(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2014-525901

(P2014-525901A)

(43)公表日　平成26年10月2日(2014.10.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/605	(2006.01)	C07K	14/605	ZNA	4C076
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C084
A61K 38/26	(2006.01)	A61K	37/28		4H045
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111	
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 76 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-517014 (P2014-517014)
(86)(22)出願日　平成24年6月12日 (2012.6.12)
(85)翻訳文提出日　平成26年2月19日 (2014.2.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/042084
(87)国際公開番号　WO2012/177443
(87)国際公開日　平成24年12月27日 (2012.12.27)
(31)優先権主張番号　61/500,027
(32)優先日　平成23年6月22日 (2011.6.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/547,360
(32)優先日　平成23年10月14日 (2011.10.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　505407553
インディアナ　ユニヴァーシティ　リサーチ　アンド　テクノロジー　コーポレイション
アメリカ合衆国、インディアナ州　４６２０２、インディアナポリス、ウェスト　テンス　ストリート　３５１
(74)代理人　100092093
弁理士　辻居　幸一
(74)代理人　100082005
弁理士　熊倉　禎男
(74)代理人　100084663
弁理士　箱田　篤
(74)代理人　100093300
弁理士　浅井　賢治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】グルカゴン／ＧＬＰ－１レセプタコ－アゴニスト

(57)【要約】
ここでは、自然のグルカゴンと比較して、GLP-1レセプタにおいて高い活性を示す、ペプチドおよび変異ペプチドを提供する。
【選択図】図1

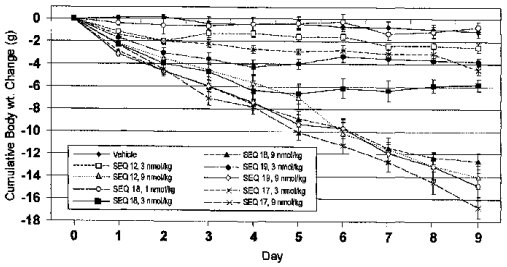


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下のアミノ酸配列：a)配列番号:17、b)配列番号:12、c)配列番号:13、d)配列番号:14、e)配列番号:15、またはf)配列番号:16を含むまたは該アミノ酸配列からなるペプチドあるいはその製薬上許容される塩。
【請求項２】
前記配列番号:17のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のペプチドまたはその製薬上許容される塩。
【請求項３】
前記配列番号:12のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のペプチドまたはその製薬上許容される塩。
【請求項４】
前記配列番号:13のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のペプチドまたはその製薬上許容される塩。
【請求項５】
前記配列番号:14のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のペプチドまたはその製薬上許容される塩。
【請求項６】
前記配列番号:15のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のペプチドまたはその製薬上許容される塩。
【請求項７】
前記配列番号:16のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のペプチドまたはその製薬上許容される塩。
【請求項８】
変異ペプチドまたはその製薬上許容される塩であって、該変異ペプチドが、請求項1記載のペプチドのアミノ酸配列と少なくとも85％、90％または95％同一であるアミノ酸配列を含み、該変異ペプチドが、請求項1記載のペプチドのアミノ酸配列とは、以下の特徴の1つ以上を含む点において異なっており：
a．位置10におけるアシル化アミノ酸またはアルキル化アミノ酸；
b．アシル化アミノ酸またはアルキル化アミノ酸が、自然のグルカゴン(配列番号:1)の当該位置の対応するアミノ酸又は自然のアミノ酸の保存的置換で置き換えられ、また場合により新規なアシル化またはアルキル化アミノ酸が異なる位置に導入される；
c．該変異ペプチドが、位置24において親水性部分と共有結合したアミノ酸を含む；
d．親水性部分と共有結合したアミノ酸が、自然のグルカゴン(配列番号:1)の当該位置の対応するアミノ酸で置換されており、また場合により親水性部分と共有結合した新規なアミノ酸が異なる位置において導入される；
e．該変異ペプチドのC-末端アミノ酸が、C-末端α-カルボキシレートの代わりにC-末端アミドを含む；
f．位置１～２９のいずれかにおけるアミノ酸が、自然のグルカゴン(配列番号:1)の当該位置の対応するアミノ酸で置換される、
g.又はこれらの任意の組合せ、
ここで、該変異ペプチドは、自然のグルカゴンと比較して増強されたGLP-1レセプタにおける活性を呈し、かつGIPレセプタに比して、ヒトGLP-1レセプタに対する少なくとも100-倍高い選択性を呈する、ことを特徴とする前記変異ペプチドまたはその製薬上許容される塩。
【請求項９】
位置16、17、21、24、29、C-末端拡張部分内の位置、または該C-末端においてアミノ酸と共有結合した親水性部分を含む、請求項8記載の変異ペプチドまたはその製薬上許容される塩。
【請求項１０】

親水性部分と共有結合したCys、Lys、Orn、ホモシステイン、およびAc-Pheを含み、場合により該Cys、Lys、Orn、ホモシステイン、およびAc-Pheが、前記変異ペプチドの位置16、17、21、24、29、C-末端拡張部分内の位置、または該C-末端に位置している、請求項8記載の変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩。

【請求項１１】

前記親水性部分が、ポリエチレングリコール、場合により10kDa～40kDaの分子量のPEGである、請求項8～10の何れか1項に記載の変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩。

【請求項１２】

C8～C20のアルキル鎖、C12～C18のアルキル鎖、またはC14若しくはC16のアルキル鎖を含むアシル化またはアルキル化アミノ酸を含有する、請求項8～11の何れか1項に記載の変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩。

【請求項１３】

式I、式II、または式IIIのアシル化またはアルキル化アミノ酸である、アシル化またはアルキル化アミノ酸を含有し、場合により該式Iのアミノ酸がLysである、請求項8～12の何れか1項に記載の変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩。

【請求項１４】

アシル化またはアルキル化アミノ酸を含有し、該アシル基またはアルキル基が、スペーサを介して該アミノ酸に共有結合しており、場合により該スペーサが、アミノ酸またはジペプチドである、請求項8～13の何れか1項に記載の変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩。

【請求項１５】

前記スペーサが、1または2個の酸性残基を含む、請求項14記載の変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩。

【請求項１６】

(グルカゴンレセプタにおけるEC50)/(GLP-1レセプタにおけるEC50)の値が約20以下である、請求項1～15の何れか1項に記載のペプチドまたは変異ペプチドまたはその製薬上許容される塩。

【請求項１７】

前記グルカゴンレセプタにおけるEC50よりも2～10倍大きな、前記GLP-1レセプタにおけるEC50を呈する、請求項1～16の何れか1項に記載のペプチドまたは変異ペプチドまたはその製薬上許容される塩。

【請求項１８】

ヘテロロガス部分と結合した請求項1～17の何れか1項に記載のペプチドまたは変異ペプチドを含む複合体またはその製薬上許容される塩であって、該複合体が、自然のグルカゴンと比較して前記GLP-1レセプタにおける増強された活性を呈し、かつGIPレセプタに比して、前記ヒトGLP-1レセプタに対する少なくとも100倍高い選択性を呈することを特徴とする、前記複合体またはその製薬上許容される塩。

【請求項１９】

前記ヘテロロガス部分が、ペプチド、ポリペプチド、核酸分子、抗体またはそのフラグメント、ポリマー、量子ドット、小分子、毒素、診断薬の1つ以上を含む、請求項18記載の複合体またはその製薬上許容される塩。

【請求項２０】

前記ヘテロロガス部分が、ペプチドであり、かつ複合体が融合ペプチドまたはキメラペプチドである、請求項19記載の複合体またはその製薬上許容される塩。

【請求項２１】

前記ペプチドまたは変異ペプチドのC-末端から位置31のアミノ酸に1-21アミノ酸の拡張部分を含む、請求項20記載の複合体またはその製薬上許容される塩。

【請求項２２】

前記拡張部分が、Gly、Glu、Cys、Gly-Gly、Gly-Glu、GPSSGAPPPS(配列番号: 9)または

GGPSSGAPPPS(配列番号: 10)からなる群から選択される、請求項21記載の複合体またはその製薬上許容される塩。
【請求項２３】
請求項1～22の何れか1項に記載のペプチドまたは変異ペプチドを含むダイマーまたはマルチマー、またはこれらの製薬上許容される塩。
【請求項２４】
請求項1～23の何れか1項に記載のペプチドまたは変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩；請求項18～22の何れか1項に記載の複合体、またはその製薬上許容される塩；請求項23記載のダイマーまたはマルチマー、またはその製薬上許容される塩；またはこれらの組合せ、および製薬上許容される担体を含む、薬剤組成物。
【請求項２５】
抗糖尿病薬または抗肥満症薬を含む、請求項24記載の薬剤組成物。
【請求項２６】
患者の疾患または医学的状態を治療する方法であって、該疾患または医学的状態が代謝症候群、糖尿病、肥満症、肝脂肪症、および神経組織変性症からなる群から選択され、該方法が、該患者に請求項24または25記載の薬剤組成物を、該疾患または医学的状態を治療するのに有効な量で投与することを含む、前記方法。
【請求項２７】
前記患者に、抗糖尿病薬または抗肥満症薬を投与することを更に含む、請求項26記載の方法。
【請求項２８】
請求項1～27の何れか1項に記載のペプチドまたは変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩；請求項18～22の何れか1項に記載の複合体、またはその製薬上許容される塩；請求項23記載のダイマーまたはマルチマー；またはこれらの組合せの、疾患または医学的状態を治療するための使用。
【請求項２９】
請求項1～28の何れか1項に記載のペプチドまたは変異ペプチド、またはその製薬上許容される塩；請求項18～22の何れか1項に記載の複合体、またはその製薬上許容される塩；請求項23記載のダイマーまたはマルチマー；またはこれらの組合せの、疾患または医学的状態を治療するための医薬の製造における使用。
【請求項３０】
前記疾患または医学的状態が、代謝症候群、糖尿病、肥満症、肝脂肪症、および神経組織変性症からなる群から選択される、請求項28または29記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［関連出願との相互引照］
本件特許出願は、2011年6月22日付で出願された米国仮特許出願No.61/500,027および2011年10月14日付で出願された米国仮特許出願No.61/547,360に基く優先権を主張するものである。これら仮特許出願各々の内容全体を、参考としてここに組入れるものとする。
［電子的に提出された資料の参考としての組入れ］
資料内容全体の参考としての組入れは、本件と同時に提出されたコンピュータ-読出し可能な拡散/アミノ酸配列リストであり、以下のように識別される：2012年5月25日に作成された、15キロバイトACII(テキスト)、ファイル名「07012KL_PCT_Sequence_Listing.txt」。
【背景技術】
【０００２】
プレプログルカゴンは、様々な組織内で処理されて、グルカゴン、グルカゴン-様ペプチド-1(GLP-1)、グルカゴン-様ペプチド-2(GLP-2)およびオキシントモジュリン(OXM)を包含する多数の異なるプログルカゴン-由来のペプチドを形成する158アミノ酸のプリカーサ

ポリペプチドであり、これらはグルコースホメオスターシス、インシュリン分泌、胃内容排出および腸の成長を含む広範囲に及ぶ生理的な機能並びに食物摂取量の調節に関与している。グルカゴンは29-アミノ酸ペプチドであり、これはプレプログルカゴンの33-61アミノ酸に相当し、一方でGLP-1はプレプログルカゴンの72-108アミノ酸に相当する、37-アミノ酸ペプチドとして生成される。GLP-1(7-36)アミドまたはGLP-1(7-37)酸は、GLP-1の生物学的に有力な形態であり、このことは、GLP-1レセプタにおいて本質的に等価な活性を持つことを立証している。

【０００３】

低血糖症に罹った際に、血糖値レベルが正常値以下に低下した場合、グルカゴンは、肝臓がグリコーゲンを分解し、グルコースを放出するようにシグナルを発し、結果として血糖値レベルを正常なレベルへと上昇させる。低血糖症は、糖尿病による高血糖症に罹っている(高い血糖値レベルを持つ)患者におけるインシュリン療法の一般的な副作用である。即ち、グルコースの調節におけるグルカゴンの最も認識されている役割は、インシュリンの作用を打ち消し、中和し、かつ血糖値レベルを維持することにある。

【０００４】

GLP-1は、グルカゴンとは異なる生物学的活性を有している。その作用は、インシュリン合成および分泌の刺激、グルカゴン分泌の阻止、および食物摂取の阻止を含む。GLP-1は、糖尿病患者における高い血糖値を低下させることが示されている。エキセンディン-4、即ちGLP-1との約50％アミノ酸同一性を共有する、トカゲ毒液由来のペプチドは、該GLP-1レセプタを活性化し、また同様に糖尿病患者における高い血糖値を低下させることが示されている。

【０００５】

また、GLP-1およびエキセンディン-4が、食物摂取量を低下し、また体重減を促進し、糖尿病患者ばかりでなく、肥満症を患う患者にとっても有利な効果を持つことが明らかとなっている。肥満症を患う患者は、糖尿病、高血圧症、高脂血症、心臓血管疾患、および筋骨格疾患に罹患するより高い危険性を有する。

【発明の概要】

【０００６】

本発明は、前記グルカゴンレセプタにおける活性、前記GLP-1レセプタにおける活性、または該グルカゴンレセプタおよび該GLP-1レセプタ各々における活性を呈するペプチドおよび変異ペプチドを提供する。例示的態様において、ここに開示されるペプチドおよび変異ペプチドは、自然のグルカゴンと比較して、増強された該GLP-1レセプタにおける活性を示す。例示的な局面において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、前記GIPレセプタに比して、少なくとも100-倍のヒトGLP-1レセプタに対する選択性を示す。

【０００７】

本開示は、更にヘテロロガス(非-相同)部分と結合した本明細書に記載のペプチドおよび変異ペプチドの何れかを含む複合体をも提供する。例示的な局面において、該ヘテロロガス部分は、ペプチドまたはタンパク質であり、また該複合体は、融合タンパク質またはキメラペプチドである。例示的な局面において、該ヘテロロガス部分はポリマー、例えばポリエチレングリコールである。本開示は、更にここに記載するペプチドおよび変異ペプチドの何れかを含むダイマーおよびマルチマーをも提供する。

【０００８】

本開示は、更にここに記載するペプチドおよび変異ペプチドの何れかおよび製薬上許容される担体、並びに患者における疾患または医学的状態(例えば、代謝症候群、糖尿病、肥満症、肝脂肪症、および神経組織変性症、低血糖症)を治療しまたは予防する方法をも提供する。該方法は、該患者に、場合により薬剤組成物に処方されたここに記載するペプチドまたはペプチド変異体を、該疾患または医学的状態を治療するのに有効な量で投与することを含む。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】図1は、実施例7に記載したような、賦形剤コントロールまたは所定用量の、配列番号:12、17、18または19からなるペプチドで処置したDIOマウスの、累積体重変化(g)のグラフを示す図である。
【図２】図2は、実施例7に記載したような、賦形剤コントロールまたは所定用量の、配列番号:12、17、18または19からなるペプチドで処置したDIOマウスの、基礎グルコース濃度(mg/dl)のグラフを示す図である。
【図３】図3Aは、実施例8に記載したような、賦形剤コントロール、リラグルチド(Lira)、または所定用量の、配列番号:17または20からなるペプチドで治療した、肥満したアカゲザルに係る累積体重変化(％)のグラフを示す図である。図3Bは、実施例8に記載したような、賦形剤コントロール、リラグルチド(Lira)、または所定用量の、配列番号:17または20からなるペプチドで治療した、肥満したアカゲザルの累積食物摂取量(第0日における食物摂取を基準とする百分率として表示)に係るグラフを示す図である。
【図４】図4は、実施例9に記載したような、賦形剤コントロールまたは所定用量の、配列番号:17からなるペプチドで治療した、糖尿病を患うアカゲザルの血糖値レベル(mg/dL)に係るグラフを示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１０】
定義
本明細書において使用する「約」なる用語は、10％だけ、述べられている値を越えるまたはこれに満たない値またはその値の範囲を意味するが、任意の値または様々な値の範囲を、この広義の定義のみに指定することを意図するものではない。先行する「約」なる用語を持つ各値または様々な値の範囲は、また述べられた絶対値または様々な値の範囲の具体値を包含することを意図する。
【００１１】
本明細書において使用するような用語「製薬上許容される担体」とは、任意の標準的な製薬担体、例えばリン酸緩衝塩溶液、水、エマルション、例えば油/水型または水/油型エマルション、および様々な型の湿潤剤を含む。この用語は、またヒトを含む動物における使用について、US連邦政府の規制機関により承認された、あるいはUS薬局方(US Pharmacopeia)において掲載されている薬剤全てを包含する。
【００１２】
ここで使用する用語「製薬上許容される塩」とは、親化合物の生物学的活性を維持している、該親化合物の塩を意味し、これらの塩は、生物学的なものである必要はないが、望ましからぬものではない。本明細書において記載される化合物の多くは、アミノ基および/またはカルボキシル基またはこれらに類似する基の存在により、酸塩および/または塩基塩を形成し得る。
【００１３】
製薬上許容される塩基付加塩は、無機または有機塩基から製造することができる。無機塩基から誘導される塩は、例示のみの目的で、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウムおよびマグネシウム塩を包含する。有機塩基から誘導される塩は、一級、二級および三級アミンとの塩を含むが、これらに限定されない。
【００１４】
ここで使用するような用語「治療(する)」とは、特定の障害、疾患または状態の予防、または特定の障害、疾患または状態に関連する症状の軽減および/または該症状の予防または排除を含む。例えば、ここで使用する用語「糖尿病を治療(する)」とは、一般にグルコースの血中レベルをその正常なレベルに向けて変更することを意味し、また与えられた状況に応じて血糖値レベルを高めまたは下げることを含むことができる。
【００１５】
ここで使用するような、グルカゴンペプチドの「有効な量」または「治療上有効な量」とは、非-毒性であり、かつ所定の効果を与えるのに十分な該ペプチドの量を意味する。例えば、所定の効果の一つは、例えば正常値に近い血糖値レベルにおける変化によって測

定される、高血糖症の予防または治療であり、あるいは例えば体重における減少によって測定される、体重減の誘発/体重増の阻止であり、あるいは体重増加の阻止または低減、または体脂肪分布の正常化である。該「有効」量は、個々の年齢および一般的な状態、投与モード等に依存して、患者(対象)毎に変動するであろう。即ち、正確な「有効量」を特定することが常に可能であるわけではない。しかし、あらゆる個々の場合における適切な「有効」量は、日常業務的実験を利用して、当業者により容易に決定し得るものである。

【００１６】

用語「腸管外(非経口)」とは、消化管を経由するのではなく、ある他の経路、例えば皮下、筋肉内、髄腔内、または静脈内経路によることを意味する。

【００１７】

ここで使用する用語「ペプチド」とは、3またはそれ以上のアミノ酸および典型的には100個未満のアミノ酸からなる鎖を包含し、ここで該アミノ酸は、天然産のまたはコード化されたあるいは非-天然産のあるいは非-コード化アミノ酸である。非-天然産のアミノ酸とは、インビボにおいて天然に産しないが、それにも拘らずここに記載されるペプチド構造に組入れることのできるアミノ酸を意味する。ここで使用する「非-コード化」アミノ酸なる用語は、以下の20個のアミノ酸の何れかのL-異性体ではないアミノ酸を意味する：Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr。ここで使用する「コード化」アミノ酸なる用語は、以下の20個のアミノ酸の何れかのL-異性体であるアミノ酸を意味する：Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr。幾つかの態様において、ここに記載するペプチドおよび変異ペプチドは、配列番号:1(これは長さにおいて29アミノ酸に匹敵する)とほぼ同一の長さのもの、例えば長さ25～35アミノ酸のペプチドである。例示的な長さは、アミノ酸数で29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50個に相当する長さを包含する。

【００１８】

典型的には、ポリペプチドおよびタンパク質は、「ペプチド」の長さよりも長いポリマー長さを持つ。

【００１９】

本件出願全体を通して、数値による特定のアミノ酸の位置に係る全ての言及(例えば、位置28)は、自然のグルカゴン(配列番号:1)における該当位置のアミノ酸を意味するか、あるいはその任意の類似体における対応するアミノ酸位置を意味する。例えば、ここにおける「位置28」なる言及は、配列番号:1の第一のアミノ酸が欠失しているグルカゴン類似体に対する対応する位置27を意味する。同様に、ここにおける「位置28」なる言及は、配列番号:1のN-末端の前に1個のアミノ酸が付加されているグルカゴン類似体に対する対応する位置29を意味する。ここで使用するような「アミノ酸修飾」とは、(i)配列番号:1のアミノ酸の、異なるアミノ酸(天然産またはコード化されたまたは非-コード化または非-天然産のアミノ酸)による置換または置換え、(ii)配列番号:1に対するアミノ酸(天然産またはコード化されたまたは非-コード化または非-天然産のアミノ酸)の付加または(iii)配列番号:1の1またはそれ以上のアミノ酸の欠失を意味する。

【００２０】

2つのアミノ酸配列に係る「%同一性(percent identity)」とは、これら2つの配列を、最大の対応性を達成するように整列(例えば、最適のアライメントを得るためにギャップを導入することができる)させた場合に、第2の基準配列の長さで割った、第一の配列の、該第二の基準配列におけるアミノ酸に適合する(同一である)アミノ酸の数を意味する。

【００２１】

アミノ酸「修飾(変性)(modification)」とは、挿入、欠失または1個のアミノ酸のもう一つのアミノ酸による置換を意味する。幾つかの態様において、該アミノ酸の置換または置換えは、保存的アミノ酸置換、例えば位置2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28または29の1またはそれ以上におけるアミノ酸の保存的置換である。ここで使用する用語「保存的アミノ酸置換」とは、1個のアミノ酸の、これと同様

な性質、例えばサイズ、電荷、疎水性、親水性、および/または芳香族性等を持つもう一つのアミノ酸による置換えであり、また以下の5つの群の一つ内での交換を含む：
I．小さな脂肪族、非-極性または僅かに極性の残基：Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；
II．極性の負に帯電した残基およびそのアミドおよびエステル：Asp、Asn、Glu、Gln、システイン酸およびホモシステイン酸；
III．極性の正に帯電した残基：His、Arg、Lys、オルニチン(Orn)；
IV．大きな脂肪族非-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。

【００２２】
幾つかの態様において、前記アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換ではなく、例えば非-保存的アミノ酸置換である。

【００２３】
ここで使用する用語「帯電(した)アミノ酸」または「帯電残基」とは、生理的pHにおいて水性溶液中で負に帯電した(即ち、脱-プロトン化された)または正に帯電した(即ち、プロトン化された)側鎖を含むアミノ酸を意味する。例えば、負に帯電したアミノ酸はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、およびホモグルタミン酸を含み、一方で正に帯電したアミノ酸はアルギニン、リジンおよびヒスチジンを含む。帯電したアミノ酸は、コード化された20個のアミノ酸の中の帯電アミノ酸並びに非-定型または非-天然産または非-コード化アミノ酸を含む。

【００２４】
ここで使用する用語「酸性アミノ酸」とは、第二の酸性部分(該アミノ酸のカルボン酸基以外の)を含むアミノ酸を意味し、例えば該第二の酸性部分は、カルボン酸基またはスルホン酸基を含む。

【００２５】
ここで使用する用語「アシル化アミノ酸」とは、天然産のアミノ酸にとって固有のものではないアシル基を含むアミノ酸を意味し、該アシル化アミノ酸が製造された手段(例えば、ペプチド内に該アミノ酸を導入する前のアシル化、またはペプチド内に導入した後のアシル化)とは無関係である。

【００２６】
ここで使用する用語「アルキル化アミノ酸」とは、天然産のアミノ酸にとって固有のものではないアルキル基を含むアミノ酸を意味し、該アミノ酸を製造した手段とは無関係である。従って、本開示による該アシル化アミノ酸およびアルキル化アミノ酸は、非-コード化アミノ酸である。

【００２７】
ここで使用する、ある分子の第二のレセプタに相対的な第一のレセプタに対する「選択性」なる用語は以下の比を意味する：該第一のレセプタにおける該分子のEC50で割った、該第二のレセプタにおける該分子のEC50。例えば、1 nMなる第一のレセプタにおけるEC50および100nMなる第二のレセプタにおけるEC50を持つ分子は、該第二のレセプタに相対的に、該第一のレセプタに対して100-倍の選択性を持つ。

【００２８】
ここで使用する用語「自然(未修飾)のグルカゴン」とは、配列番号:1の配列からなるペプチドを意味し、また前記用語「自然(未修飾)のGLP-1」とは、GLP-1（7-36）アミド、GLP-1(7-37)酸またはこれら2つの化合物の混合物を示す包括的な用語である。

【００２９】
ここで使用する、ある分子の「グルカゴン力価(効力)」または「自然のグルカゴンと比較した力価(効力)」とは、グルカゴンレセプタにおける自然なグルカゴンのEC50で割った、該グルカゴンレセプタにおける該分子のEC50の反比を意味する。

【００３０】
ここで使用する、ある分子の「GLP-1の力価(効力)」または「自然のGLP-1と比較した力

価(効力)」とは、GLP-1レセプタにおける自然なGLP-1のEC50で割った、該GLP-1レセプタにおける該分子のEC50の反比を意味する。

【００３１】

態様

本開示は、GLP-1レセプタ、グルカゴンレセプタ、またはこれらGLP-1レセプタおよびグルカゴンレセプタ両者において活性を呈する、ペプチドおよび変異ペプチドを提供する。この点に関連して、本開示は、GLP-1レセプタアゴニストペプチド、グルカゴンレセプタアゴニストペプチド、およびGLP-1/グルカゴンレセプタコアゴニストペプチドを提供する。例示的な態様において、ここに開示されるペプチドおよび変異ペプチドは、自然なヒトグルカゴン(配列番号:1)と比較して、該GLP-1レセプタにおける増強された活性またはより高い力価を示す。例示的な態様において、本開示に係るペプチドおよび変異ペプチドは、自然なヒトGLP-1(配列番号:2)またはその活性形(配列番号:5および6)の一つと比較して、上記GLP-1レセプタにおいてより高い力価を示す。例示的な態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、自然なヒトGLP-1に比して、該グルカゴンレセプタにおいてより高い力価を示す。例示的な態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、自然なヒトグルカゴンに比して、該グルカゴンレセプタにおいてより高い力価を示す。

【００３２】

例示的な態様において、本明細書に記載するペプチドおよび変異ペプチドは、自然のグルカゴンまたは自然のGLP-1に対して、諸特性におけるその他の改善、例えばより高い安定性、より高い溶解性、循環の際の延長された半減期、作用の遅延された発現、延長された作用期間、減衰されたピーク(例えば、比較的低い平均ピーク血漿濃度)、およびDPP-IV等のプロテアーゼに対する改善された抵抗性等を示す。

【００３３】

本明細書に記載する前記ペプチドおよび変異ペプチドは、自然のヒトグルカゴンのアミノ酸配列(配列番号:1)を基本とするものであり、また「ペプチド」、「変異ペプチド」、「グルカゴン類似体」、「類似体」、または「グルカゴンペプチド」としてここに記載されるものである。「類似体」または「変異体」または「修飾体」等の用語は、デノボ(de novo)で合成されたペプチドまたはタンパク質を包含し、また任意の特別な修飾段階の実施を必要としない。幾つかの局面において、本明細書に記載されるペプチドおよび変異ペプチドは、配列番号:1に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15のアミノ酸修飾を含む、また幾つかの例においては、本発明において更に説明されるように、16またはそれ以上(例えば、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26)のアミノ酸修飾を含む、配列番号:1の修飾アミノ酸配列を含有する。従って、グルカゴン類似体および/またはグルカゴンペプチドに係る以下の説明は、自然のヒトグルカゴン(配列番号:1)と本開示によるペプチドまたは変異ペプチドとの間の類似性の程度とは無関係に、ここに開示されるペプチドおよび変異ペプチドの全てに対して当てはまる。

