない（例えば2倍より大きい）。したがって、（生理学的条件下でPBS中での）インスリンポリペプチドからのジペプチドプロドラッグ成分の切断半減期は、DPP-IVプロテアーゼを含む溶液でのインスリンポリペプチドからのジペプチドプロドラッグ成分の切断半減期の2倍、3倍、4倍又は5倍を超えない。ある実施態様では、DPP-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血清（ヒト血清を含む）である。

【0183】

ある実施態様にしたがえば、ジペプチドプロドラッグ成分は構造U-Bを含み、ここでUはアミノ酸又はヒドロキシシル酸であり、BはN-アルキル化アミノ酸である。ある実施態様では、U-Bの構造が選択され、ここで当該インスリンポリペプチドからのU-Bの化学的切断は、生理学的条件下のPBS中で約1から約720時間の間に少なくとも約90%が完了する。ある実施態様では、インスリンポリペプチドからのU-Bの化学的切断の半減期（ $t_{1/2}$ ）は、生理学的条件下のPBSで少なくとも約1時間から約1週間である。ある実施態様では、U、B又はU-Bが連結されるインスリンポリペプチドのアミノ酸は非コードアミノ酸である。いくつかの実施態様では、U及び/又はBはD立体異性体構造のアミノ酸である。いくつかの例示的な実施態様では、UはD立体異性体構造のアミノ酸であり、BはL立体異性体構造のアミノ酸である。いくつかの例示的な実施態様では、UはL立体異性体構造のアミノ酸であり、BはD立体異性体構造のアミノ酸である。いくつかの例示的な実施態様では、UはD立体異性体構造のアミノ酸であり、BはD立体異性体構造のアミノ酸である。ある実施態様では、BはN-アルキル化アミノ酸であるが、プロリンではない。ある実施態様では、アミノ酸BのN-アルキル基は C_1 - C_{18} アルキルであり、ある実施態様では、N-アルキル化基は C_1 - C_6 アルキルである。ある実施態様では、Uは、アルファ炭素で二置換を有するアミノ酸である。

【0184】

ある実施態様では、1つ以上のジペプチド成分は、B鎖のN-末端アミノ基又はインスリンポリペプチドに存在するアミノ酸の側鎖アミノ基から選択される1つ以上のアミノ基により形成されるアミド結合を介してインスリンポリペプチドに連結される。ある実施態様では、インスリンポリペプチドは2つのジペプチド成分を含み、ここで該ジペプチド成分は場合によってPEG化され、アルキル化され、アシル化され又はデボ-ポリマーに連結される。ある実施態様にしたがえば、該ジペプチド伸長部は、活性部位に又は活性部位近くに存在するリジン残基の側鎖アミンを介してインスリンポリペプチドと共有結合により連結される。ある実施態様では、ジペプチド伸長部は合成アミノ酸又は改変アミノ酸を介して添付され、ここで該合成アミノ酸又は改変アミノ酸は、ジペプチド伸長部の共有結合による添付に適切な官能基を提示する（例えばアミノ-フェニルアラニンの芳香族アミン）。ある実施態様にしたがえば、1つ以上のジペプチド成分は、B鎖のN-末端アミノ基、又は自然のままのインスリンのA19、B16又はB25位に対応する位置に存在する4-アミノ-フェニルアラニン残基の芳香族アミンの側鎖アミノ基から選択されるアミノ基で当該インスリンポリペプチドに連結される。

【0185】

出願人らは、A鎖の19位の本来のチロシンに代えて4-アミノフェニルアラニンアミノ酸部分の選択的挿入は、当該インスリンペプチドの効力の低下を生じることなく受け入れられ得ることを見出した。本明細書に開示のジペプチドプロドラッグ成分によるこの活性部位アミノ基のその後の化学的アミド化はインスリン受容体結合活性を劇的に低下させ、したがって適切なインスリンプロドラッグを提供する（図5参照、前記はインスリン(p-NH₂-F)^{A19}に匹敵し得る活性を有することが示されたIGF1Y¹⁶L¹⁷(p-NH₂-F)^{A19}アナログについてのデータを提供する（図3参照））。出願人らは、類似の改変をIGF^{B16B17}アナログペプチドに実施して、プロドラッグの化学反応のための適切な添付部位を提供できることを見出した。したがって、ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグ成分は、インスリン(p-NH₂-F)^{A19}又はIGF^{B16B17}インスリンポリペプチドのA19 4-アミノフェニルアラニンの芳香環にアミド結合を介して連結され、ここで当該ジペプチドのC-末端アミノ酸はN-アルキル化アミノ酸を含み、当該ジペプチドのN-末端アミノ酸は任意のアミノ酸である。また別の実施態様では、プロドラッグはN-末端アルファアミンにアミド結合を介して連結されるジペプチド成分を含み、ここでジペプチド成分の側鎖の1つはアシル化される。

【0186】

ある実施態様にしたがえば、インスリンポリペプチドプロドラッグ誘導体が提供され、前記誘導体は、B鎖のN-末端アルファアミン、又は自然のままのインスリンのA19、B16又はB25と対応する位置に存在するか若しくは連結部分に存在する4-アミノ-フェニルアラニン残基の芳香族アミンの側鎖アミノ基に、アミド結合を介して連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有するB鎖を含み、該ジペプチド成分の側鎖の1つはC18からC25炭化水素基でアシル化される。インスリンポリペプチドプロドラッグ誘導体は、自然のままのインスリンA鎖若しくは自然のままのIGF-1 A鎖、又は本明細書に開示の前記の任意のアナログを含むことができる。

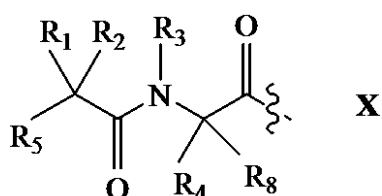
【0187】

ある実施態様にしたがえば、ジペプチドプロドラッグ成分は下記式Xの一般構造を含み

:

【0188】

【化44】



【0189】

式中、 R_1 、 R_2 、 R_4 及び R_8 は別個に、 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) 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 はそれらが添付される原子と一緒に becoming C_3 - C_{12} シクロアルキル又はアリールを形成するか；又は R_4 及び R_8 はそれらが添付される原子と一緒に becoming C_3 - C_6 シクロアルキルを形成し；

R_3 は、 C_1 - C_{18} アルキル、(C_1 - C_{18} アルキル)OH、(C_1 - C_{18} アルキル)NH₂、(C_1 - C_{18} アルキル)SH、(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 、及び(C_1 - C_4 アルキル)(C_3 - 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、それらが結合する原子と一緒に becoming 4、5又は6員複素環式環を形成し；

R_5 はNHR₆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_2 は、それらが添付される原子と一緒に becoming 4、5又は6員複素環式環を形成し；さらに

R_7 は H 及びOHから成る群から選択される。ある実施態様では、プロドラッグ成分がインスリンポリペプチドのN-末端アルファアミンに連結され、さらに R_4 及び R_3 が、それらが添付される原子と一緒に becoming 4、5又は6員複素環式環を形成するとき、 R_1 及び R_2 の少なくとも1つは H 以外である。

【0190】

ある実施態様では、構造：IB-LM-IAを含むインスリンポリペプチドが提供され、式中、IBは、配列J-R₂₃R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFF(配列番号：65)を含み、LMは本明細書に開示する連結部分であり、IAは、配列GIVEQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃(配列番号：49)を含み、式中、

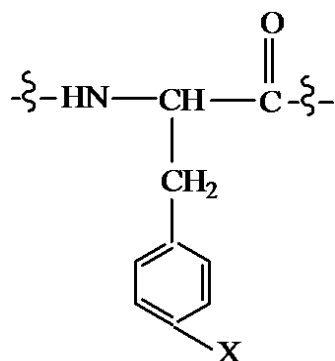
X_8 は、スレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され；

X_{17} は、グルタミン酸又はグルタミンであり；

X_{19} は、下記一般構造のアミノ酸であり(式中、XはOH又はNHR₁₀(R_{10} は、 H 又は一般構造U-B(Uはアミノ酸又はヒドロキシル酸で、BはN-アルキル化アミノ酸である)を含むジペプチド成分である)から成る群から選択される)；

【0191】

【化45】



【0192】

X_{23} はアスパラギン又はグリシンであり；

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；

R_{22} は、FVNQ(配列番号：47)、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-末端アルファアミンから成る群から選択され；さらに

R23は、結合又は1から6つの荷電アミノ酸を含むアミノ配列である。

【0193】

さらに別の実施態様では、B鎖は配列 X_{22} VNQX X_{25} LCGX X_{29} X X_{30} LVEALYLVCGERGFFYT-Z X_1 -B X_1 （配列番号：66）を含み、式中、

X X_{22} 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；

X 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 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 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；

Z X_1 は、アスパルテート-リジン、リジン-プロリン及びプロリン-リジンから成る群から選択されるジペプチドであり；さらに

B X_1 は、スレオニン、アラニン又はスレオニン-アルギニン-アルギニントリペプチドから成る群から選択される。

ある実施態様にしたがえば、構造：IB-LM-IAを含むインスリンポリペプチドが提供され、式中、IBは配列 X_{25} LCGX X_{29} X X_{30} LVEALYLVCGERGFF（配列番号：65）を含み、LMはIBをIAに共有結合により連結する本明細書に開示の連結部分であり、IAは配列GIVEQCCX X_8 SICSLYQLENX X_{19} CX X_{21} （配列番号：55）を含み、ここで、配列番号：65のC-末端フェニルアラニン残基は、介在アミノ酸を全く存在させることなく連結部分LMに直接共有結合される。

【0194】

ある実施態様では、構造：IB-LM-IAを含むインスリンポリペプチドが提供され、式中、IBは配列J-R X_{23} -R X_{22} -X X_{25} LCGX X_{29} X X_{30} LVX X_{33} X X_{34} LYLVCGDX X_{42} GFX X_{45} （配列番号：51）を含み、LMは本明細書に開示の連結部分であり、IAは配列GIVX X_4 ECCX X_8 SCDLX X_{14} X X_{15} LX X_{17} X X_{18} X X_{19} CX X_{21} -R X_{13} （配列番号：68）を含み、式中、

Jは、H又はU-Bの一般構造（Uはアミノ酸又はヒドロキシル酸であり、Bはアミド結合により連結されるN-アルキル化アミノ酸である）を含むジペプチド成分であり；

X X_4 は、アスパラギン酸又はグルタミン酸であり；

X X_8 は、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり；

X X_9 及びX X_{14} は、別個にアルギニン、オルニチン、リジン又はアラニンから選択され；

X X_{15} は、アルギニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり；

X X_{17} は、グルタミン酸又はグルタミンであり；

X X_{18} は、メチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり；

X X_{19} はチロシンであり；

X X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり；

R X_{22} は、共有結合、AYRPSE（配列番号：46）、グリシン-プロリン-グルタミン酸トリペプチド、プロリン-グルタミン酸ジペプチド及びグルタミン酸から成る群から選択され；

R X_{23} は、結合又は1から6つの荷電アミノ酸を含むアミノ酸配列であり；

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

X X_{45} はチロシンであり；さらに

R X_{13} は、COOH又はCONH X_2 である。

【0195】

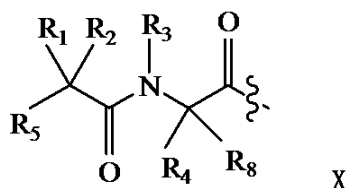
ジペプチドプロドラッグ成分

ジペプチドプロドラッグ成分の置換基及びインスリンポリペプチドへのその添付部位を

選択して、本明細書に開示するインスリンポリペプチドのプロドラッグアナログについて所望の半減期を提供できる。例えば、下記構造を含むジペプチドプロドラッグ成分がインスリンポリペプチドB鎖のN-末端アミノ酸のアルファアミノ基に連結されるとき、

【0196】

【化46】



10

【0197】

生理学的条件下のPBS中で約1時間の $t_{1/2}$ を有する化合物が以下の場合に提供される：

R_1 及び R_2 は別個に C_1 - C_{18} アルキル又はアリールであるか、又は R_1 及び R_2 は $-(CH_2)_p$ (式中 p は2-9である)により連結され；

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであり；

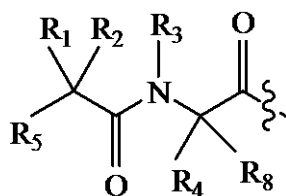
R_4 及び R_8 は各々水素であり；さらに

R_5 はアミンである。

他の実施態様では、N-末端で連結され、さらに約1時間の $t_{1/2}$ を有するプロドラッグは、下記構造を有するジペプチドプロドラッグ成分を含む：

【0198】

【化47】



20

【0199】

式中、 R_1 及び R_2 は、別個に C_1 - C_{18} アルキル又は $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール) R_7 であるか、又は R_1 及び R_2 は $-(CH_2)_p$ (式中 p は2-9である)により連結され；

30

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_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) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) OH 及びハロから成る群から選択され；さらに

R_8 はHである。

また別にある実施態様では、インスリンポリペプチドプロドラッグ誘導体が提供され、ここで該ジペプチドプロドラッグは、インスリンポリペプチドB鎖のN-末端アミノ酸のアルファアミノ基に連結され、さらに該プロドラッグは生理学的条件下のPBS中で約6から約24時間の $t_{1/2}$ を有する。ある実施態様では、生理学的条件下のPBS中で約6から約24時間の $t_{1/2}$ を有するインスリンポリペプチドプロドラッグ誘導体が提供され、ここで該プロドラッグ成分は式Xの構造を有し、さらに

40

R_1 及び R_2 は、別個に水素、 C_1 - C_{18} アルキル及びアリール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である)により連結され；

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 はそれらが添付される原子と一緒に4-12複素環式環を形成し；

R_4 及び R_8 は、別個に水素、 C_1 - C_8 アルキル及びアリールから選択され；さらに

R_5 はアミンであるが、ただし、 R_1 及び R_2 がともに水素ではないということはなく、 R_4 又は R_8 の1つは水素であることを条件とする。

50

【0200】

さらに別の実施態様では、インスリンポリペプチドプロドラッグ誘導体が提供され、ここで、ジペプチドプロドラッグは、インスリンポリペプチドB鎖のN-末端アミノ酸のアルファアミノ基に連結され、さらにプロドラッグは生理学的条件下のPBS中で約72から約168時間の $t_{1/2}$ を有する。ある実施態様では、生理学的条件下のPBS中で約72から約168時間の $t_{1/2}$ を有するインスリンポリペプチドプロドラッグ誘導体が提供され、ここでプロドラッグ成分は式Xの構造を有し、さらに

R_1 は、水素、 C_1 - C_8 アルキル及びアリールから成る群から選択され；

R_2 はH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；さらに

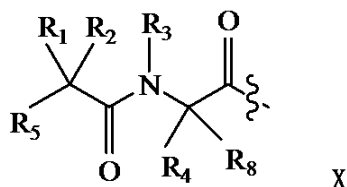
R_5 は、アミン又はN-置換アミン又はヒドロキシルであるが、ただし、 R_1 がアルキル又はアリールである場合、 R_1 及び R_5 はそれらが添付される原子と一緒にあって4 - 11複素環式環を形成することを条件とする。

【0201】

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドB鎖ペプチドのN-末端アルファアミノ酸に連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有し、さらに例えば約12から約72時間、又はいくつかの実施態様では約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成分を含み：

【0202】

【化48】



【0203】

式中、

R_1 及び R_2 は、別個に水素、 C_1 - C_{18} アルキル、(C_1 - C_{18} アルキル)OH、(C_1 - C_4 アルキル) NH_2 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るか、又は R_1 及び R_2 は(CH_2) $_p$ (式中 p は2 - 9である)により連結され；

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 はそれらが添付される原子と一緒にあって4 - 12複素環式環を形成し；

R_4 及び R_8 は、別個に水素、 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；

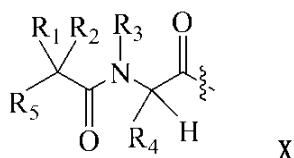
R_5 は NH_2 であり；さらに

R_7 は、H、 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)CONH $_2$ 、(C_0 - C_4 アルキル)COOH、(C_0 - C_4 アルキル) NH_2 、(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 及び R_2 がともに水素ではないということはなく、 R_4 又は R_8 の1つは水素であることを条件とする。

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドB鎖ペプチドのN-末端アミノ酸に連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有し、さらに例えば約12から約72時間、又はいくつかの実施態様では約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成分を含み：

【0204】

【化 4 9】



【 0 2 0 5】

式中、 R_1 及び R_2 は、別個に水素、 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である)により連結され；

R_3 は C_1 - C_8 アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 はそれらが添付される原子と一緒にあって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

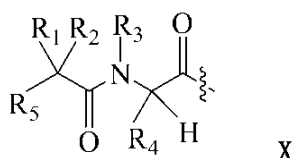
R_5 は NH_2 であるが；

ただし、 R_1 及び R_2 がともに水素ではないということはないことを条件とする。

他の実施態様では、インスリンポリペプチドB鎖ペプチドのN-末端アミノ酸に連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有し、さらに例えば約12から約72時間、又はいくつかの実施態様では約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成分を含み：

【 0 2 0 6】

【化 5 0】



【 0 2 0 7】

式中、 R_1 及び R_2 は、別個に水素、 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；

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

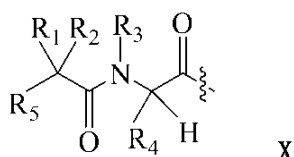
R_5 は NH_2 であるが；

ただし、 R_1 及び R_2 がともに水素ではないということはないことを条件とする。

いくつかの実施態様では、インスリンポリペプチドB鎖ペプチドのN-末端アミノ酸に連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有し、さらに例えば約12から約72時間、又はいくつかの実施態様では約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成分を含み：

【 0 2 0 8】

【化 5 1】



【 0 2 0 9】

式中、 R_1 及び R_2 は、別個に水素、 C_1 - C_8 アルキル、(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である)により連結され；

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；

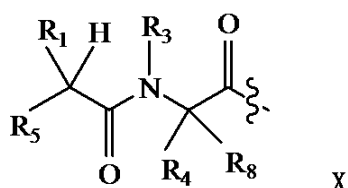
ただし、 R_1 及び R_2 がともに水素ではないということはないことを条件とする。

【0210】

さらにまた、インスリンポリペプチドのN-末端アルファアミノ酸に連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有し、さらに例えば約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成分は下記構造を有し：

【0211】

【化52】



10

【0212】

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 はそれらが添付される原子と一緒にあって4、5又は6員の複素環式環を形成し；さらに

20

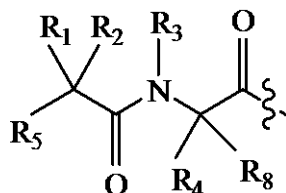
R_7 は、水素、 C_1 - C_{18} アルキル、 C_2 - C_{18} アルケニル、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) OH 及びハロから成る群から選択されるが、ただし R_1 がアルキル又は $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール) R_7 である場合、 R_1 及び R_5 は、それらが添付される原子と一緒にあって4 - 11複素環式環を形成することを条件とする。

【0213】

いくつかの実施態様では、ジペプチドプロドラッグ成分は、インスリンポリペプチドの内部アミノ酸の側鎖アミンに連結される。この実施態様では、例えば約1時間の $t_{1/2}$ を有するプロドラッグは下記構造を有する：

【0214】

【化53】



30

【0215】

式中、 R_1 及び R_2 は、別個に C_1 - C_8 アルキル又は $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール) R_7 であるか、又は R_1 及び R_2 は $-(CH_2)_p-$ (式中 p は2 - 9である) により連結され；

40

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；

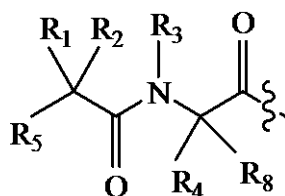
R_5 は NH_2 であり；さらに

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) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) OH 及びハロから成る群から選択される。

さらにまた、例えば約6から約24時間の $t_{1/2}$ を有し、さらに内部アミノ酸側鎖に連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有するプロドラッグが提供され、ここで、該プロドラッグは下記構造を有するジペプチドプロドラッグ成分を含む：

【0216】

【化54】



【0217】

式中、 R_1 及び R_2 は、別個に水素、 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るか、又は R_1 及び R_2 は $-(CH_2)_p$ - (式中 p は2-9である)により連結され；

10

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 は、それらが添付される原子と一緒にって4-12複素環式環を形成し；

R_4 及び R_8 は、別個に水素、 C_1 - C_{18} アルキル又は $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール) R_7 であり；

R_5 は NHR_6 であり；

R_6 はH又は C_1 - C_8 アルキルであるか、又は R_6 及び R_2 は、それらが添付される原子と一緒にって4、5又は6員複素環式環を形成し；さらに

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) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) OH 及びハロから成る群から選択されるが；

20

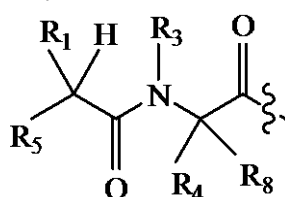
ただし R_1 及び R_2 がともに水素ではないということはなく、 R_4 又は R_8 の少なくとも1つは水素であるということを経条件とする。

【0218】

さらにまた、例えば約72から約168時間の $t_{1/2}$ を有し、さらにインスリンポリペプチドの内部アミノ酸側鎖に連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有するプロドラッグが提供され、ここで、該ジペプチドプロドラッグ成分は下記構造を有する：

【0219】

【化55】



30

【0220】

式中、 R_1 は、水素、 C_1 - C_{18} 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；

40

R_5 は NHR_6 又は OH であり；

R_6 はH又は C_1 - C_8 アルキルであるか、又は R_6 及び R_1 は、それらが添付される原子と一緒にって4、5又は6員複素環式環を形成し；さらに

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) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) OH 及びハロから成る群から選択されるが；

ただし R_1 及び R_2 がともにそれぞれ別個にアルキル又は $(C_0$ - C_4 アルキル) $(C_6$ - C_{10} アリール) R_7 である場合、 R_1 又は R_2 のどちらかが $(CH_2)_p$ (式中 p は2-9である)により R_5 に連結されることを条件とする。

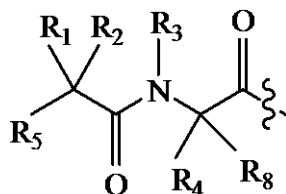
【0221】

50

ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグ成分は、インスリンポリペプチドの芳香族アミノ酸のアリール基に存在するアミンを介して該インスリンポリペプチドに連結され、ここでプロドラッグは、例えば約1時間の $t_{1/2}$ を有し、さらに下記のジペプチド構造を有する：

【0222】

【化56】



10

【0223】

式中、 R_1 及び R_2 は、別個に C_1 - C_{18} アルキル又は(C_0 - C_4 アルキル)(C_6 - C_{10} アリール) R_7 であり；

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 は、それらが添付される原子と一緒にあって4-12複素環式環を形成し；

R_4 及び R_8 は、別個に水素、 C_1 - C_{18} 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_5 は NH_2 又は OH であり；さらに

20

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) $CONH_2$ 、(C_0 - C_4 アルキル) $COOH$ 、(C_0 - C_4 アルキル) NH_2 、(C_0 - C_4 アルキル) OH 及びハロから成る群から選択される。

別の実施態様では、式IVの構造(m_1 は0から3の整数である)を含み、生理学的条件下のPBSで約6から約24時間の $t_{1/2}$ を有するインスリンポリペプチドプロドラッグ誘導体が提供される。ある実施態様では、生理学的条件下のPBSで約6から約24時間の $t_{1/2}$ を有するインスリンポリペプチドプロドラッグは式IVの構造を含み、ここで、

R_1 は水素、 C_1 - C_{18} アルキル及びアリール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である)により連結され；

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 は、それらが添付される原子と一緒にあって4-6複素環式環を形成し；

30

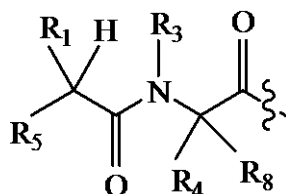
R_4 及び R_8 は、別個に水素、 C_1 - C_{18} アルキル及びアリールから成る群から選択され；さらに R_5 はアミン又はN-置換アミンである。ある実施態様では、 m_1 は1である。

【0224】

ある実施態様では、芳香族アミノ酸を介して連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有し、さらに例えば約6から約24時間の $t_{1/2}$ を有するプロドラッグが提供され、ここで該ジペプチドは下記の構造を含む：

【0225】

【化57】



40

【0226】

式中、 R_1 は、水素、 C_1 - C_{18} アルキル、(C_1 - C_{18} アルキル) OH 、(C_1 - C_4 アルキル) NH_2 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} アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 はそれらが添付される原子と一緒にあって4-6複素環式環を形成し；

50

R_4 及び R_8 は、別個に水素、 C_1 - C_{18} 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_5 は NHR_6 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、それらが添付される原子と一緒にあって4、5又は6員複素環式環を形成し；さらに

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) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) OH 及びハロから成る群から選択される。

別の実施態様では、式IVの構造 (m_1 は0から3の整数である) を含み、生理学的条件下のPBSで約72から約168時間の $t_{1/2}$ を有するインスリンポリペプチドプロドラッグ誘導体が提供される。ある実施態様では、生理学的条件下のPBSで約72から約168時間の $t_{1/2}$ を有するインスリンポリペプチドプロドラッグは式IVの構造を含み、ここで、

R_1 及び R_2 は、別個に水素、 C_1 - C_8 アルキル及びアリールから成る群から選択され；

R_3 は C_1 - C_{18} アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 は、それらが添付される原子と一緒にあって4 - 6複素環式環を形成し；

R_4 及び R_8 は各々水素であり；さらに

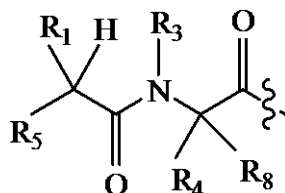
R_5 は、アミン、 N -置換アミン及びヒドロキシルから選択される。ある実施態様では、 m_1 は1である。

【0227】

ある実施態様では、芳香族アミノ酸を介して連結されるジペプチドプロドラッグ成分を有し、さらに例えば約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、ここで該ジペプチドは以下の構造を含み；

【0228】

【化58】



【0229】

式中、 R_1 及び R_2 は、別個に水素、 C_1 - C_8 アルキル、 $(C_1$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、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るか、又は R_1 及び R_5 は、それらが添付される原子と一緒にあって4 - 11複素環式環を形成し；

R_3 は、 C_1 - C_{18} アルキルであるか、又は R_3 及び R_4 はそれらが添付される原子と一緒にあって4 - 6複素環式環を形成し；

R_4 は水素であるか、又は R_3 とともに4 - 6複素環式環を形成し；

R_8 は水素であり；

R_5 は NHR_6 又は OH であり；

R_6 は H 又は C_1 - C_8 アルキルであるか、又は R_6 及び R_1 は、それらが添付される原子と一緒にあって4、5又は6員複素環式環を形成し；さらに

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) $CONH_2$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) $COOH$ 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) NH_2 、 $(C_0$ - C_4 アルキル) OH 及びハロから成る群から選択される。

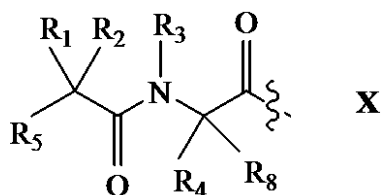
【0230】

ある実施態様にしたがえば、式Xのジペプチドは、インスリン又はIGF-1受容体と相互作用するインスリンポリペプチドの能力に干渉する大きなポリマーを含むようにさらに改変され。その後のジペプチドの切断によって、当該ジペプチド複合体からインスリンポリペプチドが放出され、放出されたインスリンポリペプチドは完全な活性を有する。ある実施態様にしたがえば、式Xのジペプチドは、大きなポリマーを含むようにさらに改変され、前記ポリマーは、インスリン又はIGF-1受容体と相互作用する当該結合されたインスリンポリペプチドの能力に干渉する。ある実施態様にしたがえば、インスリンポリペプチドは

、下記式Xの一般構造のジペプチドを含み：

【 0 2 3 1 】

【 化 5 9 】



【 0 2 3 2 】

ここで、式Xのジペプチドのアミノ酸側鎖の1つはPEG化又はアシル化される。

ある実施態様では、構造IB-LM-IAを含むインスリンポリペプチドが提供され、ここでIBは配列J-R₂₃-R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LX₃₆LVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号：69）を含み、LMは本明細書に開示する連結部分を含み、

さらにIAは配列GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LEX₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号：70）を含み、式中、

JはH又は式Xのジペプチド成分であり；

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；

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；

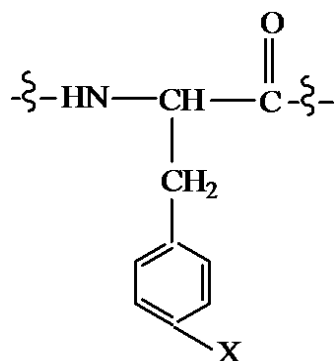
X₁₅は、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、アラニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり；

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；

X₁₉は、下記一般構造のアミノ酸であり（式中、XはOH又はNHR₁₀（R₁₀は、H又は式Xの一般構造を含むジペプチド成分である）から成る群から選択される）；

【 0 2 3 3 】

【 化 6 0 】



【 0 2 3 4 】

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；

X₂₅は、ヒスチジン又はスレオニンであり；

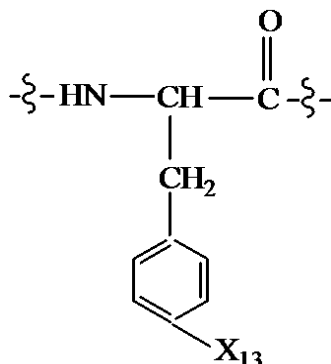
X₂₉は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され；

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；

X_{33} は、アスパラギン酸、グルタミン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、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され；
 X_{45} は、下記一般構造のアミノ酸であり（式中、 X_{13} はH、OH及び NHR_{12} （ R_{12} は、H又は式Xの一般構造を含むジペプチド成分である）から成る群から選択される）；

【0235】

【化61】



10

【0236】

R_{22} は、AYRPSE（配列番号：46）、FVNQ（配列番号：47）、PGPE（配列番号：48）、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-末端アルファアミンから成る群から選択され；

20

R_{23} は、結合又は $G(X_{60})_d(X_{61})_gK$ （配列番号：71）（式中、 X_{60} 、 X_{61} は別個にグルタミン酸又はアスパラギン酸で、 d 及び g は別個に1-6の範囲の整数である）であり；さらに

R_{13} はCOOH又はCONHであり；

さらに式Xのジペプチドはアシル化又はPEG化される。ある実施態様では、Jは、式Xのアシル化又はPEG化ジペプチドを含む。

【0237】

本明細書に開示するインスリンポリペプチド及びそのプロドラッグ誘導体をさらに改変して、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、ペプチドの腎浄化を妨げることによって当該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、それらの相対的に小さい分子サイズのために容易に浄化される。40kDaより大きいペプチド分子量の増加は腎閾値を超え、血漿中での持続時間を顕著に延長する。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、共有結合により連結される親水性部分を含む。

30

ある実施態様では、親水性部分は、血漿タンパク質、ポリエチレングリコール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、本開示のインスリンアナログはさらに改変され、アミノ酸の側鎖に共有結合により連結される1つ以上の親水性基を含む。