【００３４】

ここに記載される任意のペプチド配列は、追加のアミノ酸修飾を組入れることにより、例えばここに記載される任意の修飾を、例えばここに記載の位置に含めることにより、あるいは保存的置換を組入れることにより、あるいは該当位置において自然なグルカゴンアミノ酸(配列番号:1)に戻すことによって、更に変更することができる。例示的態様において、該修飾は、例えばアシル化、アルキル化、ペグ化、C-末端における切捨て、位置：1、2、3、7、10、12、15、16、17、18、19、20、21、23、24、27、28および29の1またはそれ以上におけるそのアミノ酸の置換等を含む。例えば、ここに開示される任意のペプチド配列は、ペグ化の目的でCysを含み、変異ペプチドは、ペグ化のために異なるアミノ酸を使用し得る。もう一つの例として、変異ペプチドは、異なる位置でペグ化することができる(例えば、既存のCysを異なるアミノ酸で置換し、提案されたペグ化位置に新たなCysを挿入し、また該新たなCysをペグ化する)。更に別の例として、ここに開示される任意のペプチド配列が、アシル化のためにLysを含む場合、該Lysを、異なる位置に移動し、またその新たな位置をアシル化することができる。ここに記載する態様に何れかにおいて、該変

異ペプチドは、その親ペプチドの長さ全体に渡り、あるいは該親ペプチドのアミノ酸1-29(例えば、該親ペプチドに比して、1、2、3、4または5箇所の追加の修飾を組入れることができる)に渡り、該親ペプチドに対して例えば80%、85%、90%または95%同一であり得る。

【００３５】

ここに開示される任意のペプチド配列の複合体、融合タンパク質およびマルチマーも、本発明において意図されている。

【００３６】

ペプチドおよび変異ペプチドの活性

前記グルカゴンレセプタにおけるアゴニスト活性

例示的な態様において、本開示に係るペプチドおよび変異ペプチドは、約1,000μMまたはそれ未満(例えば、約750μMまたはそれ未満、約500μMまたはそれ未満、約250μMまたはそれ未満、約100μMまたはそれ未満、約75μMまたはそれ未満、約50μMまたはそれ未満、約25μMまたはそれ未満、約10μMまたはそれ未満、約5μMまたはそれ未満、約1μMまたはそれ未満)の、前記グルカゴンレセプタにおけるEC50を示す。例示的な態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、ナノモル(nM)範囲にあるグルカゴンレセプタ活性化に対するEC50を示す。例えば、ここに開示されるペプチドおよび変異ペプチドは、約1,000nMまたはそれ未満(例えば、約750nMまたはそれ未満、約500nMまたはそれ未満、約250nMまたはそれ未満、約100nMまたはそれ未満、約75nMまたはそれ未満、約50nMまたはそれ未満、約25nMまたはそれ未満、約10nMまたはそれ未満、約5nMまたはそれ未満、約1nMまたはそれ未満)なる、該グルカゴンレセプタにおけるEC50値を示す。例示的な態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、ピコモル(pM)範囲にある、該グルカゴンレセプタにおけるEC50値を示す。従って、例示的な局面において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、約1,000pMまたはそれ未満(例えば、約750pMまたはそれ未満、約500pMまたはそれ未満、約250pMまたはそれ未満、約100pMまたはそれ未満、約75pMまたはそれ未満、約50pMまたはそれ未満、約25pMまたはそれ未満、約10pMまたはそれ未満、約5pMまたはそれ未満、約1pMまたはそれ未満)なるグルカゴンレセプタ活性化に対するEC50値を示す。より低いEC50値が、該レセプタにおけるより高い活性または力価を表していることが理解される。

【００３７】

幾つかの態様において、ここに記載されるグルカゴン類似体は、約0.001pMまたはそれを越える、約0.01pMまたはそれを越える、または約0.1pMまたはそれを越える、該グルカゴンレセプタにおけるEC50値を示す。グルカゴンレセプタの活性化(グルカゴンレセプタ活性)は、インビトロアッセイによって、該グルカゴンレセプタを過剰発現するHEK293細胞におけるcAMP誘発を測定することにより、例えば以下の実施例2において説明されるように、該グルカゴンレセプタおよびcAMP応答性要素に結合したルシフェラーゼ遺伝子をコードするDNAにより同時導入されたHEK293細胞をアッセイすることにより測定することができる。

【００３８】

例示的な態様において、ここで開示されるペプチドおよび変異ペプチドは、約0.001%またはそれを越える、約0.01%またはそれを越える、約0.1%またはそれを越える、約0.5%またはそれを越える、約1%またはそれを越える、約5%またはそれを越える、約10%またはそれを越える、約20%またはそれを越える、約30%またはそれを越える、約40%またはそれを越える、約50%またはそれを越える、約60%またはそれを越える、約75%またはそれを越える、約100%またはそれを越える、約125%またはそれを越える、約150%またはそれを越える、約175%またはそれを越える、約200%またはそれを越える、約250%またはそれを越える、約300%またはそれを越える、約350%またはそれを越える、約400%またはそれを越える、約450%またはそれを越える、または約500%またはそれを越える、自然のグルカゴンに相対的に、上記グルカゴンレセプタにおける活性(グルカゴン力価)を示す。幾つかの態様において、ここに記載されるペプチドおよび変異ペプチドは、約5,000%またはそれ未満または約10,000%またはそれ未満の、自然のグルカゴンに相対的な、上記グルカゴンレセプタにおける活性を示す。あるレセプタにおける、該レセプタの自然なリガンドに対する、グルカ

ゴン類似体の活性は、該自然なリガンドのEC50に対する該グルカゴン類似体のEC50の反比として計算される。

【００３９】

幾つかの態様において、前記ペプチドおよび変異ペプチドは、前記グルカゴンレセプタにおいてのみ実質的な活性(力価)を示し、かつ前記GLP-1レセプタにおいては、僅か乃至殆ど活性を示さない。従って、幾つかの態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、「純粋なグルカゴンレセプタアゴニスト」であると考えられ、あるいは「グルカゴン/GLP-1レセプタコアゴニスト」であるとは考えられない。幾つかの態様において、これらのペプチドおよび変異ペプチドは、ここに記載したグルカゴンレセプタにおいて任意のレベルの活性または力価を示すが、該GLP-1レセプタにおいて実質的にほんの僅かな活性(力価)を有する。幾つかの態様において、上記グルカゴン類似体は、該GLP-1レセプタにおいてあるEC50を示し、そのEC50値は該グルカゴンレセプタにおけるEC50よりも100-倍またはそれ以上高い。

【００４０】

前記GLP-1レセプタにおけるアゴニスト活性

例示的な態様において、前記ペプチドおよび変異ペプチドは、約1,000μMまたはそれ未満(例えば、約750μMまたはそれ未満、約500μMまたはそれ未満、約250μMまたはそれ未満、約100μMまたはそれ未満、約75μMまたはそれ未満、約50μMまたはそれ未満、約25μMまたはそれ未満、約10μMまたはそれ未満、約5μMまたはそれ未満、約1μMまたはそれ未満)の、GLP-1レセプタ活性化に対するEC50を示す。例示的な態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、約1,000nMまたはそれ未満(例えば、約750nMまたはそれ未満、約500nMまたはそれ未満、約250nMまたはそれ未満、約100nMまたはそれ未満、約75nMまたはそれ未満、約50nMまたはそれ未満、約25nMまたはそれ未満、約10nMまたはそれ未満、約5nMまたはそれ未満、約1nMまたはそれ未満)なる、GLP-1レセプタ活性化に対するEC50値を示す。例示的な態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、ピコモル(pM)範囲にある、該GLP-1レセプタにおけるEC50値を持つ。従って、幾つかの態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、約1,000pMまたはそれ未満(例えば、約750pMまたはそれ未満、約500pMまたはそれ未満、約250pMまたはそれ未満、約100pMまたはそれ未満、約75pMまたはそれ未満、約50pMまたはそれ未満、約25pMまたはそれ未満、約10pMまたはそれ未満、約5pMまたはそれ未満、約1pMまたはそれ未満)なるGLP-1レセプタ活性化に対するEC50値を示す。より低いEC50値が、該レセプタにおけるより高い活性または力価を表していることが理解される。

【００４１】

幾つかの態様において、ここに記載される前記ペプチドおよび変異ペプチドは、約0.001pMまたはそれを越える、約0.01pMまたはそれを越える、または約0.1pMまたはそれを越える、前記GLP-1レセプタにおけるEC50値を示す。GLP-1レセプタの活性化(GLP-1レセプタ活性)は、インビトロアッセイによって、該GLP-1レセプタを過剰発現するHEK293細胞におけるcAMP誘発を測定することにより、例えば以下の実施例2において説明されるように、該GLP-1レセプタおよびcAMP応答性要素に結合したルシフェラーゼ遺伝子をコードするDNAにより同時導入されたHEK293細胞をアッセイすることにより測定することができる。

【００４２】

例示的な態様において、ここで開示するペプチドおよび変異ペプチドは、約0.001%またはそれを越える、約0.01%またはそれを越える、約0.1%またはそれを越える、約0.5%またはそれを越える、約1%またはそれを越える、約5%またはそれを越える、約10%またはそれを越える、約20%またはそれを越える、約30%またはそれを越える、約40%またはそれを越える、約50%またはそれを越える、約60%またはそれを越える、約75%またはそれを越える、約100%またはそれを越える、約125%またはそれを越える、約150%またはそれを越える、約175%またはそれを越える、約200%またはそれを越える、約250%またはそれを越える、約300%またはそれを越える、約350%またはそれを越える、約400%またはそれを越える、約450%またはそれを越える、または約500%またはそれを越える、自然のGLP-1に相対的に、上

記GLP-1レセプタにおけるより高い活性(GLP-1力価)を示す。幾つかの態様において、ここに記載されるペプチドおよび変異ペプチドは、約5,000%またはそれ未満または約10,000%またはそれ未満の、自然のGLP-1に相対的な、上記GLP-1レセプタにおけるより低い活性(GLP-1力価)を示す。

【００４３】

幾つかの態様において、前記ペプチドおよび変異ペプチドは、前記GLP-1レセプタにおいてのみ実質的な活性(力価)を示し、かつ前記グルカゴンレセプタにおいては、僅か乃至殆ど活性を示さない。幾つかの態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、「純粋なGLP-1レセプタアゴニスト」であると考えられ、あるいは「グルカゴン/GLP-1レセプタコアゴニスト」であるとは考えられない。幾つかの態様において、これらのペプチドおよび変異ペプチドは、ここに記載したGLP-1レセプタにおいて任意のレベルの活性または力価を示すが、該グルカゴンレセプタにおいては実質的にほんの僅かな活性(力価)しか持たない。幾つかの態様において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、該グルカゴンレセプタにおいてあるEC50を示し、この値は、該GLP-1レセプタにおけるEC50値よりも100-倍またはそれ以上である。

【００４４】

前記GLP-1レセプタおよびグルカゴンレセプタにおけるアゴニスト活性

例示的な態様において、前記ペプチドおよび変異ペプチドは、前記GLP-1レセプタおよびグルカゴンレセプタ両者において活性を示し、また「グルカゴン/GLP-1レセプタコアゴニスト」であると考えることができる。例示的な態様において、該グルカゴンレセプタにおける該ペプチドおよび変異ペプチドの活性(例えば、前記EC50または相対的活性または力価)は、該GLP-1レセプタにおけるその活性(例えば、該EC50または相対的活性または力価)とは約50-倍、約40-倍、約30-倍、約20-倍、約10-倍または約5-倍以内で異なっている(より高いまたはより低い)。例示的局面において、該ペプチドまたは変異ペプチドの前記グルカゴン力価は、そのGLP-1力価とは、約25-倍、約20-倍、約15-倍、約10-倍、または約5-倍以内で異なっている(より高いまたはより低い)。例示的局面において、該ペプチドまたは変異ペプチドの該グルカゴン力価は、そのGLP-1力価とは、約25-倍、約20-倍、約15-倍、約10-倍、または約5-倍以内で低い。

【００４５】

例示的な態様において、前記コアゴニストは、前記GLP-1レセプタにおけるその力価において、前記グルカゴンレセプタとほぼ等価であるか、これよりも相対的に高い。例えば、該GLP-1レセプタにおける前記ペプチドまたは変異ペプチドの前記相対的活性またはEC50または力価で割った、該グルカゴンレセプタにおける該ペプチドまたは変異ペプチドの該相対的活性またはEC50または力価の比は、X未満またはほぼXであり、ここでXは100、75、60、50、40、30、20、15、10、または5から選択される。例示的な態様において、該GLP-1レセプタにおける該ペプチドまたは変異ペプチドの該EC50または力価または相対的活性で割った、該グルカゴンレセプタにおける該ペプチドまたは変異ペプチドの該EC50または力価または相対的活性の比は、約1かつ約5未満(例えば、約4、約3、約2、約1)である。例示的な態様において、該グルカゴンレセプタにおける該ペプチドまたは変異ペプチドの該EC50または力価または相対的活性で割った、該GLP-1レセプタにおける該ペプチドまたは変異ペプチドの該EC50または力価または相対的活性の比は、5未満(例えば、約4、約3、約2、約1)である。例示的な態様において、該ペプチドまたは変異ペプチドの該GLP-1力価と比較した、該ペプチドまたは変異ペプチドの該グルカゴン力価の比は、Y未満またはほぼYであり、ここでYは100、75、60、50、40、30、20、15、10、および5から選択される。例示的な態様において、該ペプチドまたは変異ペプチドの該GLP-1力価と比較した、該ペプチドまたは変異ペプチドの該グルカゴン力価の比は、5未満(例えば、約4、約3、約2、約1)である。幾つかの態様において、グルカゴン類似体は、該グルカゴンレセプタにおいてあるEC50値を有し、該EC50値は、該GLP-1レセプタにおけるEC50値よりも、2-倍～10-倍(例えば、2-倍、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍、10-倍)大きな値である。

【００４６】

例示的な態様において、前記ペプチドは主としてグルカゴンアゴニストであり、またその力価において、前記GLP-1レセプタにおけるよりも前記グルカゴンレセプタにおいて相対的により高い(例えば、該ペプチドは、その力価において、該GLP-1レセプタにおけるよりも、該グルカゴンレセプタにおいて5-倍またはそれ以上高い)。例えば、該グルカゴンレセプタにおける該ペプチドまたは変異ペプチドの該相対的活性または力価またはEC50で割った、該GLP-1レセプタにおける該ペプチドまたは変異ペプチドの該相対的活性または力価またはEC50の比は、V未満またはほぼVであり、ここで該Vの値は100、75、60、50、40、30、20、15、10、または5から選択される。幾つかの態様において、該ペプチドまたは変異ペプチドの該グルカゴン力価と比較した、該ペプチドまたは変異ペプチドの該GLP-1力価の比は、W未満またはほぼWであり、ここでWは100、75、60、50、40、30、20、15、10、または5から選択される。幾つかの態様において、該ペプチドまたは変異ペプチドは、少なくとも0.1%(例えば、約0.5%またはこれを越える、約1%またはこれを越える、約5%またはこれを越える、約10%またはこれを越える、あるいはそれ以上)の、該GLP-1レセプタにおける自然なGLP-1の活性(GLP-1力価)を示し、また少なくとも0.1%(例えば、約0.5%またはこれを越える、約1%またはこれを越える、約5%またはこれを越える、約10%またはこれを越える、あるいはそれ以上)の、該グルカゴンレセプタにおける自然なグルカゴンの活性(グルカゴン力価)を示す。

【００４７】

GIPレセプタにおける活性

前記グルカゴンレセプタおよび/または前記GLP-1レセプタにおいて活性であることに加えて、ここに記載されるペプチドおよび変異ペプチドは、幾つかの局面において、GIPレセプタにおける低いアゴニスト活性を呈する。このような局面において、好ましくはかかるペプチドおよび変異ペプチドは、該GIPレセプタに対して、該GLP-1レセプタに対する選択性は、少なくとも100-倍である。

【００４８】

しかし、他の局面において、前記ペプチドおよび変異ペプチドは、前記GIPレセプタにおけるかなりの活性を呈し、例えば該GIPレセプタにおける該類似体のEC50値は、前記GLP-1レセプタにおけるEC50値とは約50-倍未満異なっており、場合により、該類似体のGIP力価は、該類似体のGLP-1力価の約50-倍以内にある。例示的な態様において、該ペプチドは約1μMまたはそれ未満、または100nMまたはそれ未満、または約75、50、25、10、8、6、5、4、3、2、または1nMまたはそれ未満のGIPレセプタ活性化活性に対するEC50値を示す。より低いEC50値が、該レセプタにおけるより高い活性または力価を表すものであることが理解される。幾つかの態様において、ここに記載するペプチドおよび変異ペプチドは約0.001nM、または0.01nM、または0.1nMなる該GIPレセプタにおけるEC50値を示す。幾つかの態様において、ここに記載したペプチドおよび変異ペプチドは、約100nM以下の、該GIPレセプタにおけるEC50値を呈する。レセプタの活性化は、インビトロアッセイによって、該レセプタを過剰発現するHEK293細胞におけるcAMP誘発を測定することにより、例えば以下の実施例2において説明されるように、該レセプタおよびcAMP応答性要素に結合したルシフェラーゼ遺伝子をコードするDNAにより同時導入されたHEK293細胞をアッセイすることにより測定することができる。

【００４９】

幾つかの態様において、ここにおいて開示されたペプチドおよび変異ペプチドは、少なくとも約0.1%、1%、10%、50%、100%、150%、または200%またはそれ以上の、自然のGIPに相対的な該GIPレセプタにおける高い活性(GIP力価)を呈する。幾つかの態様において、ここにおいて開示されたペプチドおよび変異ペプチドは、自然のGIPに相対的な該GIPレセプタにおける、1,000%、10,000%、100,000%、1,000,000%以上の高い活性を示す。あるレセプタにおける、該レセプタの自然のリガンドに相対的なグルカゴンペプチドの活性(力価)は、該自然のリガンドに対する該ペプチドに対するEC50値の反比として計算される。

【００５０】

即ち、本開示の一局面は、前記グルカゴンレセプタおよび前記GIPレセプタ両者におけ

る活性を呈する、ペプチドおよび変異ペプチド(「グルカゴン/GIPコ-アゴニスト」)を提供する。幾つかの態様において、該GIPレセプタにおける該ペプチドのEC50値は、該グルカゴンレセプタにおけるそのEC50値とは、約50-倍、40-倍、30-倍または20-倍未満異なっている(より高いまたはより低い)。幾つかの態様においては、該ペプチドのGIP力価は、そのグルカゴン力価とは、約500-倍、450-倍、400-倍、350-倍、300-倍、250-倍、200-倍、150-倍、100-倍、75-倍、50-倍、25-倍、20-倍、15-倍、10-倍、または5-倍未満異なっている(より高いまたはより低い)。幾つかの態様において、GLP-1活性は、例えば位置7におけるアミノ酸修飾、位置27または28におけるアミノ酸に対する、アミノ酸C-末端の欠失、またはこれらの組合せにより、著しく減じられまたは破壊されている。

【００５１】

本開示のもう一つの局面において、本開示に係るペプチドおよび変異ペプチドは、前記GLP-1およびGIPレセプタにおける活性を示すが、前記グルカゴンレセプタにおける有意な活性を示さない(「GIP/GLP-1コ-アゴニスト」)が、これは、例えば位置3におけるGlnのアミノ酸修飾によるものである。例えば、この位置における酸性、塩基性、または疎水性アミノ酸(グルタミン酸、オルニチン、ノルロイシン)による置換は、グルカゴン活性を低下する。他の局面において、該ペプチドおよび変異ペプチドは、該グルカゴン、GIPおよびGLP-1レセプタ各々において活性を示す(「グルカゴン/GIP/GLP-1トリ-アゴニスト」)。例えば、これら後者の局面の何れかにおいて、該GIPレセプタにおける該ペプチドのEC50値は、該GLP-1レセプタにおけるそのEC50値とは、約50-倍、40-倍、30-倍、20-倍未満異なっている(より高くまたはより低い)。幾つかの態様において、該ペプチドのGIP力価は、そのGLP-1力価とは、約25-倍、20-倍、15-倍、10-倍または5-倍未満異なっている(より高くまたはより低い)。幾つかの態様において、これらペプチドは、該グルカゴンレセプタにおける自然のグルカゴンの活性の約10%またはそれ未満なる活性を有し、該活性は、例えば約1～10%なる範囲、または約0.1～10%なる範囲、または約0.1%を越え、かつ約10%未満である。

【００５２】

複合体の活性

幾つかの態様において、ここに記載するペプチドおよび変異ペプチドは、上述の如く、前記グルカゴンレセプタにおける活性または力価を示しおよび/または該GLP-1レセプタにおける活性および/または前記GIPレセプタにおける活性を示し、また該ペプチドまたは変異ペプチドが、複合体の一部である場合(例えば、該ペプチドが親水性部分、例えばポリエチレングリコール等のヘテロロガス部分と複合化されている場合)、該ペプチドまたは変異ペプチドは、これが該複合体の一部ではない場合よりも低い活性(即ち、より低い力価またはより高いEC50)を示す。幾つかの態様において、該ペプチドまたは変異ペプチドが複合体の一部ではない場合、該ペプチドは、該グルカゴンレセプタおよび/または該GLP-1レセプタにおける力価を示し、該力価は、該ペプチドまたは変異ペプチドが複合体の一部である場合の、該ペプチドの力価の約10-倍またはそれ以上の高い値である。幾つかの局面において、該ペプチドまたは変異ペプチドは、これが複合化されていない場合には、該グルカゴンレセプタおよび/または該GLP-1レセプタにおけるある力価を示し、該力価は、複合化されている場合の該ペプチドまたは変異ペプチドの力価の約10-倍、約15-倍、約20-倍、約25-倍、約30-倍、約35-倍、約40-倍、約45-倍、約50-倍、約100-倍または更にはこれに高い値である。

【００５３】

グルカゴン類似体の構造

【００５４】

アシル化

幾つかの態様によれば、前記グルカゴン類似体は、アシル化されたアミノ酸(例えば、コード化されていないアシル化アミノ酸(例えば、天然産のアミノ酸に対して自然状態にないアシル基を含むアミノ酸))を含む。幾つかの態様における該アシル化アミノ酸は、該グルカゴン類似体が以下の(i)～(v)の1またはそれ以上を持つことを可能とする：(i) 循

環中の延長された半減期；(ii) 作用の遅延された発現；(iii) 延長された作用期間；(iv) プロテアーゼ、例えばDPP-IVに対する改善された抵抗性、および(v) 前記GLP-1およびグルカゴンレセプタの一方または両者における高い力価。本明細書において示されるように、アシル化グルカゴン類似体は、対応するアシル化されていないグルカゴン類似体に比して、前記グルカゴンおよびGLP-1レセプタにおける低下された活性を示すことはない。寧ろ、幾つかの例においては、実際にアシル化グルカゴン類似体は、該GLP-1およびグルカゴンレセプタにおける高い活性を示す。従って、該アシル化グルカゴン類似体の力価は、増強されないとしても、該グルカゴン類似体の非-アシル化型の値に匹敵するものである。

【００５５】

一態様によれば、前記グルカゴン類似体は、エステル、チオエステルまたはアミド結合を介して該グルカゴン類似体に結合しているアシル基を含み、該アシル基の存在は、循環の際の半減期を延長しおよび/またはその作用発現の遅延および/または作用期間の延長および/またはプロテアーゼ、例えばDPP-IVに対する抵抗性の改善を目的とする。

【００５６】

アシル化は、位置1-29の何れか、C-末端から29番目のアミノ酸の位置(例えば、位置30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47等、C-末端拡張部内または該C-末端における位置)を含む、該グルカゴン類似体内の任意の位置において行うことができるが、グルカゴンおよび/またはGLP-1活性が、増強されないまでも保持されることを条件とする。その非-限定的な例は、位置5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28または29を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は、9、10、12、16および20からなる群から選択される1またはそれ以上の位置においてアシル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は10、12および16からなる群から選択される1またはそれ以上の位置においてアシル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は9、10、12、16および20からなる群から選択される1またはそれ以上の位置においてアシル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は10および12の1またはそれ以上の位置においてアシル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は位置12においてアシル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は9、10、12、16、20および37-43(例えば、40)からなる群から選択される1またはそれ以上の位置においてC-末端拡張およびアシル化アミノ酸を含む。特別な態様において、アシル化は、該グルカゴン類似体の位置10において起り、また該グルカゴン類似体は、分子内架橋、例えば共有結合性分子内架橋(例えば、ラクタムブリッジ)を欠いている。分子内架橋を欠くこのようなアシル化グルカゴン類似体は、共有結合性分子内架橋を欠く対応する非-アシル化類似体と比較して、また分子内架橋を欠いており、位置10以外の位置においてアシル化されている対応する類似体に比して、上記GLP-1およびグルカゴンレセプタにおける増強された活性を持つことが明白である。本明細書において示した如く、位置10におけるアシル化は、殆どグルカゴンレセプタにおける活性を持たないグルカゴン類似体の、該グルカゴンおよびGLP-1レセプタ両者における活性を持つグルカゴン類似体への変換をも可能とする。従って、アシル化の起る該位置は、該グルカゴン類似体の全体としての活性プロフィールを変更し得る。

【００５７】

幾つかの態様における前記グルカゴン類似体は、親水性部分が結合されている場合には、同一のアミノ酸位置において、あるいは異なるアミノ酸位置においてアシル化される。非-限定的な例は、位置10におけるアシル化および該グルカゴン類似体のC-末端位置における1またはそれ以上の位置における、例えばC-末端拡張部内の、または該C-末端における位置24、28または29(例えば、C-末端Cysを付加することにより)におけるペグ化を含む。

【００５８】

前記アシル基は、前記グルカゴン類似体のアミノ酸に対して直接、またはスペーサを介

して該グルカゴン類似体のアミノ酸に対して間接的に共有結合によって結合することができ、ここにおいて該スペーサは、該グルカゴン類似体のアミノ酸と該アシル基との間に位置する。

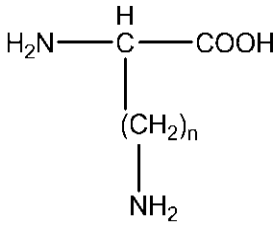
【００５９】

特別な局面においては、前記グルカゴン類似体は、該グルカゴン類似体アミノ酸の側鎖のアミノ基、ヒドロキシル基またはチオール基の直接的なアシル化により、アシル基を含むように修飾される。幾つかの態様において、アシル化の位置は、該グルカゴン類似体の位置10、20、24または29である。この点に関連して、該アシル化グルカゴン類似体は、配列番号:1のアミノ酸配列、またはここに記載した1またはそれ以上のアミノ酸修飾を含む、該アミノ酸配列の修飾されたアミノ酸配列を含むことができ、ここで該修飾において、該類似体の位置10、20、24および29におけるアミノ酸の少なくとも一つが、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオールを含む任意のアミノ酸へと修飾される。幾つかの特別な態様において、該グルカゴン類似体の直接的なアシル化は、位置10におけるアミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオールを介して起る。

幾つかの態様において、側鎖アミンを含む前記アミノ酸は、以下の式Iで表されるアミノ酸である：

【００６０】

【化１】



[式I]

【００６１】

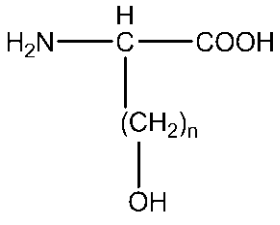
ここでn=1～4である。

幾つかの例示的な態様において、前記式Iのアミノ酸は、n-が4(Lys)またはnが3(0rn)のアミノ酸である。

他の態様において、側鎖ヒドロキシル基を含むアミノ酸は、以下の式IIで表されるアミノ酸である：

【００６２】

【化２】



[式II]

【００６３】

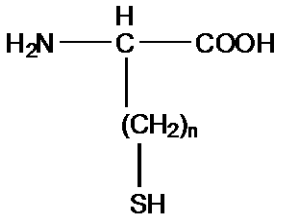
ここで、n=1～4である。

幾つかの例示的な態様において、前記式IIのアミノ酸は、nが1であるアミノ酸(Ser)である。

更に別の態様において、側鎖チオール基を含むアミノ酸は、以下の式IIIで表されるアミノ酸である：

【００６４】

【化３】



[式III]

【００６５】

ここで、n=1～4である。

幾つかの例示的な態様において、前記式IIIのアミノ酸は、nが1であるアミノ酸(Cys)である。

更に他の態様において、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含む前記アミノ酸は、前記式I、式IIまたは式IIIと同一の構造を含むジ-置換アミノ酸であるが、該式I、式IIまたは式IIIで表されるアミノ酸のα-炭素に結合した水素原子は、第二の側鎖によって置換される。

幾つかの態様において、前記アシル化グルカゴンは、該類似体と該アシル基との間にスペーサを含む。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、該スペーサに対して共有結合しており、また該スペーサは、該アシル基に共有結合している。