40

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（例えば配列番号：2の29位を含む）に位置するアミノ酸リジン（又は他の適切なアミノ酸）の側鎖のどちらかに、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、連結部分のアミノ酸の1つがペプチドリッ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、単鎖インスリンプロドラッグ誘導体が提供される。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。

【0238】

ある実施態様にしたがえば、式Xのジペプチド成分が、さらにポリエチレングリコール、アルキル又はアシル基を含む、インスリンポリペプチドのプロドラッグ誘導体が提供さ

50

れる。ある実施態様では、1つ以上のポリエチレングリコール鎖が式Xのジペプチドに連結され、ポリエチレングリコール鎖の合計分子量は、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、約40,000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、式Xのジペプチドに連結される。別の実施態様では、式Xのジペプチドは、血清アルブミンと結合させるために、したがって投与時にIGF^{B16B17}アナログペプチドを不活性化させるために十分なサイズのアシル基でアシル化される。該アシル基は直鎖状でも分枝状でもよく、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脂肪酸のいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、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。

10

別の実施態様では、本明細書に開示するインスリンポリペプチド及びそのプロドラッグアナログは、インスリンポリペプチドのA鎖のカルボキシ若しくはアミノ末端に、又はB鎖のアミノ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、ここで該付加アミノ酸は改変され、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、親水性部分は、血漿タンパク質、ポリエチレングリコール鎖及び免疫グロブリンのFc部分から成る群から選択される。

【0239】

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、好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度レベルの本明細書に開示の新規なインスリンダイマーのいずれか、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、本明細書に開示のインスリンダイマーを、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又はそれ以上の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、場合によって多様な包装容器に入れて保存される。他の実施態様では、医薬組成物は凍結乾燥粉末を含む。医薬組成物はさらに、患者に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包装できる。該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の付箋を貼付してもよい。

20

30

【0240】

開示のインスリンダイマー及びそれらの対応するプロドラッグ誘導体は、インスリンペプチドについて以前に記載されたいずれの使用にも適切であると考えられる。したがって、本明細書に記載するインスリンダイマー及びそれらの対応するプロドラッグ誘導体を用いて高血糖症を治療するか、又は高い血中グルコースレベルから生じ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、高い血中グルコースレベルを示す患者の治療で使用される、本明細書に開示のインスリンダイマー又はそのプロドラッグ誘導体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ダイマー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。

40

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ダイマー又はそのデポー若しくはプロドラッグ誘導体を標準的な投与ルート（非経口的（例えば静脈内、腹腔内、皮下又は筋肉内、髄腔内、皮内、直腸内）、経口的、鼻内又は吸入によるルートを含む）を用いて患者に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、インスリンポリペプチド又はそのプロドラッグ誘導体は注射筒内に前もって充填される。

【0241】

本明細書に開示するインスリンポリペプチド又はそのデポー若しくはプロドラッグ誘導体は、単独で又は他の抗糖尿病薬剤と一緒に投与できる。当業界で公知の又は研究中的の抗

50

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又はその機能的アナログ、スルホニルウレア、例えばトルブタミド（Orinase）、アセトヘキサミド（Dymelor）、トラザミド（Tolinase）、クロルプロパミド（Diabinese）、グリピジド（Glucotrol）、グリブリド（Diabeta, Micronase, Glynase）、グリメピリド（Amaryl）又はグイクラジド（Diamicron）；メグリチニド、例えばレバグリニド（Prandin）又はナテグリニド（Starlix）；ビグアニド、例えばメトフォルミン（Glucophage）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）、ピオグリタゾン（Actos）又はトログリタゾン（Rezulin）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）、アカルボース（Precose/Glucobay）；エクセナチド（Byetta）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、例えばビルダグリブチン又はシタグリブチン；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（フラクトース1,6-ビスホスファターゼ）阻害剤。

10

【0242】

本明細書に開示するインスリンダイマー、又はそのデポー若しくはプロドラッグ誘導体を含む医薬組成物を処方し、標準的な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患者に投与できる。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ダイマー（又はそのプロドラッグ誘導体）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、リン酸緩衝系中に約4.0から約7.0のpHで1mg/mLの濃度のインスリンダイマーを含む。医薬組成物は唯一の医薬的に活性な成分としてインスリンダイマーを含むことができるが、またインスリンダイマーは1つ以上の補足的活性物質と組み合わせることもできる。

20

本明細書に記載する全ての治療方法、医薬組成物、キット及び他の類似の実施態様は、インスリンダイマー又はそのプロドラッグ誘導体は、医薬的に許容できる前記の全ての塩を含むことを意図する。

ある実施態様では、キットは、患者にインスリンダイマー組成物を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を、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、組成物がエーロゾル装置に前もって充填されたエーロゾル調剤装置である。別の実施態様では、キットは注射筒及び注射針を含み、さらにある実施態様では、インスリンダイマー組成物は注射筒に前もって充填される。

30

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他の任意の方法によって調製される。ある種の非天然アミノ酸は標準的な組換えDNA技術で発現させることはできないが、それらの調製技術は当業界で公知である。非ペプチド部分を包含する本発明の化合物は、標準的なペプチド化学反応に加えて、利用可能なときは標準的な有機化学反応によって合成できる。

【0243】

本明細書に開示する全ての実施態様のために、第一及び第二のインスリンポリペプチドは以下のペアのいずれかから別個に選択することができる：A鎖1及びB鎖1、A鎖1及びB鎖2、A鎖1及びB鎖3、A鎖1及びB鎖4、A鎖1及びB鎖5、A鎖1及びB鎖6、A鎖1及びB鎖7、A鎖1及びB鎖8、A鎖1及びB鎖9、A鎖1及びB鎖10、A鎖1及びB鎖11、A鎖1及びB鎖12、A鎖1及びB鎖13、A鎖1及びB鎖14、A鎖1及びB鎖15、A鎖1及びB鎖16、A鎖2及びB鎖1、A鎖2及びB鎖2、A鎖2及びB鎖3、A鎖2及びB鎖4、A鎖2及びB鎖5、A鎖2及びB鎖6、A鎖2及びB鎖7、A鎖2及びB鎖8、A鎖2及びB鎖9、A鎖2及びB鎖10、A鎖2及びB鎖11、A鎖2及びB鎖12、A鎖2及びB鎖13、A鎖2及びB鎖14、A鎖2及びB鎖15、A鎖2及びB鎖16、A鎖3及びB鎖1、A鎖3及びB鎖2、A鎖3及びB鎖3、A鎖3及びB鎖4、A鎖3及びB鎖5、A鎖3及びB鎖6、A鎖3及びB鎖7、A鎖3及びB鎖8、A鎖3及びB鎖9、A鎖3及びB鎖10、A鎖3及びB鎖11、A鎖3及びB鎖12、A鎖3及びB鎖13、A鎖3及びB鎖14、A鎖3及びB鎖15、A鎖3及びB鎖16、A鎖4及びB鎖1、A鎖4及びB鎖2、A鎖4及びB鎖3、A鎖4及びB鎖4、A鎖4及びB鎖5、A鎖4及びB鎖6、A鎖4及びB鎖7、A鎖4及びB鎖8、A鎖4及びB鎖9、A

40

50

鎖4及びB鎖10、A鎖4及びB鎖11、A鎖4及びB鎖12、A鎖4及びB鎖13、A鎖4及びB鎖14、A鎖4及びB鎖15、A鎖4及びB鎖16、A鎖5及びB鎖1、A鎖5及びB鎖2、A鎖5及びB鎖3、A鎖5及びB鎖4、A鎖5及びB鎖5、A鎖5及びB鎖6、A鎖5及びB鎖7、A鎖5及びB鎖8、A鎖5及びB鎖9、A鎖5及びB鎖10、A鎖5及びB鎖11、A鎖5及びB鎖12、A鎖5及びB鎖13、A鎖5及びB鎖14、A鎖5及びB鎖15、A鎖5及びB鎖16、A鎖6及びB鎖1、A鎖6及びB鎖2、A鎖6及びB鎖3、A鎖6及びB鎖4、A鎖6及びB鎖5、A鎖6及びB鎖6、A鎖6及びB鎖7、A鎖6及びB鎖8、A鎖6及びB鎖9、A鎖6及びB鎖10、A鎖6及びB鎖11、A鎖6及びB鎖12、A鎖6及びB鎖13、A鎖6及びB鎖14、A鎖6及びB鎖15、A鎖6及びB鎖16。さらにまた、上記のインスリンポリペプチドの全ての単鎖アナログがまた本明細書に開示する本ダイマー構築物に包含され、ここで連結部分は、SRVSRX₆₈SR（配列番号：98）又はGYGSSSRX₆₈APQT（配列番号：9）である。

10

A鎖：

A鎖1 GIVEQCCTSI_{CS}LYQLENYCN（配列番号：1）、
 A鎖2 GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、
 A鎖3 GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）、
 A鎖4 TPAX75SEGIVEECCFRSCDLALLE_{TY}CA（配列番号：88）、
 A鎖5 TPAKSEGIVEECCFRSCDLALLE_{TY}CA（配列番号：103）、
 A鎖6 GIVEECCFRSCDLALLE_{TY}CA（配列番号：7）、

B鎖：

B鎖1 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF_{YTP}KT（配列番号：2）、
 B鎖2 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：77）、
 B鎖3 GPETL_{CGAELVDALYL}VCGRG_{GFY}（配列番号：77）、
 B鎖4 CGPEHL_{CGAELVDALYL}VCGRG_{GFYFN}PK（配列番号：79）、
 B鎖5 GPETL_{CGAELVDALYL}VCGRG_{GFYFN}KPT（配列番号：79）、
 B鎖6 AYRPSETL_{CGGELVDTLQFV}CGDRG_{FYFSR}PA（配列番号：87）、
 B鎖7 GPETL_{CGAELVDALQFV}CGDRG_{FYFN}KPT（配列番号：10）、
 B鎖8 TPAKSEGIVEECCFRSCDLALLE_{TY}CA（配列番号：103）、
 B鎖9 AYRPSETL_{CGGELVDTLQFV}CGDRG_{FY}（配列番号：90）、
 B鎖10 AYRPSETL_{CGGELVDTLYLV}CGDRG_{FYFSR}PA（配列番号：80）、
 B鎖11 CFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF_{YTP}KT（配列番号：94）、
 B鎖12 CGPETL_{CGAELVDALYL}VCGRG_{GFYFN}KPT（配列番号：95）、
 B鎖13 CGPETL_{CGAELVDALQFV}CGDRG_{FYFN}KPT（配列番号：96）、
 B鎖14 CGPEHL_{CGAELVDALYL}VCGRG_{FYFN}KPT（配列番号：97）、
 B鎖15 CAYRPSETL_{CGGELVDTLQFV}CGDRG_{FY}（配列番号：91）、及び
 B鎖16 CAYRPSETL_{CGGELVDTLYLV}CGDRG_{FY}（配列番号：93）。

20

30

【実施例1】

【0244】

インスリンA及びB鎖の合成

Boc化学反応を用いて、インスリンA及びB鎖を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）樹脂上で合成した。HF/p-クレゾール（95：5）を0で1時間用いて、樹脂からペプチドを切断した。HF除去及びエーテル沈殿に続いて、ペプチドを50%酢酸水溶液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。前記ペプチドは、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。ペプチドを過剰量のジエチルエーテルの添加により沈殿させ、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によってモニターし、質量分析（ESI又はMALDI）によって確認した。

40

インスリンA鎖は、アミノ酸7位のただ1つの遊離システインを用いて合成し、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}として保護した。インスリンB鎖は、7位のただ1つの遊離システインを用いて合成し、他のシステインはアセトアミドメチルB-(SH)⁷(Acm)¹⁹として保護した。粗ペプチドは通常のRP-HPLCによって精製した。

50

合成したA及びB鎖は、図1に概略した一般的な方法にしたがって、それらの自然のままのジスルフィド結合により互いに連結させた。それぞれのB鎖を、DMF又はDMSOへの溶解によりCys⁷-Npys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のモル比及び室温で反応させた。前記活性化をRP-HPLCでモニターし、生成物はESI-MSで確認した。

第一のB7-A7ジスルフィド結合は、それぞれA-(SH)⁷(Acm)^{6,11,20}及びB-(Npys)⁷(Acm)¹⁹を1:1のモル比で総ペプチド濃度10mg/mLに溶解することによって形成された。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れた。40倍モル過剰のヨウ素を前記溶液に添加し、この混合物を室温でさらに1時間攪拌した。アスコルビン酸水溶液を添加して反応を終了させた。混合物をRP-HPLCで精製し、最終化合物をMALDI-MSによって確認した。図2及び表1のデータが示すように、この方法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で合成できる。前記系には、例えば米国特許第7,045,337号及び7,083,970号に教示された系が含まれる。

【0245】

表1: 自然のままのインスリンと比較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	
	AVER.	STDEV	AVER.	STDEV
IC ₅₀ (nM)	0.24	0.07	0.13	0.08
インスリン活性の%	100		176.9	

【実施例2】

【0246】

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のNaCl、0.2N酢酸及び0.1NのNa₂CO₃を含んでいた。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時間にわたって生じた。反応の程度はRP-HPLCでモニターし、反応収量は約50%であった。

b. 精製

反応混合物を0.1%の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、流速は10mL/分、A緩衝液は水に10%ACN及び0.1%TFA、B緩衝液はACNに0.1%TFA、直線状グラジエントB%は0-40%(0-80分)。PEG-インスリン又はアナログは約35%緩衝液Bで溶出した。所望の化合物はMALDI-TOEとその後のスルフトリシス又はトリプシン分解による化学的改変によって立証した。

N-ヒドロキシスクシンイミドアシ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)をmPEG20k-NHSとともに0.1Nのピシン緩衝液(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約0.5mg/mLであった。反応の進行はHPLCでモニターした。反応収量は室温で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、流速は10mL/分、A緩衝液は水に10%ACN及び0.1%TFA、B緩衝液はACNに0.1%TFA、直線状グラジエントB%は0-40%(0-80分)。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-TOEとその後のスルフトリシス又はトリプシン分解による化学的改変

によって立証した。

フェニルアラニンの芳香環のアセチル基の還元的アミノ化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 - 4.4）に溶解した。反応溶液は、0.1NのNaCl、0.2N酢酸及び0.1NのNa₂CO₃を含んでいた。室温、24時間のインスリン又はインスリンアナログの濃度は約0.5mg/mLであった。反応の進行はHPLCでモニターした。反応の変換は約50%であった（HPLCによって計算）。

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、流速は10mL/分、A緩衝液は水に10%ACN及び0.1%TFA、B緩衝液はACNに0.1%TFA、直線状グラジエントB%は0 - 40%（0 - 80分）。PEG-インスリン又はPEG-インスリンアナログは約35%Bで収集された。所望の化合物はMALDI-TOEとその後のスルフトリシス又はトリプシン分解による化学的改変によって立証した。

【実施例3】

【0247】

インスリン受容体結合アッセイ：

各ペプチドのインスリン又はIGF-1受容体に対する親和性を、シンチレーションプロクシミティ技術を利用する競合結合アッセイで測定した。ペプチドの連続3倍希釈をトリス-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）で作成し、96ウェルプレート（Corning Inc., Acton, MA）にて0.05nMの(3-[125I]-ヨードチロシル)A TyrA14インスリン又は(3-[125I]-iodotyrosyl)IGF-1（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）と混合した。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マイクログラムのアリコットが各ウェルに存在し、ポリエチレンジオキサン処置コムギ胚芽アグルチニンA型シンチレーションプロクシミティアッセイビーズ（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）を0.25mg/ウェルで添加した。800rpmで5分振盪させた後で、プレートを室温で12時間インキュベートし、放射能をMicroBeta 1450液体シンチレーションカウンター（Perkin-Elmer, Wellesley, MA）で測定した。非特異的結合（NSB）の放射能を、テストサンプルの最高濃度の4倍濃度過剰の“コールド”の自然のままのリガンドを有するウェルで測定した。全結合放射能は競合物を含まないウェルで検出した。特異的結合パーセントを以下のように計算した：特異的結合パーセント = (結合NSB / 全結合NSB) × 100。IC₅₀値はオリジンソフトウェア（Origin software, OriginLab, Northampton, MA）を用いて決定した。

【実施例4】

【0248】

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の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）にプレートし、ダルベッコ改変イーグル培養液（DMEM（Dulbecco's modified Eagle medium））で5%CO₂及び90%湿度下にて16 - 20時間37℃で培養した。前記培養液は100IU/mLペニシリン、100µg/mLストレプトマイシン、10mM HEPES及び0.25%のウシ増殖血清（HyClone SH30541, Logan, UT）が補充されてあった。インスリン又はインスリンアナログの連続希釈を、0.5%ウシ血清アルブミン（Roche Applied Science #100350, Indianapolis, IN）補充DMEMで調製し、接着細胞を含むウェルに添加した。5%CO₂を含む湿潤雰囲気にて37℃で15分インキュベートした後、細胞を5%パラホルムアルデヒドで20分間室温にて固定し、リン酸緩衝食塩水（pH7.4）で2回洗浄し、さらにPBS中の2%ウシ血清アルブミンで1時間ブロックした。続いて前記プレートを3回洗浄し、製造業者の推奨にしたがって2%ウシ血清アルブミン含有PBSで再構成したセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗ホスホチロシン抗体（Upstate biotechnology #16-105, Temecula, CA）を充填した。室温で3時間インキュベートした後、前記プレートを4回洗浄し、0.1mLのTMBシグ

ルソリューション基質 (single solution substrate, Invitrogen, #00-2023, Carlsbad, CA) を各ウェルに添加した。発色は5分後に1NのHCl (0.05mL) を添加して停止させた。450nmでの吸収をタイターテックマルチスキャンMCC340 (Titertek Multiscan, ThermoFisher, Pittsburgh, PA) で測定した。吸収対ペプチド濃度用量応答曲線を作図し、 EC_{50} 値をオリジンソフトウェア (OriginLab, Northampton, MA) を用いて決定した。

【実施例 5】

【0249】

モデルジペプチドの切断速度 (PBS) の決定

ジペプチドN-末端伸長部の切断速度を試験することができるモデルペプチドとして、特定のヘキサペプチド (HSRGTF-NH₂; 配列番号: 72) を用いた。ジペプチド伸長モデルペプチドを調製し、該モデルペプチド結合樹脂にBoc保護サルコシン及びリジンを連続的に付加してペプチドA (Lys-Sar-HSRGTF-NH₂; 配列番号: 74) を作製した。ペプチドAをHFによって切断し、調製用HPLCによって精製した。

HPLCを用いる調製の精製:

精製は、シリカ系1×25cmのVydac C18 (粒子サイズ5 μ 、孔サイズ300 \AA) カラムでHPLC分析を用いて実施した。以下の装置を用いた: ウォーターアソシエーツ (Waters Associates) モデル600ポンプ、インジェクターモデル717、及びUV検出装置モデル486。全サンプルについて230nmの波長を用いた。溶媒Aは蒸留水中に10%CH₃CN/0.1%TFAを含み、溶媒BはCH₃CN中に0.1%TFAを含んでいた。直線状グラジエントを用いた (2時間で0 - 100%B)。流速は10mL/分で、分画サイズは4mLであった。約150mgの粗ペプチド、30mgの精製ペプチドが得られた。

ペプチドAをPBS緩衝液に1mg/mLの濃度で溶解した。この溶液を37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。サンプルを5h、8h、24h、31h及び47hで分析のために収集した。ジペプチド切断は等体積の0.1%TFAを用いてpHを低下させることによって停止させた。切断速度をLC-MSによって定性的にモニターし、HPLCによって定量的に調べた。ピークシンブルクロマトグラフィーソフトウェアを用いて、保持時間及び相対的ピーク面積をプロドラッグ及び親モデルペプチドについて定量した。

質量分析を用いる分析:

標準的なESIイオン源付きSciex API-IIIエレクトロスプレー四極質量分析計を用いて、質量スペクトルを入手した。用いたイオン化条件は下記のとおりである: 陽イオンモードのESI; イオンスプレー電圧は3.9kV; オリフィス電位は60V。使用した霧状化及びカーテンガスは流速0.9L/分の窒素であった。質量スペクトルは、0.5Th/ステップ及び2msec持続時間で600から1800トンプソンまで記録した。サンプル (約1mg/mL) を1%の酢酸を含む50%アセトニトリル水に溶解し、外部注射筒ポンプによって5 μ L/分の速度で導入した。製造業者 (Millipore Corporation, Billerica, MA) によって提供された指示にしたがい、0.6 μ LのC4樹脂を含むZipTip固相抽出チップを用いて、PBSに溶解したペプチドを分析前に脱塩した。

HPLCを用いる分析:

214nmでのUV検出装置及び150mm×4.6mmのC8 Vydacカラムが搭載されている、ベックマンシステムゴールドクロマトグラフィー (Beckman System Gold Chromatography) 系を用いて、HPLC分析を実施した。流速は1mL/分であった。溶媒Aは蒸留水中に0.1%TFAを含み、溶媒Bは90%のCH₃CN中に0.1%TFAを含んでいた。直線状グラジエントを用いた (10分で0から30%B)。ピークシンブルクロマトグラフィーソフトウェアを用いて、データを収集し分析した。

それぞれのペプチドについて、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。プロドラッグの一次解離速度定数は、多様な時間間隔におけるプロドラッグの濃度の対数を作図することによって決定された。このプロットの勾配は速度定数 'k' を提供する。種々のプロドラッグの切断半減期は、式 $t_{1/2} = 0.693/k$ を用いて計算した。このモデルペプチドHSRGTF-NH₂ (配列番号: 72) のLys-Sar伸長部の半減期は14.0hであると決定された。

【実施例 6】

【0250】

全てのD異性体モデルペプチドを用いる血漿中のジペプチド切断半減期速度

追加のモデルヘキサペプチド (dHdTdRGdTdF-NH₂、配列番号：75) を用いて、血漿中のジペプチド切断速度を決定した。各アミノ酸のD異性体 (ただしプロドラッグ伸長部は除く) を用いて、該モデルペプチドの酵素的切断を防止した。このモデルD異性体ヘキサペプチドはL-異性体と類似の態様で合成された。ペプチドAについて以前に報告したようにN-末端にサルコシン及びリジンを連続的に付加して、ペプチドB (dLys-dSar-dHdTdRGdTdF-NH₂、配列番号：75) を調製した。

それぞれのプロペプチドについて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。プロドラッグの一次解離速度定数は、多様な時間間隔におけるプロドラッグの濃度の対数を作図することによって決定された。このプロットの勾配は速度定数 'k' を提供する。このモデルペプチドdHdTdRGdTdF-NH₂ (配列番号：74) のLys-Sar伸長部の半減期は18.6hであると決定された。

10

【実施例 7】

【0251】

モデルヘキサペプチド (HSRGTF-NH₂；配列番号：72) に連結される付加ジペプチドの切断速度を、実施例5に記載した方法を用いて決定した。これらの実験で得られた結果を表2及び3に提示する。

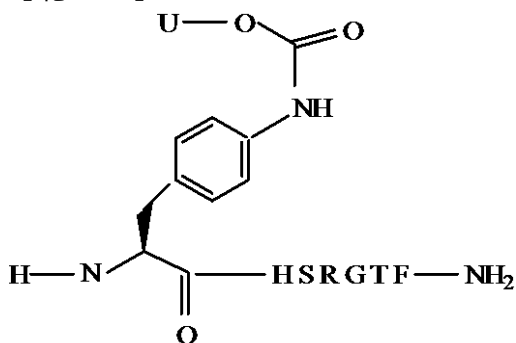
【0252】

20

表2：N-末端パラ-アミノ-Pheの側鎖に連結されたジペプチドU-BのPBS中でのモデルヘキサペプチド (HSRGTF-NH₂；配列番号：57) からの切断：

【0253】

【化62】



30

【0254】

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

10

20

【 0 2 5 5 】

表3：1位のヒスチジン（又はヒスチジンアナログ）（X）に連結されたジペプチドU-BのPBS中でのモデルヘキサペプチド（XSRGTF-NH₂；配列番号：76）からの切断

NH₂-U-B-XSRGTF-NH₂（配列番号：76）

化合物	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時間を超える
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時間を超える
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

【実施例 8】

【0256】

プロドラッグ構築に適切な構造を有するインスリンアナログの同定

A鎖の19位はインスリン活性のために重要な部位であることは知られている。したがって、プロドラッグ成分の添付を可能にするこの部位の改変が所望される。A19指定インスリンアナログを合成し、インスリン受容体におけるそれらの活性について特徴を調べた。高い活性を有する2つの構造アナログをA19で同定したが、第二の活性部位である芳香族残基 (B24) と比肩し得る構造変化では、同じように完全な活性をもつインスリンアナログを同定できなかった。

表4及び5は、インスリン受容体における完全な活性のためのA19位における高度な構造的保存を示す (受容体結合は実施例3に記載したアッセイを用いて決定した)。表4は、A1

10

20

30

40

50

9に改変を有する2つのインスリンだけが自然のままのインスリンに類似する受容体結合活性を有することを示す。4-アミノインスリンアナログについては、3つの別々の実験のデータが提供される。“活性(検定)”と表示した欄は、同時に実施した2つの別々の実験で自然のままのインスリンと対比して当該インスリンアナログのパーセント結合を比較する。“活性(0.60nM)”と表示した欄は、このアッセイを用いてインスリン結合について得られた文献上の(historical)平均値と対比した当該インスリンアナログの相対的パーセント結合である。どちらのアッセイでも、2つのA19インスリンアナログ(4-アミノフェニルアラニン及び4-メトキシフェニルアラニン)は、自然のままのインスリンとほぼ等価の受容体結合を示す。表5は、自然のままのインスリンと等価の結合活性を示す2つのA19インスリンアナログ(4-アミノ及び4-メトキシ)はまた、該インスリン受容体で等価の活性を示すことを表している(受容体活性は実施例4に記載したアッセイを用いて決定した)。

【0257】

表4：A19インスリンアナログのインスリンレセプター結合活性

アナログ	インスリン受容体			
	自然のままのリガンドに対する%			自然のままのリガンドに対する%
	IC ₅₀	STDev	活性(検定)	活性(0.60nM)
4-OH(自然のままのインスリン)	0.64	0.15	100.0	100.0
4-COCH ₃	31.9	9.47	0.6	1.9
4-NH ₂	0.31	0.12	203.0	193.5
	0.83	0.15	103.0	72.3
	0.8	0.1	94.0	75.0
4-NO ₂	215.7	108.01	0.3	1.3
3,4,5-3F	123.29	31.10	0.5	0.5
4-OCH ₃	0.5	0.50	173.0	120.0
3-OCH ₃	4.74	1.09	28.0	12.7
	5.16	3.88	18.0	11.6
4-OH,3,5,-2Br	1807.17	849.72	0.0	0.0
4-OH,3,5,-2NO ₂	2346.2	338.93	0.0	0.0

【0258】

表5：A19インスリンアナログのインスリン受容体リン酸化活性

アナログ	インスリン受容体		
	IC ₅₀	STDev	自然のままのリガンドに対する%活性(検定)
4-OH(自然のままのインスリン)	1.22	0.4	100.0
4-NH ₂	0.31	0.14	393.5
4-OCH ₃	0.94	0.34	129.8

【実施例9】

【0259】

インスリン様成長因子(IGF)アナログIGF1(Y^{B16}L^{B17})

出願人らは、インスリン受容体で自然のままのインスリンと類似の活性を示すIGFアナログを見出した。より具体的には、IGFアナログ、IGF1(Y^{B16}L^{B17})は、自然のままのIGF A鎖(配列番号：5)及び改変B鎖(配列番号：6)を含み、自然のままのIGF B鎖(配列番号：3)の15及び16位の本来のグルタミン及びフェニルアラニンが、それぞれチロシン

及びロイシン残基で入れ替えられている。図3及び下記の表6に示すように、IGF1(Y^{B16}L^{B17})及び自然のままのインスリンの結合活性は、各々がインスリン受容体の極めて強力なアゴニストであることを示している。

【0260】

表6

	インスリン標準物		IGF1(Y ^{B16} L ^{B17})	
	AVER.	STDEV	AVER.	STDEV
IC ₅₀ (nM)	1.32	0.19	0.51	0.18
%インスリン活性	100		262	

10

【実施例10】

【0261】

IGFプロドラッグアナログ

A19インスリンアナログの活性を基にして（実施例8参照）、IGF1 A:B(Y^{B16}L^{B17})アナログに対して類似の改変を実施し、インスリン受容体に結合し前記を刺激するその能力を調べた。表7に示すように、IGFアナログ、IGF1(Y^{B16}L^{B17})A(p-NH₂-F)¹⁹は、インスリン受容体に特異的に結合する（当該アナログのジペプチド伸長アナログは該インスリン受容体に特異的に結合できない）。当該ジペプチド伸長部分は、ジペプチドの偶発的切断を可能にする適切な構造を欠き（当該ジペプチドの第二の位置にN-アルキル化アミノ酸を欠く）、したがってインスリン受容体結合の回復がないことに留意されたい。

20

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IGF1 A:B(Y^{B16}L^{B17})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（例えば米国特許第7,045,337号及び7,083,970号に教示された系が含まれる）を用いてin vivoで合成することができる

【0262】

表7

	インスリン標準物		IGF1(Y ^{B16} L ^{B17}) (p-NH ₂ -F) ^{A19} アミド		IGF1(Y ^{B16} L ^{B17}) (AiBAla) ^{A19} アミド	
	AVER.	STDEV	AVER.	STDEV	AVER.	STDEV
IC ₅₀ (nM)	0.24	0.07	1.08	0.075	活性無し	
%インスリン活性	100		22			

30

IGFY^{B16}L^{B17}アナログペプチドのさらに別のプロドラッグアナログを調製した（前記アナログペプチドでは、ジペプチドプロドラッグ成分（アラニン-プロリン）は、A鎖（IGF1(Y^{B16}L^{B17})(AlaPro)^{A-1,0}）のアミノ末端にアミド結合を介して連結された）。表8に示すように、IGF1(Y^{B16}L^{B17})(AlaPro)^{A-1,0}はインスリン受容体に対する親和性が低下した。表3のデータを基準にすれば、該ジペプチドプロドラッグ成分は、当該ジペプチドプロドラッグ成分の偶発的な切断を可能にする適切な構造を欠き、したがってこのインスリン受容体結合の検出は、該プロドラッグ成分の切断の結果ではないことに留意されたい。

40

【0263】

表8

	インスリン標準物		IGF1(Y ^{B16} L ^{B17})(AlaPro) ^{A-1,0}	
	AVER.	STDEV	AVER.	STDEV.
IC ₅₀ (nM)	0.72	0.09	1.93	0.96
%インスリン活性	100		37.12	

【実施例11】

50

【 0 2 6 4 】

追加的IGFインスリンアナログ

IGF1($Y^{B16}L^{B17}$) ペプチド配列の更なる改変によって、インスリン及びIGF1受容体でそれらの効力が変化するさらに別のIGFインスリンアナログが明らかになった。これらのアナログの各々について表9に結合データ（実施例3のアッセイを用いる）を提示する。これらのアナログでは、改変の位置は、自然のままのインスリンペプチドの対応する位置を基準に示される（DPI = des B26 - 30）。例えば、本明細書で、更なる説明が一切なく “B28位” と言え、配列番号：2の最初のアミノ酸が欠失したインスリンアナログのB鎖の対応する27位を意味する。したがって、“B(Y16)” という一般的呼称は、自然のままのIGF-1配列（配列番号：3）のB鎖の15位のチロシン残基の置換を指す。インスリン及びIGFアナログの相対的受容体結合に関するデータは表9に提供され、IGFアナログ刺激リン酸化に関するデータ（実施例4のアッセイを用いる）は表10に提供される。

10

【 0 2 6 5 】

表9：インスリン及びIGFアナログの受容体結合親和性

アナログ	インスリン受容体						IGF-1 受容体						比
	nM	% インスリン					% IGF-1					%自然のま まの IGF-1	
	IC50:	STDev	日付	(検定)	活性 (0.6 nM)	IC50:	STDev	Date	(検定)	活性 (0.55 nM)			
IGF-1 A:B	10.41	1.65	9/4/2007	5.8	5.8								
IGF-1 A:B(E10Y16L17)	0.66	0.36	5/22/2007	58.7	90.9	7.85	1.98	6/4/2007	6.8	7.0	11.9		
	0.51	0.18	5/29/2007	98.8	117.6	12.19	2.17	9/18/2007	5.0	4.5			
IGF-1 A:B(E10 Y16L17)-E31E3 2 B-COOH	1.22	0.30	3/20/2008	36.5	50.0	17.50	2.25	4/4/2007	3.0	3.1	14.3		
IGF-1 A:B(D10Y16L17) DPI A- COOH	0.26	0.02	11/9/2007	301.0	231.0	6.79	1.50	4/4/2008	7.7	8.1			
	0.2	0.02	12/4/2007	380.1	300.0								
	0.42	0.06	6/5/2008	174.1	144.1								
IGF-1 A:B (E10Y16L17) DPI	0.38	0.08	8/10/2007	51.1	157.9	22.89	5.26	9/18/2007	3.3	2.4	60.2		
IGF-1 A:B (H5D10Y16L17) DPI	0.16	0.07	11/9/2007	479.0		4.66	0.77	4/4/2008	11.2	11.8	29.1		
IGF-1 A:B (H5D10Y16L17) (S=O) DPI	0.25	0.04	11/9/2007	316.0									
IGF-1 A (H8 A9 N21): B(H5D10 Y16L17) DPI A-COOH	0.05	0.01	12/4/2007	1576.7		4.03	0.50	4/4/2008	12.9	13.6	80.6		
	0.09	0.02	12/14/2007	1667.0									
IGF-1 A (H8 A9 N21) :B(H5D10 Y16L17 A22) DPI A-COOH	0.12	0.02	12/14/2007	1171.4		22.83	3.53	4/4/2008	2.3	2.4	190.3		
IGF-1 A (H8 A9 N21) :B(H5D10 Y16L17A22) (S=O) DPI A-COO H	0.36	0.10	12/14/2007	400.7									

アナログ	インスリン受容体					IGF-1 受容体					比	
	nM					% IGF-1						
	IC50:	STDev	日付	(検定)	% イン スリン	% 自然の まのイ ンスリン	IC50:	STDev	Date	(検定)	% 自然のま の IGF-1	
IGF-1 A: IGF-1 B(1-8)-In (9-17)-I GF-1 B(18-30)	1.59	0.62	5/22/2007	19.1	37.7	(0.6 nM)	131.30	58.05	6/4/2007	0.3	0.4	82.6
	2.77	1.19	5/22/2007	14.0	21.7		62.50	30.28	6/4/2007	0.9	0.9	22.6
	2.67	0.67	5/18/2007	11.3	22.5							
	2.48	1.35	5/29/2007	20.1	24.2							
IGF-1 A: In B(1-5)- IGF-1 B(YL) (6-30)	0.31	0.19	8/10/2007	62.4	193.5		27.54	6.57	9/25/2007	3.6	2	88.8
自然のままの IGF-2							13.33	1.85	9/25/2007	7.5	4.5	
IGF-2 AB												
IGF-2 AB(YL)	6.81	3.81	10/10/2007	8.4	8.8							
In A: IGF-1 B(YL)	82.62	31.75	9/4/2007	0.9	0.7							
	107.24	65.38	9/4/2007	0.7	0.6							
In A- IGF-2 D : In B- IGF-2 C	0.53	0.11	9/4/2007	141.0	113.0		1.59	0.34	9/18/2007	47.6	34.6	
**特段の指示がなければ、全ての C 末端がアミド (DPI)である	0.37	0.05	10/13/2007	179.1	162.2		14.69	3.02	9/25/2007	6.8	3.7	39.7

表 10:

アナログ	インスリン受容体			IGF-1 受容体				選択率
	EC50:	STDDev	日付	% インスリン	EC50:	STDDev	日付	% IGF
インスリン	1.26	0.098	12/14/2007		114.88	46.66	1/23/2008	90.89
	1.43	0.72	4/1/2008		86.02	29.35	5/20/2008	
	1.12	0.11	3/31/2008					
	1.53	0.13	4/11/2008					
	2.70	0.71	4/16/2008					
	1.22	0.40	5/20/2008					
IGF-1	54.39	21.102	12/14/2007	2.3	0.87	0.16	1/23/2008	100
					0.49	0.13	5/20/2008	
					0.97	0.48	7/23/2008	
IGF-1 AB								
IGF-1 A: B(E10Y16L17)	2.57	0.59	3/31/2008	49.2	7.42	5.59	7/23/2008	13
IGF-1 A: B(E10 Y16L17)-E31E32 B-COOH	7.00	2.82	3/31/2008	18.1				
	8.52	4.34	4/16/2008	31.7				
IGF-1 AB(D10Y16L17) DPI A-COOH	0.08	0.006	12/14/2007	1575	0.78	0.17	1/23/2008	111.538
	4.38	2.98	4/16/2008	??				9.75
IGF-1 AB (E10Y16L17) DPI								
IGF-1 AB (H5D10Y16L17) DPI					12.22	5.46	1/23/2008	7.1
IGF-1 AB (H5D10Y16L17) (S=O)DPI								
IGF-1 A (H8 A9 N21) B(H5D10Y16L17) DPI A-COOH	0.15	0.054	12/14/2007	840	0.43	0.44	1/23/2008	181.395
	0.25	0.2	4/16/2008	1080				2.81
IGF-1 A (H8 A9 N21) B(H5D10Y16L17)	0.35	0.064	12/14/2007	360	11.26	2.55	1/23/2008	7.7
								32.54

アナログ	インスリン受容体				IGF-1 受容体				選択率
	EC50:	STDev	日付	% インスリン	EC50:	STDev	日付	% IGF	
A22) DPI A-COOH									
	0.44	0.17	4/16/2008	614					
IGF-1 A (H8 A9 N21) B(H5D10Y16L17 A22) (S=O) DPI A-COOH	0.72	0.098	12/14/2007						
*特段の指示がなければ、全ての C 末端がアミド (DPI)である									

【実施例 12】

【0269】

インスリンポリペプチドの生合成及び精製

10

20

30

40

50

IGF-I C鎖を介して連結される自然のままのB及びA鎖を含むインスリン-IGF-I ($B^0-C^1-A^0$) ミニ遺伝子を、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 (グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH)) 下に発現ベクター-pGAPZ (Invitrogenより購入) でクローニングした。組換えタンパク質の培地中への分泌のために、サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のアルファ-接合因子リーダーシグナルをコードするN-末端ペプチドに前記ミニ遺伝子を融合させた。該ミニ遺伝子と先導-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遺伝子の分泌のためのリーダー配列を切断した。一部位アラニン変異を、 $B^0C^1A^0$ ミニ遺伝子の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) に導入した。

10

$B^0C^1A^0$ 、11のアラニン変異体及び他の選別誘導体を含むミニ遺伝子で、エレクトロポレーションによって酵母ピキア・パストリスを形質転換した。陽性の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、該構築物の酵母ゲノムへの組み込みをPCRにより確認した。アガロースDNAゲル上で833塩基対PCR生成物を可視化した。対応する酵母株を発酵させてインスリンアナログを製造した。酵母細胞は500mLのベックマン (Beckman) 遠心管にて5Kで20分遠心分離してペレットにし、培地はその後のタンパク質精製のために維持した。

増殖培地上清を0.2 μ mのミリポア (Millipore) フィルターでろ過した。該上清にアセトニトリル (ACN) を最終体積20%で添加した。20%のACN水溶液で前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。続いて前記樹脂を30mLの20%ACN水溶液で2回洗浄し、さらに0.1%のTFAを含む30%ACN水溶液で夾雑物を除去した。部分精製インスリンアナログを0.1%TFA含有54%ACN水溶液で前記カラムから溶出し凍結乾燥した。凍結乾燥サンプルを0.025Mの NH_3HCO_3 (pH8) に再懸濁し、ルナ (Luna) C18カラム (粒子サイズ10 μ m、ポアサイズ300) で精製した。ACN水溶液の20 - 60%直線状グラジエントを用いてタンパク質をカラムから溶出した。MALDI-MS陽性分画をプールし、その後の凍結乾燥のために使い捨てシンチレーションバイアルに移した。続いて凍結乾燥サンプルを0.1%TFA含有20%ACN水溶液に再懸濁し、ルナ (Luna) C18カラム (粒子サイズ10 μ m、ポアサイズ300) で精製した。ACN水溶液の18 - 54%直線状グラジエントを用いてタンパク質をカラムから溶出した。タンパク質の溶出は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確認した。

20

30

$B^0-C^1-A^0$ アナログは、インスリン受容体アイソフォーム及びIGF-1受容体の双方で等しく有効な効力を示した。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8アミノ酸へのC-ペプチド短縮は、IGF-1受容体活性の有意な低下によってインスリン作用の特異性の選択的強化を提供した。表11A及び11Bに提供するデータを参照されたい。

【 0 2 7 0 】

Table 11A

インスリンの結合とリン酸化の分析
(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	2.83±1.31	1

【 0 2 7 1 】

Table 11B

IGF-1の結合とリン酸化の分析 (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

【 0 2 7 2 】

図6及び7は、結合親和性 (IC₅₀) 及びチロシンリン酸化による生化学的シグナリング (EC₅₀) の比として単鎖インスリン変異体の *in vitro* 分析を提示する。2つの別個の測定は強い一致を示し、したがって構造-機能に対するこの *in vitro* アプローチの有効性を立証する。アナログの全てが単一の位のナノモル活性を維持し、ある種の特定のアナログは効力がわずかに強化されることを立証する (低い単一の位のナノモル濃度)。もっともインスリン選択性が強いアナログは、C-ペプチドの最後の4残基が失われたもの、C-ペプチドの2位にアラニン変異を有するもの、又は前記の組み合わせであった。

【実施例 13】

【 0 2 7 3 】

ミニPEGで連結される単鎖インスリンアナログの合成及び特徴付け

二工程ネイティブチェーンリグレーション法を用いて、一連の単鎖インスリンアナログを固相合成によって調製した。初期ペプチドは線状構築物であった。前記構築物では、N末端はCysB19で始まりAsnA21まで続き、最後のB鎖アミノ酸のC-末端からA鎖の最初のアミノ酸 (典型的にはグリシン) のN-末端までの接続として機能するエチレングリコールの短い線状ポリマーを有する。B鎖 (典型的には最終的インスリンアナログの最初のアミノ酸で開始し、B鎖のアミノ酸18 (典型的にはバリン) で終わる) のN-末端終部を、単個線状ペプチドにフラグメント結合させた (fragment-coupled)。チオール補助ネイティブチェーンリグレーションによりいったん結合が完了したら、前記ペプチドをクロマトグラフィーにより精製し、正確なジスルフィド異性体に変換し、さらにもう一度高速クロマトグラフィーによって精製した。全てのインスリンアナログをHPLC及びMS分析によって

純度を分析した。

図8Aは、リンカーとしてPEG8を用いる一事例を示す合成設計の模式図を提供する。同じアプローチを用いて、長さがもっと短い及びもっと長いアナログとともに、アミドのような直鎖状態様で共有結合により連結される1つ以上のミニPEGを使用することによって得られる多様な長さをもつアナログも合成した。

図8B及び8Cは、特定の位置で指定の長さのミニPEGによって連結される単鎖インスリンアナログの試験から得られたin vitro実験結果を提供する。図8b及び8Cは、4、8又は16エチレングリコールユニットのミニPEGの使用は効力の貧弱なインスリンアナログ（結合又は生化学シグナリングによって測定したとき自然のままのホルモンと比較して5%未満の活性を有する）を生じること示す。

表11Cに提示するデータは、同じサイズのミニPEGリンカーを用いて短縮B鎖のC-末端をA鎖のN-末端に結合させたとき、劇的に効力が増加することを示す。デス-V（アミノ酸B26-30を亡失）インスリンアナログはいったんミニPEGと結合すると、自然のままのホルモンに負けない、完全長B鎖アナログと対比して10倍を超える効力を示した。

【0274】

表11C：ミニPEG連結単鎖インスリンアナログのインスリン及びIGF-1受容体におけるリン酸化活性

	インスリン		IGF-1	
	%インスリン	n	%インスリン	n
PEG4	5.69	3	0.44	2
PEG8	7.44	5	1.21	4
PEG16	5.17	3	0.16	2
PEG無しデスV	0.04	1	0	1
k-PEG4 デスV	2.37	2	0.16	2
PEG8 デスV	91.2	5	2.43	5
PEG12 デスV	179	3	4.51	3
PEG16 デスV	83.3	3	1.39	3

リン酸化による受容体シグナリングで測定したとき、種々のサイズのPEG連結部分がどのようにインスリン及びIGF-1受容体におけるin vitro活性に影響を与えるかを測定するために、PEG鎖リンカーを用いて比較分析を単鎖アナログで実施した。データは、PEG₁₂デスV構築物（B鎖の5カルボキシ末端アミノ酸が欠失している）はもっとも強力な化合物を提供することを示した。

PEG₁₂及び単個アミノ酸（グリシン又はリジン）を連結部分として含み、自然のままのインスリンA鎖にデスV B鎖を連結する、単鎖アナログを構築した。単鎖PEG/アミノ酸連結アナログのインスリン及びIGF-1受容体におけるin vitro活性の比較分析は、受容体結合及びリン酸化による受容体シグナリングによって測定したとき、PEG/アミノ酸連結アナログは強力なインスリン受容体アゴニストであることを示した。同様に、連結部分への2つのリジン残基の付加（単鎖PEG/(リジン)₂連結アナログ）は、受容体結合及びリン酸化による受容体シグナリングによって測定したとき、強力な単鎖PEG/アミノ酸連結インスリン受容体アゴニストを生じた。

【実施例14】

【0275】

アシル化インスリンアナログ

比較インスリン耐性試験をマウスで実施し、血中グルコース濃度を低下させ低血中グルコース濃度を維持するヒトインスリンの能力を3つの異なるアシル化インスリンアナログと比較した。化合物を2つの異なる濃度で試験した（27nmol/kg及び90nmol/kg）。アシル化インスリンにはMIU-41（A14位に位置するリジン残基に添付されるガンマグルトアミン酸リンカーを介してC16アシル化を有する二鎖インスリンアナログ）、MIU-36（B鎖のN-

末端に連結されるC16アシル化を有する二鎖インスリンアナログ)、及びMIU-37 (B22位に位置するリジン残基に添付されるガンマグルタミン酸リンカーを介してC16アシル化を有する二鎖インスリンアナログ)が含まれていた。3つのアシル化インスリンアナログはいずれも、自然のままのインスリンと比較して、より基礎的なグルコースレベルを提供し低下グルコースレベルを8時間後でさえも維持した(図9A - 9Dを参照されたい)。

【実施例 15】

【0276】

PEG化インスリンアナログ

多様なPEG化インスリンアナログを調製しin vitroで試験した。表12は自然のままのインスリンと比較した各アナログのパーセント活性を示す。

表12: PEG化IGF-1及びインスリンアナログ

MIU #	名称	%インスリン活性		
		IR-B	IR-A	IGF-1 R
MIU-35	B ¹ (H5,H10,Y16,L17)25-C ¹ -A ¹ (H8,N18,N21)	17.4	61.4	3.2
MIU-56	C8-PEG20K B ¹ (H5,Y16,L17)25-PEG8-K-PEG4-A ¹ (N18,N21)		14.8	
MIU-57	B1-PEG20K MIU-35	1.1	3.1	1.2
MIU-58	B2-PEG20K-B2-ダイマー MIU-35	5.8	19.7	2.6
MIU-59	B1-PEG20K インスリン	11.7	17.3	0.3
MIU-60	B29-PEG20K, B1,A1-NH ₂ CO インスリン	2.7	2.4	<<0.3
MIU-61	B1,B29,A1-3-PEG5K インスリン	<0.1	0.2	<<<0.3
MIU-66	B1-PEG20K, A1-NH ₂ CO インスリン	2.9	3.0	<0.3
MIU-67	B2, C8-PEG10K 2-PEG化 MIU-35	0.1	0.2	<0.1
MIU-68	B2, B22-PEG10K 2-PEG化 MIU-35	0.1	0.4	<0.1
MIU-69	B2, A14-PEG10K 2-PEG化 MIU-35	0.5	1.0	<0.1
MIU-1	インスリン標準物	100	100	1.77

比較インスリン耐性試験をマウスで実施し、アシル化インスリンアナログ、デテミア (Detemir) の能力をPEG化単鎖インスリンアナログMIU-56 (B¹(H5,Y16,L17)25-PEG8-K-PEG4-A¹(N18,21)) と対比して比較した。この単鎖アナログは、A鎖及びB鎖を継ぎ合わせる連結部分 (PEG8-K-PEG4) 中のただ1つのリジン残基の側鎖に連結される20kDaのPEGを含む。このPEG化アナログは24時間の作用持続の維持を示し、作用の開始は、24時間を通して作用を持続させるために必要とされる投薬時における動物の鎮静薬を回避するために十分にゆるやかである。

20 k DaのPEG鎖を介して頭対頭で連結される2つのインスリン単鎖アナログ (B¹(H5,Y16,L17)25-C1-A¹(N18,21)) を含むダイマー (MIU58) を調製した。このダイマーは、親化合物よりも効力は低い、なお活性を有することが判明した。

要約すれば、インスリンアナログのPEG化は、インスリン系又はIGF系ペプチド骨格のいずれを用いても、in vivoで低血糖をもたらさずにより延長された作用持続及び基礎プロフィールを提供する。

【実施例 16】

【0277】

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を投与した。プロドラッグ誘導体 [B¹(Y16,L17,Y25)29a : A¹(aF19-dLys(Ac),NLeu)]はA19位に4-アミノ-フェニルアラニン置換を有し、このA19位でジペプチドdLys(Ac),NLeuが、当該A19残基の4-アミノの位置に共有結合により連結される。このジペプチドは、生理学的条件下で約5時間の半減期で自己切断されるであろう。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、血中グルコースを低下させるその能力を

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すことが判明した。

【実施例 17】

【0278】

PEG化される低効力アラニンアナログ

本明細書に開示する多様なインスリンアナログの作用持続時間は、インスリン受容体におけるそれらの活性を低下させることによって増加させることができる。したがって、ある実施態様では、本明細書に開示のインスリンアナログは、改変してインスリン受容体におけるそれらの効力を減少させることができる。前記には、1から8、1から5、1から3、1から2又は1アミノ酸置換による改変が含まれる。ある実施態様では、アミノ酸置換は、B5、B10、B24、A1又はA8から成る群から選択される位置のアラニン置換である。これらの位置の1つ以上におけるアラニン置換は実質的に効力を低下させ、したがってインスリン受容体における作用持続時間を延長する。ある実施態様では、本明細書に開示のインスリンアナログは、B5、B24、A1又はA8位における一アラニンアミノ酸置換によってさらに改変される。これらの化合物を、表13に示すようにPEG化によってさらに改変することができる（GE₅W = GEEEEEW、可溶性を高めるためにインスリンアナログのN-末端に付加されるペプチド）。

【0279】

表13：

名称	配列	IR-B	IR-A	IGF-1 R
MIU-35	B ¹ (H5,10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (H8N18,21)	17.4%	61.4%	3.2%
GE ₅ W-Ala,B5	GE ₅ W-B ¹ (A5H10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (H8N18N21)	2.3%	8.6%	0.3%
Ala,B5	B ¹ (A5H10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (H8N18N21)	5.7%		2.5%
Ala,B24	B ¹ (H5,10Y16L17A24)25-C ¹ -A ¹ (H8N18,N21)	0.4%	0.1%	0.3%
GE ₅ W-Ala,A1	GE ₅ W-B ¹ (H5,10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (A1H8N18,21)	0.7%	2.1%	0.5%
Thr,A8	B ¹ (H5,10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (T8N18,21)	8.4%	20.4%	3.7%
	PEG化アナログ			
MIU-57	B1-PEG20K MIU-35	1.1%	4.5%	1.2%
	B1-PEG20K (GE ₅ W)-Ala,A1 MIU-35	0.1%	0.3%	

表14に示すように、単鎖及び二鎖インスリンアナログを調製し、インスリン及びIGF-1受容体における活性についてin vitroで試験し、さらにそれらのPEG化誘導体と比較した。非PEG化型はPEG化誘導体と比較して高い活性を有する。さらにまた、2つの10kDa PEG鎖を用いる二PEG化二鎖インスリンアナログは、ただ1つの20kDa PEG鎖を含む同じアナログと比較してほぼ同様な活性を有する化合物を生じる（B1,A14-10K B¹(H5,10Y16L17R29)29 : A¹(H8K14N18,21)及びB¹(H5,10Y16L17K29)29 : A¹(H8N18,21)と対比したB¹(H5,10Y16L17K29)29 : A¹(H8,N18,21)の相対的活性を参照されたい）。単鎖アナログB¹(H5,10Y16L17K29)29-A¹(H8,N18,21)については、20kDaの付加は、インスリンタイプA受容体でほぼ100倍の活性を有する化合物B¹(H5,10Y16L17K29)29-A¹(H8N18,21)を生じる。したがって、二鎖又は単鎖アナログを調製し、PEG鎖のサイズ、数及び添付部位を選択することによって、インスリンアナログのin vivo効力を、及びおそらくはin vivo作用持続時間を改変できる。

【0280】

表 14 : 二鎖 IGF-1 アナローグの PEG 化

親ペプチド骨格		配列				IR-A	IR-B	IGF-1R
アナローグ名称								
MIU-43	DP8Mut3	B ¹ (H5,10Y16L17R29)30-C ¹ デス 9-12-A ¹ (H8,N18,21)				97.5%	16.7%	14.2%
	DP8Mut3KA14	B ¹ (H5,10Y16L17R29)30-C ¹ デス 9-12-A ¹ (H8,K14,N18,21)				132.2%	12.6%	
	DP3(SC)	B ¹ (H5,10Y16L17K29)29-A ¹ (H8,N18,21)				0.03%		
	DP3(TC)	B ¹ (H5,10Y16L17K29)29 : A ¹ (H8,N18,21)				159.8%	33.1%	
PEG 化アナローグ								
アナローグ名称		配列				IR-A	IR-B	IGF-1R
MIU-79	ジ-10K-SC	B1,A14-10K	B ¹ (H5,10Y16L17R29)30-C ¹ デス 9-12-A ¹ (H8,K14,N18,21)			1.7%	0.2%	
	ジ-10K-TC	B1,A14-10K	B ¹ (H5,10Y16L17R29)29 : A ¹ (H8K14N18,21)			6.4%	2.1%	
MIU-77	モノ-20K-SC	B1-20K	B ¹ (H5,10Y16L17K29)29-A ¹ (H8N18,21)			0.1%		
MIU-78	モノ-20K-TC	B1-20K	B ¹ (H5,10Y16L17K29)29 : A ¹ (H8N18,21)			8.2%	3.2%	

【実施例 18】

【0281】

インスリンダイマーの調製

ダイマー誘導体を合成するために用いられるモノマーペプチドの配列は表16に列挙される。

【0282】

10

20

30

40

50

表15：インスリンダイマーの配列

No.	インスリンダイマー	MIU#	配列
48	Cys ^{B1} -Cys ^{B1} #2*ダイマー		B ¹ [C1H5Y16L17O22R29]29:A ¹ [O9,14,15N18,21]
49	Phe ^{B1} -Phe ^{B1} #28ダイマー		B ⁰ [R29]29:A ⁰
50	Phe ^{B1} -(GE ₅ W) ₂ -Phe ^{B1} #30ダイマー	MIU-96	GE ₅ W-B ⁰ [H22R29]29:A ⁰
51	Lys ^{B29} -Lys ^{B29} インスリンダイマー	MIU-90	B ⁰ :A ⁰
52	Lys ^{B29} -Lys ^{B29} MIU-3*ダイマー		B ⁰ -C ¹ -A ⁰
53	Lys ^{C8} -Lys ^{C8} #3ダイマー		B ¹ [H5Y16L17]25-PEG ₈ KPEG ₄ -A ¹ [N18,21]
54	Lys ^{C8} -Lys ^{C8} #11*ダイマー		B ¹ [H5,10Y16L17]25-C ¹ [K8]-A ¹ [H8N18,21]
55	Lys ^{B1} -PEG ₉ -Lys ^{B1} #20*ダイマー		GE ₅ K-B ¹ [[H5,10Y16L17]25-C ¹ -A ¹ [H8N18,21]
56	Gly ^{B2} -PEG10K-Gly ^{B2} #11ダイマー		B ¹ [H5,10Y16L17]25-C ¹ -A ¹ [H8N18,21]
57	Gly ^{B2} -PEG20K-Gly ^{B2} #11ダイマー	MIU-58	B ¹ [H5,10Y16L17]25-C ¹ -A ¹ [H8N18,21]
58	Lys ^{C8} -PEG20K-Lys ^{C8} #3ダイマー		B ¹ [H5Y16L17]25-PEG ₈ KPEG ₄ -A ¹ [N18,21]

【 0 2 8 3 】

表16：出発インスリンモノマーの配列

No.	インスリンモノマー	MIU#	配列
2*	Thz-B ¹ -A ¹		Thz-B ¹ [H5Y16L17O22R29]29:A ¹ [O9,14,15N18,21]
3	PEG8KPEG4		B ¹ [H5Y16L17]25-PEG ₈ KPEG ₄ -A ¹ [N18,21]
11	DP8	MIU-35	B ¹ [H5,10Y16L17]25-C ¹ -A ¹ [H8N18,21]
11*	DP8KC8		B ¹ [H5,10Y16L17]25-C ¹ [K8]-A ¹ [H8N18,21]
20*	GE5K-DP8		GE ₅ K-B ¹ [H5,10Y16L17]25-C ¹ -A ¹ [H8N18,21]
28	DP55		B ⁰ [R29]29:A ⁰
30	GE5W DP55H22		GE ₅ W-B ⁰ [R29H22]29:A ⁰
	MIU-3*		B ⁰ -C ¹ -A ⁰

【 0 2 8 4 】

#48:Cys^{B1}-Cys^{B1} #2* ダイマーの全化学合成：

ダイマー#48は、インスリンアナログ#2*の2つの分子をそれらのN末端システインでジスルフィド結合により架橋して調製した。アナログ#2*は、2つのペプチドセグメントのネイティブケミカルリグレーションにより調製した。非天然アミノ酸、チアゾリジン-4-カルボン酸(Thz)(前記はシステインの保護型である)をB鎖のN末端に導入した。インスリンアナログを形成された3つのジスルフィド結合により正確な構造に折り畳んだ後、pH4.0の水溶液中でメトキシルアミンにより処理してThzをシステインに変換した。Thzの導入はB鎖のN末端に追加のシステインを提供し、本来のインスリン配列中の他の6つのシステインのジスルフィドペアリングを破壊しない。B鎖N末端における架橋ジスルフィドの形成を促進するために、DTNP(2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン))をCys^{B1}ペプチドの半分に添加してN-末端システインを活性化させた。続いて前記活性化ペプチドを他方の半分のCys^{B1}ペプチドと反応させて、ジスルフィド連結ホモダイマーを形成した。合成完了後に、このダイマーアナログをトリプシン処理して、両ペプチドサブユニットを二鎖構造に変換した(図22A：#48(Cys^{B1}-Cys^{B1}#2ダイマー)の合成模式図を参照されたい)

。

【 0 2 8 5 】

#49 : Phe^{B1}-Phe^{B1}#28ダイマー 及び #50 : Phe^{B1}-(GE₅W)₂-Phe^{B1}#30ダイマーの半合成 :

アナログ#49及び#50を2つのインスリンアナログ(#28又は#30)のダイマー化によって調製した。ペプチド#28はインスリンB鎖(デスB30)及びA鎖とともに、酵素切断を可能にするためにただ1つのK^{B29}R変異を含んでいた。ペプチド#28は別のアルギニン(B22位)を含んでいた(前記のプロテアーゼ消化のアクセス性はより低い)。反応時間、反応温度及び酵素/ペプチド比を制御することによって、Arg^{B29}のC末端で選択的に切断して二鎖インスリンを生成することができた。二鎖構造への変換は、質量分析で測定したとき18Daの分子量付加によって確認できた。ペプチド#30は、R^{B22}H変異及びN末端における前配列GEE 10
EEEWの存在を除いて#28と構造的に類似していた。Arg^{B22}はHis^{B22}によって取り換えられてより厳密で有効なトリプシン切断を可能にした。

#49及び#50はともに、類似する方法で2つのインスリンペプチドをN末端のアミノ基で架橋することにより合成された。ダイマー#49の合成は図22Bに示されている。s-トリチル-メルカプトプロピオン酸をDIC及びDIEAの存在下でヒドロキシルスクシンイミドにより活性化し、アミン反応性スクシンイミジルエステル(NHSエステル)を生成した。前記NHSエステルをN末端アミノ基と反応させ、各ペプチドのN末端のs-トリチル-メルカプトプロピオン酸とともにアミド結合を形成させた。続いて無水TFAで処理してトリチル保護基を除去した。この方法によって、さらに別のチオール基を各生合成インスリンペプチドのN末端に導入した。N-末端チオール改変ペプチドの半分をDTNP(2,2'-ジチオビス(5-ニトロ 20
ピリジン))で活性化し、続いて他方の半分と混合してN末端架橋インスリンダイマーを生成した(#49及び#50)。合成完了後に、ダイマーをトリプシンで処理して両ペプチドサブユニットを二鎖構造に変換した。

【 0 2 8 6 】

#51 : Lys^{B29}-Lys^{B29}インスリンダイマーの合成 :

ダイマー#51は、2つの自然のままのヒトインスリンペプチドをそれらのLys^{B29}残基でダイマー化して合成した。B鎖及びA鎖のN末端のアミノ基をpH7.0でカルバミル化によって選択的に保護した。続いて、リジン^{B29}の側鎖の -アミンを活性化s-トリチル-メルカプトプロピオン酸と反応させてLys^{B29}チオール-改変インスリンを生成した。前記トリチル保護基をTFA処理により除去し、続いてDTNP(2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン))を触媒に用い2つのチオール基間でジスルフィド結合を形成した(図22C参照)。 30

【 0 2 8 7 】

#52 : Lys^{B29}-Lys^{B29}MIU-3^{*}ダイマー 及び #54 : Lys^{C8}-Lys^{C8}#11^{*}ダイマーの合成 :