【００６６】

幾つかの態様において、前記スペーサは、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含むアミノ酸、または側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含むアミノ酸を含有するジペプチドまたはトリペプチドである。該スペーサが結合している該アミノ酸は、該スペーサに対する結合を可能とする部分を含むあらゆるアミノ酸(例えば、一または二重にα-置換されたアミノ酸)であり得る。例えば、側鎖NH_2, -OH、または-COOH(例えば、Lys、Orn、Ser、AspまたはGlu)を含むアミノ酸が適している。この点に関して、前記アシル化グルカゴン類似体は、配列番号:1のアミノ酸配列、または1またはそれ以上のここに記載したアミノ酸修飾を含む該配列の修飾アミノ酸配列を含むことができ、後者の修飾においては、位置10、20、24および29における少なくとも一つのアミノ酸が、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはカルボキシレートを含む任意のアミノ酸へと修飾される。

幾つかの態様において、前記スペーサは、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含むアミノ酸；または側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含むアミノ酸を含有するジペプチドまたはトリペプチドである。

【００６７】

アシル化が、スペーサのアミノ基を介して起る場合、該アシル化は、該アミノ酸のα-アミンまたは側鎖アミンを介して起り得る。該α-アミンがアシル化されるこの例において、該スペーサのアミノ酸は、任意のアミノ酸であり得る。例えば、該スペーサのアミノ酸は、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-アミノバレリアン酸、7-アミノヘプタン酸、および8-アミノオクタン酸であり得る。あるいはまた、該スペーサのアミノ酸は酸性残基、例えばAsp、Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、システイン酸、γ-グルタミン酸であり得る。

【００６８】

前記スペーサのアミノ酸の前記側鎖アミンがアシル化されている例において、該スペーサのアミノ酸は、側鎖アミンを含むアミノ酸、例えば上記式Iで示されるアミノ酸(例えば、LysまたはOrn)である。この例においては、前記α-アミンおよびアシル化すべき該スペーサのアミノ酸の側鎖アミン両者に関して、前記グルカゴン類似体をジアシル化することが可能である。本発明の様々な態様は、このようなジアシル化分子を含む。

【００６９】

アシル化がスペーサのヒドロキシル基を介して起る場合、前記アミノ酸または前記ジペプチドまたはトリペプチドのアミノ酸の一つは、上記式IIのアミノ酸であり得る。一特定の例示的な態様において、該アミノ酸はSerである。

【００７０】
アシル化がスペーサのチオール基を介して起る場合、前記アミノ酸または前記ジペプチドまたはトリペプチドのアミノ酸の一つは、上記式IIIのアミノ酸であり得る。一特定の例示的な態様において、該アミノ酸はCysである。
【００７１】
幾つかの態様において、前記スペーサは、親水性二官能性スペーサである。幾つかの態様において、該親水性二官能性スペーサは、2またはそれ以上の反応性の基、例えばアミン、ヒドロキシルまたはチオールおよびカルボキシル基、または任意のこれらの組合せを含む。幾つかの態様において、該親水性二官能性スペーサは、ヒドロキシル基およびカルボキシレート基を含む。他の態様において、該親水性二官能性スペーサは、アミノ基およびカルボキシレート基を含む。他の態様において、該親水性二官能性スペーサは、チオール基およびカルボキシレートを含む。特定の一態様において、該スペーサはアミノポリ(アルキルオキシ)カルボキシレート基を含む。この点に関して、該スペーサは、例えば$NH_2(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mCOOH$を含むことができ、該式においてmは1～6なる範囲の任意の整数であり、またnは2～12なる範囲の任意の整数であり、該化合物は、例えば8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸であり、これはペプチドインターナショナル社(Peptides International, Inc.)(KY, ルイスビル(Louisville))から市販品として入手し得る。
【００７２】
幾つかの態様において、前記スペーサは疎水性二官能性スペーサである。疎水性二官能性スペーサは当分野において公知である。これについては、例えばBioconjugate Techniques, G.T. Hermanson (1996年、CA、サンジエゴの、アカデミックプレス(Academic Press, San Diego, CA)刊)を参照のこと。この文献の内容全体を参考としてここに組入れる。幾つかの態様において、該疎水性二官能性スペーサは、2またはそれ以上の反応性の基、例えばアミン、ヒドロキシル、チオールおよびカルボキシル基または任意のこれらの組合せを含む。幾つかの態様において、該疎水性二官能性スペーサはヒドロキシル基およびカルボキシレート基を含む。他の態様において、該疎水性二官能性スペーサはアミノ基およびカルボキシレート基を含む。他の態様において、該疎水性二官能性スペーサはチオール基およびカルボキシレート基を含む。カルボキシレート基およびヒドロキシル基またはチオール基を含む適当な疎水性二官能性スペーサは、当分野において公知であり、例えば8-ヒドロキシオクタン酸および8-メルカプトオクタン酸を含む。
【００７３】
幾つかの態様において、前記二官能性スペーサは、そのカルボキシレート基間に1～7個の炭素原子を持つ非-分岐メチレン基を含むジカルボン酸ではない。幾つかの態様において、該二官能性スペーサは、そのカルボキシレート基間に1～7個の炭素原子を持つ非-分岐メチレン基を含むジカルボン酸である。
【００７４】
特定の態様における、前記スペーサ(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、または疎水性二官能性スペーサ)は、その長さにおいて3～10個の原子(例えば、6～10個の原子(例えば、6、7、8、9または10個の原子))を持つものである。更なる特定の態様において、該スペーサは、その長さにおいて約3～10個の原子(例えば、6～10個の原子)を含むものであり、また前記アシル基は、C12～C18脂肪族アシル基、例えばC14脂肪族アシル基、C16脂肪族アシル基であり、従って該スペーサおよび該アシル基の全長は、14～28個の原子、例えば約14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27または28個の原子に相当する。幾つかの態様において、該スペーサおよび該アシル基の長さは、17～28(例えば、19～26、19～21)個の原子なる範囲にある。
【００７５】
上記態様の幾つかによれば、前記二官能性スペーサは、長さにおいて3～10個の原子に相当するアミノ酸主鎖を含む、合成または天然産のアミノ酸(本明細書において記載された任意のものを含むが、これらに限定されない)であり得る(例えば、6-アミノヘキサン酸、5-アミノバレリアン酸、7-アミノヘプタン酸および8-アミノオクタン酸)。あるいはま

た、該スペーサは、長さにおいて3～10個(例えば、6～10個)の原子に相当するペプチド主鎖を持つジペプチドまたはトリペプチドスペーサであり得る。該ジペプチドまたはトリペプチドスペーサの各アミノ酸は、該ジペプチドまたはトリペプチドの他のアミノ酸と同一または異なっていてもよく、また以下に列挙するものからなる群から独立に選択することができる：天然産のまたはコード化および/または非-コード化または非-天然産のアミノ酸であって、例えば天然産のアミノ酸(Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr)のあらゆるD-またはL-異性体、または以下に列挙するものからなる群から選択される非-天然産のまたは非-コード化アミノ酸のあらゆるD-またはL-異性体：β-アラニン(β-Ala)、N-α-メチル-アラニン(Me-Ala)、アミノ酪酸(Abu)、γ-アミノ酪酸(γ-Abu)、アミノヘキサン酸(ε-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、β-アスパラギン酸(β-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、α-tert-ブチルグリシン、2-アミノ-5-ウレイド-n-バレリアン酸(シトルリン(Cit))、β-シクロヘキシルアラニン(Cha)、アセタミドメチル-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)、γ-グルタミン酸(γ-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(O_2))、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)、p-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-NO_2))、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-デヒドロプロリン、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)、O-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)、O-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、チロシンサルフェートテトラブチルアミン、メチル-バリン(MeVal)およびアルキル化3-メルカプトプロピオン酸。

【００７６】

幾つかの態様において、前記スペーサは全体として負の電荷を含み、例えば1つまたは2つの負に帯電したアミノ酸を含む。幾つかの態様において、前記ジペプチドは、一般的な構造A-Bを持つジペプチドの何れでもない。該構造において、AはGly、Gln、Ala、Arg、Asp、Asn、Ile、Leu、Val、PheおよびProからなる群から選択され、また該構造において、BはLys、His、Trpからなる群から選択される。幾つかの態様において、該ジペプチドスペーサは、Ala-Ala、β-Ala-β-Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、γ-アミノ酪酸-γ-アミノ酪酸、Glu-Gluおよびγ-Glu-γ-Gluからなる群から選択される。

【００７７】

幾つかの例示的な態様において、前記グルカゴン類似体は、スペーサのアミン、ヒドロキシルまたはチオール基のアシル化によって、アシル基を含むように修飾され、該スペーサは、位置10、20、24または29におけるアミノ酸の側鎖に、または該グルカゴン類似体のC-末端アミノ酸において結合している。

【００７８】

更なる特定の態様において、前記アシル基は、前記グルカゴン類似体の位置10におけるアミノ酸に結合しており、また該スペーサおよびアシル基の長さは、14～28個の原子に相当する。幾つかの局面における、該位置10におけるアミノ酸は、Lys等の上記式Iのアミノ

酸、または該式Iのものに関連するジ-置換アミノ酸である。更なる特定の態様において、該グルカゴン類似体は、共有結合性分子内架橋等の分子内架橋を欠くものである。該グルカゴン類似体は、例えば該類似体のα-ヘリックスを安定化するために、1またはそれ以上のα,α-ジ-置換アミノ酸、例えばAIBを含むグルカゴン類似体であり得る。

【００７９】

アミン、ヒドロキシル基およびチオール基を介するペプチドの適当なアシル化法は、当分野において公知である。これについては、例えば実施例19(アミンを介するアシル化方法に関して)、Miller, Biochem. Biophys. Res. Commun., 218: 377-382 (1996); Shimohigashi & Stammer, Int. J. Pept. Protein Res., 19: 54-62 (1982)；およびPreviero等, Biochim. Biophys. Acta, 263: 7-13 (1972)(ヒドロキシル基を介するアシル化法について)；およびSan & Silvius, J. Pept. Res., 66: 169-180 (2005)(チオール基を介するアシル化法について)；Bioconjugate Chem., 「タンパク質の化学的修飾：変遷および応用(Chemical Modifications of Proteins: History and Applications)」, pp. 1, 2-12 (1990)；Hashimoto等, Pharmaceutical Res., 「インシュリンのパルミトイル誘導体の合成およびその生物学的な活性(Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity)」, Vol. 6, No: 2, pp.171-176 (1989)を参照することができる。

【００８０】

前記アシル化アミノ酸のアシル基は、任意のサイズ、例えば任意の長さの炭素鎖を持つものであり得、また直鎖または分岐鎖の何れでもよい。幾つかの特定の態様において、該アシル基はC4～C30脂肪酸の残基である。例えば、該アシル基は、C4脂肪酸、C6脂肪酸、C8脂肪酸、C10脂肪酸、C12脂肪酸、C14脂肪酸、C16脂肪酸、C18脂肪酸、C20脂肪酸、C22脂肪酸、C24脂肪酸、C26脂肪酸、C28脂肪酸またはC30脂肪酸の何れかを由来とする脂肪酸残基である。幾つかの態様において、該アシル基は、C8～C20脂肪酸、例えばC14脂肪酸またはC16脂肪酸を由来とするものである。

【００８１】

もう一つの態様において、前記アシル基は、胆汁酸を由来とするものである。この胆汁酸は、任意の適当な胆汁酸であり得、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、グリココール酸およびコレステロール酸を含むが、これらに限定されない。

【００８２】

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、該グルカゴン類似体による長鎖アルカンのアシル化による、アシル化アミノ酸を含む。特定の局面において、該長鎖アルカンは、該グルカゴン類似体のカルボキシル基またはその活性化型と反応するアミン、ヒドロキシルまたはチオール基(例えば、オクタデシルアミン、テトラデカノール、およびヘキサデカンチオール)を含む。該グルカゴン類似体のカルボキシル基またはその活性化型は、該グルカゴン類似体のアミノ酸(例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸)の側鎖の一部であり得、また該類似体の主鎖の一部であり得る。

【００８３】

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、該グルカゴン類似体に結合しているスペーサによる前記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修飾される。特定の局面において、該長鎖アルカンは、該スペーサのカルボキシル基またはその活性化型と反応するアミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含む。カルボキシル基またはその活性化型を含む該スペーサは、ここに記載されており、例えば二官能性スペーサ、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および疎水性二官能性スペーサを含む。

【００８４】

本明細書において使用する用語「カルボキシル基の活性化型」とは、一般式：R(C=O)Xを持つカルボキシル基を意味し、ここでXは離脱基を表し、またRは前記グルカゴン類似体または前記スペーサである。例えば、カルボキシル基の活性型は、アシルクロリド、無水

物およびエステルを含むことができるが、これらに限定されるものではない。幾つかの態様において、該活性化カルボキシル基は、N-ヒドロキシサクシンイミドエステル(NHS)離脱基を持つエステルである。

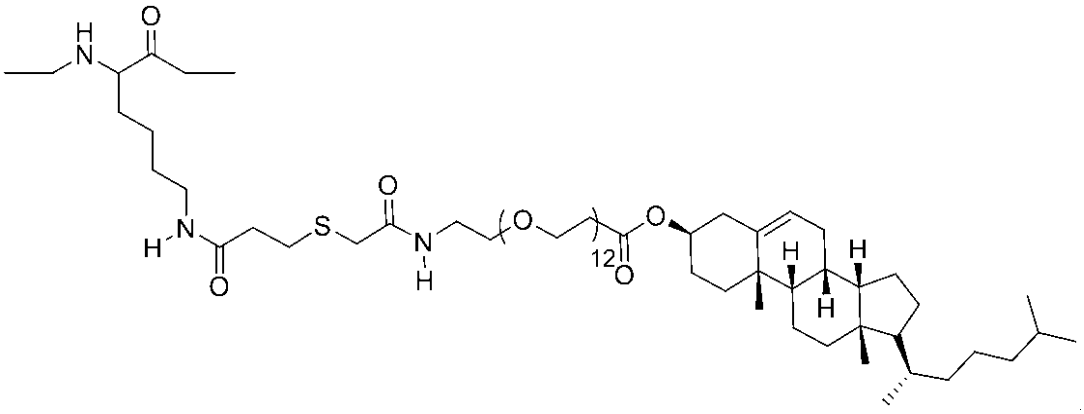
【００８５】

長鎖アルカンが前記グルカゴン類似体または前記スペーサによりアシル化されているこれら局面に関連して、該長鎖アルカンは、任意のサイズを持つものであり得、また任意の長さの炭素鎖を含むことができる。該長鎖アルカンは、直鎖または分岐鎖アルカンであり得る。幾つかの局面において、該長鎖アルカンは、C4～C30アルカンである。例えば、該長鎖アルカンは、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、またはC30アルカンの何れかであり得る。幾つかの態様において、該長鎖アルカンは、C8～C20アルカン、例えばC14アルカン、C16アルカンまたはC18アルカンを含む。

また、幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体のアミン、ヒドロキシルまたはチオール基は、コレステロール酸でアシル化される。特定の態様において、該グルカゴン類似体は、アルキル化脱アミノCysスペーサ、即ちアルキル化3-メルカプトプロピオン酸スペーサを介して該コレステロール酸に結合される。該アルキル化脱アミノCysスペーサは、例えばドデカエチレングリコール部分を含む脱アミノCysスペーサであり得る。一態様において、該グルカゴン類似体は、以下の構造を含む：

【００８６】

【化４】



【００８７】

ここに記載するアシル化グルカゴン類似体は、更に親水性部分を含むように修飾(修飾)することができる。幾つかの特定の態様において、該親水性部分は、ポリエチレングリコール(PEG)鎖を含むことができる。親水性部分の組込みは、任意の適当な手段、例えばここに記載する任意の方法を通して達成し得る。この点に関連して、該アシル化グルカゴン類似体は、ここに記載した修飾の何れかを含有する、配列番号:1を含むことができ、ここにおいて該類似体の位置10、20、24および29におけるアミノ酸の少なくとも一つはアシル基を含み、また位置16、17、21、24または29、C-末端拡張部内の位置におけるアミノ酸の少なくとも一つ、または該C-末端アミノ酸はCys、Lys、Orn、ホモ-Cys、またはAc-Pheへと修飾され、また該アミノ酸の側鎖は、親水性部分(例えば、PEG)に共有結合されている。幾つかの態様において、該アシル基は、場合によりスペーサを介して、位置10に結合されており、該スペーサはCys、Lys、Orn、ホモ-CysまたはAc-Pheを含み、更に該親水性部分は、位置24におけるCys残基において組込まれる。

【００８８】

あるいはまた、前記アシル化グルカゴン類似体はスペーサを含むことができ、ここで該スペーサはアシル化され、かつ前記親水性部分を含むように修飾される。適当なスペーサの非-限定的な例は、Cys、Lys、Orn、ホモ-CysおよびAc-Pheからなる群から選択される、1種またはそれ以上のアミノ酸を含むスペーサを包含する。

【００８９】
アルキル化
幾つかの態様によれば、前記グルカゴン類似体は、アルキル化アミノ酸(例えば、非-コード化、アルキル化アミノ酸(例えば、天然産のアミノ酸にとって自然でないアルキル基を含むアミノ酸))を含む。任意の特別な理論に拘ることなしに、グルカゴン類似体のアルキル化が、該グルカゴン類似体のアシル化と同様ではないとしても類似する効果、例えば循環の際の延長された半減期、作用の遅延された発現、延長された作用期間、DPP-IV等のプロテアーゼに対する改善された抵抗性、および前記GLP-1およびグルカゴンレセプタにおける高められた力価を実現するものと考えられる。
【００９０】
アルキル化は、アシル化のためのサイトとしてここに記載した任意の位置を含む、前記グルカゴン類似体内のあらゆる位置において行うことができ、その位置は、例えばアミノ酸位置1～29、C-末端から29番目の残基のアミノ酸位置、例えば30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47等、C-末端拡張部内の位置、または該C-末端の何れかを含むが、これらに限定されるものではなく、前記グルカゴン活性またはGLP-1活性が維持されることを条件とする。非-限定的な例は位置5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28または29を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は9、10、12、16および20からなる群から選択される1またはそれ以上の位置においてアルキル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は10、12および16からなる群から選択される1またはそれ以上の位置においてアルキル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は9、10、12、16および20からなる群から選択される1またはそれ以上の位置においてアルキル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は、位置10および12の1またはそれ以上においてアルキル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は、位置12においてアルキル化アミノ酸を含む。例示的な態様において、該グルカゴン類似体は、C-末端拡張および9、10、12、16、20および37-43(例えば、40)からなる群から選択される1またはそれ以上の位置におけるアルキル化アミノ酸を含む。該アルキル基は、該グルカゴン類似体のアミノ酸に対して直接的に、またはスペーサを介して該グルカゴン類似体のアミノ酸に対して間接的に共有結合することができ、ここで該スペーサは該グルカゴン類似体のアミノ酸と該アルキル基との間に位置する。グルカゴン類似体は、親水性部分が結合している位置と同一のアミノ酸位置において、または異なるアミノ酸位置においてアルキル化されていてもよい。非-限定的な例は、位置10におけるアルキル化および該グルカゴン類似体のC-末端位置、例えば位置24、28または29、C-末端拡張部分内、または該C-末端における1またはそれ以上の位置におけるペグ化(例えば、C-末端Cysを付加することにより)を含む。
【００９１】
特定の局面において、前記グルカゴン類似体は、そのアミノ酸の側鎖におけるアミン、ヒドロキシルまたはチオール基を直接アルキル化することによって、アルキル基を含むように修飾される。幾つかの態様において、アルキル化は、該グルカゴン類似体の位置10、20、24または29において行われる。この点に関連して、該アルキル化グルカゴン類似体は、配列番号:2のアミノ酸配列、またはここに記載した1またはそれ以上のアミノ酸修飾を含む、該配列の修飾されたアミノ酸配列を含むことができ、ここで位置10、20、24および29における少なくとも一つのアミノ酸が、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含む任意のアミノ酸へと修飾される。幾つかの特定の態様において、該グルカゴン類似体の直接的なアルキル化は、位置10における該アミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を介して起る。
【００９２】
幾つかの態様において、側鎖アミンを含有するアミノ酸は、上記式Iで示されるアミノ酸である。幾つかの例示的な態様において、該式Iのアミノ酸は、nが4(Lys)またはnが3(Orn)のアミノ酸である。

【００９３】
他の態様において、側鎖ヒドロキシル基を含む前記アミノ酸は、上記式IIで表されるアミノ酸である。幾つかの例示的な態様において、該式IIで表されるアミノ酸は、nが1(Ser)のアミノ酸である。
【００９４】
更に別の態様において、側鎖チオール基を含む前記アミノ酸は、上記式IIIで表されるアミノ酸である。幾つかの例示的な態様において、該式IIIで表されるアミノ酸は、nが1(Cys)のアミノ酸である。
【００９５】
更に別の態様において、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含む前記アミノ酸は、上記式I、式IIまたは式IIIの構造と同一の構造を含むジ-置換アミノ酸であるが、但し該式I、式IIまたは式IIIで表されるアミノ酸のα-炭素に対して結合した水素原子は、第二の側鎖で置換されている。
【００９６】
幾つかの態様において、前記アルキル化グルカゴン類似体は、該類似体と該アルキル基との間にスペーサを含む。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、該スペーサに対して共有結合しており、該スペーサは、該アルキル基に対して共有結合している。幾つかの例示的な態様において、該グルカゴン類似体は、スペーサのアミン、ヒドロキシルまたはチオール基をアルキル化することにより、アルキル基を含むように修飾され、該スペーサは、該グルカゴン類似体の位置10、20、24または29におけるアミノ酸の側鎖に結合している。該スペーサが結合しているアミノ酸は、該スペーサに対して結合し得る部分を含む任意のアミノ酸であり得る。例えば、側鎖NH_2、-OH、または-COOHを含むアミノ酸(例えば、Lys、Orn、Ser、Asp、またはGlu)が適している。この点に関連して、該アルキル化グルカゴン類似体は、配列番号:1の修飾アミノ酸配列を含むことができ、これは1またはそれ以上のここに記載したアミノ酸修飾を含み、該修飾において、位置10、20、24および29におけるアミノ酸の少なくとも一つが、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはカルボキシレートを含む任意のアミノ酸へと修飾されている。
【００９７】
幾つかの態様において、前記スペーサは、側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含むアミノ酸または側鎖アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含むアミノ酸を含有するジペプチドまたはトリペプチドである。
【００９８】
アルキル化がスペーサのアミノ基を介して起る場合、該アルキル化は、アミノ酸のα-アミンまたは側鎖アミンを通して起り得る。該α-アミンがアルキル化される例において、該スペーサのアミノ酸は、任意のアミノ酸であり得る。例えば、該スペーサのアミノ酸は、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-アミノバレリアン酸、7-アミノヘプタン酸および8-アミノオクタン酸であり得る。あるいはまた、該スペーサのアミノ酸は酸性残基、例えばAspおよびGluであってもよいが、該アルキル化が該酸性残基のα-アミン上で起ることを条件とする。該スペーサのアミノ酸の側鎖アミンがアルキル化される例において、該スペーサのアミノ酸は側鎖アミンを含むアミノ酸、例えば上記式Iのアミノ酸(例えば、LysまたはOrn)である。この例においては、前記グルカゴン類似体がジ-アルキル化されるように、該α-アミンおよび該スペーサのアミノ酸の側鎖アミン両者をアルキル化することが可能である。本発明の様々な態様は、このようなジ-アルキル化分子をも包含する。
【００９９】
アルキル化がスペーサのヒドロキシル基を通して起る場合、前記アミノ酸または前記ジペプチドまたはトリペプチドのアミノ酸の一つは、上記式IIのアミノ酸であり得る。特定の例示的な態様において、該アミノ酸はSerである。
【０１００】
アルキル化がスペーサのチオール基を通して起る場合、前記アミノ酸または前記ジペプ

チドまたはトリペプチドのアミノ酸の一つは、上記式IIIのアミノ酸であり得る。特定の例示的な態様において、該アミノ酸はCysである。

【０１０１】

幾つかの態様において、前記スペーサは親水性二官能性スペーサである。幾つかの態様において、該親水性二官能性スペーサは2またはそれ以上の反応性の基、例えばアミン、ヒドロキシル、チオールおよびカルボキシル基または任意のこれらの組合せを含む。幾つかの態様において、該親水性二官能性スペーサはヒドロキシル基およびカルボキシレートを含む。他の態様において、該親水性二官能性スペーサはアミノ基およびカルボキシレートを含む。他の態様において、該親水性二官能性スペーサはチオール基およびカルボキシレートを含む。特定の一態様において、該スペーサはアミノポリ(アルキルオキシ)カルボキシレートを含む。この点に関連して、該スペーサは、例えば$NH_2(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mCOOH$を含むことができ、ここでmは1～6なる範囲の任意の整数であり、またnは2～12なる範囲の任意の整数であり、これは、例えばKY、ルイスビル(Louisville, KY)のペプチドインターナショナル社(Peptides International, Inc.)から市販品として入手し得る8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸である。

【０１０２】

幾つかの態様において、前記スペーサは疎水性二官能性スペーサである。幾つかの態様において、該疎水性二官能性スペーサは、2またはそれ以上の反応性の基、例えばアミン、ヒドロキシル、チオールおよびカルボキシル基または任意のこれらの組合せを含む。幾つかの態様において、該疎水性二官能性スペーサはヒドロキシル基およびカルボキシレートを含む。他の態様において、該疎水性二官能性スペーサはアミノ基およびカルボキシレートを含む。他の態様において、該疎水性二官能性スペーサはチオール基およびカルボキシレートを含む。カルボキシレートおよびヒドロキシル基またはチオール基を含む適当な疎水性二官能性スペーサは当分野において公知であり、また例えば8-ヒドロキシオクタン酸および8-メルカプトオクタン酸を包含する。

【０１０３】

特定の態様における、前記スペーサ(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、または疎水性二官能性スペーサ)は、その長さにおいて3～10個の原子(例えば6～10個の原子(例えば、6、7、8、9または10個の原子))に相当する。更なる特定の態様において、該スペーサは、その長さにおいて約3～10個の原子(例えば、6～10個の原子)に相当し、また前記アルキル基はC12～C18アルキル基、例えばC14アルキル基、C16アルキル基であり、従って該スペーサおよび該アルキル基の全長さは、14～28個の原子、例えば約14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27または28個の原子に相当する。幾つかの態様において、該スペーサおよびアルキル基の長さは、17～28(例えば、19～26、19～21)個の原子に相当する。

【０１０４】

幾つかの上記態様に従えば、前記二官能性スペーサは、その長さにおいて3～10原子に相当するアミノ酸主鎖を含む、合成または非-天然産または非-コード化アミノ酸であり得る(例えば、6-アミノヘキサン酸、5-アミノバレリアン酸、7-アミノヘプタン酸および8-アミノオクタン酸)。あるいはまた、該スペーサはその長さにおいて3～10個の原子(例えば、6～10個の原子)に相当するペプチド主鎖を持つ、ジペプチドまたはトリペプチドスペーサであり得る。該ジペプチドまたはトリペプチドスペーサは、例えばここにおいて教示された任意のアミノ酸を含む、天然産またはコード化および/または非-コード化または非-天然産のアミノ酸で構成し得る。幾つかの態様において、該スペーサは全体として負の電荷を含み、例えば1または2個の負に帯電したアミノ酸を含む。幾つかの態様において、該ジペプチドスペーサはAla-Ala、β-Ala-β-Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、γ-アミノ酪酸-γ-アミノ酪酸およびγ-Glu-γ-Gluからなる群から選択される。

【０１０５】

アミン、ヒドロキシルおよびチオールを介してペプチドをアルキル化する適当な方法は当分野において公知である。例えば、ウイリアムソン(Williamson)のエーテル合成を、前

記グルカゴン類似体のヒドロキシル基と前記アルキル基との間にエーテル結合を形成するのに使用し得る。また、前記ペプチドとアルキルハライドとの求核置換反応は、エーテル、チオエーテルまたはアミノ結合の何れかを結果し得る。

【０１０６】

前記アルキル化グルカゴン類似体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を持つものであり得、また直鎖または分岐鎖であり得る。幾つかの態様において、該アルキル基は、C4～C30アルキルである。例えば、該アルキル基は、C4アルキル、C6アルキル、C8アルキル、C10アルキル、C12アルキル、C14アルキル、C16アルキル、C18アルキル、C20アルキル、C22アルキル、C24アルキル、C26アルキル、C28アルキル、またはC30アルキルの何れであり得る。幾つかの態様において、該アルキル基は、C8～C20アルキル、例えばC14アルキルまたはC16アルキルである。