ダイマー#52及び#54はともに生合成単鎖インスリンアナログ(前記は意図的に配列中にただ1つのリジンを含んでいる)のダイマーである。ダイマー#52は、Lys^{B29}残基で対称的に架橋されたMIU-3^{*}の2つの分子を含んでいた。MIU-3は以前に単鎖インスリンアナログと確認され、3つの受容体(タイプA及びタイプBインスリン受容体並びにIGF-1受容体を含む)でアゴニスト作用を示した。MIU-3^{*}はMIU-3と同じペプチド配列を共有するが、ただしN末端に前配列GEEEEEWを有していた。ダイマー#54は単鎖インスリンアナログ#11^{*}を用いて構築された。アナログ#11^{*}はアナログ#11のC8位にただ1つのリジン取替えを含んでいた。#52及び#54はともに、#51の合成と類似する方法を用いリジン残基の架橋によって構築された。N-末端 -アミンをカルバミル化によって選択的にブロックし、続いて#51の合成で記載したように(スキーム4)、チオール改変をリジン側鎖の -アミンに導入した。 40

【 0 2 8 8 】

#53 : Lys^{C8}-Lys^{C8}#3ダイマーの合成 :

ダイマー#53はインスリンアナログ#3(Cドメインとして非ペプチドリinkerを含んでいる)から調製した。ペプチド#3は、デスV B鎖、PEGリンカー及びA鎖を含んでいた。リジン残基を8ユニットPEG及び4ユニットPEGの間に挿入し、ダイマー化部位として供した。ペプチド#3は、2つのペプチドセグメント間におけるネイティブケミカルリグーションに 50

より調製された。簡単に記せば、セグメント1はB鎖の最初の17アミノ酸及びそのC末端に活性化チオエステルを含んでいた。セグメント1のN末端をアシル化し、一方、ペプチドアッセンプリー完了後にもなお樹脂上で維持した。セグメント1を、B鎖のC末端であるセグメント2、PEGリンカー及びA鎖に連結し、完全長の単鎖インスリンペプチドを生成した。この完全長生成物を折畳み緩衝液で脱塩し、ペプチドの折り畳み及びジスルフィド形成を可能にした。正確に折り畳まれたペプチドを逆相クロマトグラフィーで精製し、続いてチオール改変に用いた。ペプチド#3は、Cドメインの中央のリジン側鎖上にただ1つのアミノ基を含み、前記は位置特異的チオール導入を可能にした。DTNPの触媒作用下で2つのチオール基間にジスルフィド結合を形成することによって、チオール改変インスリンペプチド(#3)をダイマー化した(図22E)。

10

【0289】

#55: Lys^{B1}-PEG₉-Lys^{B1}#20^{*}ダイマーの合成:

ダイマー#55は、それらのリジン^{B1}側鎖アミンで短い9ユニットPEGスペーサーにより架橋された2つの単鎖インスリンペプチド#20^{*}を含んでいた。ペプチド#20^{*}は、B1位のTrpからLysへの変異を除き#20と同じ配列を共有していた。ペプチド#20^{*}はインスリンペプチドのN末端に前配列GEEEEを含み、前記前配列の除去のためのLysC切断部位としてB1位にリジンを有していた。N末端アミンをカルバミル化によって選択的にブロックし、Lys^{B1}の-アミンをアミン反応性試薬による架橋反応のために残した。続いてLys^{B1}の-アミンを、両末端上にスクシンイミジルエステルを有するホモ-二官能性9-ユニットPEGと反応させて、PEG₉-連結インスリンダイマーを生成した(図22F参照)。PEGペプチドダイマーは、逆相クロマトグラフィーによってモノPEG化ペプチド及び未反応試薬から分離された。

20

【0290】

#56: Gly^{B2}-PEG10K-Gly^{B2}#11ダイマー及び#57: Gly^{B2}-PEG20K-Gly^{B2}#11ダイマーの合成:

ダイマー#56及び#57は、2つの単鎖インスリンペプチドのN末端アミノ基を異なる長さの二官能性PEGリンカーにより架橋して調製された。PEGリンカーは両端をスクシンイミジルエステル(NHSエステル)で官能化され、前記エステルはN末端アミンと反応して、PEGリンカーの両端と2つのインスリン分子を結合させた(図22G参照)。PEGペプチドダイマーは、逆相クロマトグラフィーによってモノPEG化ペプチド及び未反応試薬から分離された。

30

【0291】

#58: Lys^{C8}-PEG20K-Lys^{C8}#3ダイマーの合成:

ダイマー#58は、2つの単鎖インスリンアナログ#3のリジン-アミンを両端にNHSエステルを有する二官能性20K PEGリンカーで架橋して調製された。-アミンとNHSエステルとの間の反応により、2つのペプチドはPEGリンカーの両端に結合された(図21H参照)。PEGペプチドダイマーは、逆相クロマトグラフィーによってモノPEG化ペプチド及び未反応試薬から分離された。

【実施例19】

【0292】

in vitro生物学的活性

40

B1-B1インスリンダイマー

#48: Cys^{B1}-Cys^{B1}#2^{*}ダイマー(完全アゴニスト):

インスリンアナログB¹[H5Y16L17O22R29]29:A¹[09,14,15N18,21]は、Arg^{B29}以外の全てのアルギニンをオルニチンに取り替えたIGF-1から誘導した。オルニチンの側鎖はリジンの側鎖より1メチレン基だけ短い。オルニチンペプチドはトリプシンにより認識されない。なぜならば、短縮側鎖は該酵素の活性部位に嵌合しないからである。したがって、トリプシン切断はB鎖C末端のArg^{B29}に向かい、切断後に二鎖インスリンを生じた。このアナログは、以前の結合アッセイの結果によればタイプAインスリン受容体で55%の活性を示した。アナログ#2^{*}は、B鎖N末端に追加の本来のものではないアミノ酸Thzを含んでいた(前記はメトキシシアミンによる処理でシステインに変換できる)。折り畳みプロセス

50

の完了後に、遊離Cysの存在下に折り畳み緩衝液中でThz^{B1}をCys^{B1}に変換した。Cys^{B1}と溶液中に存在する添加した遊離アミノ酸システインとの間でジスルフィド結合を形成することによって、アナログ2^{*}をモノマー状態で維持した。タイプAインスリン受容体では、Cys-Cys^{B1}ペプチドは、リン酸化アッセイで23.1%の活性及び結合アッセイで55.4%の活性を示した。このことは、ただ1つのシステインをB鎖N末端に添加することはin vitro結合又はシグナリングに影響しないことを示した。

アナログ#48 (アナログ#2^{*}のダイマー型) は、リン酸活性では101.7%の受容体活性及び結合アッセイでは146.7%の活性を示した。ダイマー化は受容体活性で3 - 4倍の増加をもたらし、前記は関数的であるかもしれない。

【実施例 20】

【0293】

全化学合成によるジスルフィド連結ダイマーの調製

B1-B1ジスルフィド連結ダイマー (#48) の合成：

ペプチドセグメント、B¹[Thz1H5Y16L17](1-18)- -チオエステル-RRRR-NH₂、B¹(19-29)[O22]-A¹[09,14,15N18,21]-NH₂、及びN-アセチル-B¹[H5Y16L17](1-18)- -チオエステル-RRRR-NH₂を段階的固相ペプチド合成によって合成した。ネイティブケミカルリゲーションにより2つのペプチドセグメントを一緒に連結して、完全長のインスリンペプチドを生成した。N末端のThzアミノ酸を2mMのメトキシルアミンでpH4.0にて処理してシステインに変換した。反応物を室温で3時間攪拌し、変換の完了はMALDI-TOFで確認した。続いてペプチド溶液をpH8.0に調節し、10% DMSOを添加してジスルフィド結合を誘発した。ダイマーの生成は分析用HPLCでモニターした。ダイマー化生成物は逆相カラムで未反応モノマーから分離し、その実体はMALDIで確認した。

【0294】

C8-C8ジスルフィド連結ダイマー (#53) の合成：

s-トリチル-メルカプトプロピオン酸 (Trt-SCH₂CH₂COOH) (National Biochemical Corp., Ohio)、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (Sigma) 及びジイソプロピルカルボジイミド (DIC) の各々1mmolを2mLのDMF中で室温にて30分攪拌しながら混合し、Trt-SCH₂CH₂CO-NHSエステルを調製した。5% TFAを含む無水DMFにインスリンペプチドを10mMの濃度で溶解した。活性化Trt-SCH₂CH₂CO-NHSエステルの2当量を前記溶液に添加した。2% エタノールアミンで終了させる前に、反応物を室温で2時間攪拌した。続いて4% チオアニソール (Sigma) 及び8% トリイソプロピルシラン (TIPS) (Sigma) を含む無水TFAで、前記反応物を5倍に希釈してトリチル保護基を除去した。脱保護反応物を室温で30分攪拌し、続いてエーテルで20倍に希釈しペプチドを沈殿物として抽出した。前記希釈反応物を遠心分離し、沈殿ペプチドを1% 酢酸/20% アセトニトリル水溶液に溶解して凍結乾燥させた。凍結乾燥生成物をDMSOに再溶解した。前記ペプチド溶液の半分と1等量の2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン) (DTNP) (Sigma) を混合してチオール基を活性化した。前記活性化反応は分析用HPLCでモニターでき、反応の過程もまた黄色の出現で提示された。続いて活性化ペプチドと他方の半分の未反応ペプチドを混合しジスルフィド結合ダイマーを生成した。ダイマー化生成物を逆相HPLCで未反応モノマーから分離し、所望の分画をプールし凍結乾燥させた。前記の実体はMALDI又はLC-MSで確認した。

【0295】

半合成によるジスルフィド連結ダイマーの調製

インスリンアナログを生物学的合成によって大腸菌 (E. coli) 細胞から調製した。N末端アミンをカルバミル化するために、50mMシアン酸カリウム (Sigma) を含むPBS緩衝液 (pH7.0) にインスリンペプチドを0.5mg/mLの濃度で溶解した。反応物を室温で一晩攪拌し、カルバミル化反応の完了をMALDIで確認した。前記カルバミル化ペプチドを逆相カラムで脱塩し、ペプチド含有分画をプールし凍結乾燥させた。N末端の -アミン又はリジン側鎖の -アミンでHS-CH₂CH₂COをペプチドに結合させて、ダイマー#53の合成で述べたように2つの分子間でジスルフィド結合を形成することによってインスリンダイマーを生成した。

【 0 2 9 6 】

半合成によるPEG連結ダイマーの調製

化学合成又は生合成によって調製したインスリンペプチドを5%DIEA含有無水DMFに10mg/mLの濃度で溶解した。二官能性NHS-PEG_n-NHS (n=9、10K、20K) (Creative PEGWorks) の0.5当量をペプチド溶液に添加した。反応物を室温で1時間攪拌した。反応過程は分析用HPLCでモニターした。完了後、反応物を少なくとも20倍の反応物体積に0.1%TFA/10%アセトニトリル水溶液で希釈した。希釈反応物を続いて逆相カラムにロードし、ダイマー化誘導体を精製し凍結乾燥させた。

【 0 2 9 7 】

in vitro生物学的活性のアッセイ競合結合アッセイ：

インスリンアナログの受容体結合親和性を、シンチレーションプロキシミティ技術を用いて競合結合アッセイで試験した。組換えヒトインスリン (Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN) を標準物質として (“コールド” の自然のままのインスリン) この試験に加えた。96ウェルプレート (Corning Inc., Acton, MA) で、インスリンアナログ及びインスリン標準物についてシンチレーションプロキシミティ緩衝液で連続5倍希釈を実施した。前記緩衝液は以下を含む：50mMトリス-HCl、150mM NaCl、0.1%w/vウシ血清アルブミン (Sigma Aldrich, St Louis, MO) (pH7.5)。希釈ペプチドを0.05nMの組換えヒト^[125I]-インスリン (3-^[125I]ヨードチロシルTyr^{A14}インスリン) (Perkin Elmer, Waltham, MA) と混合した。ヒトインスリン受容体を過剰発現する細胞の1 - 6mgの形質膜フラグメントのアリコットを、プロテアーゼ阻害剤及び0.25mgのポリエチレンイミン処理 (PVT) コムギ胚芽アグルチニン (WGA) シンチレーションプロキシミティビーズ (Aersham Biosciences, Piscataway, NJ) とともに各ウェルに添加した。プレートを800rpmで5分間震盪し、続いて12時間室温でインキュベートした。放射能をマイクロベータ (MicroBeta1) 450液体シンチレーション計測装置 (Perkin Elmer, Waltham, MA) で測定した。非特異的結合 (NSB) の放射能は、最高濃度の試験サンプルの4倍濃度の “コールド” の自然のままのインスリンを含むウェルで測定した。全結合放射能 (TB) は、競合物として “コールド” の自然のままのインスリンを含まないウェルで検出した。特異的結合パーセンテージは[(結合-NSB)/TB] × 100%として計算した。試験サンプル濃度に対する%特異的結合のプロットはIC50値を提供する (前記はオリジンソフト (Origin software (Origin Lab, Northampton, MA)) によって決定された)。アナログの親和性は自然のままのヒトインスリンの親和性と比較した値として示された：[IC50(インスリン)/IC50(アナログ) × 100%。

【 0 2 9 8 】

受容体キナーゼ活性アッセイ：

タイプAインスリン受容体、タイプBインスリン受容体又はIGF-1受容体を過剰発現するトランスフェクトHEK293細胞を、抗生物質、10mM HEPES及び125 µg/mLゼオシン (Zeocine) を含む10%ウシ増殖血清補充ダルベッコ (Dulbecco) 改変イーグル培地 (DMEM, Hyclone, Logan, UT) で維持した。ポリリジン被覆96ウェルプレート (Corning) で、細胞を80 µLの血清枯渇培地に4.0 × 10⁴細胞/ウェルの密度でプレートした。細胞を16時間、無血清DMEM (0.25%ウシ増殖血清、抗生物質及び10mM HEPESを含む) で培養した。0.5%BSA含有DMEMでインスリンアナログ及びインスリン標準物質について連続5倍希釈を実施した。トランスフェクト細胞を含む各ウェルに20 µLのアナログ溶液を添加し、37 °Cで15分間インキュベートした。インキュベーション後に細胞をホルマリンで20分間固定し、続いて0.1%トリトンX-100含有PBS緩衝液で2回洗浄した。続いて封鎖溶液 (PBS、0.1%トリトンX-100及び2%BSAを含む) を添加して、非特異的な抗体結合部位を封鎖した。3回洗浄後、50 µLの抗体 (4G10抗ホスホチロシン-HPR結合物 (Millipore)) を10,000倍希釈してプレートに添加した。細胞を抗体とともに3時間室温でインキュベートし、続いて0.1%トリトンX-100含有PBSで4回洗浄した。100 µLの蛍光発生基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加し、蛍光発生のために5 - 10分間インキュベートした。蛍光発生反応は1NのHClを添加して停止させた。蛍光シグナルは、タイタ

10

20

30

40

50

ーテック (Titerteck) マルチスキャンMCC340リーダーにより450nmでプレート进行スキャンして記録した。EC₅₀値は、オリジンソフト (Origin Lab, Northampton, MA) を用いて、試験サンプル濃度に対してOD450nmをプロットすることによって計算した。

全てのアッセイでヒトインスリン標準物質又はヒトIGF標準物質と比較した活性が各実験内で決定され、続いて実験数に対して平均が決定される。したがって、あるアナログのEC₅₀又はIC₅₀は受容体結合活性を示すであろう。

【0299】

アンタゴニスト作用アッセイ：

0.5%BSA含有DMEMでインスリンアナログ及びインスリン標準物質について連続5倍希釈を実施した。10μLのアナログ溶液を10μLのインスリン溶液 (12nM) と混合して、6nMのインスリン及び所望の濃度のインスリンアナログを含む混合物を調製した。20μLの混合溶液を、トランスフェクト細胞を含む各ウェルに添加し、37℃で15分間インキュベートした。この後に続く手順は上記に記載した受容体キナーゼ活性アッセイと同じであった。

10

【0300】

げっ歯類におけるインスリン耐性試験：

急性インスリン耐性試験を試験期間中ずっと絶食させたC57BL/6マウス又はdb/dbマウスで実施した。試験化合物は皮下に投与した。血中グルコースレベルを注射直前、並びに8時間試験では1、2、3、6及び8時間で、又は24時間試験では1、2、3、6、8、12及び24時間で測定した。

20

【0301】

B1-B1 PEG連結インスリンダイマー (完全アゴニスト)：

一連のPEG連結B1-B1ダイマーを調製し、受容体活性におけるリンカーの長さの影響を同定した。PEGリンカーの分子サイズは500Daから20KDaまで変化させた。全てのPEG連結B1-B1ダイマーはインスリン受容体で完全なアゴニストであった。それらの受容体活性は表17に要約されている。ダイマー#55は2つのインスリンアナログ間にリンカーとして9ユニットの短いPEGを含み、#55の活性はそのモノマーペプチド骨格#20と類似していた。ダイマー#56及び#57は相対的に大きなPEGリンカーを含んでいた。これは、おそらく立体的妨害のために受容体活性を高度に低下させた。PEGリンカーの分子サイズの増加は、明らかに受容体活性に対してより強い負の影響を誘発した。しかしながら、タイプA及びタイプB受容体の双方で、PEG20K架橋ダイマー (#57) は、20K PEG化モノマー (#39) よりもほぼ4倍強力であり、ダイマー構造はインスリン受容体に対して相乗的結合を誘発し受容体活性の増加をもたらすように思われることを示している。

30

【0302】

表 17 : PEG 連結インスリンダイマーの受容体活性

No.	名称	MIU#	配列	リン酸化 (EC ₅₀)		
				%IR-B	%IR-A	%IGF-1R
	インスリン		B ⁰ :A ⁰	100.0	100.0	1.8
	IGF-1		B ¹ C ¹ A ¹ D ¹	0.7	8.4	100.0
55	Lys ^{B1} -PEG ₉ -Lys ^{B1} #20*ダイマー		GE ₅ -K-B ¹ (H5,10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (H8N18,21)	-	44.0	-
56	Gly ^{B2} -PEG10K-Gly ^{B2} #11 ダイマー		B ¹ (H5,10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (H8N18,21)	9.7	38.2	-
57	Gly ^{B2} -PEG20K-Gly ^{B2} #11 ダイマー	MIU-58	B ¹ (H5,10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (H8N18,21)	5.8	19.7	2.6%
58	Lys ^{C8} -PEG20K-Lys ^{C8} #3 ダイマー		B ¹ (H5Y16L17)25-PEG ₈ -K-PEG ₄ -A ¹ (N18,21)	-	18.6	-
38	C8-PEG20K #3 モノマー	MIU-56	B ¹ (H5Y16L17)25-PEG ₈ -K-PEG ₄ -A ¹ (N18,21)	2.0	14.8	-
39	B1-PEG20K #11 モノマー	MIU-57	B ¹ (H5,10Y16L17)25-C ¹ -A ¹ (H8N18,21)	1.1	4.5	1.2

【実施例 2 1】

【0 3 0 3】

B29-B29インスリンダイマー

#51 : Lys^{B29}-Lys^{B29} インスリンダイマー (部分的アゴニスト) :

10

20

30

40

50

ダイマー#51は、自然のままのインスリン配列で組み立てられたB29-B29架橋ダイマーである。ダイマー#51は、以前に報告したB29-B29' PEG連結ダイマーと構造的に類似するが、#51がジスルフィド結合によって架橋されているという点異なる。同一ではないが、#51のリンカーの長さは、Lys^{B29}の -アミンが8原子リンカーによって離されているのでB29-B29' ダイマーとほぼ同じである。さらにまた、#51は、B鎖及びA鎖のN末端にカルバミル化を含み、それは受容体効力を~30%減少させるがインスリン受容体における完全なアゴニスト作用は維持した。

以前に報告したB29-B29' ダイマーと同じように、#51はまたインスリン受容体で部分的アゴニスト作用を示した。ダイマー#51はS字状用量応答曲線を誘発することができ、インスリン受容体でダイマー#51によって誘発される最大応答は、自然のままのインスリンによって誘発される最大応答のちょうど半分であった(図11A及び図11B)。インスリン受容体における他の弱い完全なアゴニストとは異なり、最大応答はリガンドの濃度を単純に上昇させることでは達成できなかった。部分的アゴニストのEC₅₀は図11に列挙されなかった。なぜならば、当該値は、最大応答のレベルの相違のために完全アゴニストの値と対比させることができなかったからである。

部分的アゴニスト#51はまた、インスリン受容体でインスリン作用に対してアンタゴニスト作用を示した。アンタゴニスト作用を試験するために、インスリン受容体を過剰発現する操作HEK293細胞を表示の濃度の#51及び6nMのインスリンの組み合わせで処理した。受容体キナーゼ活性アッセイの以前の結果を基にして、6nMのインスリンが95%の最大応答を誘発できた。コントロール実験では、インスリンと入れ替えて当該手順をダイマー#51で繰り返した。この拮抗アッセイは、#51はインスリン作用と拮抗し、自然のままのインスリンによって誘発される最大応答の半分に受容体応答を減少させ得ることを示した。

ダイマー#51はまた、自然のままのインスリンと比較したときIGF-1受容体で効力の低下を示した(図11C)。応答曲線は低い効力のために不完全であったので、IGF-1受容体で#51は部分的アゴニストであったのか又は弱い完全アゴニストであったのかは明瞭ではない。ダイマー#51はまた、HMEC分裂アッセイでHMEC細胞増殖の刺激に弱い効力を示した(図11D)。

【 0 3 0 4 】

C8-C8インスリンダイマー

#53 : Lys^{C8}-Lys^{C8}#3ダイマー (部分的アゴニスト) :

ダイマー#53はアナログ#3の2つの分子をダイマー化して調製された。ペプチド#3はIGF-1誘導単鎖アナログであり、8-ユニットミニPEG、リジン及び4-ユニットミニPEGで連結されたIGF-1 B鎖及びA鎖を含む。インスリン受容体活性を回復させさらにIGF-1受容体活性を減少させるために、精選変異をB鎖及びA鎖に導入した。ペプチド#3はインスリン受容体で完全な効力を示した。追加のチオール基をメルカプトプロピオン酸との反応によりLys^{C8}側鎖に導入した。それぞれのC8位の2つのチオール基の間にジスルフィド基を形成し、2つのペプチドを架橋してダイマー#53を生成した。

ダイマー#53はまたタイプA及びタイプB両インスリン受容体で部分的なアゴニストであった。#53によって誘発される最大応答はまた、両受容体でインスリンによって誘発される最大応答のちょうど半分であった。濃度の増加につれて、受容体応答は減少した。高濃度で、#53は当該受容体を完全に不活化することができた。拮抗アッセイは#53が競合的にインスリンの作用を阻害することを示し、高濃度ではインスリン受容体は完全にサイレントであった。IGF-1受容体では、#53はまた部分的アゴニスト作用を示した。#53は受容体応答刺激で不完全性を示したが、前記はインスリン受容体との結合では完全に強力であった。結合アッセイでは、#53は、濃度が増加するにつれインスリン受容体から放射能標識インスリンを完全に追い出すことができた。#53の結合親和性は自然のままのインスリンより~1.5倍も高かった(図17)。結合親和性と生物学的応答誘発能力との間の矛盾は、インスリン作用に対するアンタゴニスト作用が理由であるはずである。この現象は、B29-B29' ダイマーの研究で報告され、B29-B29' ダイマー及びC8-C8' ダイマーの本データでもまた観察され、当該矛盾は部分的アゴニストダイマーの固有の構造的な特徴であること

が示唆される。この部分的アゴニスト作用は、in vivoにおける新規な治療特性と不可分であり得る。なぜならば、インスリン作用と拮抗する能力は過剰投与の傾向を制限し得るからである。

【 0 3 0 5 】

#58 : Lys^{C8}-PEG-Lys^{C8}#3ダイマー (完全アゴニスト) :

アナログ#3のC8位に結合される20kPEGを有するアナログ#38は完全アゴニストである。したがって、C8位の改変により誘発される構造的変化で部分的アゴニスト作用は引き起こされなかった。ダイマー内の2つのインスリン分子間の距離の影響を調べるために、20K PEGリンカーを導入して、アナログ#3の2つの分子をそれらのC8位で架橋した(前記はダイマー#58を生じた)。#58では、2つのインスリン分子は大きなPEGスペーサーで離され、より独立的に作用すると期待された。ダイマー#58はインスリン受容体で完全なアゴニスト作用を示し、おそらくは立体的PEGリンカーのために効力が低下した。PEGリンカーによるインスリン分子の分離はインスリン受容体における部分的アゴニスト作用を停止し、2つの活性部位間の距離は部分的アゴニスト作用にとって決定的であることを示唆した。PEG連結ダイマー#58はPEG化モノマー#38と類似する効力を示した。B1-B1 PEG連結ダイマーについて観察された効力の増加はC8-C8 PEG連結ダイマーでは出現せず、C8-C8'結合は、インスリン受容体との相乗的結合のためにB1-B1'結合ほど適切ではない可能性を示唆した。

【 0 3 0 6 】

#54 : Lys^{C8}-Lys^{C8}#11^{*}ダイマー (完全アゴニスト) :

ダイマー#54もまたIGF-1誘導鎖アナログ(#11^{*})から作製された。ミニPEGリンカーの代わりに、#11^{*}のCドメインはIGF-1 Cペプチドに由来する12アミノ酸を含んでいた。IGF-1 CペプチドのArg^{C8}をLys^{C8}と取り替え、前記をダイマー化部位として用いた。ダイマー#54もまたインスリン受容体でほぼ完全なアゴニストであった(図18A及び18B)。#54によって誘発される最大受容体応答のレベルは、他の2つの部分的アゴニスト(#51及び#53)によって誘発されるものよりはるかに高かった。ダイマー#53及びダイマー#54は受容体における作用態様で大きな相違を示したが、ただしそれらはともにC8-C8'結合を有していた。前記相違はペプチド骨格の構造から発した。#3と#11^{*}との間のもっとも顕著な相違はCドメインの内容であった。ペプチド#3はCドメインとして非ペプチジルPEGを利用し、一方、#11は12アミノ酸配列を含んでいた。両Cドメインの長さはほぼ同じであったが、PEGリンカーはアミノ酸配列よりも可撓性がより大きいと考えられ、構造的剛直性による拘束はおそらくより少なかった。構造的可撓性の重要性はまたB29-B29ダイマーの研究でも観察された。二鎖インスリンのダイマー(#51)は部分的アゴニストであり、一方、12アミノ酸CペプチドによるB鎖及びA鎖の結合(#52)は部分的アゴニスト作用を喪失させた。ペプチド#11^{*}はまたB10及びA8位に追加された2つのHis変異を含み、前記は受容体選択性を高めるために設計された。これら2つの変異は、部分的アゴニスト作用の決定に必要とされる蓋然性はより少ないと考えられる。

【 0 3 0 7 】

動物実験 : in vivo活性

B1-B1'ダイマー#50 (完全アゴニスト) 及びB29-B29'ダイマー#51 (部分的アゴニスト) :

完全アゴニスト#50及び部分的アゴニスト#51を実験期間中ずっと絶食させた正常マウスで試験した。試験化合物は皮下注射により投与し、血中グルコースレベルを注射後24時間にわたって測定した。

インスリンを正常マウスに陽性コントロールとして投与した。インスリンは注射後2時間以内に血中グルコースレベルの迅速な減少を誘発した。血中グルコースレベルは注射後2時間で上昇し始め、4時間後に基準線に復帰した(図14A)。完全アゴニスト#50はin vivoで効力の有意な強化を示した。#50の12nmol/kgの投薬は、自然のままのインスリンの60nmol/kg投薬と同様な血糖効果を示した。60nmol/kg用量で#50を投与された8匹のマウスのグループで2匹のマウスのみが生存し、300nmol/kg投与では当該グループのマウスはいず

10

20

30

40

50

れも生存しなかった（図14B）。ダイマー#50はin vitroアッセイでは自然のままのインスリンよりも～2倍強力であったが、in vivoではインスリンよりも約5倍強力であった。in vivoアッセイにおけるこの顕著な増加はアビジチーの結果の可能性がある（in vitro細胞系アッセイではそれを捕捉できなかった）。

部分的アゴニスト#51はin vivoで効力の低下を示した。#51の60nmol/kgの投薬によって誘発される血糖効果はインスリンの20nmol/kg投薬によって誘発される血糖効果と同様であった。#51の300nmol/kg投薬によって誘発される血中グルコースプロフィールはインスリンの60nmol/kg投薬によって誘発されるものと同様であった。最高の投薬の300nmol/kgでも、#51は低血糖を誘発しなかった（図14C）。この効力の低下は、in vitroで観察されたように、おそらく受容体における部分的活性化によって引き起こされる。

10

【0308】

PEG連結ダイマー及びPEG化モノマー：

PEG化モノマー及びPEG連結ダイマーはともに血中グルコースの減少を誘発でき、前記作用は非PEG化ペプチドと比較して長く続いた。PEG化モノマーの血糖効果は24時間にわたって延長されたが、PEG連結ダイマーの投与後に血中グルコースレベルは6時間後に上昇を開始した。このことは、PEG連結ダイマーは、PEG化モノマーよりも循環からより迅速に除去される可能性があることを示した。

PEG連結ダイマーはインスリン受容体で完全なアゴニストであった。Gly^{B2}-PEG20K-Gly^{B2}ダイマー#57は、Gly^{B2}-PEG20Kモノマー#39よりもin vitroで約5倍強力であった。しかしながら、ダイマー#57のin vivo血糖効果はモノマー#39の血糖効果よりも延長が短く、ダイマー#57の両投薬のAUCはモノマー#39のAUCよりも低かった。当該ダイマーによってもたらされる受容体における効力の増加は受容体媒介除去を加速する可能性があり、前記は薬理動態プロフィールの短縮をもたらすであろう（図15A及び15B参照）。

20

【実施例22】

【0309】

インスリンヘテロダイマーの調製

本実験では、我々は、B29及びA1をつなぐペプチド結合を介して1つの活性な単鎖インスリン及び1つの不活性なモノマーミニプロインスリンを含む共有結合連結インスリンヘテロダイマーを調製した。不活性なモノマーユニットは酵素により活性な状態に変換でき、前記は各モノマーユニットの個々の機能の解明を可能にした。さらにまた、我々は、IR-A優先IGF-2結合を介してIR-A活性に選択的に拮抗するように、2つのインスリン-IGF-2ヘテロダイマーを設計した。インスリン-インスリンヘテロダイマー及びインスリン-IGF-2ヘテロダイマーに関するこの構造情報は表18に要約され、これらのヘテロダイマーの構築に用いられたモノマーペプチドは表19に列挙されている。

30

【0310】

表18：インスリン-インスリンヘテロダイマー及びインスリン-IGF-2 ヘテロダイマーの配列

No.	インスリンダイマー	配列
59	Cys ^{B1} -Lys ^{C8} #2(sc) - #3 ダイマー	B ¹ [C1H5Y16L17K29]29-A ¹ [N18,21] + B ¹ [H5Y16L17]25-PEG ₈ KPEG ₄ -A ¹ [N18,21]
60	Cys ^{B1} -Lys ^{C8} #2(tc) - #3 ダイマー	B ¹ [C1H5Y16L17K29]29-A ¹ [N18,21] + B ¹ [H5Y16L17]25-PEG ₈ KPEG ₄ -A ¹ [N18,21]
61	Phe ^{B1} -Lys ^{C8} #27 - #31 ダイマー	B ⁰ 25-C ¹ -A ⁰ + B ² -C ² [K8]-A ² -D ² [R4]
62	Lys ^{C8} -Ala ^{B1} #27* - IGF-2 ダイマー	B ⁰ 25-C ¹ [K8]-A ⁰ + B ² -C ² -A ² -D ² [R4]

【 0 3 1 1 】

表19：インスリン及びIGF-2モノマーの配列

10

20

30

40

No.	インスリンモノマー	配列
2(sc)	Thz-B ¹ -A ¹ (単鎖)	Thz-B ¹ [H5Y16L17K29]29-A ¹ [N18,21]
2(tc)	Thz-B ¹ -A ¹ (二鎖)	Thz-B ¹ [H5Y16L17K29]29 : A ¹ [N18,21]
3	PEG8KPEG4(SC)	B ¹ [H5Y16L17K29]25-PEG ₈ KPEG ₄ -A ¹ [N18,21]
27	DP9	B ⁰ 25-C ¹ -A ⁰
31	DP28	B ² -C ² [K8]-A ² -D ² [R4]
27*	DP9KC8	B ⁰ 25-C ¹ [K8]-A ⁰
	IGF-2	B ² -C ² -A ² -D ²

10

【 0 3 1 2 】

インスリンヘテロダイマーは2つの異なるインスリンモノマーを架橋することによって合成された。位置特異的架橋は、チオール活性化インスリンペプチドとチオール改変インスリン誘導体との間でジスルフィド結合を形成することによって達成された。

ダイマー#59は2つの異なるインスリンアナログ#2(sc)及び#3を含んでいた。前記ダイマーは、#2(sc)のB1位と#3のC8位との間で架橋された。#2及び#3はともに、インスリン受容体活性を回復しさらにIGF-1受容体活性を低下させる精選変異を有するIGF-1系配列から誘導された。ペプチド#2(sc)は、直鎖 -アミド結合によってつながれたLys^{B29}及びGly^{A1}を有するB鎖及びA鎖を含んでいた。単鎖#2(sc)は、LysC酵素による処理で二鎖アナログ#2(tc)に変換できた。ペプチド#2(tc)は、インスリン受容体との結合及び受容体活性化刺激において完全な効力を示した。アナログ#2は、非天然アミノ酸ThzをB鎖のN-末端に含み、前記は水溶液中においてpH4.0でメトキシルアミンによる処理でシステインに変換できた。N-末端システインを他のペプチドの活性化チオール基と反応させてジスルフィドを形成した(前記は2つのインスリンモノマーを架橋してダイマーを形成する)。

20

#2の全合成は図23Aに示されている。2つのペプチドセグメントを段階的固相ペプチド合成によって個々に調製した。第一のセグメントはB鎖のN-末端18アミノ酸とともにネイティブケミカルリグーションのために意図されるチオエステル活性化を含んでいた。4つのアルギニンを前記チオエステルのC末端に付加し、このセグメントの可溶性を強化した。第二のセグメントは残りのB鎖及び完全長のA鎖を含んでいた。この2つのペプチドセグメントを逆相クロマトグラフィーで精製してから、一緒に連結して完全長の単鎖インスリンを生成した。第二のセグメントのN-末端システインを第一のセグメントのC-末端チオエステルとチオール-チオエステル交換により反応させて、チオエステル連結中間体を生成した。再編成は5員環内で生じ、2つのペプチドセグメント間で本来のペプチド結合を形成した。連結反応の完了は分析用HPLC及び質量分析によって確認された。完了したら、脱塩及び緩衝液交換のために前記連結反応物をサイズ排除クロマトグラフィーにロードした。ペプチドを小分子試薬から分離し、折畳み緩衝液(20mMグリシン、0.5M GnHCl (pH0.5))と交換した。所望のペプチド生成物を含む分画をプールし、ペプチド濃度を0.5mg/mLに調整した。前記折畳み反応物にシステインを8mMの濃度で添加してジスルフィドシャッフリング及びペプチド再折畳みプロセスを促進した。窒素をペプチド溶液に送り込み空気媒介酸化を減少させた(前記によって過誤折り畳み異性体の生成が減少する)。折畳み反応は攪拌せずに室温でまた別には4 で維持した。ペプチドの折り畳みプロセスを完了させるために、一般的には室温で24時間、4 で48時間を要した。正確な構造に折り畳まれた後は疎水性が減少するので、折り畳みの進行は分析用HPLCで観察できた。ペプチドの折り畳みはまた質量分析によっても確認でき、3つのジスルフィド結合の形成により6ダルトンの分子量の減少が提示された。正確に折り畳まれたペプチドは、逆相クロマトグラフィーによって過誤折り畳み異性体及び他の試薬から分離された。続いて精製インスリンアナログ#2をメトキシルアミン(pH4.0)で処理し、N末端Thzをシステインに変換した。チオール活性化試薬2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン)(DTNP)もまた当該ペプチド溶液に添加して、N-末端システインのチオール基をin situで活性化した。チオール活性化インスリンアナログ#2を逆相クロマトグラフィーで精製し、ヘテロダイマーの構築に用いた。

30

40

50

【0313】

チオール改変インスリンアナログ#3の調製は図23Bに示されている。アナログ#3は単鎖インスリンアナログで、B鎖とA鎖との間のCドメインとして非ペプチジルリンカーを有していた。以前の試験では、12ユニットPEGによるTyr^{B25}からGly^{A1}の連結は、インスリン受容体で完全な効力を有する単鎖インスリンアナログの生成を確認した（PCT/US2011/040699（前記文献の開示は本明細書に組み入れられる））。我々は、PEGリンカーの中央にリジンを付け加えて、改変のための部位として供した。この変化は受容体の活性に影響を与えなかった。ペプチド#3をB鎖のN-末端でアシル化して -アミンを封鎖した（前記はリジン側鎖 -アミンにおける位置特異的改変を可能にした）。ペプチド#3もまた、固相ペプチド合成及びネイティブケミカルリゲーションを組み合わせることで多様な態様で合成した。第一のセグメントはB鎖のN-末端17アミノ酸及びC末端のチオエステルテールを含んでいた。このペプチドセグメントは、C末端チオエステルが塩基に対し不安定であるのでt-Boc化学反応によって合成した。ペプチドを樹脂から切断する前にN-末端アミンをアセチル化した。第二のセグメントはB鎖の残りの7アミノ酸、8ユニットミニPEG、リジンとその後続く4ユニットミニPEG及び完全長A鎖を含んでいた。第二のペプチドセグメントはt-Boc化学反応及びFmoc化学反応の双方で調製でき、この実験ではFmoc手法によって合成した。完全長アナログ#3を上記に記載した方法と同じ方法で結合し折り畳んだ。リジンの側鎖アミンにチオール基を導入するために、我々は、s-トリチル-メルカプトプロピオン酸をDIC及びDIEAの存在下でヒドロキシルスクシンイミドと反応させることによって、アミン反応性スクシンイミジルエステル（NHSエステル）を調製した。NHSエステルをN末端アミノ基と反応させてアミド結合を生成した（前記はs-トリチル-メルカプトプロピオン酸とペプチドのN末端を結合させる）。続いてトリチル保護基を無水TFAによる処理で除去した。したがって、追加されるチオール基は、予め形成された3つのジスルフィド結合を妨害することなく生合成インスリンペプチドのN-末端に導入された。

チオール活性化インスリンアナログ#2及びチオール改変アナログ#3を1:1の比でDMFに溶解した。2つのチオール基との間のジスルフィド結合の形成は2つのインスリン分子間でB1-C8結合を生じて#59（Cys^{B1}-Lys^{C8}#2(sc)-#3インスリンヘテロダイマー）を生成した（図24A）。ダイマー#59はLysCプロテアーゼによって#60に変換できた。LysCは選択的にLys^{B29}のC末端で切断され、二鎖構造を生成した（図24B）。

アナログ#61は、1つの単鎖インスリンモノマー及び1つのIGF-2モノマーを含むヘテロダイマーであった。インスリンアナログ#27のN-末端アミンはジスルフィド結合を介してIGF-2アナログ#31のLys^{C8}側鎖アミンと架橋された。ペプチド#27は、インスリンデSV B鎖、12アミノ酸IGF-1 C鎖及びインスリンA鎖を含む単鎖インスリンアナログであった。ペプチド#31はArg^{C8}Lys及びLys^{D4}Argの2つの変異を有するIGF-2アナログで、前記はC8位への位置特異的結合を可能にした。#27及び#31とともに大腸菌細胞での生合成で調製した。精製インスリンアナログ#27を、s-トリチル-メルカプトプロピオン酸の活性化NHSエステルと反応させてN-末端アミンを改変した。トリチル保護基はTFAで切断して遊離チオール基を生じ、このチオール基を続いてDTNP（2,2'-ジチオビス（5-ニトロピリジン））を用いて活性化した（図25A）。チオール活性化インスリン#27は、IGF-2アナログ#31と架橋させる前に精製した。意図的に、#31は配列のC8位にただ1つのリジンアミノ酸を含んでいた。アナログ#31のN-末端アミンは、シアン酸カリウムとの反応によるpH7.0でのカルバミル化によって選択的に封鎖され、この活性化NHSエステルとのカップリングのためのただ1つの反応部位としてLys^{C8}が残された。続いて、上記に記載した同じ手法を用いてメルカプトプロピオニル基でLys^{C8}を改変した（図25B）。続いてDMSO中でチオール改変#31を#27と1:1の比で混合して、ダイマー#61（#27-#31ヘテロダイマー）を生成した（図25C）。ジスルフィド形成反応で遊離された5-ニトロピリジン-2-チオールはDMSO中で黄色を示した（前記は反応の進行を示した）。

【0314】

ダイマー#62は#61と比較して逆向き結合を含んでいた。IGF-2のN-末端は単鎖アナログ#27^{*}のLys^{C8}と架橋された。ペプチド#27^{*}は、架橋反応のために設計されたC8位のリジ

ン変異を除いて#27と同じ配列を共有した。ペプチド#27^{*}はN末端で選択的にカルバミル化され、続いてLys^{C8}は上記に記載したようにメルカプト-プロピオニルで改変された(図26A)。他方のモノマーユニットは自然のままのIGF-2ペプチドから調製された。自然のままのIGF-2はDドメインにリジン残基を含んでいた。このリジンの ϵ -アミンをpH10.5でアセトイミド化して選択的に封鎖した。アセトイミド化反応はN末端 ϵ -アミンでは生じないが、それはこれら2つのアミン基のpKaが相違するためであった。続いてN末端 ϵ -アミンをメルカプトプロピオニル基で改変した(図26B)。チオール改変#27^{*}又はチオール改変IGF-2のどちらかをDTNPで活性化し、続いて他方のペプチドの遊離チオール基と反応させることができた。この実験では、我々は、チオール改変#27^{*}の活性化を選択した。なぜならば、#27^{*}はIGF-2よりも疎水性であり、活性化Cys(Npys)-27^{*}はさらに疎水性が高かったからである。このことは、逆相HPLCでの維持時間で測定される2つのモノマーの溶出ピークの明瞭な分離を可能にした。C8-チオール活性化#27^{*}をDMSO中でB1-チオール改変IGF-2と1:1の比で混合し、ダイマー#62を生成した(図26C)。ダイマー形成は2つのモノマーピークの間に出現する新規な溶出ピークによって示された。

【0315】

ヘテロダイマーのin vitro受容体活性

#59の一方のモノマーを直鎖 ϵ -アミド結合でB29からA1に繋ぐことによって不活化した。以前の実験によって、インスリンのLys^{B29}とA鎖のN末端との間のペプチド結合は当該分子を完全に不活化するが、B29-A1インスリンの結晶構造は自然のままのインスリンと本質的には同じであることが示された。一方のモノマーを不活化することによって、他方の活性なモノマーの機能を#59で解明しようとした。ダイマー#59は、タイプAインスリン受容体でほとんどアゴニスト作用を示さなかった。#59によって誘発される最大受容体応答は、基準線レベルから顕著には相違しなかった。インスリン受容体を過剰発現するHEK293細胞を6nMのインスリン及び指定濃度の#59で処理した。6nMのインスリン濃度は、インスリン受容体で最大応答の95%の誘発に有効であることが立証された。受容体応答は、6nMのインスリンの存在下で#59の濃度を増加させることによって低下し、ダイマー#59は、インスリン受容体のアンタゴニストとして作用して受容体応答を阻害できることが示された(図20A)。ポリエチレングリコール(PEG)のアナログ#3のLys^{C8}への結合はこの最大応答のレベルを変化させなかった(なぜならば、アナログ#38は効力が低下した(EC₅₀がより高い)完全なアゴニストであるからである)。インスリン配列の精選残基に結合させた部分(例えばPEG又は脂肪酸)が最大受容体活性化に影響を及ぼすことはこれまで報告されたことはない。不活性なインスリン分子を活性なインスリンペプチドに結合させることの生物学的な結果は、不活性なポリマー(例えばPEG)をインスリンに結合させることによる結果とは甚だしく相違した。アナログ#2(sc)はインスリン受容体でPEGとほぼ同じ程度に不活性であったが、ダイマー構造で存在するとき前記は顕著な阻害効果を提示した。

不活性なモノマーユニット#2(sc)を、LysCプロテアーゼで処理して活性な二鎖構造#2(tc)に変換した(ダイマー#60が生成された)。B1-C8結合によって架橋された、#60の両ユニットは活性なものであった。酵素処理は部分的アゴニスト作用を回復させ、最大受容体応答は50%まで増加した。ダイマー#60もまたインスリン作用に対してアンタゴニスト効果を示した。6nMインスリンと一緒にインキュベートしたとき、#60の濃度の増加は受容体応答を100%近くから0%(基準線レベル)に低下させることができた(図20B)。#60は、#59よりも高い最大応答をインスリン受容体で誘発したが、インスリンの作用と拮抗する能力は#59とほぼ同じであった。拮抗試験で測定したとき、#60の50%最大阻害濃度(IC₅₀)は1.89±0.29nMであったが、#59のIC₅₀は2.08±0.54nMであった。タイプBインスリン受容体では、#59によって誘発される最大応答は、自然のままのインスリンによって誘発されるもののわずか10%であった。酵素処理によって生成されたダイマー#60はなお部分的アゴニストであったが、#60によって誘発される最大応答は50%に増加した(図20C)。ダイマー#59はIGF-1受容体で部分的アゴニスト作用を示した。#59によって誘発される最大応答レベルは、自然のままのIGF-1によって誘発される最大応答の50%であった。ダイマ

10

20

30

40

50

ー#60は完全なアゴニストでありIGF-1受容体で顕著に効力が増加した(図20D)。#60のダイマー構造はIGF-1受容体との相乗的結合を可能にしたのかもしれない(前記は2つの弱い一価IGF-1受容体アゴニストを強力な二価ダイマーに変換した)。

#60の受容体応答曲線は本質的には#53のものと同等であった(#53はC8-C8結合を有するインスリンアナログ#3のホモダイマーである)。このことは、1つのインスリンアナログの別の単鎖インスリンのC8位への架橋は、B1-C8結合であろうと又はC8-C8結合であろうと部分的アゴニスト作用のための1つの要件であることを示唆した。C8位に結合されるモノマーインスリンユニットの受容体活性は、ダイマー化誘導体によって誘発されるインスリン受容体における最大応答のレベルに影響を及ぼした。このユニットが不活性であるとき、受容体活性はほぼ完全に阻害された。このユニットの受容体活性の回復はまた最大受容体応答のレベルを増加させた。

【実施例 23】

【0316】

受容体アイソフォーム選択性が強化されたインスリンダイマー

1つの不活性なモノマーユニットを含むヘテロダイマーについて観察された阻害効果は、受容体アイソフォーム選択性が強化されたヘテロダイマーを設計するという概念を提供した。インスリン受容体は2つのアイソフォームとして存在する(タイプAインスリン受容体(IR-A)及びタイプBインスリン受容体(IR-B))。IR-Bはもっぱらインスリン応答組織で発現され、代謝作用と不可分であると一般的に考えられている。IR-Bに対する優先性はインスリン薬剤設計で重要な意味を有する。なぜならば前記優先性は薬理学的利益の改善を提供し得るからである。インスリンは両アイソフォームに等しく結合しこれを活性化する。構造的に類似するペプチドIGF-2は、インスリンの親和性に近い親和性でIR-Aと結合できるが、IR-Bに対しては10倍低い結合親和性を有する。2つのインスリン分子のダイマー構造としての連結はインスリン受容体でアンタゴニスト作用を生じるので、IR-A優先IGF-2ペプチドとインスリンとの結合はまた、IR-BよりもIR-Aでより強いアンタゴニスト作用を提供するかもしれない。受容体活性化を刺激する固有の効力(前記は EC_{50} で測定される)を改変する代わりに、受容体選択性を有するヘテロダイマーを設計して最大受容体応答のレベルを調整した。

化学合成によるインスリンヘテロダイマーの調製

インスリンアナログ#2(sc) B¹[Thz1H5Y16L17K29]29-A¹[N18,21]を、固相ペプチド合成及びネイティブケミカルリゲーションによって合成した。ネイティブケミカルリゲーションの完了後、連結ペプチド#2(sc)をサイズ排除クロマトグラフィーにより折畳み緩衝液(0.5M GnHCl、20mMグリシン(pH10.5))に置き換えた。ペプチド濃度を0.5mg/mLに調整し、8mMシステインをペプチド溶液に添加した。折り畳み反応物を攪拌せずに24時間室温に静置した。折り畳み反応の完了は分析用逆相HPLC及び質量分析によってモニターできた。折り畳み完了後、pHを4.0に調整し、2mMのメトキシシアミンをペプチド溶液に添加した。チオール活性化試薬2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン)(DTNP)もまたインスリンペプチド1当量につき2当量で添加した。一般的にThzからCysへの変換は完了に4時間を要し、Cys^{B1}はin situでDTNPにより活性化された。Cys^{B1}(Npys)-ペプチド#2(sc)は逆相HPLCで精製した。

単鎖インスリンアナログ#3を活性化NHSエステルと反応させてチオール改変ペプチドを生成した。Trt-SCH₂CH₂CO-NHSエステルを調製するために、s-トリチル-メルカプトプロピオン酸(Trt-SCH₂CH₂COOH)(National Biochemical Corp., Ohio)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(Sigma)及びジイソプロピルカルボジイミド(DIC)のそれぞれ1mmolを2mLのDMFに室温で30分間攪拌しながら混合した。インスリンペプチドを5%TFA含有無水DMFに10mMの濃度で溶解した。活性化Trt-SCH₂CH₂CO-NHSエステルの2当量を前記溶液に添加した。反応物を室温で2時間攪拌してから2%のエタノールアミンで終了させた。4%のチオアニソール(Sigma)及び8%のトリイソプロピルシラン(TIPS)(Sigma)を含む無水TFAの5倍体積を続いて添加し、トリチル保護基を除去した。脱保護反応物を室温で30分間攪拌し、続いてエーテルで20倍に希釈してペプチドを沈殿物として抽出した。前記希

10

20

30

40

50

釈反応物を遠心分離し、沈殿ペプチドを1%酢酸/20%アセトニトリル水溶液に溶解して凍結乾燥した。Cys活性化#2(sc)及びチオール改変#3をDMSOに1:1の比で溶解して、#2のCys^{B1}と#3のLys^{C8}(SCH₂CH₂COOH)との間でジスルフィド結合を形成させた(前記によってB1-C8連結ヘテロダイマー#59が生成された)。Npysはジスルフィド形成後に遊離されるので、ダイマー形成は黄色の発色によって示された。反応の過程は分析用HPLCによってモニターし、ダイマーの形成は質量分析によって確認した。ダイマー#59を逆相HPLCによって精製して凍結乾燥した。

ダイマー#61は、ダイマー#59のモノマー#2ユニットをLysCプロテアーゼによって二鎖構造に切断することによって生成した。ダイマー#59をPBSに0.5mg/mLの濃度で溶解した。1mgペプチドにつき0.5ユニットのLysCをペプチド溶液に添加した。切断反応物を37℃の水浴中で12時間インキュベートした。切断は、質量分析で分子量の18ダルトン増加により確認した。

【0317】

半合成によるインスリンヘテロダイマーの調製

インスリン及びIGF-2アナログを大腸菌細胞から生物学的合成によって調製した。インスリンアナログ#27^{*}及びIGF-2アナログ#31をN末端アミンでカルバミル化した。ペプチドを0.5mg/mLの濃度で、50mMシアン酸カリウム(Sigma)含有PBS緩衝液(pH7.0)に溶解した。前記反応物を一晩室温で攪拌し、カルバミル化反応の完了をMALDIで確認した。カルバミル化ペプチドを逆相カラムで脱塩し、ペプチドを含む分画をブールし凍結乾燥した。IGF-2のLys^{D4}の-アミンを封鎖するためにIGF-2ペプチドを50mMのNaHCO₃水溶液(pH10.5)に溶解した。メチルアセトイミデート(Sigma)を50倍モル過剰でペプチド溶液に添加した。アセトイミド化反応物を室温で30分間攪拌した。1NのHClでpHを3.0に低下させて反応を終了した。

アナログ#27^{*}若しくはIGF-2ペプチドのN末端-アミン又はカルバミル化#27^{*}若しくは#31のリジン側鎖-アミンにHS-CH₂CH₂COを結合させた。インスリンアナログ#27又は#27^{*}に導入したチオール基をDTNPで活性化した。改変ペプチドを逆相HPLCで精製し、凍結乾燥した。#27及び#31を1:1の比でDMSOに溶解し、ダイマー#61を生成した。#27^{*}及びIGF-2を1:1の比でDMSOに溶解し、ダイマー#62を生成した。

【0318】

結果

B1-C8結合を有する2つのインスリン-IGF-2ヘテロダイマーを設計して、2つのインスリン受容体アイソフォームにおけるそれらの活性を精査した。ダイマー#61は1つの単鎖インスリン#27及び1つのIGF-2アナログ#31を含んでいた。#27のN末端はジスルフィド結合によって#31のLys^{C8}に架橋された。ペプチド#31は、Lys^{D4}Arg及びArg^{C8}Lysの2つの変異を有するIGF-2配列から誘導された。この設計はLys^{C8}位との架橋反応をもたらした。これら2つの位置は受容体活性のために必須ではなく、これら2つの位置の変異は、IR-A及びIR-Bの双方でわずかに2倍効力を低下させた。ダイマー#62はまた1つの単鎖インスリンアナログ#27^{*}を含み、そのLys^{C8}は自然のままのIGF-2のN-末端アミンにジスルフィド結合を介して架橋されていた。インスリン及びIGF-2モノマーの向きは、2つのモノマーユニットの向きの影響を調べるために#62で逆になっていた。

ダイマー#61は両受容体で部分的アゴニストであったが、最大応答はIR-Bで高かった。IR-Aでは、#61によって誘発される最大応答は、自然のままのインスリンによって誘発される最大応答の~50%であったが、IR-Bでは最大応答は~80%であった(図22A及び22B)。逆向きのインスリン及びIGF-1ユニットを含むダイマー#62もまたIR-Bでより高い最大応答を示した。ダイマー#62は、最大応答がIR-Bでインスリンのそれとほぼ同じであったのでIR-Bではほぼ完全なアゴニストであった。対照的に、#62はIR-Aではなお部分的アゴニストであった。前記はインスリンがタイプA受容体で誘発する最大応答の約80%を誘発した。

#61及び#62はともに、より高い最大応答で示されるようにタイプBインスリン受容体に対して優先性を示した。ダイマー#61は、受容体活性化において#62よりも強い阻害性作用を示した。なぜならば、両受容体アイソフォームで#61によって誘発される最大応答は

、#62によって誘発されるものよりも低いからである。インスリン及びIGF-2モノマーユニットの向きは受容体選択性を変化させなかったが、受容体活性化の阻害にはなお影響を示した。#61及び#62の応答曲線はベル形であった（前記ベル形はインスリンホモダイマー#53及びインスリンヘテロダイマー#60についても観察された）。最大レベルに達した後、受容体応答は#61又は#62の濃度を増加させることによって低下した。しかしながら、#61又は#62では受容体応答は～50%までしか低下しなかったが、一方、#53及び#60は高濃度で受容体活性化を完全に阻害することができた。#61及び#62はIGF-1受容体とともに部分的アゴニストであり、さらに#61は、最大受容体活性化で#62よりも強い阻害性作用を示した（図22E）。

本発明の好ましい態様は、下記の通りである。

〔1〕インスリンアナログダイマーであって、以下のi)、ii)、iii)又はiv)の第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチド、

i) 第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドであって、

前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドはともに単鎖インスリンアナログであり、各々はA鎖、B鎖及び連結部分の第一並びに第二のセットを含み、A鎖、B鎖及び連結部分の各セットについて前記連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合しており、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドはPEGを介して互いに連結されているか、又は第一及び第二のインスリンポリペプチドそれぞれの連結部分のリジンの側鎖に共有結合するジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結されており、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、GIVEQCCTSIICSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLEYCA（配列番号：7）から独立して選択される配列を含み、

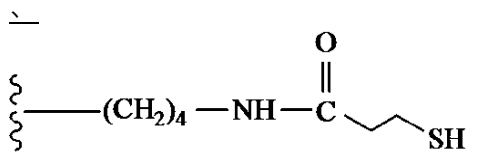
前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのB鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）、GPETLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：77）、GPETLCGAELVDALQFVCGRGFY（配列番号：89）、GPEHLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：14）、AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFY（配列番号：90）及びAYRPSETLCGGELVDTLYLVCGRGFY（配列番号：92）から独立して選択される配列を含み、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの連結部分は、GYGSSSRX_{6,8}APQT（配列番号：9）、X_{5,1}X_{5,2}GSSSX_{5,7}X_{5,8}APQT（配列番号：16）及びPEG8-X_{6,8}-PEG4から独立して選択される配列を含み、

X_{5,1}はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、

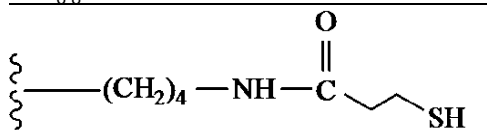
X_{5,2}はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、

X_{5,7}及びX_{5,8}の一方はアルギニンであり、他方は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり



且つ、

X_{6,8}は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である、



ii) 第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドであって、

前記第一のインスリンポリペプチドは第一のA鎖及び第一のB鎖を含む二鎖インスリンアナログであり、前記第一のA鎖及び第一のB鎖は鎖間ジスルフィド結合を介して互いに連結されており、

前記第二のインスリンポリペプチドは第二のA鎖、第二のB鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンアナログであり、前記連結部分の第一の末端は第二のB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記連結部分の第二の末端は第二のA鎖のアミノ末端と共有結合しており、

第一及び第二のインスリンポリペプチドはジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結されており、該ダイマー化リンカーの第一の末端は前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アミノ酸の側鎖と共有結合しており、該ダイマー化リンカーの第二の末端は第二のインスリンポリペプチドの連結部分のリジンの側鎖と共有結合しており、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、GIVEQCCTSI₁CSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLEYCA（配列番号：7）から独立して選択される配列を含み、

前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖は、CFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：94）、CGPETLCGAELVDALYLVCGRGFYFNKPT（配列番号：95）、CGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPT（配列番号：96）、CGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFYFNKPT（配列番号：97）、CAYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFY（配列番号：91）及びCAYRPSETLCGGELVDTLYLVCGRGFY（配列番号：93）から独立して選択される配列を含み、

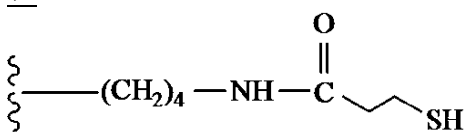
前記第二のインスリンポリペプチドのB鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）、GPETLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：77）、GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFY（配列番号：89）、GPEHLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：14）、AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFY（配列番号：90）及びAYRPSETLCGGELVDTLYLVCGRGFY（配列番号：92）から独立して選択される配列を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドの連結部分は、GYGSSSRX_{6,8}APQT（配列番号：9）、X_{5,1}X_{5,2}GSSSX_{5,7}X_{5,8}APQT（配列番号：16）及びPEG8-X_{6,8}-PEG4から独立して選択される配列を含み、

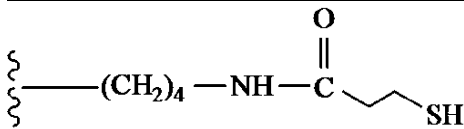
X_{5,1}はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、

X_{5,2}はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、

X_{5,7}及びX_{5,8}の一方はアルギニンであり、他方は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、



X_{6,8}は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である、



iii) 第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドあって、

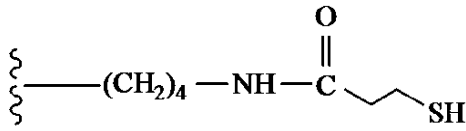
前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドはともに、それぞれA鎖及びB鎖の第一並びに第二のセットを含む二鎖インスリンアナログであり、各セットのA鎖及びB鎖は鎖間ジスルフィド結合を介して互いに連結されており、さらに該第一及び第二のインスリンポリペプチドは、2つのB鎖それぞれのカルボキシ末端アミノ酸の側鎖を継ぎ合わせるダイマー化リンカーを介して互いに連結されており、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、GIVEQCCTSI₁CSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLEYCA（配列番号：7）から成る群から独立して選択される配列を含み、

前記第一及び第二のインスリンのB鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPX_{6,8}T（配列番号：94）

号：2）及びGPETLCGAELVDALYLVCGDRGFYFNX_{6,8}PT（配列番号：99）から成る群から独立して選択される配列を含み、

X_{6,8}は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である、



iv) 第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドであって、

前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドはともに、各々がA鎖、B鎖及び連結部分の第一並びに第二のセットを含む単鎖インスリンアナログであり、A鎖、B鎖及び連結部分の各セットについて前記連結部分の第一の末端はB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ末端と共有結合しており、さらに第一及び第二のインスリンポリペプチドはPEG又はジスルフィド保有ダイマー化リンカーを介して互いに連結されており、ここで該ダイマー化リンカーの第一の末端は第一又は第二のインスリンポリペプチドの一方の連結部分のリジンの側鎖と共有結合しており、該ダイマー化リンカーの第二の末端は他方の第一又は第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アミンと共有結合しており、

前記第一のインスリンポリペプチドのA鎖は、配列TPAKSEGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：103）を含み、

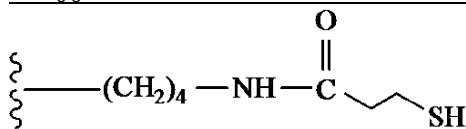
前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖は、配列AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFY（配列番号：90）又はAYRPSETLCGGELVDTLYLVCGDRGFY（配列番号：92）を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドのA鎖は、配列GIVEQCCTSLCSLYQLENYCN（配列番号：1）を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドのB鎖は、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）及びGPEHLCAELVDALYLVCGDRGFY（配列番号：14）から独立して選択される配列を含み、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの連結部分はGYGSSSRX_{6,8}APQT（配列番号：9）、SRVSRX_{6,8}SR（配列番号：87）及びPEG8-X_{6,8}-PEG4から独立して選択される配列を含み、

X_{6,8}はアルギニン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である、



を含む、インスリンアナログダイマー。

〔2〕前記ダイマーが第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、

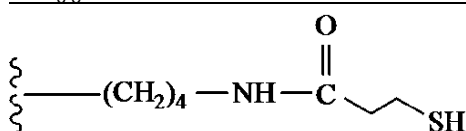
前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドがともに単鎖インスリンアナログであり、

前記第一及び第二のインスリンのA鎖がGIVEQCCTSLCSLYQLENYCN（配列番号：1）及びGIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）から独立して選択される配列を含み、