【０１０７】

幾つかの特定の態様において、前記アルキル基は、胆汁酸のステロイド部分、例えばコール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、タウロコール酸、グリココール酸およびコレステロール酸を含む。

【０１０８】

本開示の幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、求核長鎖アルカンと該グルカゴン類似体との反応による、アルキル化アミノ酸を含み、ここにおいて該グルカゴン類似体は求核置換に適した離脱基を含む。特定の局面において、該長鎖アルカンの求核性の基は、アミン、ヒドロキシル、またはチオール基(例えば、オクタデシルアミン、およびヘキサデカンチオール)を含む。該グルカゴン類似体の離脱基は、アミノ酸の側鎖の一部であり得、または上記ペプチド主鎖の一部であり得る。適当な離脱基は、例えばN-ヒドロキシサクシンイミド、ハロゲン原子、およびスルホネートエステルを含む。

【０１０９】

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、前記求核長鎖アルカンと該グルカゴン類似体に結合しているスペーサとの間の反応によって、アルキル基を含むように修飾され、ここにおいて該スペーサは前期離脱基を含む。特定の局面において、該長鎖アルカンはアミン、ヒドロキシルまたはチオール基を含む。幾つかの態様において、該離脱基を含むスペーサは、ここに記載された任意のスペーサ、例えば更に適当な離脱基を含むアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能性スペーサおよび疎水性二官能性スペーサであり得る。

【０１１０】

長鎖アルカンが前記グルカゴン類似体または前記スペーサによってアルキル化される、本開示のこれら局面に関連して、該長鎖アルカンは任意のサイズを持つものであり得、また任意の長さの炭素鎖を含むことができる。該長鎖アルカンは、直鎖または分岐鎖アルカンであり得る。幾つかの局面において、該長鎖アルカンは、C4～C30アルカンである。例えば、該長鎖アルカンは、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、またはC30アルカンの何れかであり得る。幾つかの態様において、該長鎖アルカンは、C8～C20アルカン、例えばC14アルカン、C16アルカンまたはC18アルカンを含む。

【０１１１】

また、幾つかの態様において、アルキル化は前記グルカゴン類似体とコレステロール部分との間で起きる可能性がある。例えば、コレステロールのヒドロキシル基は、前記長鎖アルカン上の離脱基を移動させて、コレステロール-グルカゴン類似体生成物を形成する可能性がある。

【０１１２】

ここに記載されたアルキル化グルカゴン類似体は、親水性部分を含むように、更に修飾することができる。幾つかの特定の態様において、該親水性部分は、ポリエチレングリコール(PEG)鎖を含むことができる。親水性部分の組込みは、任意の適当な手段、例えばこ

こに記載された方法の何れかによって実現し得る。この点に関連して、該アルキル化グルカゴン類似体は、ここに記載した1またはそれ以上のアミノ酸修飾を含む、修飾された配列番号:1を含み、該配列において、位置10、20、24および29におけるアミノ酸の少なくとも一つがアルキル基を含み、かつ位置16、17、21、24および29、C-末端拡張部分内の一つの位置におけるアミノ酸の少なくとも一つ、または該C-末端アミノ酸がCys、Lys、Orn、ホモ-CysまたはAc-Pheへと修飾されており、また該アミノ酸の側鎖は、親水性部分(例えば、PEG)に共有結合されている。幾つかの態様において、該アルキル基は、場合によりCys、Lys、Orn、ホモ-CysまたはAc-Pheを含むスペーサを介して、位置10に結合しており、更に該親水性部分は位置24におけるCysに組込まれている。

【０１１３】

あるいはまた、前記アルキル化グルカゴン類似体はスペーサを含むことができ、ここで該スペーサは、アルキル化されかつ前記親水性部分を含むように修飾される。適当なスペーサの非-限定的な例は、Cys、Lys、Orn、ホモ-CysおよびAc-Pheからなる群から選択される1またはそれ以上のアミノ酸を含有するスペーサを含む。

【０１１４】

α-ヘリックスの安定化およびα-ヘリックスを活性化するアミノ酸

如何なる特定の理論にも拘ることなしに、ここに記載したグルカゴン類似体はヘリックス構造、例えばα-ヘリックスを含む。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は該α-ヘリックス構造を安定化するアミノ酸を含む。従って、幾つかの局面において、該グルカゴン類似体は、1種またはそれ以上のα-ヘリックスを活性化するアミノ酸を含む。ここにおいて使用するような用語「α-ヘリックスを活性化する(alpha helix promoting)アミノ酸」とは、グルカゴン類似体の一部である、そのα-ヘリックスに高い安定性を与えるアミノ酸を意味する。α-ヘリックスを活性化するアミノ酸は、当分野において公知である。これについては、例えばLyu等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 5317-5320 (1991); Branden & Tooze, タンパク質構造序論(Introduction to Protein Structure), ガーランド出版社(Garland Publishing), NY, ニューヨーク(New York, NY), 1991; Fasman, タンパク質構造の予測およびタンパク質配座決定の原理(Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation), Fasman編, NY, プレナム(Plenum, NY), (1989)を参照することができる。本発明の様々な目的にとって適したα-ヘリックスを活性化するアミノ酸は、アラニン、ノルバリン、ノルロイシン、α-アミノ酪酸、α-アミノイソ酪酸、ロイシン、イソロイシン、バリン等を含むがこれらに限定されない。幾つかの態様において、該α-ヘリックスを活性化するアミノ酸は、天然産のタンパク質において見られるα-ヘリックスの一部としての任意のアミノ酸、例えばLeu、Phe、Ala、Met、Gly、Ile、Ser、Asn、Glu、Asp、Lys、Argである。

【０１１５】

幾つかの態様において、前記α-ヘリックスを活性化するアミノ酸は、グリシンまたはアラニンと比較して、該α-ヘリックスに対してより高い安定性を与える。幾つかの態様において、該α-ヘリックスを活性化するアミノ酸は、α,α-ジ-置換アミノ酸である。

【０１１６】

α-ヘリックス：α-ヘリックス活性化アミノ酸の位置

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、自然なグルカゴンの配列(配列番号:1)に類似するアミノ酸配列を含み、また該グルカゴン類似体は少なくとも一つのα-ヘリックス活性化アミノ酸を含む。幾つかの態様において、該α-ヘリックス活性化アミノ酸は、12～29なる範囲の位置(自然のグルカゴン(配列番号:1)の番号付けに従って)の何れかに位置している。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、配列番号:1の修飾されたアミノ酸配列を含み、また、例えば位置12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29の1またはそれ以上において、少なくとも一つのα-ヘリックス活性化アミノ酸を含んでいる。幾つかの態様において、グルカゴン類似体は、位置16、17、20および21の1つ、2つ、3つまたは全てにおいてα-ヘリックス活性化アミノ酸を含んでいる。

【０１１７】

α-ヘリックス：α,α-ジ-置換アミノ酸

幾つかの態様において、前記α-ヘリックス活性化アミノ酸は、α,α-ジ-置換アミノ酸である。特定の態様において、該α,α-ジ-置換アミノ酸はR^1およびR^2を含み、その各々は、α-炭素に結合しており、ここでR^1およびR^2の各々は、夫々独立に、場合によりヒドロキシル基、アミド基、チオール基、ハロゲン原子で置換されたC1-C4アルキル基からなる群から選択され、あるいはR^1およびR^2はこれらが結合しているα-炭素と共に、リング(例えば、C3-C8リング)を形成する。幾つかの態様において、R^1およびR^2の各々は、メチル基、エチル基、プロピル基およびn-ブチル基からなる群から選択され、あるいはR^1およびR^2は一緒にシクロオクタンまたはシクロヘプタン(例えば、1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸)を形成する。幾つかの態様において、R^1およびR^2は同一である。幾つかの態様において、R^1はR^2とは異なっている。幾つかの態様において、R^1およびR^2の各々は、C1～C4アルキル基である。幾つかの局面において、R^1およびR^2の各々は、C1またはC2アルキル基である。幾つかの態様において、R^1およびR^2の各々は、該α,α-ジ-置換アミノ酸がα-アミノイソ酪酸(AIB)となるように、メチル基である。

【０１１８】

幾つかの局面において、ここに記載されたグルカゴン類似体は、1またはそれ以上のα,α-ジ-置換アミノ酸を含み、また該グルカゴン類似体は、該α,α-ジ-置換アミノ酸が共有結合性架橋の不在下で該α-ヘリックスを安定化することができることから、特に共有結合性の分子内架橋(例えば、ラクタム)を欠いている。幾つかの局面において、該グルカゴン類似体は、前記C-末端(位置12～29の近傍)において1またはそれ以上のα,α-ジ-置換アミノ酸を含む。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体の位置16、17、18、19、20、21、24、28または29の1、2、3、4またはそれ以上は、α,α-ジ-置換アミノ酸、例えばアミノイソ酪酸(AIB)、メチル基、エチル基、プロピル基およびn-ブチル基から選択される同一または異なる基でジ-置換されたアミノ酸、またはシクロオクタンまたはシクロヘプタン(例えば、1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸)で置換されている。例えば、位置16のAIBによる置換は、分子内架橋、例えば非-共有結合性分子内架橋(例えば、塩橋)または共有結合性架橋(例えば、ラクタム)の不在下で、GLP-1活性を増強する。幾つかの態様において、位置16、20、21または24の1、2、3またはそれ以上はAIBで置換されている。特定の態様において、自然のヒトグルカゴン(配列番号:1)の位置2、16に相当するアミノ酸の一方または両者は、AIB等のα,α-ジ-置換アミノ酸によって置換されている。

【０１１９】

幾つかの態様によれば、分子内架橋を欠く前記グルカゴン類似体は、アミノ酸位置12～29内に、α,α-ジ-置換アミノ酸および該グルカゴン類似体の位置10におけるアミノ酸の側鎖に共有結合したアシルまたはアルキル基による、1またはそれ以上の置換を含む。特定の態様において、該アシルまたはアルキル基は、アミノ酸上に自然には存在しないものである。幾つかの局面において、該アシルまたはアルキル基は、位置10におけるアミノ酸にとって非-天然のものである。分子内架橋を欠くこのようなアシル化またはアルキル化グルカゴンペプチドは、アシル化されていない相当するペプチドと比較して、前記GLP-1およびグルカゴンレセプタにおいて増強された活性を示す。該GLP-1およびグルカゴンレセプタにおける活性の更なる増強は、該アシル基またはアルキル基と該類似体の位置10におけるアミノ酸の側鎖との間にスペーサを組入れることにより、分子内架橋を欠く該アシル化グルカゴンペプチドによって実現し得る。組込んだスペーサの存在下または不在下でのアシル化またはアルキル化につき、以下において更に説明する。

【０１２０】

α-ヘリックス：分子内架橋

幾つかの態様において、前記α-ヘリックス活性化アミノ酸はアミノ酸であり、これは分子内架橋を介して前記グルカゴン類似体のもう一つのアミノ酸と結合している。このような態様において、分子内架橋を介して結合しているこれら2つのアミノ酸各々は、α-ヘリックス活性化アミノ酸であると考えられる。幾つかの態様において、該グルカゴン類似

体は、1または2個の分子内架橋を含む。幾つかの特定の態様において、該グルカゴン類似体は、少なくとも一つの他のα-ヘリックス活性化アミノ酸、例えばα,α-ジ-置換アミノ酸との組合せで一つの分子内架橋を含む。

【０１２１】

幾つかの態様において、前記分子内架橋は、例えばファンデルワールス相互作用、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、双極子-双極子相互作用等を含む非-共有結合性の結合を介して該グルカゴン類似体の2つの部分を連結する橋である。この点に関連して、幾つかの局面における該グルカゴン類似体は、非-共有結合性の分子内架橋を含む。幾つかの態様において、該非-共有結合性の分子内架橋は塩橋である。

【０１２２】

幾つかの態様において、前記分子内架橋は、共有結合を介して前記類似体の2つの部分を連結する橋である。この点に関連して、幾つかの局面における該グルカゴン類似体は、共有結合性の分子内架橋を含む。

【０１２３】

幾つかの態様において、前記分子内架橋(例えば、非-共有結合性分子内架橋、共有結合性分子内架橋)は、アミノ酸3個分離れた2つのアミノ酸同士の間、例えば位置iおよびi+4のアミノ酸間で形成され、ここでiは12～25なる範囲の任意の整数(例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24および25)である。より詳しくは、アミノ酸対12と16、16と20、20と24または24と28(i=12、16、20または24であるアミノ酸対)の側鎖は相互に結合され、その結果前記グルカゴンのα-ヘリックスを安定化する。あるいはまた、iは17であり得る。幾つかの特定の態様において、該グルカゴン類似体は、アミノ酸17と21との間に分子内架橋を含む。幾つかの特定の態様において、該グルカゴン類似体はその位置16と20または12と16におけるアミノ酸間に分子内架橋を、また位置17および21におけるアミノ酸間に第二の分子内架橋を含む。1またはそれ以上の分子内架橋を含むグルカゴン類似体がここにおいて目論まれている。位置iおよびi+4におけるアミノ酸が一つの分子内架橋によって連結されている特定の態様において、該リンカーのサイズは約8原子、または約7-9原子に相当する。

【０１２４】

他の態様において、前記分子内架橋は、アミノ酸2個分離れた2つのアミノ酸間、例えば位置jおよびj+3における2つのアミノ酸間に形成され、ここでjは12～26なる範囲の任意の整数(例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25および26)である。幾つかの特定の態様において、jは17である。位置jおよびj+3におけるアミノ酸が、1つの分子内架橋によって連結されている特定の態様において、該リンカーのサイズは、約6原子または約5～7原子に相当する。

【０１２５】

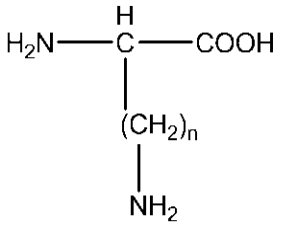
更に別の態様において、前記分子内架橋は、アミノ酸6個分離れた2つのアミノ酸間に、例えば位置kおよびk+7におけるアミノ酸間に形成され、ここでkは12～22なる範囲の任意の整数(例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21および22)である。幾つかの特定の態様において、kは12、13または17である。例示的な態様において、kは17である。

α-ヘリックス：分子内架橋に関与するアミノ酸

(共有結合的または非-共有結合的に)結合して、6-原子の結合架橋を形成することのできるアミノ酸対の例は、OrnとAspの対、GluとnDが2である上記式Iのアミノ酸との対、およびホモグルタミン酸とnDが1である上記式Iのアミノ酸との対を含み、ここで該式Iは以下の通りである：

【０１２６】

【化５】



[式I]

【０１２７】

ここでn=1～4である。

結合して、7-原子の結合架橋を形成することのできるアミノ酸対の例は、Orn-Glu(ラクタムリング)、Lys-Asp(ラクタム)、またはホモSer-ホモGlu(ラクトン)を含む。8-原子のリンカーを形成することのできるアミノ酸対の例は、Lys-Glu(ラクタム)、ホモLys-Asp(ラクタム)、Orn-ホモGlu(ラクタム)、4-アミノPhe-Asp(ラクタム)、またはTyr-Asp(ラクトン)を含む。9-原子のリンカーを形成することのできるアミノ酸対の例は、ホモLys-Glu(ラクタム)、Lys-ホモGlu(ラクタム)、4-アミノPhe-Glu(ラクタム)、またはTyr-Glu(ラクトン)を含む。これらアミノ酸上の任意の側鎖は、前記α-ヘリックスの3-次元構造が破壊されない限りにおいて、更に追加の化学基で置換されていてもよい。当業者は、同様なサイズを持つ安定化構造を創成し、また所定の効果をもたらすであろう、化学的に修飾された誘導体を含む、上記以外のアミノ酸対または上記以外のアミノ酸類似体を予想することができる。例えば、ホモシステイン-ホモシステインジスルフィド架橋は、その長さにおいて6-原子に相当し、また更に修飾して所望の効果を得ることができる。

【０１２８】

共有結合がない場合においてさえ、上記のアミノ酸対(または当業者が予想することのできる類似のアミノ酸対)は、また非-共有結合性の結合を介して、例えば塩橋の形成または水素-結合による相互作用を通して、前記α-ヘリックスに追加の安定性を与えることができる。従って、塩橋は以下のような対間に生成することができる：OrnとGluとの対間、LysとAspとの対間、ホモ-セリンとホモ-グルタメートとの対間、LysとGluとの対間、AspとArgとの対間、ホモ-LysとAspとの対間、Ornとホモ-グルタメートとの対間、4-アミノPheとAspとの対間、TyrとAspとの対間、ホモ-LysとGluとの対間、Lysとホモ-Gluとの対間、4-アミノPheとGluとの対間、またはTyrとGluとの対間。幾つかの態様において、前記類似体は、以下のアミノ酸対の何れかの間に塩橋を含む：OrnとGluとの対間、LysとAspとの対間、LysとGluとの対間、AspとArgとの対間、ホモ-LysとAspとの対間、Ornとホモ-グルタメートとの対間、ホモ-LysとGluとの対間、およびLysとホモ-Gluとの対間。塩橋は、逆に帯電した側鎖を持つ他の対間に形成することができる。これについては、例えばKallenbach等の、「アミド結合：化学、生化学および材料科学における構造的な重要性(The Amide Linkage: Structural Significance in Chemistry, Biochemistry, and Materials Science)」, ジョンウイリー＆サンズ社(John Wiley & Sons, Inc.)(2000)における：「タンパク質構造および折畳みにおけるペプチド結合の役割(Role of the Peptide Bond in Protein Structure and Folding)」と題する論文を参照のこと。

【０１２９】

幾つかの態様において、上記非-共有結合性分子内架橋は、疎水性架橋である。一態様によれば、上記類似体のα-ヘリックスは、位置jおよびj+3またはiおよびi+4において、疎水性アミノ酸を組入れることにより、安定化される。例えば、iはTyrであり得、かつi+4はValまたはLeuの何れかであり得；iはPheであり得、かつi+4はMetであり得；あるいはiはPheであり得、かつi+4はIleであり得る。本発明の目的に対して、上記アミノ酸対は、逆にすることができ、結果として位置iにおける指示されたアミノ酸が、今回はi+4に位置し、一方で該i+4におけるアミノ酸が、位置iに位置し得ることを理解すべきである。同様に、適当なアミノ酸対が、jおよびj+3についても形成し得ることをも理解すべきである。

【０１３０】

α-ヘリックス：共有結合性分子内架橋

幾つかの態様において、前記共有結合性分子内架橋は、ラクタムリングまたはラクタム架橋である。該ラクタムリングのサイズは、前記アミノ酸側鎖の長さに依存する可能性があり、また一態様において、該ラクタムは、オルニチンの側鎖をアスパラギン酸の側鎖に結合することにより形成される。ラクタム架橋およびその製造方法は当分野において公知である。これについては、例えばHouston, Jr等, J. Peptide Sci., 1: 274-282 (2004)および本発明の実施例1を参照することができる。幾つかの態様において、該類似体は、配列番号:1の修飾された配列およびiとi+4との間にラクタム架橋を含み、ここでiは本明細書において前に定義されたものである。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、2つのラクタム架橋、即ち位置16および20におけるアミノ酸間に一つの架橋および位置17および21におけるアミノ酸間にもう一つの架橋を含む。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、一つのラクタム架橋および一つの塩橋を含む。更なる例示的な態様は、本明細書における「実施例」と題する項目において記載される。更なる例示的な態様は、場合によりラクタム架橋を持つ以下の対を含む：位置12におけるGluと位置16におけるLys；位置12における自然のLysと位置16におけるGlu；位置16におけるGluと位置20におけるLys；位置16におけるLysと位置20におけるGlu；位置20におけるGluと位置24におけるLys；位置20におけるLysと位置24におけるGlu；位置24におけるGluと位置28におけるLys；位置24におけるLysと位置28におけるGlu。

【０１３１】

幾つかの態様において、前記共有結合性分子内架橋はラクトンである。ラクトン架橋を作成する適当な方法は当分野において公知である。これについては、例えばSheehan等, J. Am. Chem. Soc., 95: 875-879 (1973)を参照のこと。

【０１３２】

幾つかの局面において、オレフィンメタセシスが、全-炭化水素架橋システムを用いて前記類似体のα-ヘリックスの1または2ターン(巻き)を架橋するために利用される。本例における該グルカゴン類似体は、変動する長さのオレフィン系側鎖を持ち、かつ前記jおよびj+3またはiおよびi+4位置においてRまたはS型の立体化学的配置をとる、α-メチル化アミノ酸を含む。幾つかの態様において、該オレフィン系側鎖は、(CH_2)nを含み、ここでnは1～6なる範囲の任意の整数である。幾つかの態様において、8原子なる架橋長さに対して、nは3である。幾つかの態様において、6原子なる架橋長さに対して、nは2である。オレフィン系架橋を含む一例示的なグルカゴン類似体は、ここでは配列番号:17として記載する。このような分子内架橋を形成するための適当な方法は、当分野において記載されている。これについては、例えばSchafmeister等, J. Am. Chem. Soc., 122: 5891-5892 (2000)およびWalensky等, Science, 305: 1466-1470 (2004)を参照のこと。更なる態様において、該類似体は隣接するヘリックスターン上に位置するO-アリルSer残基を含み、これはルテニウム触媒を用いた閉環メタセシスによって一緒に架橋される。このような架橋の手順は、例えばBlackwell等, Angew. Chem. Int. Ed., 37: 3281-3284 (1998)において記載されている。

【０１３３】

特定の局面において、シスチンのペプチド模倣体として広く採用されている、天然産以外のチオ-ジアラニンアミノ酸、ランチオニンは、前記α-ヘリックスの一つのターンを架橋するのに使用される。ランチオニンを基本とする適当な環化方法は、当分野において公知である。これについては、例えばMatteucci等, Tetrahedron Letters, 45: 1399-1401 (2004); Mayer等, J. Peptide Res., 51: 432-436 (1998); Polinsky等, J. Med. Chem., 35: 4185-4194 (1992); Osapay等, J. Med. Chem., 40: 2241-2251 (1997); Fukase等, Bull. Chem. Soc. Jpn., 65: 2227-2240 (1992); Harpp等, J. Org. Chem., 36: 73-80 (1971); Goodman & Shao, Pure Appl. Chem., 68: 1303-1308 (1996);およびOsapay & Goodman, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1599-1600 (1993)を参照することができる。

【０１３４】

幾つかの態様において、位置iおよびi+7における2つのGlu残基間のα,ω-ジアミノアル

カンテザー(例えば1,4-ジアミノプロパンおよび1,5-ジアミノペンタン)は、前記類似体のα-ヘリックスを安定化するために使用されている。このようなテザーは、該ジアミノアルカンテザーの長さに依存して、その長さにおいて9-原子またはそれ以上の原子数に相当する架橋の生成へと導く。このようなテザーによって架橋されたペプチドを作成するための適当な方法は、当分野において公知である。これについては、例えばPhelan等, J. Am. Chem. Soc., 119: 455-460 (1997)を参照のこと。

【０１３５】

更に別の態様において、ジスルフィド架橋が、前記類似体のα-ヘリックスの1または2つのターンを架橋するために使用される。あるいはまた、硫黄原子の一つまたは両者が、等量の(isosteric)マクロ環化をもたらすメチレン基により置換されている、改善されたジスルフィド架橋が、該類似体のα-ヘリックスを安定化するために使用されている。ジスルフィド架橋または硫黄を基本とする環化によりペプチドを修飾する適当な方法は、例えばJackson等, J. Am. Chem. Soc., 113: 9391-9392 (1991)およびRudinger & Jost, Experientia, 20: 570-571 (1964)において記載されている。

【０１３６】

更に別の態様において、前記類似体のα-ヘリックスは、jおよびj+3、またはiおよびi+4に位置する、2つのHis残基またはHisとCysとの対による金属原子の結合を通して安定化される。該金属原子は、例えばRu(III)、Cu(II)、Zn(II)またはCd(II)であり得る。このような金属結合を基本とするα-ヘリックスの安定化方法は当分野において公知である。これについては、例えばAndrews & Tabor, Tetrahedron, 55: 11711-11743 (1999)；Ghadiri等, J. Am. Chem. Soc., 112: 1630-1632 (1990)；およびGhadiri等, J. Am. Chem. Soc., 119: 9063-9064 (1997)を参照することができる。

【０１３７】

あるいはまた、前記類似体のα-ヘリックスは、また他のペプチド環化手段により安定化することも可能であり、該手段はDavies, J. Peptide Sci., 9: 471-501 (2003)において論評されている。該α-ヘリックスはアミド架橋、チオエーテル架橋、チオエステル架橋、ウレア架橋、カルバメート架橋、スルホンアミド架橋等の形成により安定化することができる。例えば、チオエステル架橋は、該C-末端とCys残基の側鎖との間に形成し得る。あるいはまた、チオエステルは、チオールを持つアミノ酸(Cys)およびカルボン酸基を持つアミノ酸(例えば、Asp、Glu)の側鎖を通して形成し得る。他の方法においては、架橋剤、例えばスベリン酸(オクタン二酸)等のジカルボン酸は、アミノ酸側鎖の2つの官能基、例えば遊離アミノ基、ヒドロキシル基、チオール基、およびこれらの組合せの間に結合を導入し得る。

【０１３８】

DPP-IV抵抗性ペプチド

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、位置1または2、あるいは位置1および2の両者において、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP IV)による開裂に対する該グルカゴン類似体の抵抗性を実現するアミノ酸を含む。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、位置1において、以下に列挙するアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸を含む：D-ヒスチジン、デアミノヒスチジン、ヒドロキシル-ヒスチジン、アセチル-ヒスチジン、ホモ-ヒスチジン、N-メチルヒスチジン、α-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、またはα,α-ジメチルイミダゾール酢酸(DMIA)。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、位置2において、以下に列挙するアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸を含む：D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン、またはα-アミノイソ酪酸。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、位置2において、DPP IVに対する該グルカゴン類似体の抵抗性を実現するアミノ酸を含み、かつDPP IVに対する該グルカゴン類似体の抵抗性を実現する該アミノ酸はD-セリンではない。

【０１３９】

幾つかの局面において、DPP IVに対する該グルカゴン類似体の抵抗性を実現するアミノ酸を含む前記グルカゴン類似体は、例えば位置「i」および「i+4」、例えば12と16；16と

20；または20と24におけるアミノ酸間の共有結合を介して、グルカゴンのC-末端部分に見られるα-ヘリックスを安定化するアミノ酸修飾をも更に含む。幾つかの態様において、この共有結合は、位置16におけるグルタミン酸と位置20におけるリジンとの間のラクタム架橋である。幾つかの態様において、この共有結合は、ラクタム架橋以外の分子間架橋である。例えば、適当な共有結合法は、オレフィンメタセシス法、ランチオニンを基本とする環化法、ジスルフィド架橋法または修飾された硫黄-含有架橋形成法、α,ω-ジアミノアルカンテザーを使用する方法、金属原子架橋を形成する方法、および他のペプチド環化手段の任意の1つまたはそれ以上を含む。

【０１４０】

位置1の修飾

幾つかの特定の態様において、前記グルカゴン類似体は、(a) 位置1におけるHisの大きな芳香族アミノ酸による置換および(b) 該分子のC-末端部分(例えば、位置12～29近傍)における該α-ヘリックスを安定化する分子内架橋を含む。特定の態様において、該位置1におけるアミノ酸はTyr、Phe、Trp、アミノ-Phe、ニトロ-Phe、クロロ-Phe、スルホ-Phe、4-ピリジル-Ala、メチル-Tyr、または3-アミノTyrによって置換される。幾つかの態様における該分子内架橋は、ここに記載したものの何れかである。幾つかの局面において、該分子内架橋は、3個の介在するアミノ酸により隔てられた、2つのアミノ酸の側鎖間、即ち位置iおよびi+4におけるアミノ酸の側鎖間にある。幾つかの態様において、該分子内架橋は、ラクタム架橋である。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、位置1における大きな芳香族アミノ酸および該類似体の位置16および20におけるアミノ酸間のラクタム架橋を含む。幾つかの局面におけるかかるグルカゴン類似体は、更に1またはそれ以上(例えば、2、3、4、5またはそれ以上)のここに記載したその他の修飾を含む。例えば、該グルカゴン類似体は、上記C-末端カルボキシレートの代わりにアミドを含む。また、幾つかの態様において、かかるグルカゴン類似体は、1またはそれ以上の、位置17における大きな脂肪族アミノ酸、位置18におけるイミダゾール含有アミノ酸、および位置19における正に帯電したアミノ酸を更に含む。幾つかの態様において、位置1における修飾および分子内架橋を含む該グルカゴン類似体は、更に位置17-19においてアミノ酸配列Ile-His-Glnを含む。このような修飾は、前記GLP-1レセプタおよび前記グルカゴンレセプタにおける該グルカゴン類似体の活性を消滅させないように行うことができる。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、更にアシル化またはアルキル化アミノ酸残基を含む。