前記第一及び第二のインスリンのB鎖がFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）及びGPEHLCAELVDALYLVCGDRGFY（配列番号：14）から独立して選択される配列を含み、

前記ダイマー化リンカーがGYGSSSRX_{6,8}APQT（配列番号：9）及びPEG8-X_{6,8}-PEG4から独立して選択される配列を含み、

X_{6,8}が下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である、



前記〔1〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔3〕前記ダイマーが第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、

前記第一のインスリンポリペプチドが第一のA鎖及び第一のB鎖を含む二鎖インスリンアナログであり、前記第一のA鎖及び第一のB鎖が鎖間ジスルフィド結合を介して互いに連結されており、

前記第二のインスリンポリペプチドが第二のA鎖、第二のB鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンアナログであり、前記連結部分の第一の末端が第二のB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記連結部分の第二の末端が第二のA鎖のアミノ末端と共有結合しており、

10

第一及び第二のインスリンポリペプチドが、第一のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端システイン側鎖と第二のインスリンポリペプチドの連結部分の改変リジンの側鎖との間でジスルフィド結合を介して互いに連結されており、

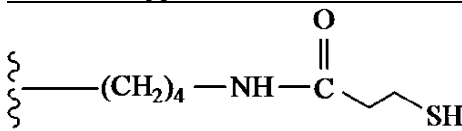
前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖が、GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLEYCA（配列番号：7）から独立して選択される配列を含み、

前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖がCFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：94）及びCGPEHL CGAELVDALYLVCGRGFY NKPT（配列番号：97）から独立して選択される配列を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドのB鎖がFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）及びGPEHL CGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：14）から独立して選択される配列を含み、

20

前記第二のインスリンポリペプチドの連結部分が配列GYGSSSRX_{6,8}APQT（配列番号：9）を含み、X_{6,8}が下記の側鎖を含むアミノ酸である、



前記〔1〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔4〕前記ダイマーが第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含み、

30

前記第一のインスリン及び第二のインスリンポリペプチドがともに単鎖インスリンアナログであり、

前記第一のインスリンポリペプチドのA鎖が配列TPAKSEGIVECCFRSCDLALLEYCA（配列番号：103）を含み、

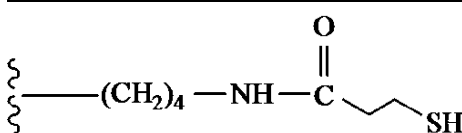
前記第一のインスリンポリペプチドのB鎖が配列AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFY（配列番号：90）を含み、前記第一のインスリンポリペプチドのための連結部分が配列SRVSRX_{6,8}SR（配列番号：98）を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドのA鎖が配列GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN（配列番号：1）を含み、

前記第二のインスリンポリペプチドのB鎖が配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）を含み、前記第二のインスリンポリペプチドのための連結部分が配列GYGSSSRX_{6,8}APQT（配列番号：9）を含み、

40

X_{6,8}がアルギニン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸である、



前記〔1〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔5〕糖尿病治療に付随する低血糖のリスクを軽減する方法であって、前記方法が、前記〔1〕～〔4〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマーを含む医薬組成物の

50

有効量を投与する工程を含む、前記方法。

〔 6 〕部分的アゴニストインスリンダイマーを含む医薬組成物の有効量を投与する工程を含む、糖尿病治療に付随する低血糖のリスクを軽減する方法であって、

前記部分的アゴニストインスリンダイマーが、ダイマー化リンカーを介して互いに連結されている第一及び第二のインスリンポリペプチドを含み、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドは各々独立して、下記 i) 及び ii) から成る群から選択されるインスリンポリペプチドを含み、

i) 鎖間ジスルフィド結合を介して連結されているA鎖及びB鎖を含む二鎖ヘテロ二重体、
ii) A鎖、B鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンポリペプチドであって、前記連結部分の第一の末端がB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記連結部分の第二の末端がA鎖のアミノ末端と共有結合している前記ポリペプチド、

前記A鎖はGIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LEX₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃ (配列番号：70) の配列を含み、

前記B鎖はX₂₅LCGX₂₉X₃₀LX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅ (配列番号：44) の配列を含み、

X₄はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、

X₅はグルタミン酸又はグルタミンであり、

X₈はスレオニン、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、

X₉はセリン、アルギニン、オルニチン又はアラニンあり、

X₁₀はセリン又はイソロイシンであり、

X₁₂はセリン又はアスパラギン酸であり、

X₁₄はアルギニン、チロシン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₅はグルタミン、アルギニン、アラニン、オルニチン又はロイシンであり、

X₁₈はメチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、

X₁₉はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X₂₁はアラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X₂₅はヒスチジン又はスレオニンであり、

X₂₉アラニン、グリシン又はセリンであり、

X₃₀はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸又はシステイン酸であり、

X₃₃はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、

X₃₄はアラニン又はスレオニンであり、

X₄₁はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、

X₄₂はアラニン、オルニチン又はアルギニンであり、

X₄₅はチロシン又はフェニルアラニンであり、及び、

R₁₃はCOOH又はCONH₂であり、且つ、

a) 第一及び第二のインスリンポリペプチドは、第一及び第二のインスリンポリペプチドそれぞれのB29位アミノ酸の側鎖を介して互いに連結されているか、

b) 前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの少なくとも一方は単鎖インスリンポリペプチドであり、該第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドの一方のB1位アミノ酸の側鎖と前記連結部分のアミノ酸の側鎖とを介して互いに連結されているか、又は

c) 第一及び第二のインスリンポリペプチドがともに単鎖インスリンポリペプチドであり、該第一及び第二のインスリンポリペプチドは、第一及び第二のインスリンポリペプチドそれぞれの連結部分のアミノ酸の側鎖を介して互いに連結されている、前記方法。

〔 7 〕該単鎖インスリンアナログの連結部分が、GYGSSSRX₆₈APQT (配列番号：9)、SRVSRX₆₈SR (配列番号：98)、X₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₅₈APQT (配列番号：16)、(SSSSX₅₉APPPSLPSP SRLPGPSDTPILPQX₆₀)_n (配列番号：18)、MGSSSSX₅₉APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQEEEEEX₆₀ (配列番号：19) 及びW₂-Z₂-Y₂から成る群から選択され、

W₂はPEG6、PEG7又はPEG8であり、

Y₂はPEG4、PEG5又はPEG6であり、且つ

10

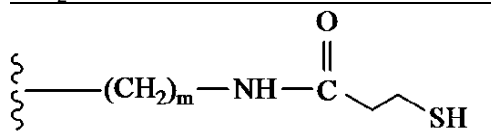
20

30

40

50

Z_2 はリジン、システイン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、



n は1、2又は3から成る群から選択される整数であり、

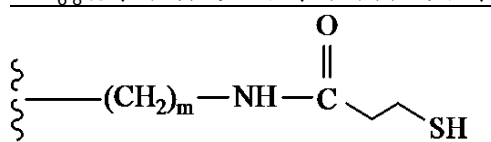
$X_{5.1}$ はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、

$X_{5.2}$ はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、

$X_{5.7}$ 及び $X_{5.8}$ は独立して、アルギニン、リジン、システイン、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン又はオルニチンであり、

$X_{5.9}$ 及び $X_{6.0}$ は独立してアルギニン又はリジンであり、且つ

$X_{6.8}$ は、アルギニン、システイン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、

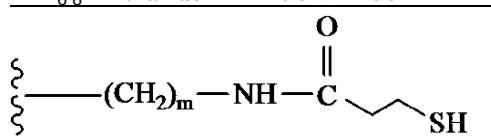


m は1 - 4 ~ 選択される整数である、

前記〔6〕に記載の方法。

〔8〕該第一及び第二のインスリンポリペプチドの連結部分が独立して、SRVSRX_{6.8}SR（配列番号：98）、GYGSSSRKAPQT（配列番号：21）、GYGSSSRX_{6.8}APQT（配列番号：9）及びPEG8-X_{6.8}-PEG4から成る群から選択され、

$X_{6.8}$ が下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、

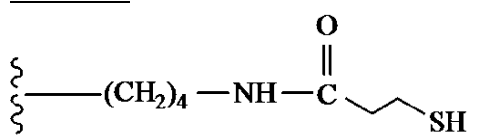


m が4である、

前記〔6〕又は〔7〕に記載の方法。

〔9〕該第一のインスリンポリペプチドが第一の連結部分を含む単鎖インスリンポリペプチドであり、第一及び第二のインスリンポリペプチドが、第二のインスリンポリペプチドのN-末端アミン又はB1位アミノ酸の側鎖と前記第一の連結部分のアミノ酸の側鎖とを介して互いに連結されている、前記〔6〕～〔8〕のいずれか1項に記載の方法。

〔10〕該第二のインスリンポリペプチドが、鎖間ジスルフィド結合を介して連結されているA鎖及びB鎖を含む二鎖ヘテロ二重体であり、該第一のインスリンポリペプチドが、A鎖、B鎖及び連結部分を含む単鎖インスリンポリペプチドであり、該連結部分がPEG8-X_{6.8}-PEG4又はGYGSSSRX_{6.8}APQT（配列番号：9）であり、 $X_{6.8}$ が下記構造IIの側鎖を含むアミノ酸であり、



且つ、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドが、第二のインスリンポリペプチドのN-末端アミン又はB1位アミノ酸の側鎖と第一のインスリンポリペプチドの連結部分に存在する構造IIの側鎖を含むアミノ酸とを介して互いに連結されている、前記〔6〕～〔8〕のいずれか1項に記載の方法。

〔11〕該第一及び第二のインスリンポリペプチドが、GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN（配列番号：1）、GIVDECCFRSCDLRRLENYCN（配列番号：11）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）及びGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：7）から成る群から独立して選択されるA鎖

10

20

30

40

50

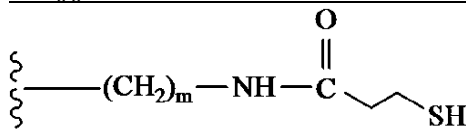
、並びにFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：2）、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）、GPETLCGAELVDALYLVCGRGFY（配列番号：77）、CGPEHLCGAELVDALYLVCGRGFYFNPK（配列番号：78）、GPETLCGAELVDALYLVCGRGFYFNKPT（配列番号：79）及びAYRPSETLCGELVDTLYLVCGRGFYFSRPA（配列番号：80）から成る群から独立して選択されるB鎖を含む、前記〔6〕～〔10〕のいずれか1項に記載の方法。

〔12〕該第一及び第二のインスリンポリペプチドが各々単鎖インスリンポリペプチドであり、

該第一のインスリンポリペプチドが、GIVEQCCTSIICSLYQLENYCN（配列番号：1）のA鎖配列、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）のB鎖配列、並びにPEG8- $X_{6.8}$ -PEG4及びGYGSSSRX $_{6.8}$ APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含む第一の連結部分を含み、

該第二のインスリンポリペプチドが、GIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：7）、TPAX $_{7.5}$ SEGIVECCFRSCDLALLETYCA（配列番号：88）又はGIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号：5）のA鎖配列、AYRPSETLCGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA（配列番号：87）又はGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPT（配列番号：10）のB鎖配列、並びにPEG8- $X_{6.8}$ -PEG4及びGYGSSSRX $_{6.8}$ APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含む第二の連結部分を含み、

$X_{6.8}$ はアルギニン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、



$X_{7.5}$ はリジン又はアルギニンであり、さらに、

該第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一又は第二のインスリンポリペプチドの一方のN末端アミン又はB1位アミノ酸の側鎖と他方のインスリンポリペプチドの連結部分のリジン側鎖とを介して互いに連結されている、前記〔6〕に記載の方法。

〔13〕第一のインスリンポリペプチド及び第二のインスリンポリペプチドを含むインスリンアナログダイマーであって、

前記第一のインスリンポリペプチドは単鎖インスリンポリペプチドであり、GIVX $_4$ X $_5$ CCX $_8$ X $_9$ X $_{10}$ CX $_{12}$ LX $_{14}$ X $_{15}$ LEX $_{18}$ X $_{19}$ CX $_{21}$ -R $_{13}$ （配列番号：70）の第一のA鎖配列、X $_{25}$ LCGX $_{29}$ X $_{30}$ LVX $_{33}$ X $_{34}$ LYLVCGX $_{41}$ X $_{42}$ GFX $_{45}$ （配列番号：44）の第一のB鎖配列及び第一の連結部分を含み、前記第一の連結ペプチドの第一の末端は第一のB鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記第一の連結部分の第二の末端は第一のA鎖のアミノ末端と共有結合しており、

前記第二のインスリンポリペプチドは単鎖インスリン又は二鎖インスリンであって、GIVX $_4$ X $_5$ CCX $_8$ X $_9$ X $_{10}$ CX $_{12}$ LX $_{14}$ X $_{15}$ LEX $_{18}$ X $_{19}$ CX $_{21}$ -R $_{13}$ （配列番号：70）の第二のA鎖配列及びX $_{25}$ LCGX $_{29}$ X $_{30}$ LVX $_{33}$ X $_{34}$ LYLVCGX $_{41}$ X $_{42}$ GFX $_{45}$ （配列番号：44）の第二のB鎖配列を含むが、ただし前記第二のインスリンポリペプチドが単鎖インスリンであるときは、前記第二のインスリンポリペプチドはさらに第二の連結部分を含むことを条件とし、ここで前記第二の連結部分の第一の末端は該B鎖のカルボキシ末端と共有結合しており、前記第二の連結部分の第二の末端は該A鎖のアミノ末端と共有結合しており、

前記第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一の連結部分の8位アミノ酸の側鎖を、a) 第二のインスリンポリペプチドのアミノ末端、又はb) 第二の連結部分の8位アミノ酸の側鎖と共有結合により連結する結合又は二官能性連結部分を介して互いに連結されており、

X_4 はグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、

X_5 はグルタミン酸又はグルタミンであり、

X_8 はスレオニン、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、

X_9 はセリン、アルギニン、オルニチン又はアラニンあり、

X_{10} はセリン又はイソロイシンであり、

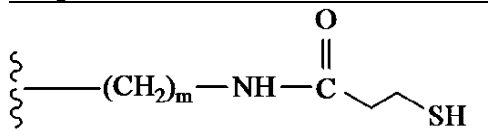
X_{12} はセリン又はアスパラギン酸であり、

X_{14} はアルギニン、チロシン、オルニチン又はアラニンであり、

X_{15} はグルタミン、アルギニン、アラニン、オルニチン又はロイシンであり、
 X_{18} はメチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、
 X_{19} はチロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、
 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} アラニン、グリシン又はセリンであり、
 X_{30} はヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸又はシステイン酸であり、
 X_{33} はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、
 X_{34} はアラニン又はスレオニンであり、
 X_{41} はアスパラギン酸又はグルタミン酸であり、
 X_{42} はアラニン、オルニチン又はアルギニンであり、
 X_{45} はチロシン又はフェニルアラニンであり、且つ
 R_{13} はCOOH又はCONH₂であり、さらに、
 前記ダイマーが、自然のままのインスリンと比較して60%以下の最大用量応答を示す、
 前記インスリンアナログダイマー。
 [1 4] 前記第一及び場合によって第二の連結部分が独立して、GYGSSSRX₆₈APQT (配列番号：9)、SRVSRX₆₈SR (配列番号：98)、X₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₅₈APQT (配列番号：16)、(SSSX₅₉APPPSLPSPSRPLPGPSDTPILPQX₆₀)_n (配列番号：18)、MGSSSX₅₉APPPSLPSPSRPLPGPSDTPILPQEEEEEX₆₀ (配列番号：19) 及びW₂-Z₂-Y₂から成る群から選択され、
 W_2 はPEG6、PEG7又はPEG8であり、
 Y_2 はPEG4、PEG5又はPEG6であり、且つ
 Z_2 はリジン、システイン、又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり

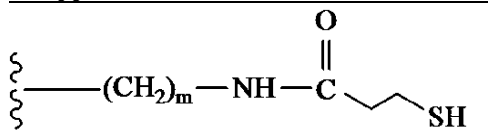
10

20



n は1、2又は3から成る群から選択される整数であり、
 X_{51} はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、
 X_{52} はアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、
 X_{57} 及び X_{58} は独立して、アルギニン、リジン、システイン、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン又はオルニチンであり、
 X_{59} 及び X_{60} は独立してアルギニン又はリジンであり、且つ
 X_{68} はシステイン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、

30



m は1~4から選択される整数である、
 前記[13]に記載のインスリンアナログダイマー。
 [1 5] 前記第一及び場合によって第二の連結部分が独立して、配列GYGSSSRKAPQT (配列番号：21)、GYGSSSRX₆₈APQT (配列番号：9)、SRVSRX₆₈SR (配列番号：98) 又はPEG8-X₆₈-PEG4から成り、 m が4である、前記[13]に記載のインスリンアナログダイマー。
 [1 6] 該第二のインスリンポリペプチドが二鎖インスリンであり、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドが、第一の連結ペプチドの8位アミノ酸のアミノ酸側鎖を、第二のインスリンポリペプチドのB鎖のN-末端アルファアミンに共有結合により連結する結合又は二官能性連結部分を介して互いに共有結合されている、前記[13] ~ [15] のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。
 [1 7] 該第二のインスリンポリペプチドが単鎖インスリンであり、前記第一及び第二の

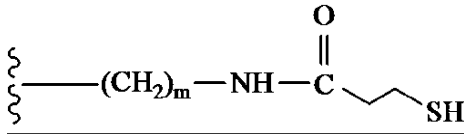
40

50

インスリンポリペプチドが、前記第一の連結ペプチドの8位アミノ酸のアミノ酸側鎖を、前記第二の連結ペプチドの8位アミノ酸の側鎖に共有結合により連結する結合又は二官能性連結部分を介して互いに共有結合されている、前記〔15〕に記載のインスリンアナログダイマー。

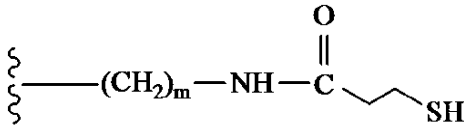
〔18〕該第一の連結部分がPEG8- $X_{6.8}$ -PEG4又は配列GYGSSSRX $_{6.8}$ APQT（配列番号：9）から成り、

$X_{6.8}$ は下記構造Iの側鎖を有するアミノ酸であり、



10

m は1~4から選択される整数であり、且つ、第一及び第二のインスリンポリペプチドが、下記構造Iの側鎖を有する第一の連結部分のアミノ酸の側鎖と、



第二のインスリンポリペプチドのN-末端に付加されるシステインの側鎖との間でジスルフィド結合を介して互いに共有結合されている、前記〔15〕に記載のインスリンアナログダイマー。

20

〔19〕該第一及び第二のインスリンポリペプチドが同じ配列を有する、前記〔13〕~〔18〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

〔20〕該第一のインスリンポリペプチドが自然のままのヒトインスリンA及びB鎖を含み、該第二のインスリンポリペプチドがIGF-2 A及びB鎖を含む、前記〔13〕~〔18〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

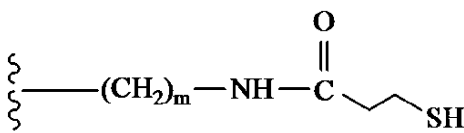
〔21〕該第一及び第二のインスリンポリペプチドが各々単鎖インスリンポリペプチドであり、

該第一のインスリンポリペプチドが、GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN（配列番号：1）のA鎖配列、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF（配列番号：23）のB鎖配列、並びにPEG8- $X_{6.8}$ -PEG4及びGYGSSSRX $_{6.8}$ APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含む第一の連結部分を含み、且つ

30

該第二のポリペプチドが、TPAX75SEGIVECCFRSCDLALLE TYCA（配列番号：88）のA鎖配列、AYRPSETLCGGELVD TLQFVCGDRGFYFSRPA（配列番号：87）のB鎖配列、並びにPEG8- $X_{6.8}$ -PEG4及びGYGSSSRX $_{6.8}$ APQT（配列番号：9）から成る群から選択される配列を含む第二の連結部分を含み、

$X_{6.8}$ はアルギニン又は下記構造Iの側鎖を含むアミノ酸であり、



40

$X_{7.5}$ はリジン又はアルギニンであり、さらに、

第一及び第二のインスリンポリペプチドは、前記第一又は第二のインスリンポリペプチドの一方のB鎖のN末端アミン又はB1位アミノ酸の側鎖と他方のインスリンポリペプチドの連結部分のリジン側鎖とを介して互いに連結されている、前記〔20〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔22〕該第一及び第二のインスリンポリペプチドが、GIVDECCX $_8$ X $_9$ SCDLRRLEX $_{1.8}$ YCX $_{2.1}$ -R $_{1.3}$ （配列番号：81）のA鎖配列及びX $_{2.5}$ LCGAELVDALYLVC GD X $_{4.2}$ GFY（配列番号：82）のB鎖配列を含み、

X_8 はヒスチジン又はフェニルアラニンであり、

X_9 はアルギニン、オルニチン又はアラニンであり、

50

X_{18} はメチオニン、アスパラギンであり、

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_{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、且つ

R_{13} はCOOHである、

前記〔13〕～〔20〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

〔23〕該第一及び第二のインスリンポリペプチドが、GIVEQCCTSI $\overline{\text{CS}}$ LYQLENYCN (配列番号：1)、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA (配列番号：5) 及びGIVECCFRSCDLALLE $\overline{\text{TY}}$ CA (配列番号：7) から成る群から独立して選択されるA鎖、並びにFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF $\overline{\text{YTP}}$ KT (配列番号：2)、GPETLCGAELVDALYLVC $\overline{\text{GDR}}$ GFY (配列番号：77)、GPETLCGAELVDALYLVC $\overline{\text{GDR}}$ GFYFNKPT (配列番号：) 及びAYRPSETLCG $\overline{\text{GEL}}$ VD $\overline{\text{TL}}$ YLVC $\overline{\text{GDR}}$ GFYFSRPA (配列番号：80) から成る群から独立して選択されるB鎖を含む、前記〔22〕に記載のインスリンアナログダイマー。

10

〔24〕 X_8 がフェニルアラニンであり、 X_9 がアルギニンあり、 X_{18} 及び X_{21} がともにアスパラギンであり、 X_{25} がヒスチジンであり、且つ、 X_{42} がアルギニンである、前記〔22〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔25〕前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのA鎖がGIVDECCX8RSCDLRRLENYCN (配列番号：83) 及びGIVEQCCTSI $\overline{\text{CS}}$ LYQLENYCN (配列番号：1) から独立して選択される配列を含み、前記第一及び第二のインスリンポリペプチドのB鎖がGPETLCGAELVDALYLVC $\overline{\text{GDR}}$ GFY (配列番号：77)、HLCGAELVDALYLVC $\overline{\text{GDR}}$ GFY (配列番号：84) 及びHLCGSHLVEALYLVCGERGFF (配列番号：85) から独立して選択される配列を含み、 X_8 がヒスチジン又はフェニルアラニンである、前記〔13〕～〔20〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

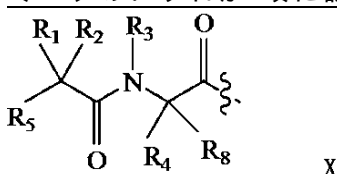
20

〔26〕親水性部分が、該連結部分のアミノ酸と、又はA鎖のA9、A14及びA15から成る群から選択される位置又はB鎖のB1、B2、B10、B22、B28若しくはB29位のアミノ酸で共有結合により連結されている、前記〔1〕～〔4〕及び〔13〕～〔25〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

〔27〕該親水性部分がポリエチレングリコール鎖である、前記〔26〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔28〕下記式Xの構造のジペプチド成分をさらに含む、前記〔1〕～〔4〕及び〔13〕～〔27〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマーであって、

30



前記ジペプチド成分は、該ジペプチド成分と第一又は第二のインスリンポリペプチドのアミンとの間で形成されるアミド結合を介して前記インスリンアナログダイマーに連結されており、

R_1 、 R_2 、 R_4 及び R_8 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)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_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独立して選択され、 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り、又は

40

R_1 及び R_2 は、それらが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ているか、若しくは

R_4 及び R_8 はそれらが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ており、

R_3 は、 C_1 - C_{18} アルキル、(C_1 - C_{18} アルキル)OH、(C_1 - C_{18} アルキル)NH $_2$ 、(C_1 - C_{18} アルキル

50

)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はそれらが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ており、

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R₁はそれらが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ており、且つ

R₇は、H、OH、C₁-C₁₈アルキル、C₂-C₁₈アルケニル、(C₀-C₄アルキル)CONH₂、(C₀-C₄アルキル)COOH、(C₀-C₄アルキル)NH₂、(C₀-C₄アルキル)OH、及び八口から成る群から選択される、

10

前記インスリンアナログダイマー。

〔29〕R₁及びR₂が独立してC₁-C₁₈アルキル又はアリールであり、

R₃はC₁-C₁₈アルキルであるか、又はR₃及びR₄はそれらが結合する原子と一緒に4～12複素環式環を形成しており、

R₄及びR₈は水素、C₁-C₁₈アルキル及びアリールから成る群から独立して選択され、且つ

R₅はアミン又はヒドロキシルである、

前記〔28〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔30〕R₁及びR₂が水素、C₁-C₈アルキル及びアリールから成る群から独立して選択され

、
R₃はC₁-C₁₈アルキルであるか、又はR₃及びR₄はそれらが結合する原子と一緒に4～6複素環式環を形成しており、

20

R₄及びR₈は各々水素であり、且つ

R₅は、アミン、N-置換アミン及びヒドロキシルから成る群から選択される、

前記〔28〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔31〕該ジペプチド成分のアミノ酸に連結されたデポーポリマーをさらに含む、前記〔28〕に記載のインスリンアナログダイマー。

〔32〕第一又は第二のインスリンポリペプチドのアミノ酸側鎖が、アルキルアミン、アミド、エーテル、エステル、チオエーテル、又はチオエステル結合によりアシル基又はアルキル基に共有結合により付着しており、前記アシル基又はアルキル基は天然に存在するアミノ酸にとって本来のものではない、前記〔1〕～〔4〕及び〔8〕～〔26〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

30

〔33〕ジペプチド成分を構成するアミノ酸の一つのアミノ酸側鎖が、アルキルアミン、アミド、エーテル、エステル、チオエーテル、又はチオエステル結合によりアシル基又はアルキル基に共有結合により付着しており、前記アシル基又はアルキル基は天然に存在するアミノ酸にとって本来のものではない、前記〔28〕～〔30〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー。

〔34〕前記ダイマーが、B鎖のN-末端アルファアミン、A14、A15、B1、B2、B10、B22、B28、B29位アミノ酸の側鎖、アミノ酸の側鎖、又は連結部分のアミノ酸の側鎖から選択される1つ以上の位置でアシル化されている、前記〔32〕に記載のインスリンアナログダイマー。

40

〔35〕前記〔1〕～〔4〕又は〔13〕～〔34〕のいずれか1項に記載のインスリンアナログダイマー及び医薬的に許容できる担体を含む、医薬組成物。

〔36〕糖尿病を治療する方法であって、前記方法が前記〔35〕に記載の医薬組成物の有効量を投与する工程を含む、前記方法。

〔37〕高血糖治療用医薬の製造における、前記〔1〕～〔4〕又は〔13〕～〔34〕のいずれか1項に記載の化合物の使用。

〔38〕糖尿病を治療するための、前記〔1〕～〔4〕又は〔13〕～〔34〕のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【図 1】

二工程のインスリン鎖結合

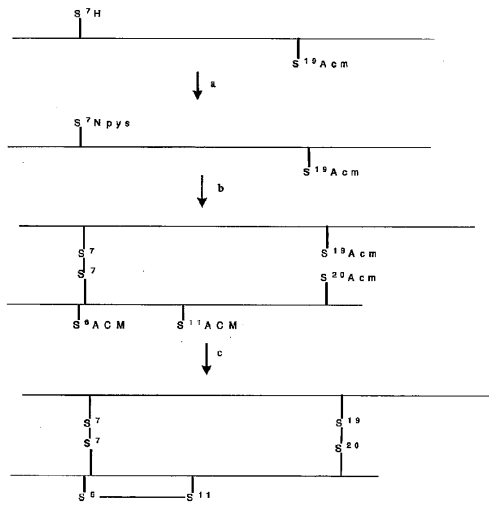
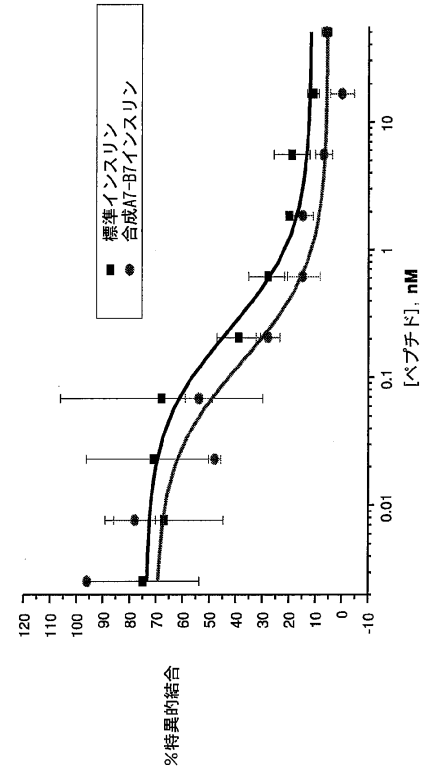


Fig. 1

【図 2】

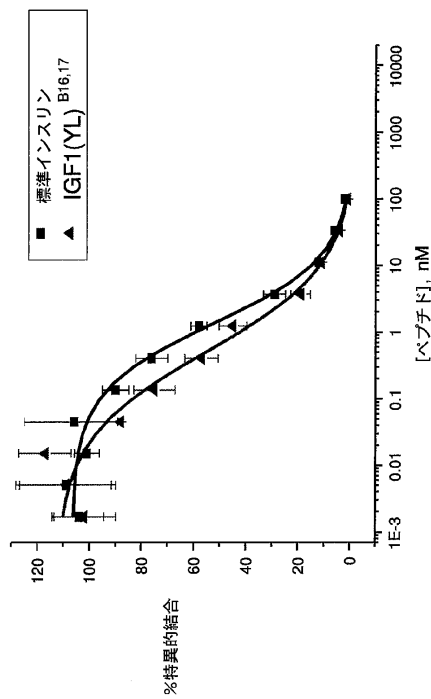
Fig. 2

合成“A7-B7”誘導インスリンの受容体結合



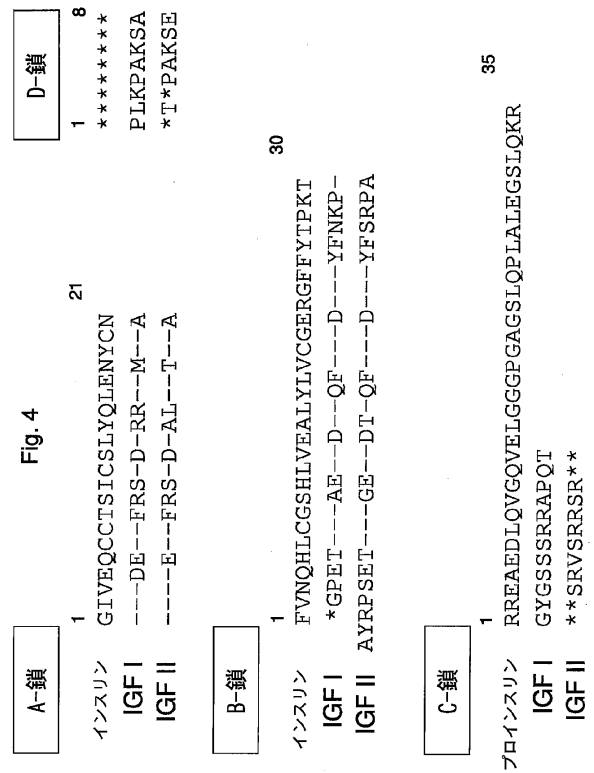
【図 3】

Fig. 3

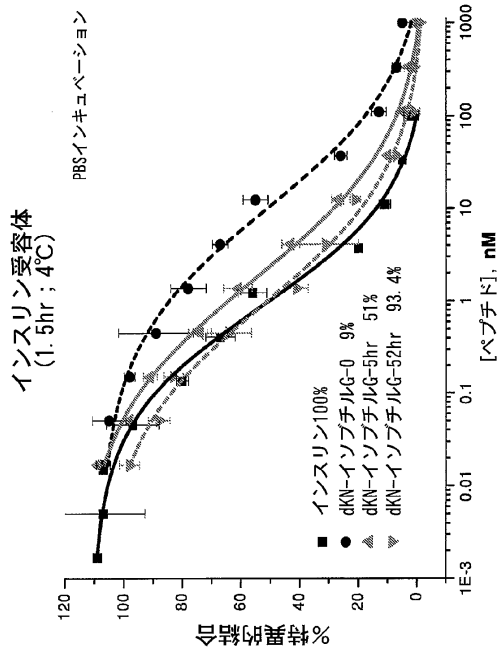


【図 4】

Fig. 4



【図 5 A】



【図 5 B】

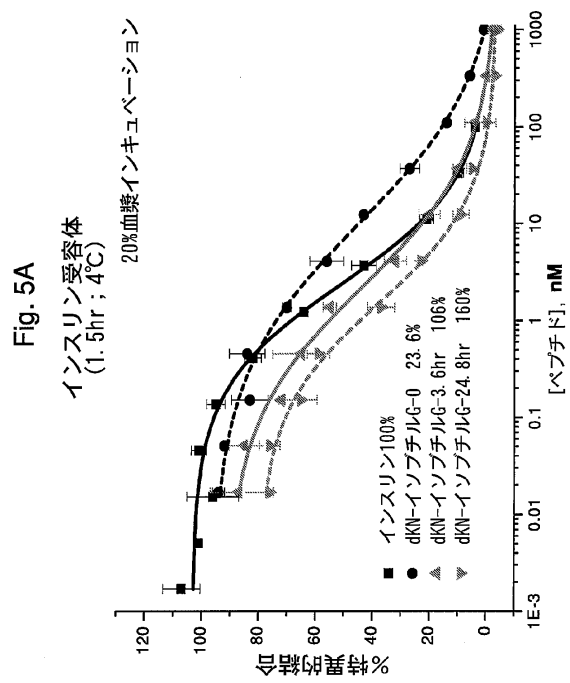
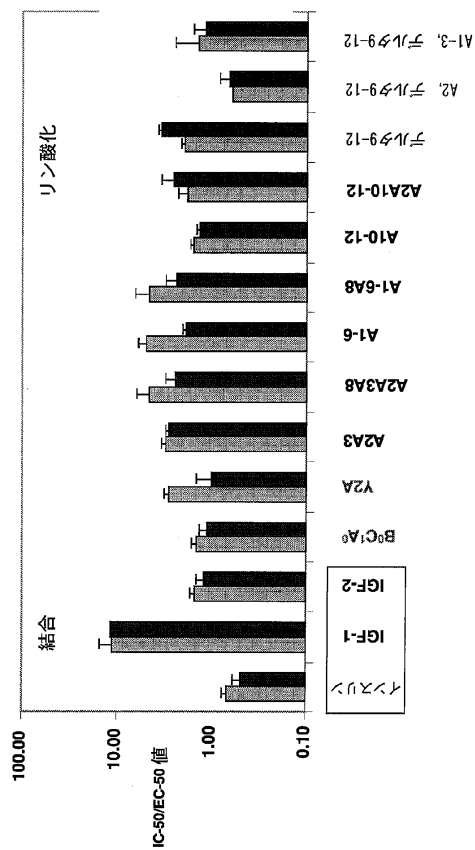


Fig. 5A

Fig. 5B

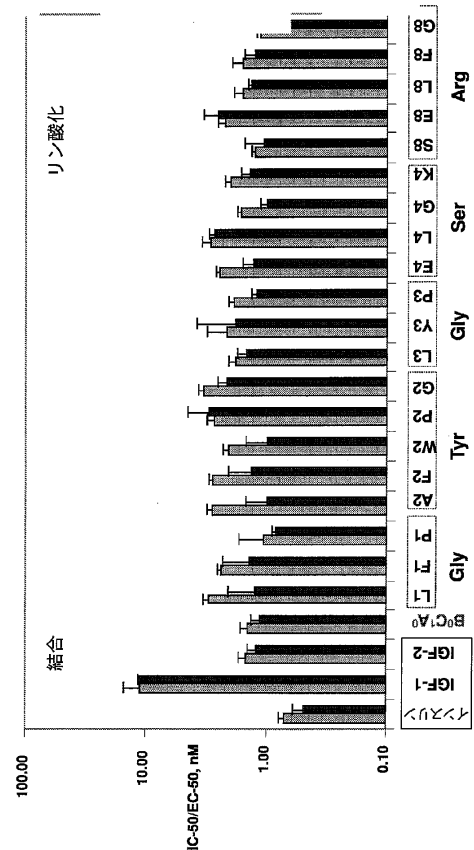
【図 6】

FIG 6
B⁰C¹A⁰インスリンアナログの受容体プロファイル
インスリン受容体タイプA結合及びリン酸化

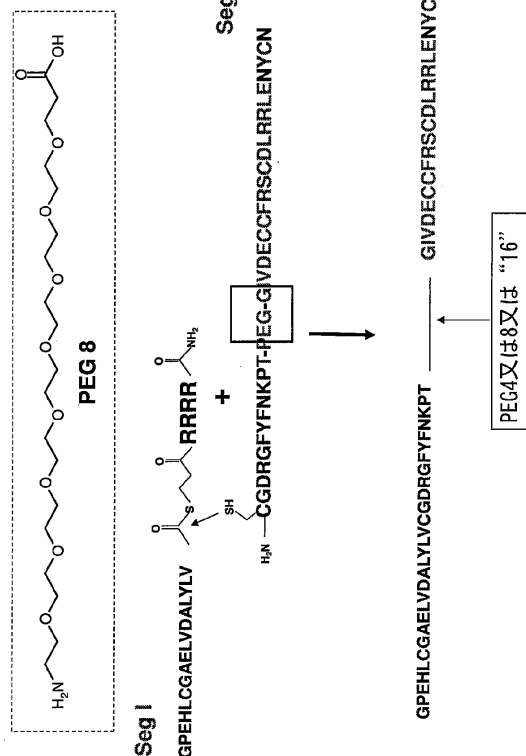


【図 7】

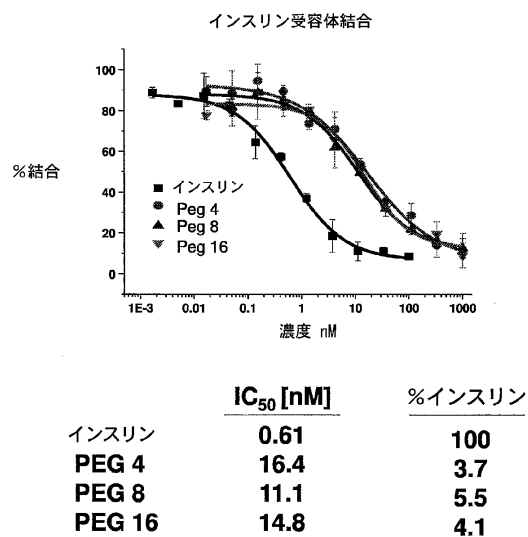
FIG 7
B⁰C¹A⁰インスリンアナログの受容体プロファイル
インスリン受容体タイプA結合及びリン酸化



【 ㄨ 8 B 】

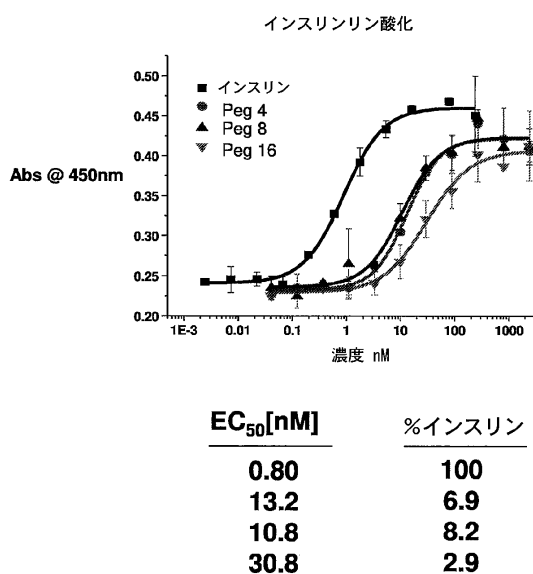


インスリン-Pegのin vitro分析

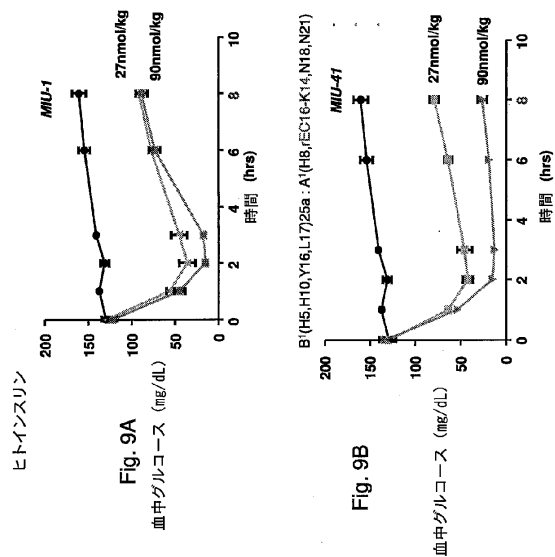


【 図 9 A - B 】

Fig. 8C



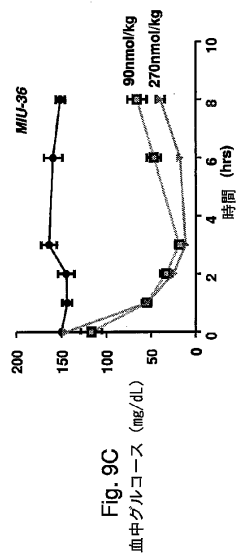
比較インスリン耐性試験 アセチル化アナログ



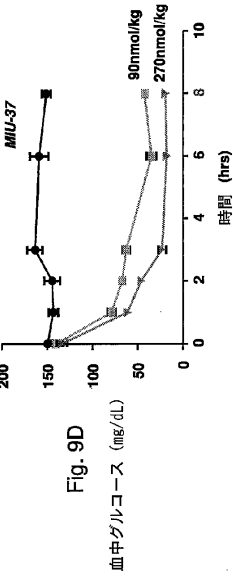
【図 9 C - D】

比較インスリン耐性試験 アシル化アナログ

B1(C16-K0,H5,H10,Y16,L17)25a:A1(N18,N21)



B1(H5,H10,Y16,L17,C16E-K22)25a:A1(N18,N21)

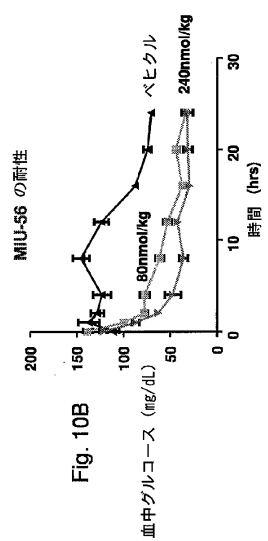
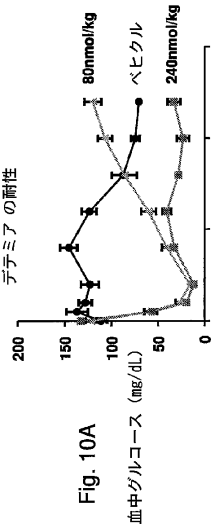


【図 10 A - B】

デテミア及びMIU-56の比較インスリン耐性試験

MIU-56: C8-20k, PEG化モノマー B(H5,Y16,L17)25a-PEG8-K-PEG4-A(N18,21)

デテミアの耐性



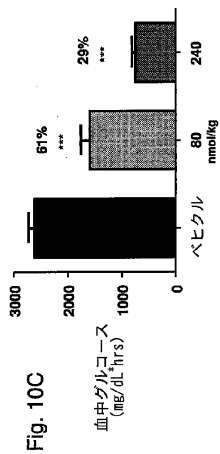
【図 10 C - D】

デテミア及びMIU-56の比較インスリン耐性試験

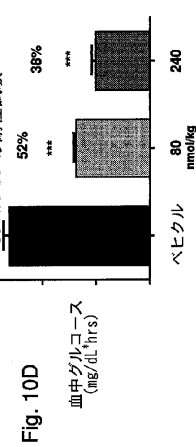
MIU-56: C8-20k, PEG化モノマー B(H5,Y16,L17)25a-PEG8-K-PEG4-A(N18,21)

C57/Blkマウスの血中グルコースAUC_{0-24hrs}

scデテミアの耐性試験

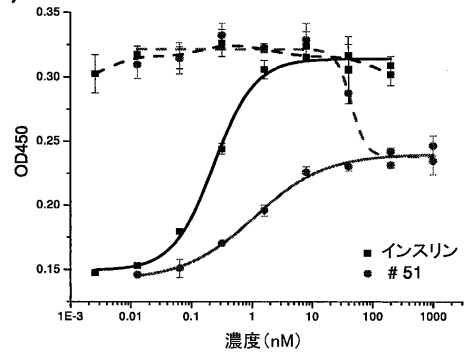
C57/Blkマウスの血中グルコースAUC_{0-24hrs}

sc MIU-56 の耐性試験



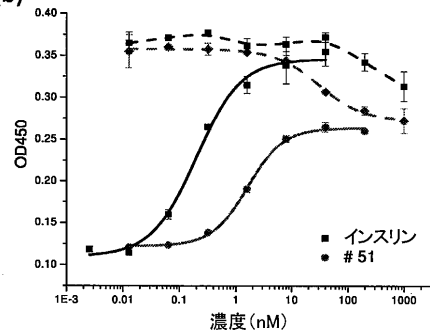
【図 11 A】

Fig. 11 (a) タイプAインスリン受容体リン酸化アッセイ

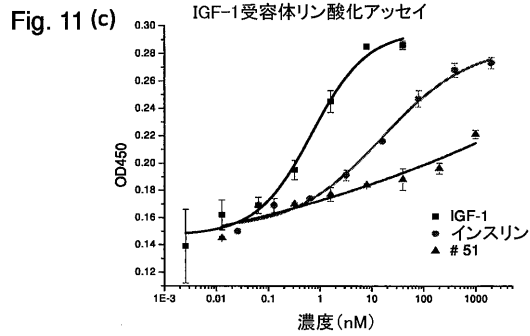


【図 11 B】

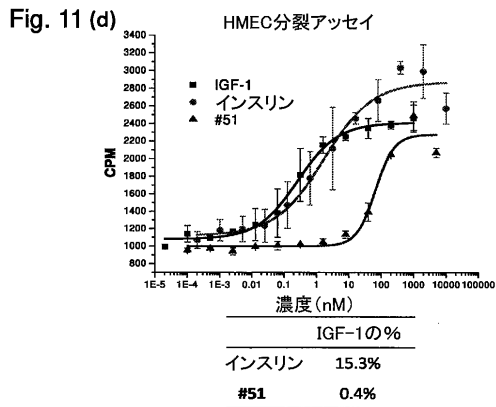
Fig. 11 (b) タイプBインスリン受容体リン酸化アッセイ



【図 1 1 C】

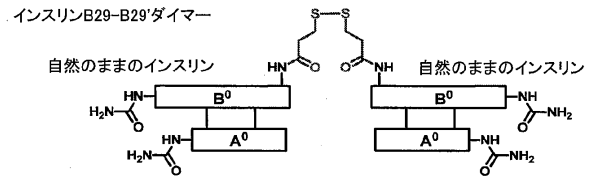


【図 1 1 D】



【図 1 1 E】

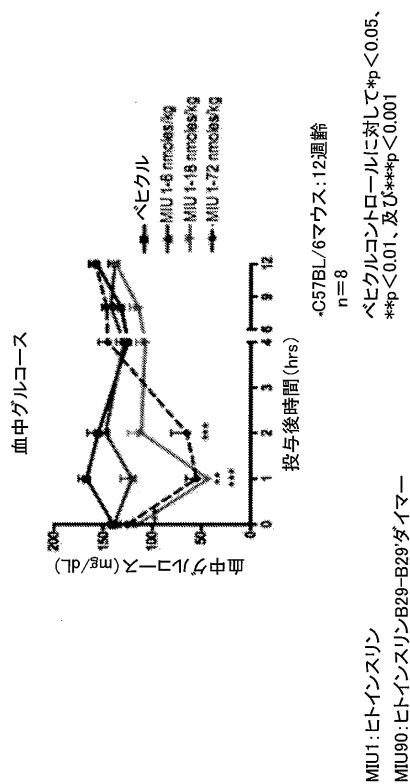
Fig. 11E: インスリンB29-B29'ダイマー



【図 1 2 A】

C57BL/6マウス実験におけるMIU-90

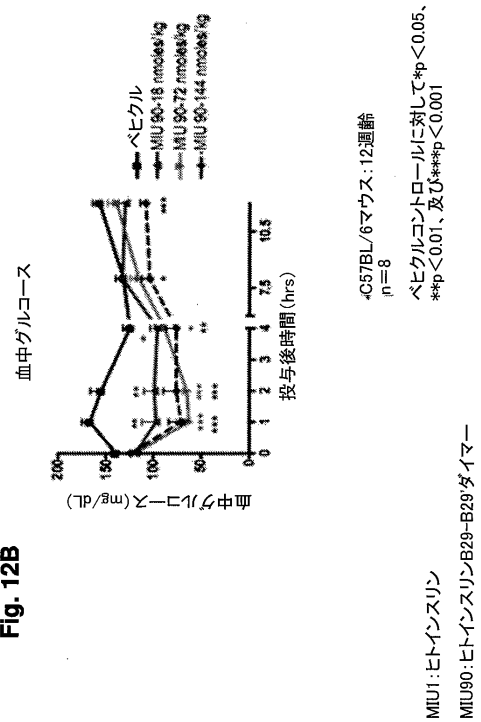
Fig. 12A



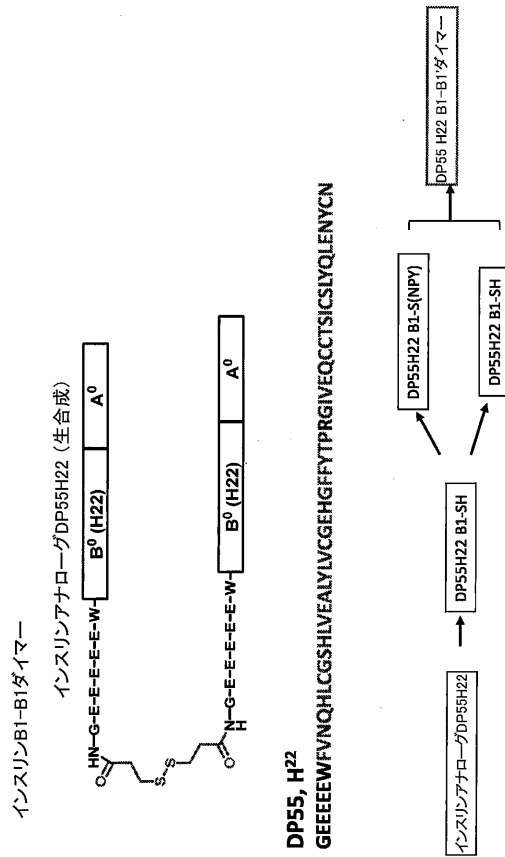
【図 1 2 B】

C57BL/6マウス実験におけるMIU-90

Fig. 12B

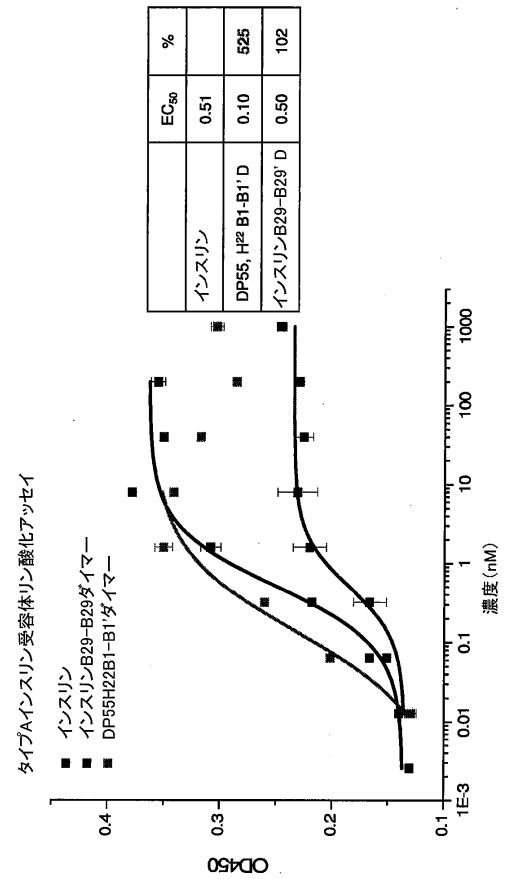


【図 13 A】

Fig. 13A 完全アゴニスト(DP55, H²² B1-B1'ダイマー)の合成

【図 13 B】

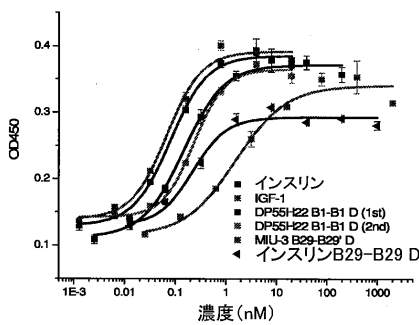
Fig. 13B: B1-B1' とB29-B29' の活性対比



【図 13 C - 1】

Fig. 13C: B1-B1'ダイマー

タイプAインスリン受容体リン酸化アッセイ

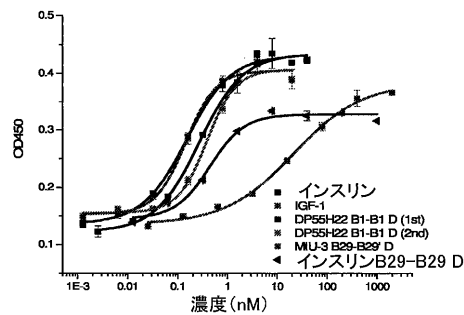


	EC ₅₀
インスリン	0.1~0.3
IGF-1	1.55
DP55, H ²² B1-B1' D (1 st prep)	0.08
DP55, H ²² B1-B1' D (2 nd prep)	0.23
DP55 B1-B1' D	0.13

【図 13 C - 2】

Fig. 13C: B1-B1'ダイマー

タイプBインスリン受容体リン酸化アッセイ



	EC ₅₀
インスリン	0.1~0.3
IGF-1	21.94
DP55, H ²² B1-B1' D (1 st prep)	0.15
DP55, H ²² B1-B1' D (2 nd prep)	0.39
DP55 B1-B1' D	0.15

【図 14 A - B】

C57BL/6マウスの血中グルコースにおけるインスリンの作用

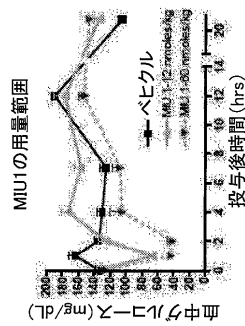


Fig. 14A

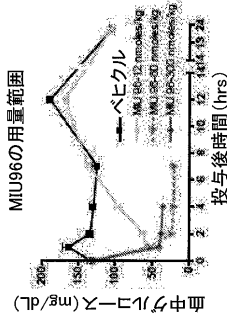
C57BL/6マウス: DOB 1/23/12 11週齢
n=8

Fig. 14B

【図 14 C】

C57BL/6マウスの血中グルコースにおけるインスリンの作用

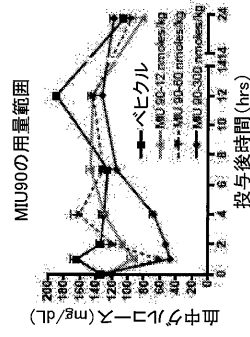
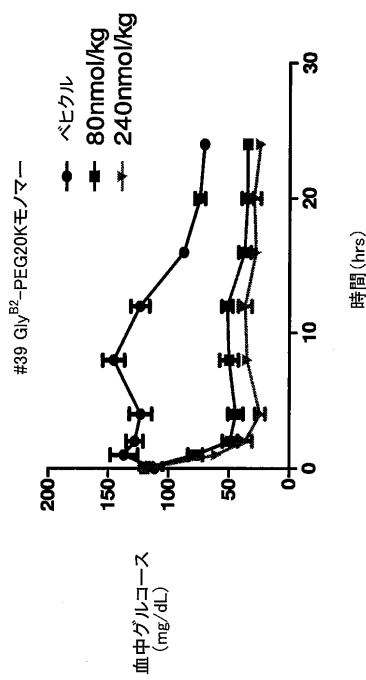


Fig. 14C

C57BL/6マウス: DOB 1/23/12 11週齢
n=8

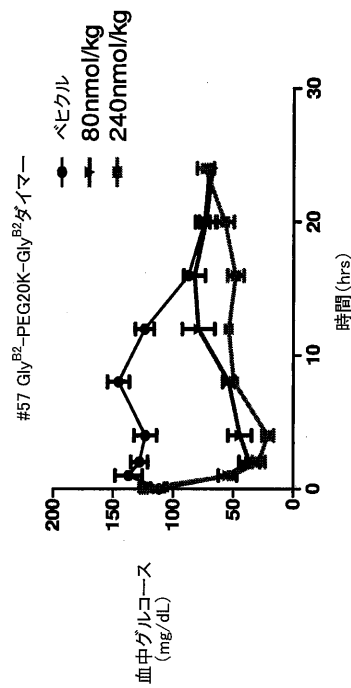
【図 15 A】

Fig. 15A



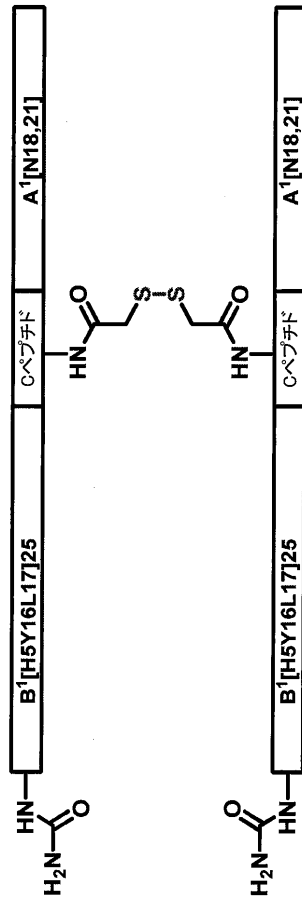
【図 15 B】

Fig. 15B



【図 16 A】

Fig. 16A: C8-C8ジスルフィドダイマー



【図 16 C】

C8-C8ジスルフィドダイマー: 部分的アゴニスト及びアンタゴニスト

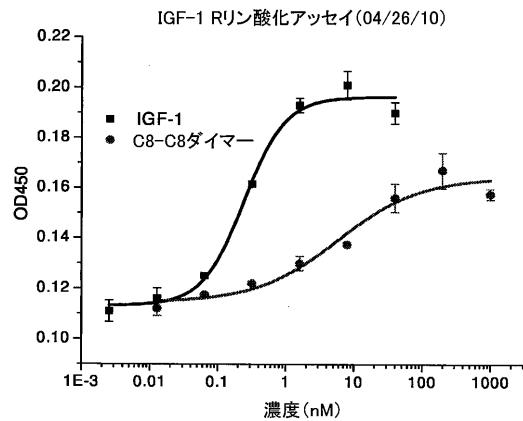


Fig. 16C

【図 16 B】

C8-C8ジスルフィドダイマー: 部分的アゴニスト及びアンタゴニスト

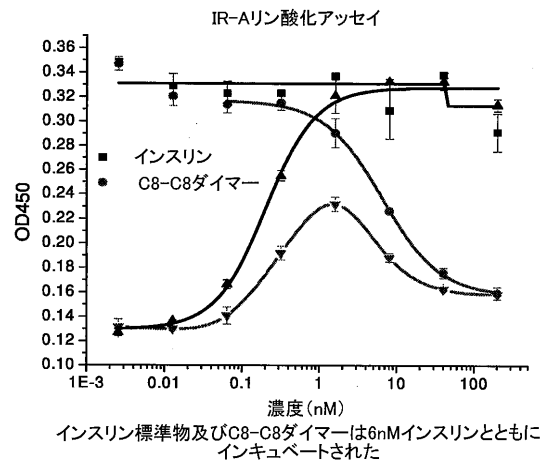
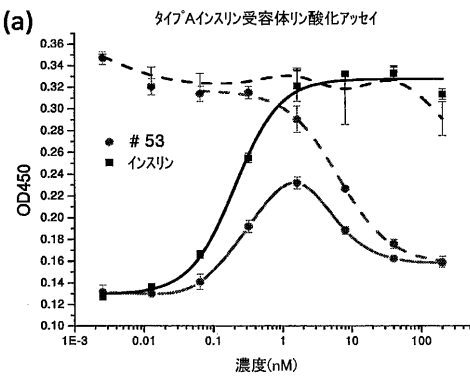


Fig. 16B

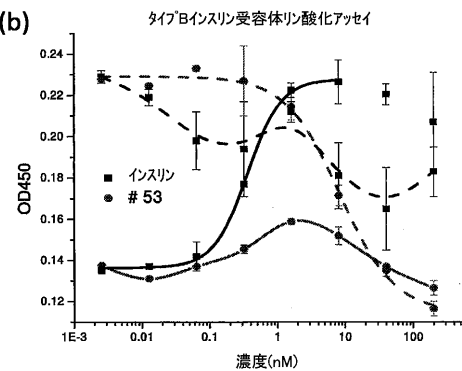
【図 17 A】

Fig. 17 (a)