【０１４１】

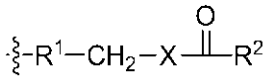
位置3の修飾

幾つかの態様において、前記配列番号:1の第三のアミノ酸(Gln3)は、酸性、塩基性または疎水性アミノ酸残基で置換されており、またこのような修飾は、該グルカゴンレセプタ活性の低下をもたらす。幾つかの態様において、該酸性、塩基性または疎水性アミノ酸はグルタミン酸、オルニチン、ノルロイシンである。幾つかの局面において、これら残基の1つによる修飾により、該グルカゴン類似体は、実質的に減じられまたは消滅させられたグルカゴンレセプタ活性を示すものとなる。幾つかの局面において、例えばグルタミン酸、オルニチン、ノルロイシンで置換された該グルカゴン類似体は、該グルカゴンレセプタにおける自然のグルカゴンの活性の約10％またはそれ未満、例えば約1～10％、または約0.1～10％、あるいは約0.1％を越え、かつ約10％未満なる活性を有し、一方で該GLP-1レセプタにおけるGLP-1の活性の少なくとも20％を示す。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、自然のグルカゴンの活性の約0.5％、約1％または約7％を示し、一方該GLP-1レセプタにおけるGLP-1の活性の少なくとも20％を示す。

【０１４２】

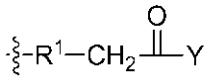
幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体の配列番号:1の位置3におけるグルタミンは、前記グルカゴンレセプタにおける活性の実質的な喪失なしに、グルタミン類似体で置換され、また幾つかの場合においては、グルカゴンレセプタ活性の増強を伴う。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、構造I、IIまたはIIIで表される側鎖を含む、天然産のまたは非-天然産のあるいは非-コード化アミノ酸である：

【０１４３】
【化６】



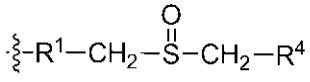
構造I

【０１４４】
【化７】



構造II

【０１４５】
【化８】



構造III

【０１４６】
ここで、R^1はC_{0-3}アルキルまたはC_{0-3}ヘテロアルキル基であり、R^2はNHR^4またはC_{1-3}アルキル基であり、R^3はC_{1-3}アルキル基であり、R^4はHまたはC_{1-3}アルキル基であり、XはNH、OまたはSであり、またYはNHR^4、SR^3またはOR^3である。幾つかの態様において、XはNHであり、あるいはYはNHR^4である。幾つかの態様において、R^1はC_{0-2}アルキル基またはC_1ヘテロアルキル基である。幾つかの態様において、R^2はNHR^4またはC_1アルキル基である。幾つかの態様において、R^4はHまたはC_1アルキル基である。例示的な態様において、上記構造Iの側鎖を含むアミノ酸が提供され、ここでR^1はCH_2-Sであり、XはNHであり、またR^2はCH_3(アセタミドメチル-システイン、C(Acm))であり、R^1はCH_2であり、XはNHであり、またR^2はCH_3(アセチルジアミノブタン酸、Dab(Ac))であり、R^1はC_0アルキル基であり、XはNHであり、R^2はNHR^4であり、またR^4はH(カルバモイルジアミノプロピオン酸、Dap(ウレア))であり、またはR^1はCH_2-CH_2であり、XはNHであり、またR^2はCH_3(アセチルオルニチン、Orn(Ac))である。例示的な態様において、上記構造IIの側鎖を含むアミノ酸が提供され、ここでR^1はCH_2であり、YはNHR^4であり、かつR^4はCH_3(メチルグルタミン、Q(Me))である。例示的な態様において、上記構造IIIの側鎖を含むアミノ酸が提供され、ここでR^1はCH_2であり、かつR^4はH(メチオニン-スルホキシド、M(O))である。特定の態様において、位置3におけるアミノ酸は、Dab(Ac)で置換されている。例えば、グルカゴン類似体は、2009年6月16日付で出願された国際特許出願PCT/US2009/047438に記載の配列リストに係る配列番号:595、配列番号:601、配列番号:603、配列番号:604、配列番号:605、および配列番号:606の修飾されたアミノ酸配列を含むことができる。この特許出願の内容全体をここに参考として組入れるものとする。ここで、これらアミノ酸配列は、ここにおいて更に説明するように修飾されており、例えば少なくとも3個のα-ヘリックス活性化アミノ酸を含むように修飾、(i) 位置10においてアシル化またはアルキル化アミノ酸を含むように、(ii) 位置16においてα-ヘリックス活性化アミノ酸を含むように、(iii) 位置17および/または18において脂肪族アミノ酸を含むように、および(iv) 位置27に対するC-末端に位置する少なくとも一つの帯電したアミノ酸を含むように、また場合により更なる修飾を含むように修飾され、該グルカゴン類似体の対応する位置において、エキセンディン-4(配列番号:8)のアミノ酸配列18-24の少なくとも3個のアミノ酸を含むように修飾される。

【０１４７】
位置7の修飾

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、位置7におけるアミノ酸修飾を持つ、修飾された配列番号:1を含む。幾つかの局面において、配列番号:1の位置7におけるアミノ酸(Thr)は、大きな脂肪族アミノ酸、例えばIle、Leu、Ala等により置換される。このような修飾は、該グルカゴン類似体のGLP-1レセプタにおける活性を大幅に減じるものと考えられている。

【０１４８】

位置15の修飾

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、安定性を改善する、位置15におけるアミノ酸修飾を有する、修飾された配列番号:1を含む。幾つかの局面において、配列番号:1の位置15におけるアミノ酸は、欠失状態にあるかまたはグルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸で置換されている。このような修飾は、長期間に渡り、特に酸性またはアルカリ性バッファー、例えば5.5～8なる範囲のpHのバッファー中で、前記類似体の劣化または開裂を低減する。幾つかの態様において、この修飾を含む該グルカゴン類似体は、25℃にて24時間後に、元の類似体の少なくとも75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%を維持する。

【０１４９】

位置16の修飾

一態様によれば、増強された力価を有し、かつ場合により改善された溶解性および安定性を持つ、グルカゴンの類似体が提供される。一態様において、増強されたグルカゴンおよびGLP-1力価は、自然のグルカゴン(配列番号:1)の16位におけるアミノ酸修飾によってもたらされる。非-限定的な例として、このような増強された力価は、位置16における天然産のセリンを、グルタミン酸または4原子相当の長さの側鎖を持つ他の負に帯電したアミノ酸、あるいはまたグルタミン、ホモグルタミン酸、またはホモシステイン酸、もしくは少なくとも一つのヘテロ原子(例えばN、O、S、P)を含みかつ約4(または3-5)原子相当の側鎖長さの側鎖を持つ、帯電したアミノ酸の何れか一つで置換することにより与えられる。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、位置16におけるSerの、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、スレオニンまたはグリシンからなる群から選択されるアミノ酸による置換を含む、修飾された配列番号:1を含む。幾つかの局面において、位置16における該セリン残基はグルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸およびホモシステイン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換されている。幾つかの特定の局面において、位置16における該セリン残基は、グルタミン酸またはその保存的置換体(例えば、エキセンディン-4アミノ酸)により置換されている。

【０１５０】

もう一つの態様において、前記グルカゴン類似体は、位置16におけるSerを、ThrまたはAIBまたは上記の如き他のα-ヘリックス活性化アミノ酸で置換することによって修飾された、配列番号:1の修飾配列を含む。幾つかの態様において、該α-ヘリックス活性化アミノ酸は、j+3またはi+4におけるアミノ酸と共に非-共有結合性の分子内架橋を形成する。

【０１５１】

位置17-18の修飾

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は修飾された配列番号:1を含み、ここでは、位置17および18におけるその二塩基性Arg-Argサイトが排除されている。如何なる特定の理論にも拘るつもりはないが、幾つかの態様における該二塩基性サイトの排除は、該グルカゴン類似体のインビボでの効力を改善するものと考えられる。幾つかの局面において、該グルカゴン類似体は、この点に関連して、配列番号:1の位置17および18におけるアミノ酸の一方または両方を、塩基性アミノ酸以外のアミノ酸、例えば脂肪族アミノ酸で置換することにより修飾される。幾つかの態様において、位置17または18におけるアミノ酸の一つは欠失しているか、あるいはこれら位置17および18の間に1個のアミノ酸が挿入されている。幾つかの態様において、位置17におけるArgは、ここに記載したような他のアミノ酸、例えばGln、親水性部分を含むアミノ酸、α-ヘリックス活性化アミノ酸で置換されている。幾つかの態様において、該α-ヘリックス活性化アミノ酸は、j+3またはi+4におけるアミノ酸と共に非-共有結合性の分子内架橋を形成する。幾つかの態様において、該位置18におけるArgは、ここに記載した如き他のアミノ酸で置換されている。例示的な局面において、該位置18におけるアミノ酸は、α,α-ジ置換アミノ酸、例えばAIBである。幾つかの局面において、該位置18におけるアミノ酸は、Ala等の小さな脂肪族アミノ酸である。幾つかの特定の態様において、該位置18におけるアミノ酸は、Ala等の小さな脂

肪族アミノ酸であり、かつ該位置17におけるArgは未修飾の状態を維持している。

【０１５２】

位置20の修飾

前記GLP-1レセプタにおける増強された活性は、また位置20におけるアミノ酸修飾によっても与えられる。幾つかの態様において、位置20におけるグルタミンは、上記の如く、AIB等のα-ヘリックス活性化アミノ酸により置換されている。幾つかの態様において、該α-ヘリックス活性化アミノ酸は、j-3またはi-4におけるアミノ酸と共に非-共有結合性の分子内架橋を形成する。幾つかの特定の態様において、該アミノ酸は、帯電しているか、あるいは水素-結合形成能を持ち、かつ少なくとも約5(または約4-6)原子に相当する長さの側鎖を有する親水性アミノ酸、例えばリジン、シトルリン、アルギニン、またはオルニチンであり、また該アミノ酸は、場合により位置16におけるもう一つのα-ヘリックス活性化アミノ酸、例えば負に帯電したアミノ酸と共に塩橋を形成する。幾つかの特定の局面におけるこのような修飾は、Glnの脱アミド化を介して起る分解を低減し、また幾つかの態様においては、前記グルカゴン類似体の前記GLP-1レセプタにおける活性を高める。幾つかの局面において、該位置20におけるアミノ酸はGluまたはLysまたはAIBである。

【０１５３】

位置21、23、24および28における修飾

幾つかの態様において、位置21および/または位置24は、α-ヘリックス活性化アミノ酸で置換することにより修飾される。幾つかの態様において、該α-ヘリックス活性化アミノ酸は、j-3またはi-4におけるアミノ酸と共に非-共有結合性の分子内架橋を形成する。幾つかの局面において、該α-ヘリックス活性化アミノ酸はAIBである。

例示的な態様において、前記位置23におけるアミノ酸はIleである。

例示的な態様において、前記位置28におけるアミノ酸は、AIB等のα,α-ジ置換アミノ酸である。

【０１５４】

帯電したC-末端

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、該類似体のC-末端部分に帯電したアミノ酸を導入するアミノ酸置換および/または付加によって修飾される。幾つかの態様において、このような修飾は安定性および溶解性を高める。ここにおいて使用する用語「帯電(した)アミノ酸」または「帯電(した)残基」とは、生理的pH条件下にある水性溶液において、負に帯電した(即ち、脱プロトン化された)または正に帯電した(即ち、プロトン化された)側鎖を含むアミノ酸を意味する。幾つかの局面において、帯電アミノ酸修飾部を導入するこれらアミノ酸置換および/または付加は、配列番号:1の位置27に対するC-末端位置におけるものである。幾つかの態様において、1、2または3個(および幾つかの例においては、3個を越える)の帯電アミノ酸は、該C-末端部分(例えば、位置27に対するC-末端位置)内に導入される。幾つかの態様によれば、位置28および/または29における自然のアミノ酸は、帯電アミノ酸によって置換され、および/または更なる態様においてはまた、1～3個の帯電アミノ酸が該類似体のC-末端に付加される。例示的な態様において、1，2または全ての該帯電アミノ酸は負に帯電したものである。幾つかの態様における該負に帯電したアミノ酸はアスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、またはホモグルタミン酸である。幾つかの局面において、これらの修飾は溶解度を高め、例えば25℃にて24時間後に測定した場合に、約5.5～8なる範囲の与えられたpH、例えばpH 7において、自然のグルカゴンに対して、少なくとも2-倍、5-倍、10-倍、15-倍、25-倍、30-倍またはそれ以上の溶解度を与える。

【０１５５】

C-末端の切捨て

幾つかの態様によれば、本明細書において記載したグルカゴン類似体は、1または2個のアミノ酸残基だけ、そのC-末端を切り捨てることにより修飾される。このような修飾されたグルカゴンペプチドは、ここにおいて示したように、前記グルカゴンレセプタおよびGLP-1レセプタにおける同様な活性および力価を維持している。この点に関連して、該グル

カゴン類似体は、場合によりここに記載した付随的な修飾の何れかを伴う、前記自然のグルカゴン類似体(配列番号:1)のアミノ酸配列1～27または1～28を含むことができる。

【０１５６】

電荷-中性C-末端

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は修飾された配列番号:1を含み、ここでそのC-末端アミノ酸のカルボン酸基は、電荷に関して中性な基、例えばアミドまたはエステルで置換されている。如何なる理論にも拘るつもりはないが、幾つかの局面におけるこのような修飾は、前記GLP-1レセプタにおける該グルカゴン類似体の活性を高める。従って、幾つかの態様において、該グルカゴン類似体はアミド化ペプチドであり、結果としてそのC-末端残基は、アミノ酸のα-カルボキシレートの代わりにアミドを含んでいる。ここで使用するような、ペプチドまたは類似体に対する一般的な言及は、修飾されたアミノ末端、カルボキシ末端、またはアミノおよびカルボキシ末端両者を持つペプチドを包含することを意図する。例えば、該末端カルボン酸基の代わりにアミド基を含むアミノ酸連鎖は、標準的なアミノ酸を示すアミノ酸配列により包含されることを意味する。

【０１５７】

その他の修飾

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、付随的にまたは更に以下のようなアミノ酸修飾を含む：

(i) 位置2におけるSerのAlaによる置換；

(ii) 位置10におけるTyrのValまたはPheまたはTrpによる置換；

(iii) 位置12におけるLysのArgによる置換；

(iv) 位置17におけるArgの、Glnまたは小さな脂肪族アミノ酸、例えばAla、または大きな脂肪族アミノ酸、例えばIleによる置換；

(v) 位置18におけるArgの、小さな脂肪族アミノ酸、例えばAla、またはイミダゾール-含有アミノ酸、例えばHisによる置換；

(vi) 位置19におけるAlaの、正に帯電したアミノ酸、例えばGlnによる置換；

(vii) 位置23におけるValのIleによる置換；および

(viii) 位置29におけるThrの、GlyまたはGlnによる置換。

【０１５８】

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体の安定性は、例えばロイシンまたはノルロイシンによる置換を通して、位置27におけるメチオニンを修飾することによって増大する。このような修飾は、酸化的分解の低減を可能とする。安定性も、例えばAla、Ser、ThrまたはAIBにより置換による、位置20または24または28におけるGlnの修飾によって高めることができる。このような修飾は、Glnの脱アミド化により起る分解の低減を可能とする。安定性は、位置21におけるAspの、例えばGlu等の他の酸性残基での置換による修飾によって高めることができる。このような修飾は、Aspの脱水により起る分解を減じ、結果として環式サクシンイミド中間体の生成、これに伴うイソアスパルテートへの異性化を起こすことができる。

【０１５９】

幾つかの態様において、ここに記載するグルカゴン類似体は、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、ホスホリル化、エステル化、N-アセチル化、例えばジスルフィド架橋を介する環化、または塩への転化(例えば、酸付加塩、塩基付加塩)、および/または場合によるダイマー化、マルチマー化、または重合、または複合化される。

例えば、グルカゴンレセプタ活性を増大または低下する修飾、およびGLP-1レセプタ活性を高める修飾を含むここに記載された任意の修飾は、独立にまたは組合せで適用することができる。GLP-1レセプタ活性を高める修飾の組合せは、単独で行われた任意のこのような修飾よりも高いGLP-1活性を与えることができる。

【０１６０】

例示的な態様

本開示は、自然なヒトグルカゴンの構造と類似する構造を含み、かつ自然のヒトグルカ

ゴンに比して増強された前記GLP-1レセプタにおけるアゴニスト活性を示すペプチドを提供する。通常、グルカゴンは、自然なGLP-1の該GLP-1レセプタにおける活性の約1％を有し、一方でGLP-1は、通常前記グルカゴンレセプタにおける自然なグルカゴンの活性の約0.01％未満を持つ。従って、本開示によるこれらのペプチドは、該GLP-1レセプタにおける自然のGLP-1の活性の1％を越える活性を示す。例示的な態様において、本開示に係るこれらのペプチドは、該GLP-1レセプタにおける自然なGLP-1の活性の約5％またはこれを越え、約10％またはこれを越え、約15％またはこれを越え、約20％またはこれを越え、約25％またはこれを越え、約30％またはこれを越え、約35％またはこれを越え、約40％またはこれを越え、約45％またはこれを越え、約50％またはこれを越え、約55％またはこれを越え、約60％またはこれを越え、約65％またはこれを越え、約70％またはこれを越え、約75％またはこれを越え、約80％またはこれを越え、約85％またはこれを越え、約90％またはこれを越え、約95％またはこれを越える値を示す。例示的な局面において、本開示に係る該ペプチドは、自然なGLP-1の値よりも高い、該GLP-1レセプタにおける活性を示す。従って、例示的な局面において、本開示に係る該ペプチドは、該GLP-1レセプタにおける自然なGLP-1の活性の、約100％またはそれを越える活性を示す。例示的な局面において、本開示に係る該ペプチドは、該GLP-1レセプタにおける自然のGLP-1の活性の、約150％またはこれを越える、約200％またはこれを越える、約250％またはこれを越える、約300％またはこれを越える、約350％またはこれを越える、約400％またはこれを越える、約450％またはこれを越える、約500％またはこれを越える、約550％またはこれを越える、約600％またはこれを越える、約650％またはこれを越える、約700％またはこれを越える、約750％またはこれを越える、約800％またはこれを越える、約850％またはこれを越える、約900％またはこれを越える、約950％またはこれを越える、約1,000％またはこれを越える値を示す。

【０１６１】

例示的な態様において、前記ペプチドは配列番号:12のアミノ酸配列を含む。

【０１６２】

例示的な態様において、前記ペプチドは配列番号:13のアミノ酸配列を含む。

【０１６３】

例示的な態様において、前記ペプチドは配列番号:14のアミノ酸配列を含む。

【０１６４】

例示的な態様において、前記ペプチドは配列番号:15のアミノ酸配列を含む。

【０１６５】

例示的な態様において、前記ペプチドは配列番号:16のアミノ酸配列を含み、かつ前記GIPレセプタと比較して、少なくとも100-倍の前記ヒトGLP-1レセプタに対する選択性を示す。

【０１６６】

例示的な態様において、前記ペプチドは配列番号:17のアミノ酸配列を含む。

【０１６７】

本開示は、更に本明細書において開示したペプチドの一つのアミノ酸配列に高度に類似する、アミノ酸配列を含む変異ペプチドをも提供する。例示的な態様において、本開示に係る該変異ペプチドは、配列番号:12～17の何れかのペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸1～29に対して、少なくとも80％、85％、90％または95％等価な、アミノ酸配列を含み、ここで該変異ペプチドは、前記GLP-1レセプタ、グルカゴンレセプタ、およびGIPレセプタにおける親ペプチドの活性を維持しており(例えば、該GIPレセプタと比較して、少なくとも100-倍の前記ヒトGLP-1レセプタに対する選択性を示す)、また場合により少なくとも1％なるGLP-1力価を示し、あるいはここで該GIPレセプタにおける該ペプチドのEC50値は、該GLP-1レセプタにおけるそのEC50値とは100-倍未満異なっている。例示的な態様において、本開示に係る該ペプチドは、該GIPレセプタと比較して、少なくとも100-倍の該ヒトGLP-1レセプタに対する選択性を示す。

【０１６８】

例示的な態様において、本開示に係る前記変異ペプチドは、本開示に係るペプチドのアミノ酸配列を基本とするアミノ酸配列を含むが、位置1、位置2、位置3、位置7、位置10、位置12、位置15、位置16、位置17、位置18、位置20、位置21、位置23、位置24、位置27、位置28、位置29を含むがこれらに限定されない、1またはそれ以上のアミノ酸位置において異なっている。例示的な局面において、該変異ペプチドは、その親ペプチドに対して保存的な置換を含むことができ、ここに記載したアミノ酸修飾の何れかを含むことができ、あるいは前記自然なグルカゴンの配列(配列番号:1)における該当位置に存在するアミノ酸に戻すような、アミノ酸修飾を含むことができる。例示的な局面において、本開示に係る該変異ペプチドは、本開示に係るペプチドのアミノ酸配列を基本とするアミノ酸配列を含むが、以下に列挙する点の1またはそれ以上において異なっている：

a) 該変異ペプチドは、アシル化アミノ酸またはアルキル化アミノ酸を含む；

b) アシル化アミノ酸またはアルキル化アミノ酸は、該当位置において自然なグルカゴン(配列番号:1)の対応するアミノ酸により置換され、または該自然なアミノ酸の保存的な置換、および場合により新たなアシル化またはアルキル化が、異なる位置において導入されており；

c) 該変異ペプチドは、親水性部分に共有結合されたアミノ酸を含み；

d) 親水性部分に共有結合されたアミノ酸は、該当位置において自然なグルカゴン(配列番号:1)の対応するアミノ酸により置換されており、また場合により親水性部分に共有結合された新たなアミノ酸が、異なる位置において導入されており；

e) 該変異ペプチドのC-末端アミノ酸は、C-末端α-カルボキシレートの代わりにC-末端アミドを含み；

f) 位置1～29の何れかにおけるアミノ酸は、該当位置において自然なグルカゴン(配列番号:1)の対応するアミノ酸により置換されており；または

g) これらの任意の組合せ。

【０１６９】

上記変異ペプチドの何れかに関連して、例示的な態様においては、該変異ペプチドは、位置16、17、21、24、29、C-末端拡張部分内の位置、または該C-末端におけるアミノ酸に対して共有結合している親水性部分を含む。例示的な局面において、該変異ペプチドは、親水性部分に共有結合しているCys、Lys、Orn、ホモシステインまたはAc-Pheを含み、場合によりここで、該Cys、Lys、Orn、ホモシステインおよびAc-Pheは、該変異ペプチドの位置16、17、21、24、29、C-末端拡張部分内の位置、または該C-末端に位置している。例示的な局面において、該親水性部分はポリエチレングリコールである。

【０１７０】

例示的な局面において、前記変異ペプチドは、場合により、位置10においてアシル化またはアルキル化されたアミノ酸を含む。例示的な局面において、該変異ペプチドは、C8～C20アルキル鎖、C12～C18アルキル鎖、あるいはC14またはC16アルキル鎖を含む、アシル化またはアルキル化されたアミノ酸を含む。例示的な局面において、該変異ペプチドは、アシル化またはアルキル化された上記式I、上記式IIまたは上記式IIIのアミノ酸である、アシル化またはアルキル化されたアミノ酸を含み、場合によりここで、該式Iのアミノ酸はLysである。

【０１７１】

例示的な局面において、本開示に係るペプチドは、アシル化またはアルキル化されたアミノ酸を含み、ここで該アシル基またはアルキル基は、スペーサを介して該アミノ酸に共有結合されており、場合によりここで、該スペーサはアミノ酸またはジペプチドである。例示的な態様において、該スペーサは、1またはそれ以上の酸性残基を含む。

【０１７２】

上記例示的な態様の何れかにおいて、本開示の何れかに係るペプチドまたは変異ペプチドは、約20またはそれ未満なる(例えば、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.25、0.10、0.05、0.025、0.01、0.001)、比：(前記グルカゴンレセプタにおけるEC50)/(前記GLP-1レセプタにおけるEC50)を示す。

【０１７３】
上記例示的な態様の何れかにおいて、本開示の何れかに係る前記ペプチドまたは変異ペプチドは、約20を越える(例えば、21、25、30、40、50、60、70、80、90、100、250、500、750、1000、またはそれ以上)比：(前記グルカゴンレセプタにおけるEC50)/(前記GLP-1レセプタにおけるEC50)を示す。
【０１７４】
上記例示的な態様の何れかにおいて、本開示の何れかに係る前記ペプチドまたは変異ペプチドは、前記グルカゴンレセプタにおけるEC50値よりも2-倍～10-倍大きな(例えば、3-倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍)、前記GLP-1レセプタにおけるEC50値を示す。
【０１７５】
除外(排除)
例示的な態様において、上記ペプチドの何れか一つは、ここに記載されるグルカゴン類似体から排除されるが、前記所望のGLP-1またはコ-アゴニスト活性を示す、上記ペプチドの何れかであって、これに対してここに記載したような1またはそれ以上の更なる修飾を含む該ペプチド、医薬組成物、キットおよびこのような化合物を用いた治療方法を、本発明に含めることができる：[Arg12]置換およびC-末端アミドを持つ配列番号:1のペプチド；[Arg12、Lys20]置換およびC-末端アミドを持つ配列番号:1のペプチド；[Arg12、Lys24]置換およびC-末端アミドを持つ配列番号:1のペプチド；[Arg12、Lys29]置換およびC-末端アミドを持つ配列番号:1のペプチド；[Glu9]置換を持つ配列番号:1のペプチド；[Glu9、Glu16、Lys29]置換およびC-末端アミドを持ち、His1が失われた配列番号:1のペプチド；[Glu9、Glu16、Lys29]置換およびC-末端アミドを持つ配列番号:1のペプチド；ラクタム架橋を介して結合した[Lys13、Glu17]置換およびC-末端アミドを持つ配列番号:1のペプチド；ラクタム架橋を介して結合した[Lys17、Glu21]置換およびC-末端アミドを持つ配列番号:1のペプチド；ラクタム架橋を介して結合した[Glu20、Lys24]置換を持ち、His1が失われた配列番号:1のペプチド。幾つかの態様において、上記グルカゴン類似体は、2009年2月19日付で出願され、2010年8月26日付でWO 2010/096052として公開された国際特許出願PCT/US2009/034448；2009年12月18日付で出願され、2010年8月26日付でWO 2010/096142として公開された国際特許出願PCT/US2009/068678；2009年6月16日付で出願され、2009年12月23日付でWO 2009/155258として公開された国際特許出願PCT/US2009/047438；2008年2月13日付で出願され、2008年8月21日付でWO 2008/101017として公開された国際特許出願PCT/US2008/053857；2010年12月9日付で出願された、国際特許出願PCT/US2010/059724；2009年6月16日付で出願され、2010年1月28日付でWO2010/011439として公開された国際特許出願PCT/US2009/047447；2010年6月16日付で出願され、2010年12月23日付でWO2010/148089として公開された国際特許出願PCT/US2010/38825；2011年1月26日付で出願された、国際特許出願PCT/US2011/022608；および2010年12月22日付で出願された米国仮特許出願第61/426,285号の何れかにおいて記載されている何れのペプチドでもない。これら公知文献全体を参考としてここに組入れるものとする。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、位置29後方のC-末端に結合した配列：KRNRNNIAの全てまたはその一部、例えばKRNRを含むことはない。
【０１７６】
本開示の前記グルカゴン類似体は、当分野において公知の方法によって得ることができる。ペプチドを合成するデノボの適当な方法は、例えばChan等，Fmoc固相ペプチド合成(Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis)，オックスフォードユニバーシティプレス(Oxford University Press)刊，英国、オックスフォード(Oxford, United Kingdom)，2005；「ペプチドおよびタンパク質薬物分析(Peptide and Protein Drug Analysis)」，Reid，R.編，マルセルデッカー社(Marcel Dekker，Inc.)刊，2000；「エピトープマッピング(Epitope Mapping)」，Westwood等編,オックスフォードユニバーシティプレス(Oxford University Press)刊，英国、オックスフォード(Oxford, United Kingdom)，2000；および米国特許第5,449,752号において記載されている。
【０１７７】