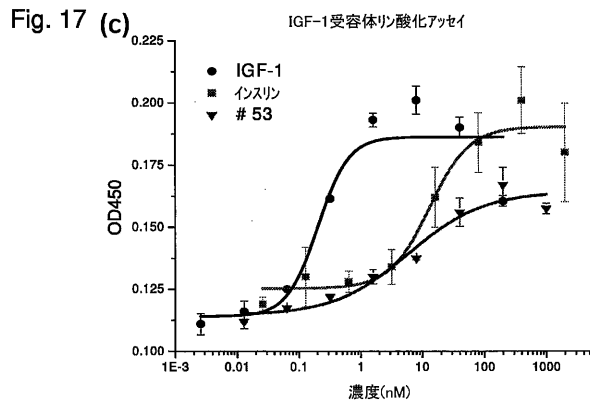


【図 17 B】

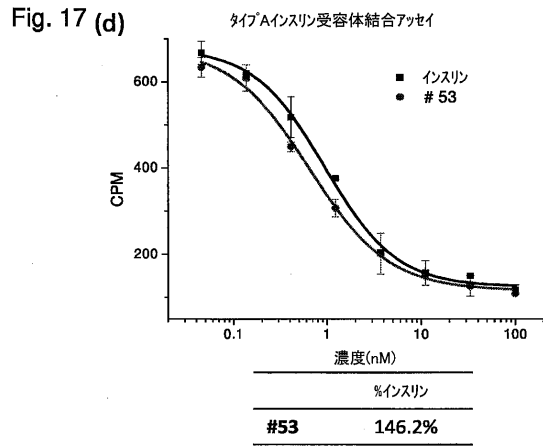
Fig. 17 (b)



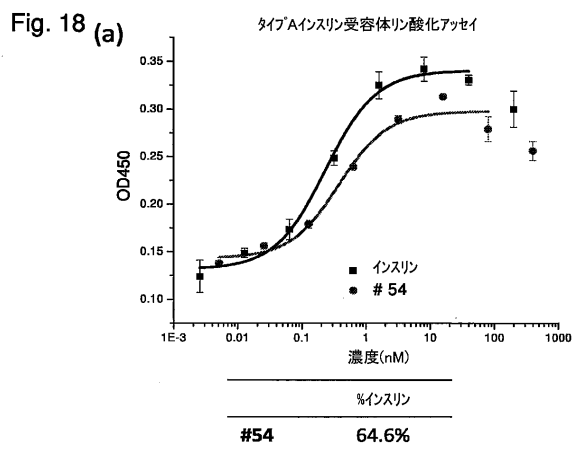
【図 17 C】



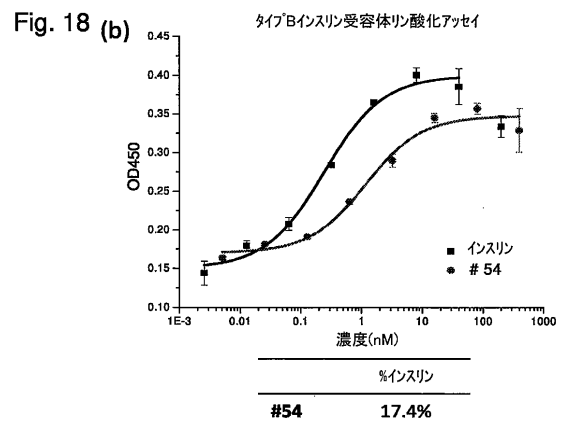
【図 17 D】



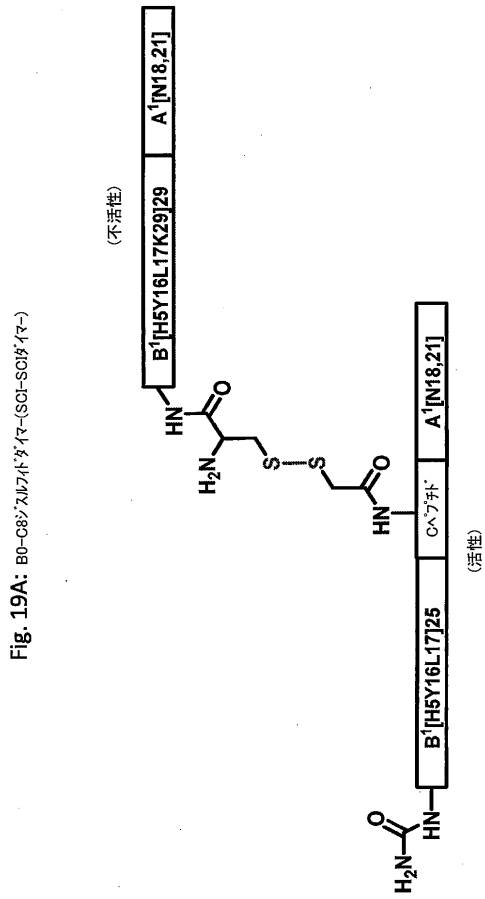
【図 18 A】



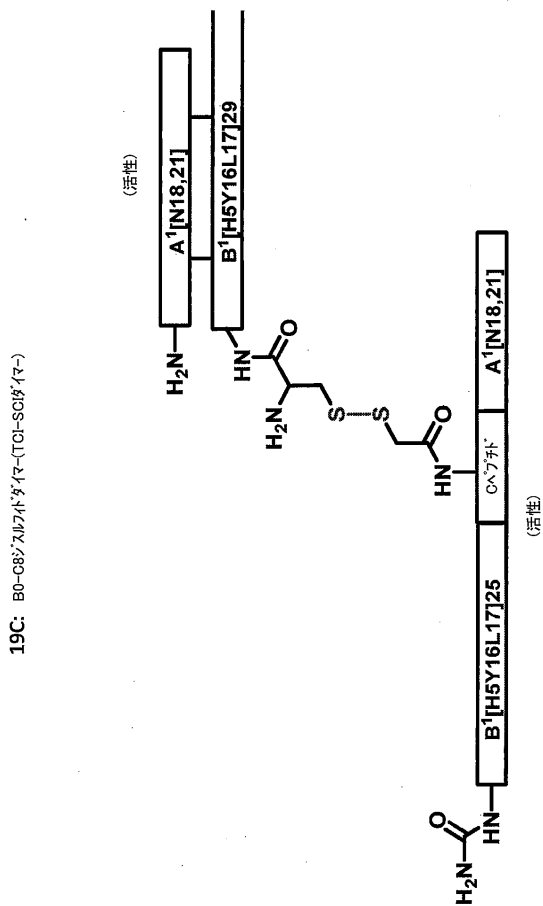
【図 18 B】



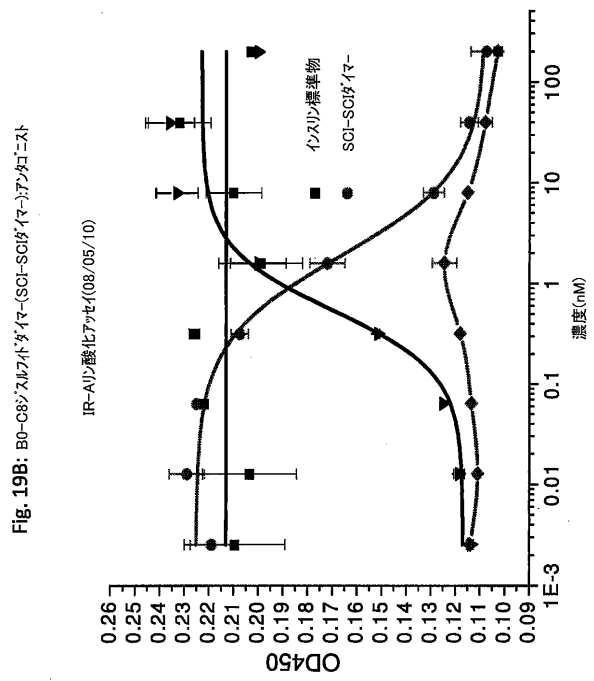
【図 19 A】



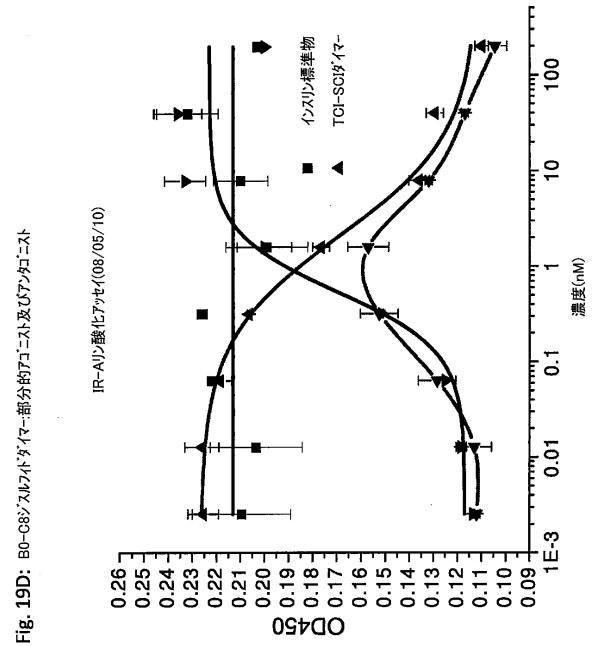
【図 19 C】



【図 19 B】

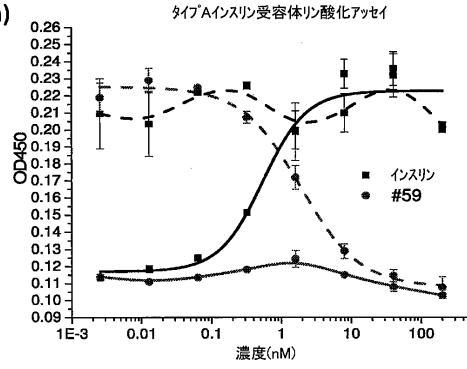


【図 19 D】



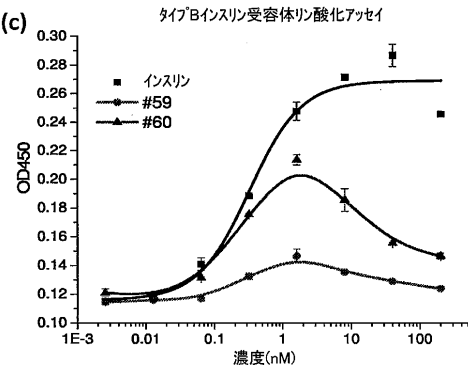
【図 20 A】

Fig. 20 (a)



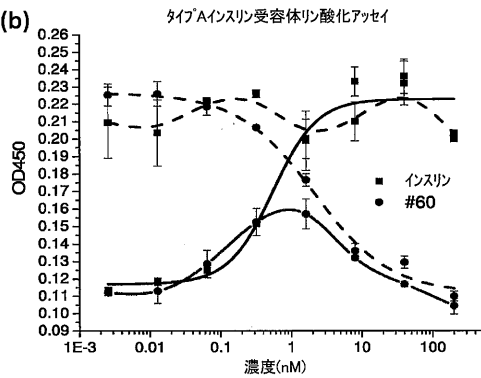
【図 20 C】

Fig. 20 (c)



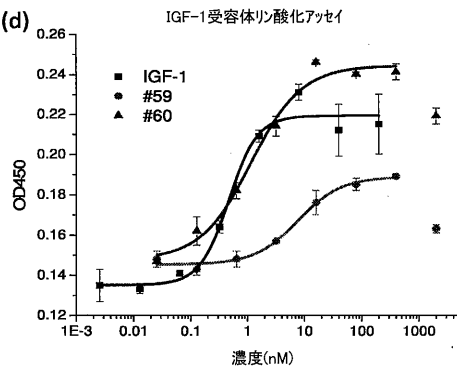
【図 20 B】

Fig. 20 (b)



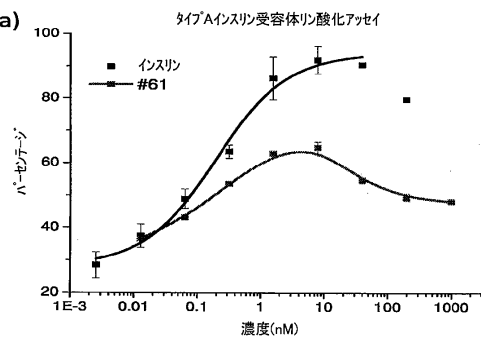
【図 20 D】

Fig. 20 (d)



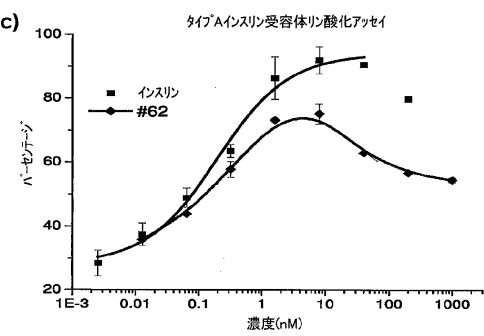
【図 21 A】

Fig. 21 (a)



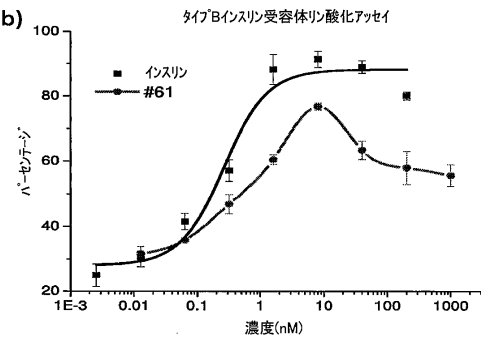
【図 21 C】

Fig. 21 (c)



【図 21 B】

Fig. 21 (b)



【図 2 1 D】

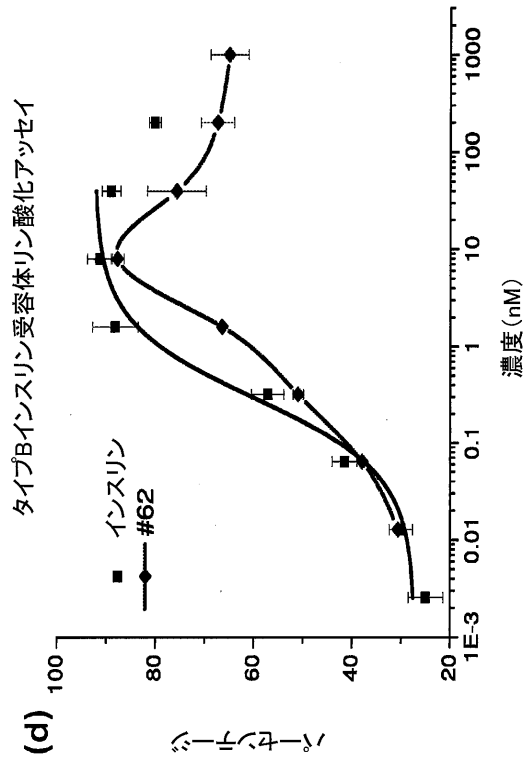


Fig. 21 (d)

【図 2 1 E】

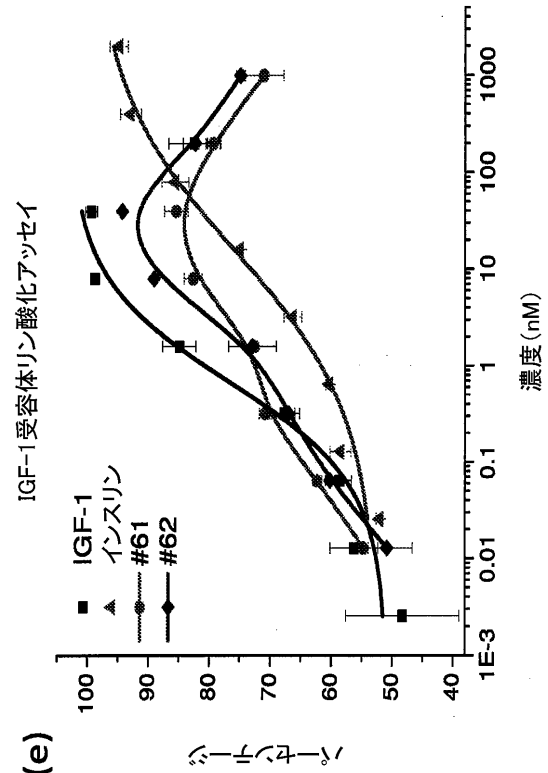
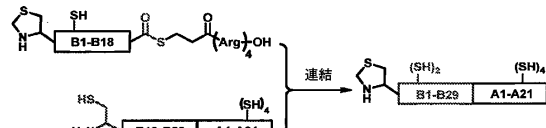


Fig. 21 (e)

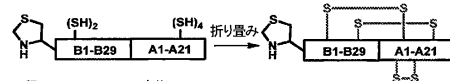
【図 2 2 A】

Fig. 22A

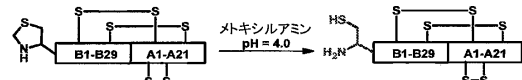
工程I: ネイティブケミカルリグーション



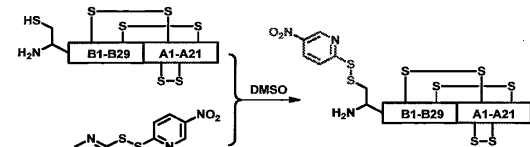
工程II: ペプチド折り畳み及びジスルフィド形成



工程III: ThzのCysへの変換

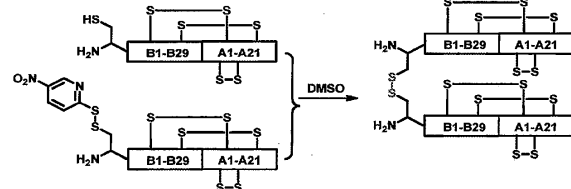


工程IV: Cysの活性化



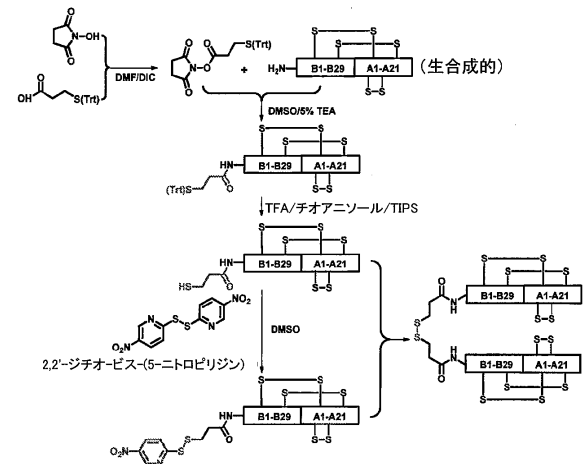
2,2'-ジチオビス-(5-ニトロピリジン)

工程V: ダイマー化



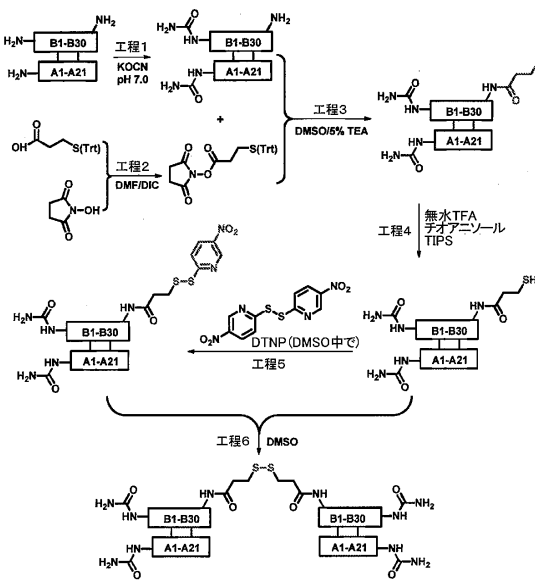
【図 2 2 B】

Fig. 22B



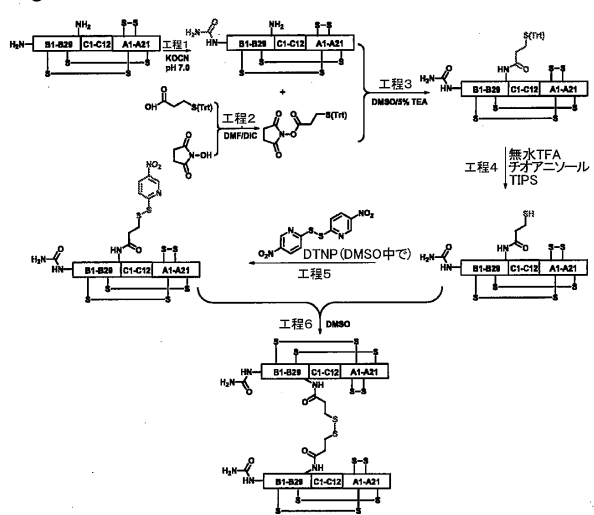
【図 22C】

Fig. 22C



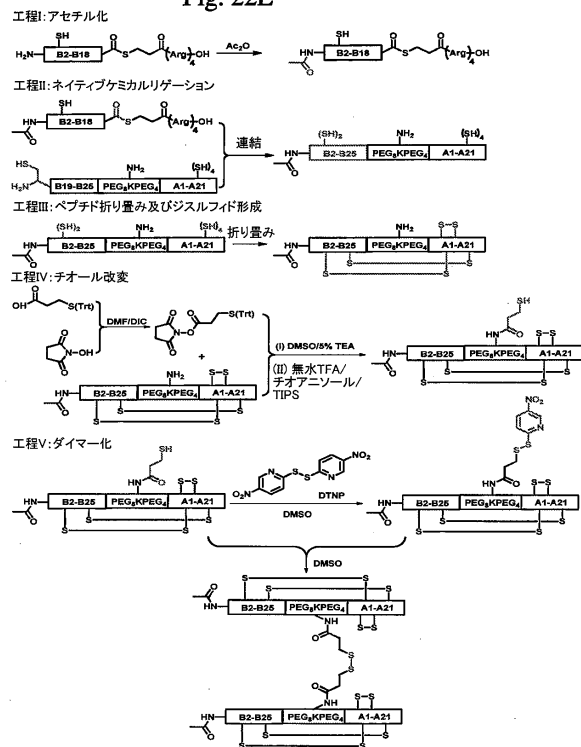
【図 22D】

Fig. 22D



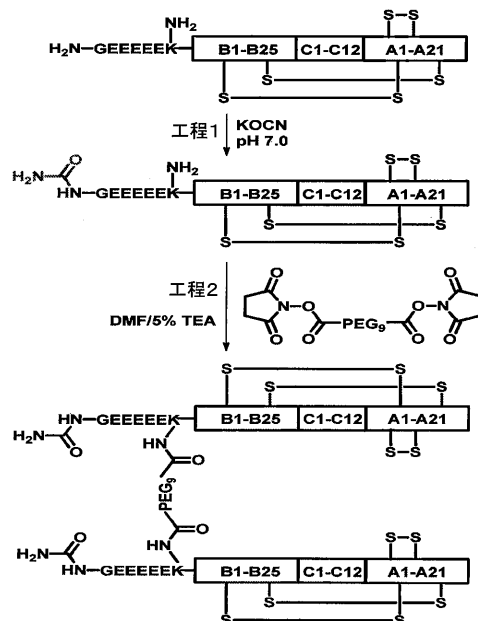
【図 22E】

Fig. 22E



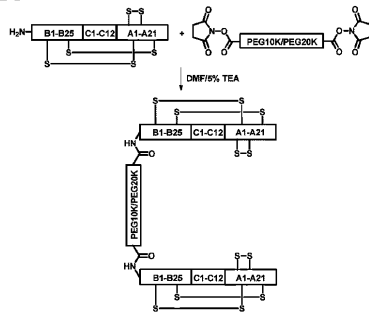
【図 22F】

Fig. 22F



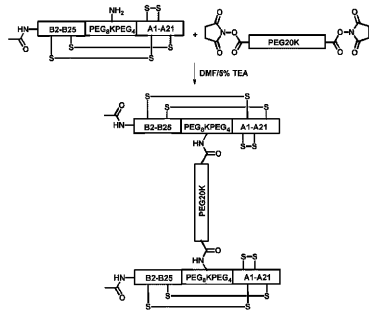
【図 22 G】

Fig. 22G



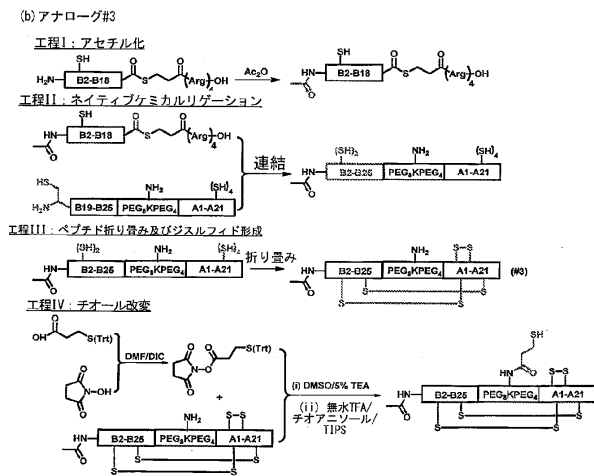
【図 22 H】

Fig. 22H



【図 23 B】

Fig. 23B

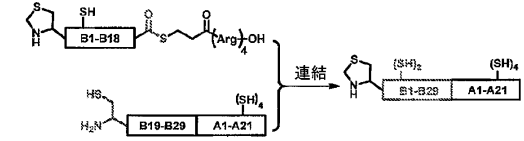


【図 23 A】

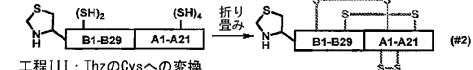
Fig. 23A

(a) アナログ#2

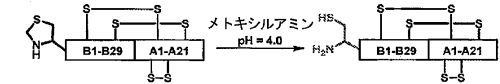
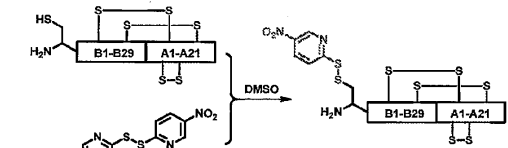
工程I : ネイティブケミカルリグーション



工程II : ペプチド折り畳み及びジスルフィド形成



工程III : ThzのCysへの変換

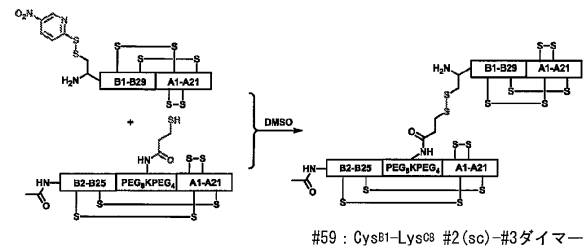
工程IV : Cys³¹の活性化

2,2'-ジチオビス-(5-ニトロピリジン)

【図 24 A】

Fig. 24A

(a) #59の合成

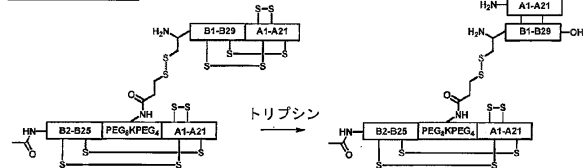


#59 : CysB1-LysC8 #2(sc)-#3ダイマー

【図 24 B】

Fig. 24B

(b) #60の合成

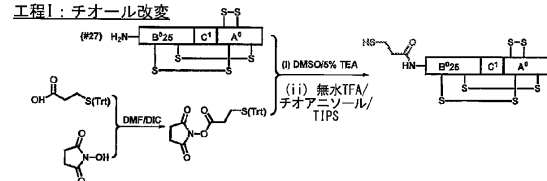
#59 : CysB1-LysC8 #2(sc)-
#3ダイマー#60 : CysB1-LysC8 #2(tc)-
#3ダイマー

【図 25 A】

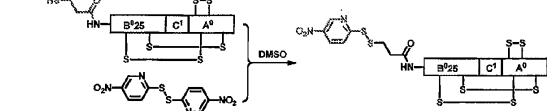
Fig. 25A

(a) アナログ#27

工程I: チオール改変



工程II: チオール活性化



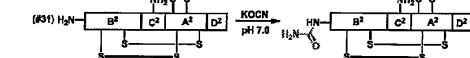
2, 2'-ジチオビス-(5-ニトロピリジン)

【図 25 B】

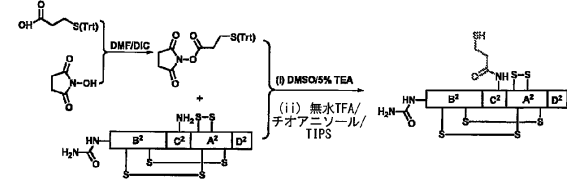
Fig. 25B

(b) アナログ#31

工程I: カルバミル化



工程II: チオール改変

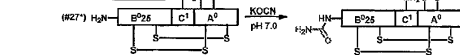


【図 26 A】

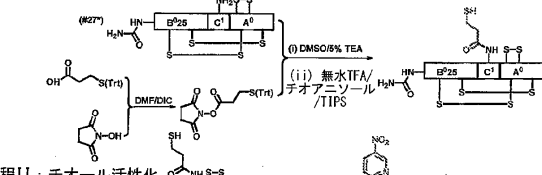
Fig. 26A

(a) アナログ#27*

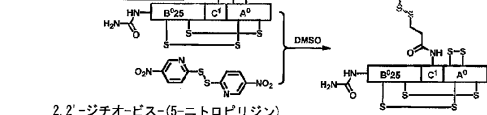
工程I: カルバミル化



工程II: チオール活性化



工程III: チオール活性化

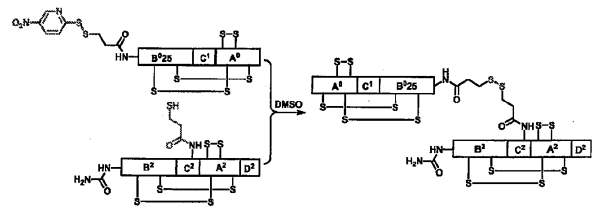


2, 2'-ジチオビス-(5-ニトロピリジン)

【図 25 C】

Fig. 25C

(c) #61の合成

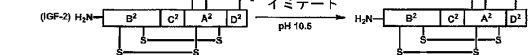


【図 26 B】

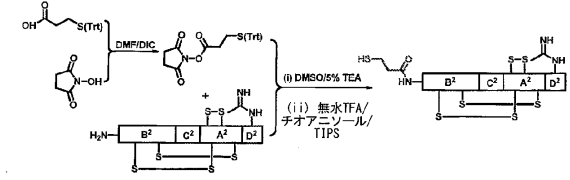
Fig. 26B

(b) IGF-2

工程I: アセトイミド化



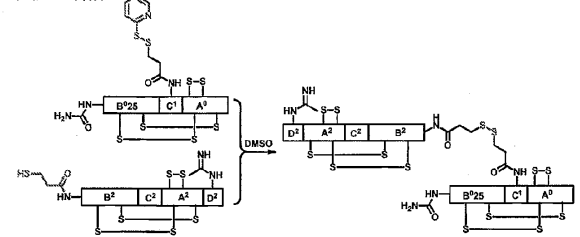
工程II: チオール改変



【図 26 C】

Fig. 26C

(c) #62の合成



【配列表】

0006387008000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (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 100183379
弁理士 藤代 昌彦
- (72)発明者 ディマルキ リチャード ディー
アメリカ合衆国 インディアナ州 46033 カーメル ウィルミントン ドライブ 10890
- (72)発明者 チャオ ヤン
アメリカ合衆国 インディアナ州 47401 ブルーミントン サウス ウォルナット ストリート パイク 3000 アpartment エフ8

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 特表2003-525864(JP,A)
国際公開第2011/159895(WO,A2)
HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT FUER PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, 1982年 3月, Vol.363 No.3, p.317-330
Mol. Endocrinol., 2009年 5月, Vol.23, No.5, p.679-688
Journal of Biological Chemistry, 2008年 5月23日, Vol.283, No.21, p.14703-14716
Science in China, 2001年12月, Vol.44, No.6, p.593-600
Biopolymer (Peptide Science), 2007年, Vol.88, No.5, p.687-713

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 1/00-19/00
Google Scholar