同様に、本開示に係る類似体が、如何なる非-コード化または非-天然産のアミノ酸をも含まない例において、前記グルカゴン類似体は、標準的な組換え法を利用し、該類似体のアミノ酸配列をコードする核酸を使用して、組換えによって製造することができる。これについては、例えばSambrook等，モレキュラークローニング：アラボラトリーマニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)．第3版，コールドスプリングハーバープレス(Cold Spring Harbor Press)刊，コールドスプリングハーバー(Cold Spring Harbor)，NY 2001；およびAusubel等，分子生物学における今日のプロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)，グリーンパブリッシングアソシエーツ＆ジョンウイリー＆サンズ(Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons)刊，NY，1994を参照のこと。

【０１７８】

幾つかの態様においては、本開示に係るグルカゴン類似体を単離する。幾つかの態様においては、本開示に係る前記グルカゴン類似体を精製する。「純度」とは相対的な用語であって、必ずしも絶対的な純度または絶対的な富化または絶対的な選別として解釈すべきではない。幾つかの局面において、該純度とは、少なくともまたは約50%であり、少なくともまたは約60%であり、少なくともまたは約70%であり、少なくともまたは約80%であり、または少なくともまたは約90%(例えば、少なくともまたは約91%、少なくともまたは約92%、少なくともまたは約93%、少なくともまたは約94%、少なくともまたは約95%、少なくともまたは約96%、少なくともまたは約97%、少なくともまたは約98%、少なくともまたは約99%)であり、または約100%である。

【０１７９】

幾つかの態様において、ここに記載されるペプチドは、様々な会社、例えばシンペプ(Synpep)社(ダブリン(Dublin)，CA)、ペプチドテクノロジーズ社(Peptide Technologies Corp.)(ガイザースバーグ(Gaithersburg)，MD)、およびマルチプルペプチドシステムズ(Multiple Peptide Systems)社(サンジエゴ(San Diego)，CA)によって工業的に合成されている。この点に関連して、これらペプチドは、合成、組換え、単離および/または精製することができる。

【０１８０】

複合体

本発明は、更にヘテロロガス部分と結合した本明細書に記載のグルカゴン類似体を1種またはそれ以上含有する複合体をも提供する。ここで、該複合体は、自然のグルカゴンと比較して、前記GLP-1レセプタにおける増強された活性を示し、また前記GIPレセプタに比して、少なくとも100-倍を越える前記一GLP-1レセプタに対する選択性を示す。ここで使用する用語「ヘテロロガス部分(heterologous moiety)」とは、「複合(接合)部分」なる用語と同義であり、またここに記載されたグルカゴン類似体とは異なる任意の分子(化学的または生化学的な、天然産または非-コード化分子)を意味する。ここに記載された類似体の何れかと結合し得る複合部分の例は、ヘテロロガスペプチドまたはポリペプチド(例えば、血漿タンパク質を含む)、標的剤、免疫グルブリンまたはそのタンパク質(例えば、可変領域、CDR、またはFc領域)、診断用ラベル、例えば放射性同位元素、発蛍光団または酵素系ラベル、水溶性ポリマーを包含するポリマー、または他の治療用または診断用薬剤を含むが、これらに限定されない。幾つかの態様において、本発明の類似体および血漿タンパク質を含有する複合体が提供され、ここで該血漿タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、フィブリノーゲンおよびグロブリンからなる群から選択される。幾つかの態様において、該複合体の血漿タンパク質部分は、アルブミンまたはトランスフェリンである。幾つかの態様における該複合体は、1種またはそれ以上の本明細書に記載のグルカゴン類似体および1種またはそれ以上の、ペプチド(これはここに記載のグルカゴンおよび/またはGLP-1レセプタに対して活性なグルカゴン類似体とは別異のものである)、ポリペプチド、核酸分子、抗体またはそのフラグメント、ポリマー、量子ドット、小分子、毒素、診断薬、炭水化物、アミノ酸を含む。

【０１８１】

幾つかの態様において、前記ヘテロロガス部分は、ここに記載したグルカゴンおよび/

またはGLP-1レセプタに対して活性なグルカゴン類似体とは別異のペプチドであり、また前記複合体は、融合タンパク質またはキメラペプチドである。幾つかの態様において、該ヘテロロガス部分は、1-21個のアミノ酸からなるペプチド拡張部分である。特定の態様において、該拡張部分は、前記グルカゴン類似体のC-末端、例えば位置29におけるアミノ酸に結合している。

【０１８２】

幾つかの特定の局面において、前記拡張部分は、単一のアミノ酸またはジペプチドである。特定の態様において、該拡張部分は、帯電したアミノ酸(例えば、負に帯電したアミノ酸(例えば、Glu)、正に帯電したアミノ酸)、親水性部分を含むアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸を含む。幾つかの局面において、該拡張部分は、Gly、Glu、Cys、Gly-Gly、Gly-Gluである。

【０１８３】

幾つかの態様において、前記拡張部分は配列番号:9(GPSSGAPPPS)、配列番号:10(GGPSSGAPPPS)、配列番号:8(KRNRNNIA)、または配列番号:11(KRNR)のアミノ酸配列を含む。特定の局面において、該アミノ酸配列は、前記グルカゴン類似体のC-末端アミノ酸、例えば位置29におけるアミノ酸を介して結合している。幾つかの態様において、配列番号:13-16のアミノ酸配列は、ペプチド結合を介して該グルカゴン類似体の位置29のアミノ酸に結合している。幾つかの特定の態様において、該グルカゴン類似体の位置29におけるアミノ酸はGlyであり、該Glyは、配列番号:8-11のアミノ酸配列の一つと融合されている。

【０１８４】

幾つかの態様において、前記ヘテロロガス部分はポリマーである。幾つかの態様において、該ポリマーは、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレンおよびその誘導体(ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキサイド、ポリアルキレンテレフタレート（polyalkylene terepthalate）を含む)、アクリル酸およびメタクリル酸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)、およびポリ(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)およびポリビニルピロリドンを包含する)、ポリグリコライド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそのコポリマー、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、およびセルロース硫酸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(エチレンオキサイド)、およびポリ(エチレンテレフタレート)を含む)、およびポリスチレンからなる群から選択される。

【０１８５】

幾つかの局面において、前記ポリマーは生分解性ポリマーであり、該生分解性ポリマーは、合成生分解性ポリマー(例えば、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ(無水物)、ポリ(o-エーテル)、ポリウレタン、ポリ(酪酸)（poly(butic acid)）、ポリ(バレリアン酸)、およびポリ(ラクチド-co-カプロラクトン))、および天然の生分解性ポリマー(例えば、アルギネートおよびデキストランおよびセルロースを包含するポリサッカライド)、コラーゲン、その化学的誘導体(例えば、アルキル、アルキレン等の化学基の置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、および当業者により慣例的に行われている他の修飾(変性)による)、アルブミンおよび他の親水性タンパク質(例えば、ゼインおよび他のプロラミン)、および疎水性タンパク質並びにこれらの任意のコポリマーおよび混合物を含む。一般的

に、これらの材料は、酵素を用いた加水分解またはインビボでの水への暴露により、表面または本体の侵食、腐食によって分解する。

【０１８６】

幾つかの局面において、前記ポリマーは、生体接着性ポリマー、例えばH.S. Sawhney, C.P. Pathak & J.A. HubbellのMacromolecules, 1993, 26, 581-587における文献(該文献の教示をここに組入れる)に記載されている生体内分解性(bioerodible)ヒドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ(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)、およびポリ(オクタデシルアクリレート)である。

【０１８７】

幾つかの態様において、前記ポリマーは水溶性ポリマーまたは親水性ポリマーである。ここにおいては、親水性ポリマーは、更に「親水性ポリマー」と題する項目において説明される。適当な水溶性ポリマーは当分野において公知であり、例えば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；クルセル(Klucel))、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC；メトセル(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(エトセル(Ethocel))、ヒドロキシエチルセルロース、様々なアルキルセルロースおよびヒドロキシアルキルセルロース、様々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、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、カルシウムカルボキシメチルセルロース、酢酸ビニル/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、マレイン酸無水物/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およびカルシウム、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-co-マレイン酸無水物、カルボキシメチルアミド、カリウムメタクリレート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、ポリエチレンオキサイド、およびこれらの誘導体、塩、およびこれらの組合せを含む。

【０１８８】

特定の態様において、前記ポリマーは、ポリアルキレングリコールである。後者は、例えばポリエチレングリコール(PEG)を含む。

【０１８９】

幾つかの態様において、前記ヘテロロガス部分は炭水化物である。幾つかの態様において、該炭水化物は単糖(例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース)、二糖(例えば、スクロース、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(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。

【０１９０】

幾つかの態様において、前記ヘテロロガス部分は脂質である。該脂質は、幾つかの態様において、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、モノ-、ジ-、トリ-置換グリセロール)、グリセロリン脂質(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)、スフィンゴ脂質(例えば、スフィンゴシン、セラミド)、ステロール脂質(例えば、ステロイド、コレステロール)、プレノール脂質、サッカロリピド(saccharolipid)、またはポリケチド、オイル、ワックス、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。

【０１９１】
幾つかの態様において、前記ヘテロロガス部分は非-共有結合性または共有結合性の結合を介して、本開示に係る前記類似体に結合している。幾つかの態様において、該ヘテロロガス部分はリンカーを介して本開示に係る前記類似体に結合している。この結合は、共有結合性化学結合、物理的な力、例えば静電力、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、または疎水性または親水性相互作用によって実現される。様々な非-共有結合性カップリング系を使用することができ、該カップリング系は、ビオチン-アビジン、リガンド/レセプタ、酵素/基質、核酸/核酸結合性タンパク質、脂質/脂質結合性タンパク質、細胞接着性分子の相手、または相互にアフィニティーを示す、任意の結合相手またはそのフラグメントを含む。

【０１９２】
幾つかの態様における前記グルカゴン類似体は、該類似体の標的アミノ酸残基と、これら標的アミノ酸の選択された側鎖またはN-またはC-末端残基と反応し得る有機誘導体化剤との反応により、直接的な共有結合を介して複合体部分と結合する。該類似体または複合体部分における反応性の基は、例えばアルデヒド基、アミノ基、エステル基、チオール基、α-ハロアセチル基、マレイミド基またはヒドラジノ基を含む。誘導体化剤は、例えばマレイミドベンゾイルスルホサクシンイミドエステル(システイン残基を介して結合)、N-ヒドロキシサクシンイミド(リジン残基を介して結合)、グルタルアルデヒド、コハク酸無水物または当分野において公知の他の薬剤を含む。あるいはまた、該複合体部分は、中間的な担体、例えば多糖またはポリペプチド担体を介して間接的に該類似体に結合することができる。多糖担体の例はアミノデキストリンを含む。適当なポリペプチド担体の例は、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、これらのコポリマー、およびこれらアミノ酸と得られる担持担体に所望の溶解性を与えるための他のアミノ酸、例えばセリンとの混合ポリマーを含む。

【０１９３】
システイニル残基は、最も一般的にα-ハロアセテート(および対応するアミン)、例えばクロロ酢酸、クロロアセタミドと反応して、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を与える。また、システイニル残基は、ブロモトリフルオロアセトン、α-ブロモ-β-(5-イミドゾイル（imidozoyl）)プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロマーキュリベンゾエート、2-クロロマーキュリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

【０１９４】
ヒスチジル残基は、5.5-7.0なる範囲のpHにて、ジエチルピロカーボネートとの反応により誘導体化される。というのは、この試薬が、該ヒスチジル側鎖に対して比較的特異性が高いからである。p-ブロモフェナシルブロミドも有用であり、該反応は、好ましくはpH 6.0にて0.1Mナトリウムカコジレート溶液中で行われる。

【０１９５】
リジニルおよびアミノ-末端残基を、コハク酸無水物または他のカルボン酸無水物と反応させる。これら試薬による誘導体化は、該リジニル残基の電荷を反転させる効果を有する。α-アミノ含有残基を誘導体化するのに適した他の試薬はイミドエステル、例えばメチルピコリンイミダート、ピリドオキサールホスフェート、ピリドオキサール、クロロボロハイドライド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソウレア、2,4-ペンタンジオンを含み、またグリオキシル酸とのトランスアミナーゼ接触反応をも含む。

【０１９６】
アルギニル残基は、1種または数種の従来の試薬、中でも特にフェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサンジオン、およびニンヒドリンとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、そのグアニジン官能基の高いpKa値の故に、該反応をアルカリ条件下で行う必要がある。その上、これらの試薬はリジンの基並びに該

アルギニンのε-アミノ基と反応する可能性がある。

【０１９７】

チロシル残基の特定の修飾は、特に興味深いことに、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応により、チロシル残基にスペクトル標識を導入することにより行うことができる。最も一般的には、N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを使用して、それぞれO-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体を形成する。

【０１９８】

カルボキシル側基(アスパルチル又はグルタミル)は、カルボジイミド(R-N=C=N-R')(ここでRおよびR'は異なるアルキル基である)、例えば1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドとの反応により選択的に修飾される。更に、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によって、アスパラギニルおよびグルタミニル残基に転化される。

【０１９９】

その他の修飾は、ピロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のホスホリル化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化(T.E. Creighton,「タンパク質：構造および分子特性(Proteins: Structure and Molecular Properties)」, W.H.フリーマン社(W.H. Freeman & Co.), サンフランシスコ(San Francisco), pp. 79-86 (1983))、アスパラギンまたはグルタミンの脱アミド化、N-末端アミンのアシル化、および/またはC-末端カルボン酸基のアミド化またはエステル化を含む。

【０２００】

もう一つの型の共有結合性修飾は、前記類似体に対して、化学的にまたは酵素学的にグリコシドをカップリングすることを含む。糖を、(a) アルギニンおよびヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) 遊離スルフヒドリル基、例えばシステインの該当する基、(d) 遊離ヒドロキシル基、例えばセリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンの該当する基、(e) 芳香族残基、例えばチロシンまたはトリプトファンの該当する基、または(f) グルタミンのアミド基に結合することができる。これらの方法は、1987年9月11日付で公開されたWO87/05330およびAplin & Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【０２０１】

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、該類似体のアミノ酸の側鎖とヘテロロガス部分との間の共有結合を介して該ヘテロロガス部分に結合される。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、位置16、17、21、24、または29、C-末端拡張部分内の位置、または該C-末端アミノ酸、またはこれらの位置の組合せにおけるアミノ酸の側鎖を介して、ヘテロロガス部分に結合される。幾つかの局面において、ヘテロロガス部分と共有結合により結合された該アミノ酸(例えば、ヘテロロガス部分を含むアミノ酸)はCys、Lys、Orn、ホモ-Cys、またはAc-Pheであり、また該アミノ酸の側鎖はヘテロロガス部分に共有結合により結合されている。

【０２０２】

幾つかの態様において、前記複合体はリンカーを含み、該リンカーは前記グルカゴン類似体と前記ヘテロロガス部分とを結合している。幾つかの局面において、該リンカーは1～約60個なる範囲の原子からなる連鎖、または1～約30原子相当またはそれ以上、2～5原子、2～10原子、5～10原子または10～20原子相当の長さの連鎖を含む。幾つかの態様において、該連鎖の原子は全て炭素原子である。幾つかの態様において、該リンカーの主鎖中の連鎖構成原子はC、O、NおよびSからなる群から選択される。連鎖構成原子およびリンカーは、より溶解性の高い複合体を与えるように、その予想される溶解性(親水性)に従って選択することができる。幾つかの態様において、該リンカーは、酵素または他の触媒または標的組織または器官または細胞において見られる加水分解条件により開裂に付される官能基を与える。幾つかの態様において、該リンカーの長さは、立体障害の可能性を減じる

のに十分に長い。該リンカーが共有結合またはペプチジル結合しており、また該複合体がポリペプチドである場合、この複合体全体は融合タンパク質である。このようなペプチジルリンカーは、任意の長さのものであり得る。例示的なリンカーは、その長さにおいて約1～50個のアミノ酸に相当し、またその長さにおいて5～50，3～5，5～10、5～15、または10～30個のアミノ酸に相当する。あるいはまた、このような融合タンパク質は、当業者には公知の方法、即ち組換え遺伝子技術によって製造することができる。

【０２０３】

複合体：Fc融合

上述の如く、幾つかの態様においては、前記類似体は、免疫グロブリンまたはその部分(例えば、可変領域、CDR、またはFc領域)と結合、例えば融合される。既知の型の免疫グロブリン(Ig)はIgG、IgA、IgE、IgDまたはIgMを含む。該Fc領域は、Ig重鎖のC-末端領域であり、これはFcレセプタに対する結合を担っており、該レセプタは、例えば再利用(これは長い半減期をもたらす)、抗体依存性細胞-媒介細胞毒性(ADCC)、および補体依存性細胞毒性(CDC)等の活性を履行する。

【０２０４】

例えば、幾つかの定義によれば、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226乃至該重鎖のC-末端に渡って伸びている。「ヒンジ領域」は、一般的にヒトIgG1のGlu216からPro230まで広がっている(他のIgGイソタイプのヒンジ領域は、システイン結合に関与しているシステインを整列させることにより、該IgG1配列と揃えることが可能である)。IgGのFc領域は、2つの定常ドメインCH2およびCH3を含む。ヒトIgG Fc領域の該CH2ドメインは、通常アミノ酸231からアミノ酸341まで広がっている。ヒトIgG Fc領域の該CH3ドメインは、通常アミノ酸342からアミノ酸447まで広がっている。免疫グロブリンまたは免疫グロブリンフラグメントのアミノ酸の番号付け、または領域について成される言及は、全てKabat等，1991,「免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」,米国公衆衛生局(U.S. Department of Public Health)，Md，ベテスダ(Bethesda，Md)に基いている。関連する態様において、該Fc領域は、1種またはそれ以上の、CH1以外の免疫グロブリンの重鎖由来の自然のまたは修飾された定常領域、例えばIgGおよびIgAのCH2およびCH3領域、またはIgEのCH3およびCH4領域を含むことができる。

【０２０５】

適当な複合体部分は、FcRn結合サイトを含む、免疫グロブリン配列の部分を含有する。FcRn、即ちサルベージ(再利用)レセプタは、免疫グロブリンを再利用し、またこれらを血液循環に戻す役割を担っている。該FcRnレセプタに結合している、IgGの該Fc部分の領域は、X-線結晶構造解析法(Burmeister等，1994，Nature，372:379)に基いて説明されている。該Fcと該FcRnとの主な接触領域は、上記CH2およびCH3ドメインの接合部近傍にある。Fc-FcRn接触は、全て単一のIg重鎖内にある。上記主な接触サイトは、該CH2ドメインのアミノ酸残基248、250-257、272、285、288、290-291、308-311、および314および該CH3ドメインのアミノ酸残基385-387、428、および433-436を含む。

【０２０６】

幾つかの複合体部分は、FcγR結合サイトを含んでいても、また含まなくてもよい。FcγRは、ADCCおよびCDCを担っている。FcγRと直接接触する該Fc領域内の位置の例は、アミノ酸234-239(下部ヒンジ領域)、アミノ酸265-269(B/Cループ)、アミノ酸297-299(C'/Eループ)、およびアミノ酸327-332(F/Gループ)(Sondermann等，Nature，406: 267-273，2000)である。IgEの下部ヒンジ領域も、該FcRI結合に含まれている(Henry等，Biochemistry，36，15568-15578，1997)。IgAレセプタ結合に関与している残基は、Lewis等の文献(J Immunol.，175:6694-701，2005)に記載されている。IgEレセプタ結合に関与しているアミノ酸残基は、Sayers等の文献(J. Biol. Chem.，279(34):35320-5，2004)に記載されている。

【０２０７】

アミノ酸修飾は、免疫グロブリンのFc領域に対して行うことができる。このような変異Fc領域は、該Fc領域のCH3ドメインにおける少なくとも一つのアミノ酸修飾(残基342-447)

および/または該Fc領域のCH2ドメインにおける少なくとも一つのアミノ酸修飾(残基231-341)を含む。FcRnに対する高いアフィニティーを付与するものと考えられる変異は、T256A、T307A、E380A、およびN434A(Shields等，2001，J．Biol．Chem.，276:6591)を含む。他の変異は、FcRnに対するアフィニティーを大幅に減じることなしに、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIBおよび/またはFcγRIIIAに対する該Fc領域の結合を減じることを可能とする。例えば、該Fc領域の位置297におけるAsnのAlaまたは別のアミノ酸による置換は、高度に保存されたN-グリコシル化サイトを除去し、また低い免疫原性と共に、随伴する延長された該Fc領域の半減期、並びに低いこれらのFcγRに対する結合性をもたらす(Routledge等，1995，Transplantation，60:847；Friend等，1999，Transplantation，68:1632；Shields等，1995，J．Biol．Chem.，276:6591)。IgG1の位置233-236におけるアミノ酸修飾がなされ、これは、これらFcγRに対する結合性を低下する(Ward & Ghetie，1995，Therapeutic Immunology，2:77およびArmour等，1999，Eur．J．Immunol.，29:2613)。幾つかの例示的なアミノ酸置換は、米国特許第7,355,008号および同第7,381,408号に記載されている。これら米国特許各々の内容全体を参考としてここに組入れる。

【０２０８】

複合体：親水性部分

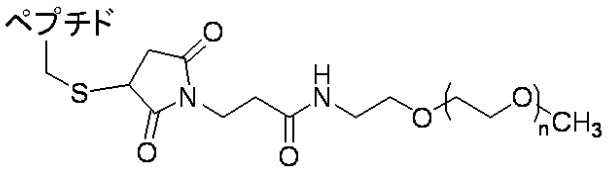
本明細書に記載したグルカゴン類似体は、生理的pHにおける水性溶液に対する溶解度およびそこでの安定性を改善するために更に修飾し、一方で自然のグルカゴンに比較して高い生物学的活性を維持することが可能である。親水性部分、例えばPEG基を、タンパク質と活性化されたポリマー分子とを反応するのに使用される任意の適当な条件下で、前記類似体と結合することができる。当分野において公知の任意の手段を使用することができ、そのような手段は、アシル化、還元的アルキル化、ミカエル(Michael)付加、チオールアルキル化を介する方法、または該PEG部分上の反応性の基(例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、α-ハロアセチル、マレイミドまたはヒドラジノ基)を介する、上記標的化合物上の反応性の基(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、マレイミドまたはヒドラジノ基)に対する、その他の化学選択的接合/結合法を含む。該水溶性ポリマーを1種またはそれ以上のタンパク質に結合するのに使用することのできる活性化用の基は、制限なしに、スルホン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフラート、トレシレート、アジジリン（azidirine）、オキシラン、5-ピリジルおよびα-ハロゲン化アシル基(例えば、α-ヨード酢酸、α-ブロモ酢酸、α-クロロ酢酸)を含む。還元的アルキル化によって該類似体に結合させた場合、選択された該ポリマーは、重合度が制御されるように、単一の反応性アルデヒド基を持つべきである。これについては、例えばKinstler等，Adv．Drug．Delivery Rev.，54：477-485（2002）；Roberts等，Adv．Drug Delivery Rev.，54：459-476（2002）；およびZalipsky等，Adv．Drug Delivery Rev.，16：157-182（1995)を参照のこと。

【０２０９】

特定の局面において、チオールを持つ前記類似体のアミノ酸残基は、PEG等の親水性部分で修飾される。幾つかの態様において、該チオール基は、ミカエル(Michael)付加反応においてマレイミド-活性化PEGで修飾されて、以下に示すようなチオエーテル結合を含むペグ化類似体を与える：

【０２１０】

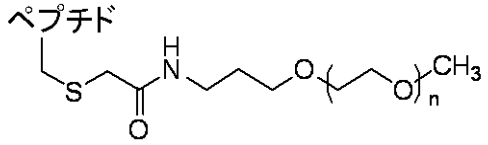
【化９】



【０２１１】

幾つかの態様において、前記チオールは求核置換反応においてハロアセチル-活性化PEGで修飾されて、以下に示すようなチオエーテル結合を含むペグ化類似体を与える：

【０２１２】
【化１０】



【０２１３】
適切な親水性部分はポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、POG)、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール(POG)、ポリオキシアルキレン、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、モノメトキシポリエチレングリコール、モノ(C1-C10)アルコキシ-またはアリールオキシ-ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリアセタール、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキソラン、エチレン/マレイン酸無水物コポリマー、ポリ(β-アミノ酸)(ホモポリマーまたはランダムコポリマーの何れか)、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(propropylene)グリコールホモポリマー(PPG)および他のポリアルキレンオキサイド、ポリプロピレンオキサイド/エチレンオキサイドコポリマー、コロン(colonic)酸または他の多糖ポリマー、フィコール(Ficoll)またはデキストランおよびこれらの混合物を含む。デキストランは、専らα1-6結合によって結合した、グルコースサブユニットからなる多糖ポリマーである。デキストランは、多くの分子量範囲、例えば約1kD～約100kDなる範囲、または約5、10、15、または20kD乃至約20、30、40、50、60、70、80または90kDなる範囲の分子量を持つものとして入手できる。線状または分岐したポリマーが意図されている。得られる複合体の製剤は、本質的に単分散または多分散の製剤であり得、また類似体当たり約0.5、0.7、1、1.2、1.5または2なるポリマー部分を持つことができる。
【０２１４】
幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、該類似体のアミノ酸の側鎖と親水性部分との間で、共有結合を介して該親水性部分と結合している。幾つかの態様において、該グルカゴン類似体は、位置16、17、21、24または29、C-末端拡張部分内の位置、または該C-末端アミノ酸、またはこれら位置の組合せにおける該アミノ酸の側鎖を介して親水性部分に結合している。幾つかの局面において、親水性部分に共有結合している該アミノ酸(例えば、親水性部分を含むアミノ酸)はCys、Lys、Orn、ホモ-CysまたはAc-Pheであり、また該アミノ酸の側鎖は、親水性部分(例えば、PEG)に共有結合している。
【０２１５】
複合体：rPEG
幾つかの態様において、本開示に係る複合体は、補助(副)類似体と融合して、グルカゴンおよび/またはGLP-1アゴニスト活性を持つ前記類似体を含み、該補助類似体は、国際特許出願公開WO2009/023270および米国特許出願公開US20080286808に記載されているもの等の、化学的PEG(例えば、組換えPEG(rPEG)分子)と類似する、拡張された配座の形成を可能とする。幾つかの局面における該rPEG分子は、1またはそれ以上のグリシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンまたはプロリンを含むポリペプチドである。幾つかの局面において、該rPEGはホモポリマー、例えばポリグリシン、ポリセリン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリアラニンまたはポリプロリンである。その他の態様において、該rPEGは、2つの型の繰返しアミノ酸を含み、例えばポリ(Gly-Ser)、ポリ(Gly-Glu)、ポリ(Gly-Ala)、ポリ(Gly-Asp)、ポリ(Gly-Pro)、ポリ(Ser-Glu)等である。幾つかの局面において、該rPEGは、3つの異なる型のアミノ酸を含み、例えばポリ(Gly-Ser-Glu)である。特定の局面において、該rPEGは、前記グルカゴンおよび/またはGLP-1アゴニスト類似体の半減期を増大する。幾つかの局面において、該rPEGは、正味の正電荷または正

味の負電荷を含む。幾つかの局面における該rPEGは、第二の構造を欠いている。幾つかの態様において、該rPEGは、その長さにおいて10に等しいかまたはこれを越える数のアミノ酸に相当し、また幾つかの態様においては、その長さは約40～約50なる範囲の数のアミノ酸に相当する。幾つかの局面における上記補助ペプチドは、ペプチド結合またはプロテイナーゼ開裂サイトを介して、本開示に係る該類似体のN-またはC-末端に融合されており、あるいは本開示に係る該類似体のループ内に挿入されている。幾つかの局面における該rPEGは、アフィニティータグを含み、あるいは5kDを越えるPEGに結合されている。幾つかの態様において、該rPEGは、本開示に係る該類似体に高い流体力学的半径、血清半減期、プロテアーゼ抵抗性、または溶解度を付与し、また幾つかの局面において、該rPEGは、該類似体に低い免疫原性を付与する。

【０２１６】

複合体：マルチマー

本発明は、更にここに記載の類似体のマルチマーまたはダイマーをも提供し、これはホモ-またはヘテロ-マルチマーまたはホモ-またはヘテロ-ダイマーを包含する。2またはそれ以上の該類似体を、当業者には公知の標準的な結合剤および手順を用いて、一緒に結合することができる。例えば、ダイマーは、特にシステイン、リジン、オルニチン、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニン残基で置換されている該類似体に対しては、二官能性チオール架橋剤および二官能性アミン架橋剤の使用により、2つのペプチド同士の間で形成することができる。該ダイマーはホモダイマーであり得、あるいはまた、該ダイマーはヘテロダイマーであり得る。幾つかの態様において、これら2つ(またはそれ以上)の類似体を連結しているリンカーは、5kDのPEG、20kDのPEG等のPEGである。幾つかの態様において、該リンカーはジスルフィド結合である。例えば、該ダイマーの各モノマーは、Cys残基(例えば、末端または内部に位置するCys)を含むことができ、また各Cys残基の硫黄原子は、該ジスルフィド結合の生成に関与している。幾つかの局面において、該モノマーは、末端アミノ酸(例えば、N-末端またはC-末端)を介して、内部のアミノ酸を介して、または少なくとも一つのモノマーの末端アミノ酸および少なくとも一つの他のモノマーの内部アミノ酸を介して、連結されている。特定の局面において、該モノマーは、N-末端アミノ酸を介して連結されてはいない。幾つかの局面において、上記マルチマーのモノマーは、一緒に尾-尾配向で結合しており、ここでは各モノマーのC-末端アミノ酸が一緒に結合されている。

【０２１７】

薬剤組成物、使用およびキット

塩

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、製薬上許容される塩等の塩の形状にある。ここで使用する用語「製薬上許容される塩」とは、化合物の塩であって、その親化合物の生物学的活性を維持するものであり、かつ生物学的にまたはその他の点で望ましからぬもののではない。このような塩は、該類似体の最終的な単離および精製中に、現場で調製することができ、あるいは別途に遊離塩基性官能基と適当な酸とを反応させることにより製造し得る。ここに記載する化合物の多くは、アミノ基および/またはカルボキシル基またはこれらに類似する基の存在により、酸および/または塩基塩を形成し得る。

【０２１８】

製薬上許容される酸付加塩は、無機および有機酸から製造することができる。代表的な酸付加塩は、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、クエン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、硫酸水素塩、ナトリウム硫酸水素塩、酪酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、ジグルコネート、グリセロリン酸塩、ヘミサルフェート、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、フマル酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩(イソチオネート)、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、シュウ酸塩、パルミトエート、ペクチネート、パースルフェート、3-フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、リン酸塩、グルタミ

ン酸塩、重炭酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、およびウンデカン酸塩を含むがこれらに限定されない。無機酸由来の塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等との酸付加塩を含む。有機酸由来の塩は、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマール酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等との酸付加塩を含む。製薬上許容される酸付加塩を製造するのに使用し得る酸の例は、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、およびリン酸等の無機酸、並びにシュウ酸、マレイン酸、コハク酸およびクエン酸等の有機酸を含む。

【０２１９】

また、塩基付加塩は、サリチル酸源の最終的な単離および精製中に、現場で調製することができ、あるいはカルボン酸-含有部分と適当な塩基、例えば製薬上許容される金属カチオンの水酸化物、炭酸塩、または重炭酸塩、あるいはアンモニアまたは有機第一、第二または第三アミンとを反応させることにより製造し得る。製薬上許容される塩は、アルカリ金属またはアルカリ土類金属、特に、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよびアルミニウム塩等に基くカチオンを含む塩、および非-毒性の四級アンモニア、およびアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアンモニウム、ジメチルアンモニウム、トリメチルアンモニウム、トリエチルアンモニウム、ジエチルアンモニウム、およびエチルアンモニウムを含むアミンカチオンの塩を含むがこれらに限定されない。塩基付加塩の生成にとって有用な代表的有機アミンは、例えばエチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペリジン、ピペラジン等を含む。有機塩基から誘導される塩は、第一、第二または第三アミンの塩を含むがこれらに限定されない。

【０２２０】

更に、塩基性窒素-含有基は、本開示の前記類似体と共に、低級アルキルハライド、例えばメチル、エチル、プロピル、およびブチルクロリド、ブロミド、およびアイオダイドとして、長鎖アルキルハライド、例えばデシル、ラウリル、ミリスチル、およびステアリルクロリド、ブロミド、およびアイオダイドとして、ベンジルおよびフェネチルブロミド等のアリールアルキルハライドおよびその他として四級化することができる。これによって、水溶性または油溶性もしくは水-または油-分散性製品が得られる。

【０２２１】

処方物

幾つかの態様によれば、薬剤組成物が提供され、ここで該組成物は、本開示に係るグルカゴン類似体または製薬上許容されるその塩、および製薬上許容される担体を含む。該薬剤組成物は、任意の製薬上許容される成分を含むことができ、該成分は、例えば酸性化剤、添加剤、吸着剤、エーロゾル噴射剤、気泡置換(air displacement)剤、アルキル化剤、固化防止剤、抗-凝固剤、抗-微生物性保存剤、酸化防止剤、防腐剤、塩基、バインダ、緩衝剤、キレート剤、被覆剤、着色剤、乾燥材、洗浄剤、希釈剤、消毒薬、崩壊剤、分散助剤、溶解促進剤、染料、緩和剤、乳化剤、エマルション安定剤、フィラー、フィルム-形成剤、香味増強剤、香味料、流動促進剤、ゲル化剤、造粒剤、湿潤剤、滑剤、粘膜接着剤、軟膏基剤、軟膏剤、油性賦形剤、有機塩基、トローチ基剤、顔料、可塑剤、研磨剤、保存剤、金属イオン封鎖剤、皮膚浸透剤、可溶化剤、溶媒、安定化剤、坐薬用基剤、表面活性剤、界面活性剤、沈殿防止剤、甘味剤、治療薬、増粘剤、張力緩和剤、毒薬(toxicity agent)、粘度-増加剤、水-吸収剤、水-混和性補助溶剤、水軟化剤または湿潤剤を含む。

【０２２２】

幾つかの態様において、前記薬剤組成物は、以下に列挙する成分の任意の1種またはその組合せを含む：アカシア、アセスルファムカリウム、アセチルトリブチルシトレート、アセチルトリエチルシトレート、寒天、アルブミン、アルコール、無水アルコール、変性アルコール、希薄アルコール、アロイリット酸、アルギン酸、脂肪族ポリエステル、アルミナ、水酸化アルミニウム、ステアリン酸アルミニウム、アミロペクチン、α-アミロース、アスコルビン酸、アスコルビルパルミテート、アスパルターム、静菌化注射用蒸留水

、ベントナイト、ベントナイトマグマ、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、安息香酸、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、ブロノポール、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチルパラベン、ブチルパラベンナトリウム、アルギン酸カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、炭酸カルシウム、サイクラミン酸カルシウム、二塩基性無水リン酸カルシウム、二塩基性脱水リン酸カルシウム、三塩基性リン酸カルシウム、プロピオン酸カルシウム、珪酸カルシウム、ソルビン酸カルシウム、ステアリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、硫酸カルシウム1/2水和物、カノラ油、カーボマー、二酸化炭素、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、β-カロチン、カラギーナン、ヒマシ油、水添ヒマシ油、カチオン性乳化ワックス、セルロースアセテート、セルロースアセテートフタレート、エチルセルロース、微晶質セルロース、粉末セルロース、珪化微晶質セルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、コレステリルアルコール、セトリミド、セチルアルコール、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、コレステロール、クロルヘキシジンアセテート、クロルヘキシジングルコネート、クロルヘキシジン塩酸塩、クロロジフルオロエタン(HCFC)、クロロジフルオロメタン、クロロフルオロカーボン(CFC)、クロロフェノキシエタノール、クロロキシレノール、コーンシロップ固形分、クエン酸無水物、クエン酸1水和物、ココアバター、着色剤、コーン油、綿実油、クレゾール、m-クレゾール、o-クレゾール、p-クレゾール、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、シクラミン酸、シクロデキストリン、デキストレート、デキストリン、デキストロース、無水デキストロース、ジアゾリジニルウレア、ジブチルフタレート、ジブチルセバケート、ジエタノールアミン、ジエチルフタレート、ジフルオロエタン(HFC)、ジメチル-β-シクロデキストリン、シクロデキストリン-型化合物、例えばカプチゾール(Captisol（登録商標）)、ジメチルエーテル、ジメチルフタレート、ジポタシウムエデンテート（dipotassium edentate）、ジソジウムエデンテート（disodium edentate）、リン酸水素二ナトリウム、ドクサートカルシウム、ドクサートカリウム、ドクサートナトリウム、ドデシルガレート、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、エデンテートカルシウムジソジウム（edentate calcium disodium）、エデト酸（edtic acid）、エグルミン(eglumine)、エチルアルコール、エチルセルロース、エチルガレート、エチルラウレート、エチルマルトール、エチルオレエート、エチルパラベン、エチルパラベンカリウム、エチルパラベンナトリウム、エチルバニリン、フルクトース、フルクトース液、粉砕フルクトース、発熱物質を含まないフルクトース、粉末化フルクトース、フマール酸、ゼラチン、グルコース、液状グルコース、飽和植物脂肪酸からなるグリセライド混合物、グリセリン、グリセリルベヘネート、グリセリルモノオレエート、グリセリルモノステアレート、自己乳化型グリセリルモノステアレート、グリセリルパルミトステアレート、グリシン、グリコール、グリコフロール、グアーガム、ヘプタフルオロプロパン(HFC)、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、高果糖液糖、ヒト血清アルブミン、炭化水素(HC)、希塩酸溶液、II型水添植物油、ヒドロキシエチルセルロース、2-ヒドロキシエチル-β-シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、イミド尿素、インジゴカルミン、イオン交換体、酸化鉄、イソプロピルアルコール、イソプロピルミリステート、イソプロピルパルミテート、等張性塩水、カオリン、乳酸、ラクチトール、ラクトース、ラノリン、ラノリンアルコール、無水ラノリン、レシチン、珪酸マグネシウムアルミニウム、炭酸マグネシウム、標準炭酸マグネシウム、無水炭酸マグネシウム、炭酸マグネシウムハイドロオキサイド、水酸化マグネシウム、ラウリル硫酸マグネシウム、酸化マグネシウム、珪酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、マグネシウムトリシリケート、無水マグネシウムトリシリケート、リンゴ酸、マルツ、マルチトール、マルチトール溶液、マルトデキストリン、マルトール、マルトース、マニトール、中鎖トリ-グリセライド、メグルミン、マントール、メチルセルロース、メチルメタクリレート、メチルオレエート、メチルパラベン、メチルパラベンカリウム、メチルパラベンナトリウム、微晶質セルロースおよびカルボキシメチル

セルロースナトリウム、流動パラフィン(鉱油)、軽質流動パラフィン、流動パラフィンおよびラノリンアルコール、オイル、オリーブ油、モノエタノールアミン、モンモリロナイト、オクチルガレート、オレイン酸、パルミチン酸、パラフィン、ピーナッツ油、ペトロラタム、ペトロラタムおよびラノリンアルコール、薬用釉薬、フェノール、液化フェノール、フェノキシエタノール、フェノキシプロパノール、フェニルエチルアルコール、酢酸フェニル水銀、ホウ酸フェニル水銀、硝酸フェニル水銀、ポラクリリン、ポラクリリンカリウム、ポロクサマー、ポリデキストロース、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキサイド、ポリアクリレート、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリメタクリレート、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンステアレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、安息香酸カリウム、重炭酸カリウム、重亜硫酸カリウム、塩化カリウム、クエン酸カリウム、無水クエン酸カリウム、リン酸水素カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、プロピオン酸カリウム、ソルビン酸カリウム、ポビドン、プロパノール、プロピオン酸、プロピレンカーボネート、プロピレングリコール、プロピレングリコールアルギネート、プロピルガレート、プロピルパラベン、プロピルパラベンカリウム、プロピルパラベンナトリウム、プロタミン硫酸塩、ナタネ油、リンゲル液、サッカリン、サッカリンアンモニウム、サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム、サフラワー油、サポー石、血清タンパク質、ゴマ油、コロイド状シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、アルギン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、無水クエン酸ナトリウム、脱水クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、シクラミン酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、三塩基性リン酸ナトリウム、無水プロピオン酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸ナトリウム、ナトリウムデンプングリコレート、フマル酸ステアリルナトリウム亜硫酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビタンエステル(ソルビタン脂肪酸エステル)、ソルビトール、70%ソルビトール溶液、大豆油、鯨ロウ、澱粉、コーンスターチ、馬鈴薯澱粉、α-化澱粉、滅菌可能なトウモロコシ澱粉、ステアリン酸、精製ステアリン酸、ステアリルアルコール、スクロース、砂糖、圧縮用砂糖、製菓用砂糖、白糖球状顆粒、転化糖、シュガータブ(Sugartab)、サンセットイエロウ(Sunset Yellow) FCF、合成パラフィン、タルク、酒石酸、タルトラジン、テトラフルオロエタン(HFC)、テオブロマオイル、チメロサール、二酸化チタン、α-トコフェロール、トコフェリルアセテート、α-トコフェリル酸サクシネート、β-トコフェロール、δ-トコフェロール、γ-トコフェロール、トラガカンス、トリアセチン、トリブチルシトレート、トリエタノールアミン、トリエチルシトレート、トリメチル-β-シクロデキストリン、トリメチルテトラデシルアンモニウムブロミド、トリス緩衝剤、トリソジウムエデンテート（trisodium edentate）、バニリン、I型水添植物油、水、軟水、硬水、炭酸ガスを含まない水、発熱物質を含まない水、注射用水、吸入用滅菌水、注射用滅菌水、灌注用滅菌水、ワックス、アニオン性乳化ワックス、カルナウバロウ、カチオン性乳化ワックス、セチルエステルワックス、微晶質ワックス、ノニオン性乳化ワックス、坐剤用ワックス、白ロウ、黄ロウ、白色ワセリン、羊毛脂、ザンタンガム、キシリトール、ゼイン、プロピオン酸亜鉛、亜鉛塩、ステアリン酸亜鉛、あるいは「製薬用賦形剤の辞典(Handbook of Pharmaceutical Excipients)」，第三版，A.H. Kibbe (ファーマシューティカルプレス(Pharmaceutical Press)刊，ロンドン(London)，UK，2000)における任意の賦形剤。該文献の内容全体を参考としてここに組入れる。Remington’s Pharmaceutical Sciences，第16版，E.W. Martin (マックパブリッシング社(Mack Publishing Co.)刊，イーストン(Easton)，Pa.，1980)(該文献の内容全体を参考としてここに組入れる)は、製薬上許容される組成物を処方する際に使用される様々な成分およびこれらを製造するための公知技術を開示している。あらゆる公知の薬剤が該薬剤組成物と非-相溶性である場合を除き、薬剤組成物におけるその使用が、本開示において意図されている。補助的な活性成分も、該組成物に配合し得る。

【０２２３】
幾つかの態様において、上記成分は、前記薬剤組成物中に任意の濃度、例えば少なくとも濃度Aにて存在することができ、ここでAは0.0001% w/v、0.001% w/v、0.01% w/v、0.1% w/v、1% w/v、2% w/v、5% w/v、10% w/v、20% w/v、30% w/v、40% w/v、50% w/v、60% w/v、70% w/v、80% w/vまたは90% w/vである。幾つかの態様において、上記成分は該薬剤組成物中に任意の濃度、例えば高くても濃度Bにて存在することができ、ここでBは90% w/v、80% w/v、70% w/v、60% w/v、50% w/v、40% w/v、30% w/v、20% w/v、10% w/v、5% w/v、2% w/v、1% w/v、0.1% w/v、0.001% w/vまたは0.0001%である。他の態様においては、該成分は、該薬剤組成物中に任意の濃度範囲、例えば約A～約Bなる範囲の濃度にて存在し得る。幾つかの態様において、Aは0.0001%であり、かつBは90%である。

【０２２４】
前記薬剤組成物は、生理的に相溶性のpHを実現するように処方することができる。幾つかの態様において、該薬剤組成物のpHは、該処方および投与経路に依存して、少なくとも5、少なくとも5.5、少なくとも6、少なくとも6.5、少なくとも7、少なくとも7.5、少なくとも8、少なくとも8.5、少なくとも9、少なくとも9.5、少なくとも10、または少なくとも10.5で、pH 11(11を含む)までであり得る。幾つかの態様において、該薬剤組成物は、生理学的に相溶性のpHを実現するために、緩衝剤を含むことができる。該緩衝剤は、該所望のpHにて緩衝作用を発揮することのできる任意の化合物、例えばリン酸緩衝液(例えば、PBS)、トリエタノールアミン、トリス、ビシン、TAPS、トリシン、HEPES、TES、MOPS、PIPES、カコジル酸塩、MES、およびその他の化合物を含むことができる。幾つかの態様において、該緩衝液の強度は、少なくとも0.5 mM、少なくとも1 mM、少なくとも5 mM、少なくとも10 mM、少なくとも20 mM、少なくとも30 mM、少なくとも40 mM、少なくとも50 mM、少なくとも60 mM、少なくとも70 mM、少なくとも80 mM、少なくとも90 mM、少なくとも100 mM、少なくとも120 mM、少なくとも150 mMまたは少なくとも200 mMである。幾つかの態様において、該緩衝液の強度は、300 mM以下(例えば、高くても200 mM、高くても100 mM、高くても90 mM、高くても80 mM、高くても70 mM、高くても60 mM、高くても50 mM、高くても40 mM、高くても30 mM、高くても20 mM、高くても10 mM、高くても5 mM、高くても1 mM)である。

投与経路

投与経路に係る以下の議論は、例証的な態様を例示するためにのみ与えられるものであり、また本発明の範囲を何ら限定するものと理解すべきではない。

【０２２５】
経口投与に適した処方物は、(a) 液状溶液、例えば、水、塩水、またはオレンジジュース等の希釈剤中に溶解された有効量の本開示に係る類似体；(b) 各々所定量の該活性成分を、固体または顆粒として含有する、カプセル、サッシェ、錠剤、薬用ドロップおよびトローチ剤；(c) 散剤；(d) 適当な液体中に分散させた懸濁剤；および(e) 適当な乳剤からなるものであり得る。液状処方物は、希釈剤、例えば水およびアルコール、例えばエタノール、ベンジルアルコール、およびポリエチレンアルコールを含むことができ、製薬上許容される界面活性剤の添加を伴っても、またその添加を伴わなくともよい。カプセル型の処方物は、例えば界面活性剤、潤滑剤、および不活性フィラー、例えばラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、およびコーンスターチ等を含有する、通常の硬質-または軟質-シェルゼラチン型のものであり得る。錠剤型の処方物は、1種またはそれ以上の、ラクトース、スクロース、マニトール、コーンスターチ、馬鈴薯澱粉、アルギン酸、微晶質セルロース、アカシア、ゼラチン、グアーガム、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸および他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、湿潤剤、保存剤、香味料、および他の製薬上適当な賦形剤を含むことができる。薬用ドロップ型の処方物は、本開示に係る上記類似体を、香料、通常はスクロースおよびアカシアまたはトラガカンス中に含むことができ、並びに香錠は、該本開示に係る類似体を、不活性基剤、例えばゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアを含み、乳剤、ゲ

ル剤等は、更に、当分野において公知の賦形剤を含むことができる。

【０２２６】

本開示の前記類似体は、単独でまたは他の適当な成分との組合せとして、経肺投与により放出することができ、また吸入によって投与すべきエーロゾル処方物とすることも可能である。これらのエーロゾル処方物は、加圧された許容し得る噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の中に入れることができる。これらは、また非-加圧式の調剤、例えばネブライザーまたはアトマイザーで使用するための薬剤として処方することも可能である。このようなスプレイ処方物は、また粘膜に吹付けるために使用することもできる。幾つかの態様において、該類似体は、粉末ブレンドまたは微細粒子またはナノ粒子形状に処方される。適当な経肺投与処方物は、当分野において公知である。これについては、例えばQian等, Int. J. Pharm., 366: 218-220 (2009)；Adjei & Garren, Pharmaceutical Research, 7(6): 565-569 (1990)；Kawashima等, J. Controlled Release, 62(1-2): 279-287 (1999)；Liu等, Pharm. Res., 10(2): 228-232 (1993)；国際特許出願公開WO 2007/133747およびWO 2007/141411を参照のこと。

【０２２７】

腸管外投与に適した処方物は、酸化防止剤、バッファー、静菌剤、および当該処方物を意図したレシピエントの血液に対して等張性にする溶質を含むことのできる、水性および非-水性の等張性無菌注射液；懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤および保存剤を含むことのできる、水性および非-水性の無菌懸濁剤を含む。ここで使用する用語「腸管外」とは、消化管を経由するのではなく、ある他の経路、例えば皮下、筋肉内、髄膜内、または静脈内投与経路によって投薬されることを意味する。本開示に係る類似体は、製薬担体内で生理的に許容される希釈剤、例えば無菌液体または液体混合物と共に投与することができ、該希釈剤は水、塩水、水性デキストロース溶液および関連する糖溶液、アルコール、例えばエタノールまたはヘキサデシルアルコール、グリコール、例えばプロピレングリコールまたはポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、ケタール、例えば2,2-ジメチル-153-ジオキソラン-4-メタノール、エーテル、ポリエチレングリコール400、オイル、脂肪酸、脂肪酸エステルまたはグリセライド、またはアセチル化脂肪酸グリセライドと共に投与することができ、また該希釈剤は、製薬上許容される界面活性剤、例えば石鹸または洗浄剤、懸濁剤、例えばペクチン、カーボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロース、または乳化剤および他の製薬用佐剤を含んでいても、また含んでいなくてもよい。

【０２２８】

腸管外投与用処方物において使用し得るオイルは、石油由来の、動物由来の、植物由来のまたは合成オイルを含む。オイルの具体的な例は、ピーナッツ油、大豆油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ油、ペトロラタム、および鉱油を含む。腸管外投与用処方物において使用するための適当な脂肪酸は、オレイン酸、ステアリン酸、およびイソステアリン酸を含む。エチルオレエートおよびイソプロピルミリステートが、適当な脂肪酸エステルの例である。

腸管外投与用処方物において使用するのに適した石鹸は、脂肪酸のアルカリ金属、アンモニウム、およびトリエタノールアミン塩を含み、また適当な洗浄剤は、(a) カチオン性洗浄剤、例えばジメチルジアルキルアンモニウムハライド、およびアルキルピリジニウムハライド；(b) アニオン性洗浄剤、例えばアルキル、アリール、およびオレフィンスルホネート、アルキル、オレフィン、エーテル、およびモノグリセライドサルフェート、およびスルホサクシネート；(c) ノニオン性洗浄剤、例えば脂肪アミンオキサイド、脂肪酸アルカノールアミド、およびポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー；(d) 両性洗浄剤、例えばアルキル-β-アミノプロピオネート、および2-アルキル-イミダゾリン四級アンモニウム塩；および(e) これらの混合物を含む。

【０２２９】

腸管外投与用の処方物は、ユニットドーズまたはマルチドーズ用の封止容器、例えばアンプルまたはバイアルビン内に収容して提供することができ、また使用の直前に、注射の

ために水等の無菌液状賦形剤の添加のみを必要とする、凍結乾燥された状態で保存することができる。その場での注射溶液および懸濁液は、当分野において公知の類の無菌散剤、顆粒、および錠剤から調製することができる。

注射可能な処方物は、本発明に従うものである。注射可能な組成物のための効果的な製薬担体に対する要件は、当業者には周知である(例えば、調剤および調剤学の実務(Pharmaceutics and Pharmacy Practice), J.B.リッピンコット社(Lippincott Company), PA, フィラデルフィア(Philadelphia, PA), Banker & Chalmers編, pp. 238-250 (1982)、および注射可能な薬物に関するハンドブック(ASHP Handbook on Injectable Drugs), Toissel, 第4版, pp. 622-630 (1986)を参照のこと)。

【０２３０】

更に、本開示に係る類似体は、様々な塩基、例えば乳化塩基または水溶性塩基と混合することにより、直腸投与用の坐剤とすることができる。経膣投与に適した処方物は、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたはスプレイ処方として提供することができ、これらは該活性成分に加えて、当分野において適当なものとして知られているような担体等を含む。

【０２３１】

上記薬剤組成物に加えて、本開示の類似体は、封入複合体、例えばシクロデキストリン封入複合体またはリポソームとして処方可能であることが、当業者により認識されるであろう。

【０２３２】

用量

本開示の類似体は、グルカゴンレセプタ活性化作用、GLP-1レセプタ活性化作用、またはグルカゴンレセプタ/GLP-1レセプタ同時活性化作用がある役割を演じている、疾患または医学的状態を治療する上で有用であると考えられている。本開示の目的にとって、投与される本開示の該類似体の量または用量は、例えば妥当な時間枠に渡って、対象または動物において、治療または予防的な応答を行うのに十分な値であるべきである。例えば、本開示の該類似体の用量は、約1～4分間、1～4時間、あるいは1～4週間またはそれ以上の期間に渡り、例えば投与時点から5～20週またはそれ以上の期間に渡り、本明細書に記載の如く細胞からのcAMPの分泌を刺激するのに十分であり、あるいは哺乳動物の血糖値レベル、脂肪レベル、食物摂取量、または体重を低下するのに十分であるべきである。幾つかの態様において、該期間は、更に長期に渡るものであり得る。該用量は、本開示に係る特定の類似体の効力および投与すべき動物(例えば、ヒト)の状態、並びに治療すべき該動物(例えば、ヒト)の体重によって決定されるであろう。

【０２３３】

投与すべき用量を決定するための多くのアッセイが、当分野において公知である。本発明の目的にとって、各々異なる用量の該類似体が施される一群の哺乳動物の内の1種の哺乳動物に、本開示に係る該類似体の所定用量を投与した際に、血糖値レベルが低下する程度を比較することを含むアッセイが、哺乳動物に投与すべき出発用量を決定するために使用し得る。或る用量を投与した際に血糖値レベルが低下される程度は、当分野において公知の方法、例えば実施例4として本明細書において記載される方法等により検定し得る。

【０２３４】

また、本開示の類似体の用量は、本開示に係る特定の類似体の投与に伴うと思われる、あらゆる有害な副作用の存在、その特徴およびその程度によって決定されるであろう。典型的に、主治医は、各個々の患者を治療するための本開示に係る該類似体の投薬量を、様々なファクタ、例えば年齢、体重、一般的な健康状態、日常の飲食物、性別、投与しようとする本開示の類似体、投与経路、および治療すべき状態の重篤度を考慮して決定するはずである。一例として、但し本発明を限定するものではないが、本開示に係る該類似体の用量は、1日当たり、かつ治療すべき対象の体重1kg当たり約0.0001～約1g(g/kg体重/日)なる範囲、約0.0001～約0.001g/kg体重/日なる範囲、または約0.01mg～約1g/kg体重/日なる範囲の値であり得る。

【０２３５】
幾つかの態様において、前記薬剤組成物は、患者に投与するのに適した純度レベルにある、本明細書に記載された類似体の何れかを含む。幾つかの態様において、該類似体は、少なくとも約90％、約91％、約92％、約93％、約94％、約95％、約96％、約97％、約98％または約99％なる純度レベルを有し、また製薬上許容される希釈剤、担体または賦形剤を有する。幾つかの局面における該薬剤組成物は、少なくともAなる濃度にて、本開示に係る該類似体を含み、ここでAは約0.001 mg/ml、約0.01 mg/ml、約0.1 mg/ml、約0.5 mg/ml、約1 mg/ml、約2 mg/ml、約3 mg/ml、約4 mg/ml、約5 mg/ml、約6 mg/ml、約7 mg/ml、約8 mg/ml、約9 mg/ml、約10 mg/ml、約11 mg/ml、約12 mg/ml、約13 mg/ml、約14 mg/ml、約15 mg/ml、約16 mg/ml、約17 mg/ml、約18 mg/ml、約19 mg/ml、約20 mg/ml、約21 mg/ml、約22 mg/ml、約23 mg/ml、約24 mg/ml、約25 mg/mlまたはそれ以上である。幾つかの態様において、該薬剤組成物は、多くてもBなる濃度にて、該類似体を含み、ここでBは約30 mg/ml、約25 mg/ml、約24 mg/ml、約23, mg/ml、約22 mg/ml、約21 mg/ml、約20 mg/ml、約19 mg/ml、約18 mg/ml、約17 mg/ml、約16 mg/ml、約15 mg/ml、約14 mg/ml、約13 mg/ml、約12 mg/ml、約11 mg/ml、約10 mg/ml、約9 mg/ml、約8 mg/ml、約, 7 mg/ml、約6 mg/ml、約5 mg/ml、約4 mg/ml、約3 mg/ml、約2 mg/ml、約1 mg/ml、または約0.1 mg/mlである。幾つかの態様において、該組成物は、A～B mg/mlなる範囲、例えば約0.001～約30.0 mg/mlなる範囲の濃度にて類似体を含むことができる。

【０２３６】
標的形状

当業者は、本開示に係る類似体が、多数の方法の何れかで修飾することができ、結果として、本開示に係る該類似体の治療または予防的効力が、該修飾によって増大することを容易に認識するであろう。例えば、本開示に係る該類似体は、直接的にまたはリンカーを介して間接的に標的部分に結合することができる。化合物、例えばここに記載したグルカゴン類似体の標的部分への結合の実行は、当分野において公知である。これについては、例えばWadhwa等, J. Drug Targeting, 3, 111-127 (1995)および米国特許第5,087,616号を参照することができる。ここで使用する「標的部分」なる用語は、細胞-表面レセプタを特異的に識別してこれと結合する任意の分子を意味し、結果として該標的部分は、本開示に係る該類似体の放出を、表面上で該レセプタ(前記グルカゴンレセプタ、前記GLP-1レセプタ)が発現される、細胞の集団に向かわせる。標的部分は、抗体またはそのフラグメント、ペプチド、ホルモン、成長因子、サイトカイン、および細胞表面レセプタに結合する、任意の他の天然または非-天然のリガンド(例えば、上皮成長因子レセプタ(EGFR)、T-細胞レセプタ(TCR)、B-細胞レセプタ(BCR)、CD28、血小板由来の成長因子レセプタ(PDGF)、ニコチン性アセチルコリンレセプタ(nAChR)等)を含むが、これらに限定されない。ここで使用する「リンカー」とは、2つの別々の実体を相互に結び付けている結合、分子または一群の分子である。リンカーは、これら2つの実体に最適な間隔を与え、あるいは更にこれら2つの実体が相互に分離することを可能とする不安定な結合を与える。不安定な結合は、光開裂性の基、酸に対して不安定な部分、塩基に対して不安定な部分および酵素-開裂性の基を含む。幾つかの態様における該用語「リンカー」とは、本開示の類似体と上記標的部分との間に橋架けする任意の薬剤または分子を意味する。当業者は、本開示に係る該類似体の機能にとって必要とされない、該類似体上のサイトが、リンカーおよび/または標的部分を結合するための理想的なサイトであることを認識している。但し、該リンカーおよび/または標的部分が一旦本開示に係る該類似体と結合した場合には、これらは該本開示に係る類似体の機能、即ち細胞からのcAMP分泌を刺激する能力、糖尿病または肥満症を治療する能力を妨害することがないことを条件とする。

【０２３７】
制御放出型処方物

あるいはまた、ここに記載するグルカゴン類似体がこれを投与すべき身体内に放出される様式が、時間および該身体内の位置に関して調節し得るように、該類似体をデポー製剤形状に改善することが可能である(これについては、例えば米国特許第4,450,150号を参照

のこと)。本開示に係る類似体のデポー製剤形状は、例えば該類似体および多孔質または非-多孔質物質、例えばポリマーを含む体内に植込み可能な組成物であり得、ここで本発明の類似体は該物質によってカプセル化されまたは該物質全体に渡り拡散し、および/または該非-多孔質物質の分解である（and/or degradation of the non-porous material）。次いで、該デポー製剤は、該身体の所定の位置に移植され、本開示の類似体は所定の速度にて該インプラントから放出される。

【０２３８】

幾つかの態様における前記薬剤組成物は、任意の型のインビボ放出プロフィールを持つように改良される。幾つかの局面において、該薬剤組成物は、即時放出型、制御放出型、持続放出型、長期放出型、遅延放出型または二-段階放出型処方物である。制御放出用のペプチドを処方する方法は当分野において公知である。これについては、例えばQian等, J. Pharm., 374: 46-52 (2009)および国際特許出願公開WO 2008/130158、同WO2004/033036、同WO2000/032218、および同WO 1999/040942を参照することができる。

【０２３９】

本発明の組成物は、更に、例えばミセルまたはリポソーム、あるいは或る他のカプセル化された形状を含むことができ、あるいは長期に及ぶ保存効果および/または送達効果を得るために、延長放出型性剤として投与し得る。ここに開示する薬剤処方物は、例えば毎日(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日に1回、3日に1回、4日に1回、5日に1回、6日に1回、1週に1回、2週に1回、3週間毎に1回、月1回、または月2回等を含む任意の治療法式に従って投与することができる。

【０２４０】

組合せ

ここに記載するグルカゴン類似体は単独で、またはここに記載する疾患または医学的状態の何れかを治療または予防するための他の治療薬との組合せで投与することができる。例えば、ここに記載したグルカゴン類似体は、抗-糖尿病薬または抗-肥満症薬と同時-投与(同時または逐次的に)することができる。当分野において公知のまたは研究中の抗-糖尿病薬は、インシュリン、レプチン、ペプチドYY(PYY)、膵臓ペプチド(PP)、線維芽細胞増殖因子21(FGF21)、Y2Y4レセプタアゴニスト、スルホニルウレア、例えばトルブタミド(オリナーゼ(Orinase))、アセトヘキサミド(ダイメラー(Dymelor))、トラザミド(トリナーゼ(Tolinase))、クロルプロパミド(ジアビナーゼ(Diabinese))、グリピジド(グルコトロール(Glucotrol))、グルブリド(ジアベータ(Diabeta)、ミクロナーゼ(Micronase)、グリナーゼ(Glynase))、グリメピリド(アマリル(Amaryl))、またはグリクラジド(ジアミクロン(Diamicron))；メグリチニド、例えばレパグリニド(プランジン(Prandin))またはナテグリニド(スターリックス(Starlix))；ビグアニド、例えばメトホルミン(グルコファージ(Glucophage))またはフェンホルミン；チアゾリジンジオン、例えばロシグリタゾン(アバンジア(Avandia))、ピオグリタゾン(アクトス(Actos))、またはトログリタゾン(レズリン(Rezulin))、または他のPPARγ阻害剤；炭水化物の消化を阻害するα-グリコシダーゼ阻害剤、例えばミグリトール(グリセット(Glyset))、アカルボース(プレコース/グルコベイ(Precose/Glucobay))；エキセナチド(バイエッタ(Byetta))またはプラムリンチド；ジペプチジルペプチド-4(DPP-4)阻害剤、例えばビルダグリプチンまたはシタグリプチン；SGLT(ナトリウム-依存性糖輸送体1)阻害剤；グルコキナーゼ活性化物質(GKA)；グルカゴンレセプタアンタゴニスト(GRA)；またはFBPアーゼ(FBPase)(フルクトース1,6-ビスホスファターゼ)阻害剤を含む。

【０２４１】

当分野において公知のまたは研究中の抗-肥満症薬は、食欲抑制剤を包含し、以下の例を含む：フェネチルアミン型の刺激剤、フェンテルミン(場合によりフェンフルラミンまたはデキスフェンフルラミンと共に)、ジエチルプロピオン(アムフェブラモン)(テヌエート(Tenuate™))、フェンジメトラジン(プレル-2(Prelu-2™)、ボントリル(Bontril™))、ベンズフェタミン(ジドレックス(Didrex™))、シブトラミン(メリジア(Meridia™)、レダクチル(Reductil™))；リモナバント(アコンプリア(Acomplia™))、他のカンナビノイド

レセプタアンタゴニスト；オキシントモジュリン；フルオキセチン塩酸塩(プロザック(Prozac))；キネクサ(Qnexa)(トピラマートおよびフェンテルミン)、エクスカリア(Excalia)(ブプロピオン(アムフェブタモン)(bupropion)およびゾニサミド(zonisamide))またはコントレイブ(ブプロピオンおよびナルトレキソン)；またはXENICAL(オルリスタット)またはオブリーン(セチリスタット(Cetilistat))(ATL-962としても知られている)に類似するリパーゼ阻害剤、またはGT 389-255。

【０２４２】

幾つかの態様における、ここに記載のペプチドは、非-アルコール性脂肪肝疾患またはNASHを治療するための薬剤と共に、同時-投与される。非-アルコール性脂肪肝疾患を治療するのに使用される薬剤は、ウルソデオキシコール酸(a.k.a.、アクチガル(Actigall)、URSO、およびウルソジオール(Ursodiol))、メトホルミン(グルコファージ)、ロシグリタゾン(アバンジア)、クロフィブラート、ゲムフィブロジル、ポリミキシンB、およびベタインを含む。

【０２４３】

幾つかの態様における、ここに記載のペプチドは、神経組織変性症、例えばパーキンソン病を治療するための薬剤と共に、同時-投与される。抗-パーキンソン病薬は、当分野において公知であり、またその例はレボドパ、カルビドパ、抗-コリン作動薬、ブロモクリプチン、プラミペキソール、およびロピニロール、アマンタジン、およびラサギリンを含むが、これらに限定されない。

【０２４４】

上記観点から、更に、本発明は、これら他の治療薬の一種をも更に含む薬剤組成物およびキットをも提供する。該追加の治療薬は、本開示の類似体と同時にまたは逐次的に投与し得る。幾つかの局面において、該類似体は該追加の治療薬を投与する前に投与され、一方他の局面においては、該類似体は該追加の治療薬を投与した後に投与される。

【０２４５】

使用

ここに記載のグルカゴン類似体および関連する薬剤組成物は、疾患または医学的状態の治療のために有用であり、該疾患または医学的状態においては、例えば前記グルカゴンレセプタ、前記GLP-1レセプタ、またはこれら両レセプタにおける活性の欠如が、該疾患または医学的状態の発症および/または進行における一因子となっている。従って、本発明は、患者における疾患または医学的状態を治療しまたは予防する方法を提供し、該方法において、該疾患または医学的状態は、医学的状態に係るある疾患であり、該疾患においては、GLP-1レセプタ活性化および/またはグルカゴンレセプタ活性化の欠如が、該医学的状態に係る疾患の発症および/または進行と関連している。該方法は、該患者に、ここに記載したものの何れかに従う類似体を、該疾患または医学的状態を治療しまたは予防するのに有効な量にて与える工程を含む。

【０２４６】

幾つかの態様において、前記疾患または医学的状態は代謝症候群(メタボリックシンドローム)である。代謝症候群X、インシュリン抵抗性症候群またはリーベンス(Reaven's)症候群としても知られる代謝症候群は、5千万人を越える米国人が患っている病気である。代謝症候群は、典型的に少なくとも3またはそれ以上の以下の危険因子の集合によって特徴付けられる：(1) 腹部肥満(腹部におけるおよびその周辺部における過度の脂肪組織)、(2) アテローム性異常脂血症(動脈壁におけるプラークの蓄積を促進する、高トリグリセライド、低HDLコレステロールおよび高LDLコレステロール症を含む血液脂肪異常)、(3) 高血圧、(4) インシュリン抵抗性またはグルコース不耐性、(5) 血栓形成促進状態(例えば、血中の高フィブリノーゲンまたはプラスミノーゲン活性化物質阻害剤-1)、および(6) 前炎症性状態(例えば、血中の高いC-反応性タンパク質)。他の危険因子は、老化、ホルモン平衡失調および遺伝的傾向を含む可能性がある。

【０２４７】

代謝症候群は、血管におけるプラークの蓄積に関連する冠動脈性心疾患および他の疾患

、例えば発作および粥状動脈硬化性心血管疾患(ASCVD)とも呼ばれる末梢血管疾患の高い危険率と関連している。代謝症候群に罹っている患者は、その初期段階におけるインシュリン抵抗性状態から、ASCVDの更に高い危険率を持つ、重篤型IIの疾患へと進行する恐れがある。如何なる特別な理論にも拘るつもりはないが、インシュリン抵抗性、代謝症候群および血管の疾患の間の関連性は、低下されたインシュリン-刺激性血管拡張、高い酸化ストレスによるNO利用性におけるインシュリン抵抗性に関連する低下、およびアジポネクチン等の脂肪細胞-由来のホルモンにおける異常性を包含する1またはそれ以上の協同作用的な発病メカニズムと関連する可能性がある(これに関しては、Lteif & Mather, Can. J. Cardiol., 20 (別冊B):66B-76B (2004)を参照のこと)。

【０２４８】

2001ナショナルコレステロールエデュケーションプログラムアダルトトリートメントパネル(National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel：ATP III)によれば、同一の個人における以下の特徴の任意の3つが、代謝症候群に関する基準を満たす：(a) 腹部肥満(男性における102cmを越える腹囲および女性における88cmを越える腹囲)、(b) 血清トリグリセライド(150mg/dlまたはそれ以上)、(c) HDLコレステロール(男性における40mg/dlまたはそれ以下または女性における50mg/dlまたはそれ以下)、(d) 血圧(130/85またはそれ以上)、および(e) 空腹時血糖値(110mg/dlまたはそれ以上)。世界保健機構(World Health Organization：WHO)によれば、以下の基準の少なくとも2つと共に、高いインシュリンレベル(高い空腹時血糖値または高い食後血糖値単独)を持つ個人は、代謝症候群に係る基準を満たしている：(a) 腹部肥満(0.9を越えるウエスト対ヒップ比、少なくとも30kg/m^2なるボディーマス指数、または約94cm(37in)を越えるウエスト測定値)、(b) 少なくとも150mg/dlなるトリグリセライドレベル、または35mg/dl未満なるHDLコレステロール値パネル、(c) 140/90またはそれ以上の血圧、または高血圧症の治療中のもの。(これについては、(Mathur, Ruchi,「メタボリックシンドローム(Metabolic Syndrome)」, 編者：Shiel, Jr., William C., メディシンネット社(MedicineNet.com)刊, 2009年5月11日)を参照のこと)。

【０２４９】

本発明の目的にとって、ある個人が前記の2001ナショナルコレステロールエデュケーションプログラムアダルトトリートメントパネルまたは上記WHOにより示された基準の一方または両方を満たした場合、該当する個人は代謝症候群に悩まされているものと考えられる。

【０２５０】

如何なる理論にも拘るつもりはないが、ここに記載のペプチドは、代謝症候群を治療するのに有用である。従って、本発明は、ある対象における代謝症候群を治療しまたは予防し、あるいはその危険因子の1、2、3またはそれ以上を減じる方法を提供し、該方法は、該対象に、ここに記載の類似体を、代謝症候群を予防し、治療するのに有効な、またはその危険因子を減じるのに有効な量で与えることを含む。

【０２５１】

幾つかの態様において、前記方法は、高血糖性の医学的状態を治療する方法である。幾つかの局面において、該高血糖性の医学的状態は、インシュリン-依存性または非-インシュリン-依存性の何れかの、糖尿病、真性糖尿病タイプI、真性糖尿病タイプII、または妊娠糖尿病である。幾つかの局面において、該方法は、腎障害、網膜症および血管疾患を含む糖尿病の1またはそれ以上の合併症を減じることにより、該高血糖性の医学的状態を治療する。

【０２５２】

幾つかの局面において、前記疾患または医学的状態は肥満である。幾つかの局面において、該肥満は薬物誘発性肥満である。幾つかの局面において、本発明の方法は、患者における体重増を阻止または減じ、あるいは体重減を高めることにより、肥満を治療する。幾つかの局面において、該方法は、食欲を減じ、食物摂取量を減じ、該患者における脂肪レベルを低下させ、あるいは胃腸管系を通過する食物の移動速度を減じることにより、肥満

を治療する。

【０２５３】

肥満は他の疾患の発症または進行と関連しているので、前記肥満を治療する方法は、更に血管の疾患(冠動脈疾患、発作、末梢血管の疾患、虚血性再灌流等)、高血圧、糖尿病タイプIIの発症、高脂血症および筋骨格疾患を包含する、肥満と関連する合併症を減じる方法においても有用である。従って、本発明は、これらの肥満-関連合併症を治療しまたは防止する方法を提供する。

【０２５４】

幾つかの態様において、前記疾患または医学的状態は、非-アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)である。NAFLDとは、単純な脂肪肝(脂肪症)から非-アルコール性脂肪肝炎(NASH)、肝硬変(肝臓の不可逆な進行したハン痕)までの範囲に及ぶ、広い範囲に渡る肝疾患を意味する。NAFLDの全段階は、普通肝臓細胞(肝細胞)における脂肪の蓄積(脂肪浸潤)を持つ。単純脂肪肝は、炎症またはハン痕を伴うことのない、肝細胞中における、或る型の脂肪、トリグリセライドの腹部蓄積である。NASHにおいて、該脂肪の蓄積は、様々な程度の、肝臓の炎症(肝炎)およびハン痕(線維症)と関連する。該炎症性細胞は、該肝細胞を破壊(肝細胞壊死)する。該用語「脂肪肝炎」および「脂肪壊死」における、「脂肪」とは、脂肪浸潤を意味し、「肝炎」とは、肝臓における炎症を意味し、また「壊死」とは、破壊された肝臓細胞を意味する。NASHは、最終的に肝臓のハン痕(線維症)へ、次いで不可逆性の進行したハン痕(肝硬変)へと導く恐れがある。NASHによって引起される肝硬変は、該NAFLDの範囲における最後かつ重篤度の最も高い段階である(これについては、Mendler, Michel, 「脂肪肝：非-アルコール性肝疾患(NAFLD)および非-アルコール性脂肪肝炎(NASH)(Fatty Liver: Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH))」,編者：Schoenfield, Leslie J., メディシンネットコム社(MedicineNet.com)刊, 2005年8月29日を参照のこと)。

【０２５５】

アルコール性肝疾患、またはアルコール-誘発性肝疾患は、過度のアルコール消費に関連する、またはこれに起因する、以下の3つの病理学的に異なる肝疾患を含む：脂肪肝(脂肪症)、慢性または急性肝炎、および肝硬変。アルコール性肝炎は、正規でない実験室テストが、唯一の指標となっている軽度の肝炎から、合併症を伴う重篤な肝臓機能不全までの範囲内にあり、該合併症は以下に列挙するものを含む：黄疸(ビリルビンの滞留に起因する黄色の皮膚)、肝性脳症(肝機能不全に起因する神経学的機能不全)、腹水症(腹部における流体の蓄積)、出血性食道静脈瘤(食道における静脈瘤)、異常な血液凝固および昏睡。組織学的に、アルコール性肝炎は、肝細胞の風船様の拡大的衰退、好中球による炎症およびしばしばマロリー(Mallory)体(細胞媒介糸状タンパク質の異常な凝集)を伴う特徴的な外観を持つ。肝硬変は、解剖学的に、線維症と合併した肝臓において蔓延った結節によって特徴付けられる。(Worman, Howard J.,「アルコール性肝疾患(Alcoholic Liver Disease)」, コロンビア大学医療センターウエブサイト(Columbia University Medical Center website))。

【０２５６】

如何なる理論にも拘るつもりはないが、ここに記載の類似体は、アルコール性肝疾患NAFLD,またはあらゆるその病期を治療するために有用であり、ここで該肝疾患及びその病期の例は、脂肪症、脂肪肝炎、肝炎、肝臓の炎症NASH、肝硬変、またはこれらの合併症を含む。従って、本発明は、対象におけるアルコール性肝疾患NAFLD,またはあらゆるその病期の予防または治療方法を提供するものであり、該方法は、アルコール性肝疾患NAFLD,またはあらゆるその病期を予防または治療するのに有効な量で、該対象にここに記載の類似体を与えることを含む。このような治療法は、以下に列挙する状態、症状の1、2、3またはそれ以上を軽減することを含む：肝臓の脂肪含有率、肝硬変の発病または進行、肝細胞癌の発病、炎症の徴候、例えば異常な肝臓酵素レベル(例えば、アスパルテートアミノトランスフェラーゼASTおよび/またはアラニンアミノトランスフェラーゼALT、またはLDH)、高い血清フェリチン、高い血清ビリルビン、および/または線維症の徴候、例えば高いTGF

-βレベル。好ましい態様において、上記ペプチドは、単純脂肪肝(脂肪症)を越えて進行した脂肪症を患い、また炎症または肝炎の徴候を示す患者を治療するのに使用される。このような方法は、例えばASTおよび/またはALTレベルの低下をもたらす可能性がある。

【０２５７】

GLP-1およびエキセンディン-4は、或る神経保護作用を持つことが明らかにされている。本発明は、またアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋委縮性側索硬化症、他の脱髄関連疾患、老人性痴呆、皮質下性痴呆、動脈硬化症性痴呆、AIDS-関連痴呆、または他の痴呆、中枢神経系の癌、外傷性脳傷害、脊髄傷害、発作または脳虚血、脳血管炎、癲癇、ハンチントン病、トゥレット症候群、ギランバレー症候群、ウイルソン病、ピック病、神経炎症性障害、脳炎、脳髄膜炎またはウイルス、真菌または細菌起源の髄膜炎、または他の中枢神経系の感染症、プリオン疾患、小脳運動失調症、小脳変質、脊髄小脳変質シンドローム、フリードライヒ運動失調症、毛細管拡張性運動失調、脊椎筋栄養失調症(spinal dysmyotrophy)、進行性核上麻痺、ジストニー、筋肉痙性、震え、色素性網膜炎、線条体黒質退化、ミトコンドリア性脳筋症、神経細胞性セロイドリポフスチン症、肝性脳症、腎性脳症、代謝性脳症、毒素-誘発性脳症、および放射線-誘発性脳損傷を含むがこれらに限定されない神経変性疾患の治療における、ここに記載される前記グルカゴン類似体の使用をも提供する。

【０２５８】

幾つかの態様において、前記疾患または医学的状態は、低血糖症である。幾つかの態様において、患者は糖尿病患者であり、また該低血糖症はインシュリンの投与により誘発される。特定の局面において、この方法は、ここに記載の類似体を、インシュリンと共に投与し、結果として該類似体がインシュリンの丸剤投与による血糖値低下作用を緩和する工程を含む。

【０２５９】

幾つかの態様において、前記グルカゴン類似体は、病院における非-糖尿病患者に、例えば腸管外栄養補給または完全非経口栄養補給を受けている患者に対して、腸管外栄養分の投与との組合せで使用される。非-限定的な例は、外科患者、昏睡状態にある患者、消化管の病気を患う患者、あるいは機能しない胃腸管(例えば、外科的除去、遮断または損傷を受けた吸収能力による)、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃腸管の閉塞、胃腸管フィステル、急性膵臓炎、虚血性腸、大胃腸手術、幾つかの先天性胃腸管異常、長期の下痢、または外科手術に起因する短期の腸症候群、ショック状態にある患者を含み、また治癒途上にある患者は、しばしば脂質、電解質、ミネラル、ビタミンおよびアミノ酸の様々な組合せと共に、炭水化物の腸管外投与を受ける。該グルカゴン類似体および腸管外栄養組成物は、同時に、異なる時点において、相互に前後して投与することができる。但し、該グルカゴン類似体が、該腸管外栄養組成物が消化されている時点において、その所定の生物学的効果を発揮することを条件とする。例えば、該腸管外栄養分は、1日当たり1、2または3回投与することができ、一方で該グルカゴン類似体は、2日に1回、1週当たり3回、1週当たり2回、1週当たり1回、2週毎に1回、3週毎に1回、または1月当たり1回投与される。

【０２６０】

ここで使用する用語「治療(する)」および「予防(する)」並びにこれらの用語からの派生語は、必ずしも100％または完全な治療または予防を示す必要はない。寧ろ、当業者が可能な利益または治療効果を持つものとして認識するような、変動する様々な度合いの治療または予防が存在する。この点に関連して、本発明の方法は、哺乳動物における疾患または医学的状態の、任意の量での任意のレベルでの治療または予防を与えることができる。その上、本発明の方法によりもたらされる該治療または予防は、該疾患または医学的状態の1またはそれ以上の状態または症状の治療または予防を含むことができる。例えば、肥満の治療法に関連して、幾つかの態様における該方法は、患者による食物摂取量の節減または患者中の脂肪レベルの低減を実現する。同様に、本発明の目的にとって、「予防」とは、上記疾患の発症または症状もしくはその状態の遅延をも包含する。

【０２６１】

上記治療法に関連して、前記患者は任意の宿主である。幾つかの態様において、該宿主は、哺乳動物である。ここで用いる用語「哺乳動物」とは、哺乳動物類の任意の脊椎動物を意味し、その例は単孔目、有袋類、および胎盤動物群（placental taxas）を含むがこれらに限定されない。幾つかの態様において、該哺乳動物は齧歯目の哺乳動物、例えばマウスおよびハムスターおよびウサギ目（the order Logomorpha）の哺乳動物、例えばウサギの一種である。幾つかの態様において、該哺乳動物は食肉目に属するものであり、ネコ科動物(ネコ)およびイヌ科の動物(イヌ)を含む。幾つかの態様において、該哺乳動物は偶蹄目由来の動物であり、例えばウシ属(ウシ)およびブタ属(ブタ)または奇蹄目由来の動物であり、例えばウマ科の動物(ウマ)を含む。幾つかの例において、該哺乳動物は霊長類、サル目(セボイズ(Ceboids)またはシモイズ(Simoids))(サル)、または類人猿目(ヒトおよび無尾猿)の動物である。特別な態様において、該哺乳動物はヒトである。

【０２６２】

キット

本開示のグルカゴン類似体は、一態様によれば、キットの一部として与えることができる。従って、幾つかの態様においては、グルカゴン類似体、例えばグルカゴンアゴニストペプチドを、その投与を要する患者に投与するためのキットが提供され、ここで該キットは、ここに記載のグルカゴン類似体を含む。

【０２６３】

一態様において、前記キットは、患者に前記グルカゴン組成物を投与するためのデバイス、例えば注射針、ペン型デバイス、ジェット噴射器、またはその他の針を含まない注射器を備えている。あるいはまた、または更には、このキットは、1またはそれ以上の容器、例えばバイアルビン、チューブ、ビン、単一または複数のチャンバーを備え、予め充填された注射器、カートリッジ、注入ポンプ(外付けまたは移植可能な)、ジェット噴射器、予め充填されたペン型デバイス等を含み、場合により凍結乾燥された状態でまたは水性溶液としての、前記グルカゴン類似体を含む。該キットは、幾つかの態様において、使用上の指示を含む。一態様によれば、該キットのデバイスはエーロゾル計量分配デバイスであり、ここで該組成物は該エーロゾルデバイス内に事前包装されている。もう一つの態様において、該キットは注射器および注射針を含み、また一態様において、無菌グルカゴン組成物が該注射器内に事前包装されている。

【実施例】

【０２６４】

以下の実施例は、単に本発明を例証するために与えられるものであり、何ら本発明の範囲を限定する目的で与えられるのではない。

【０２６５】

実施例1

グルカゴンのペプチドフラグメントの合成

【０２６６】

材料：

【０２６７】

本明細書における実施例に記載される全てのペプチドは、特に述べない限りアミド化された。

【０２６８】

MBHA樹脂(4-メチルベンズヒドリルアミンポリスチレン樹脂)を、ペプチド合成に際して使用した。MBHA樹脂、100-180メッシュ、1%DVB-架橋ポリスチレン；0.7-1.0mM/gなる配合量、Boc-保護およびFmoc-保護アミノ酸を、ミッドウエストバイオテック(Midwest Biotech)社から購入した。Boc-保護アミノ酸を用いる固相ペプチド合成を、アプライドバイオシステム430Aペプチド合成装置(Applied Biosystem 430A Peptide Synthesizer)にて行った。Fmoc-保護アミノ酸の合成は、アプライドバイオシステムモデル433ペプチド合成装置(Applied Biosystem Model 433 Peptide Synthesizer)を使用して行った。

【０２６９】

ペプチド合成(Boc-アミノ酸/HF開裂)

【０２７０】

これらの類似体の合成は、アプライドバイオシステムモデル430Aペプチド合成装置で行った。合成ペプチドは、2mMのBoc-保護アミノ酸を含むカートリッジに対して順次アミノ酸を付加することにより構築された。具体的には、該合成は、Boc DEPBT-活性化一回カップリングを利用して実施した。該カップリング段階の終了時点において、得られるペプチジル-樹脂を、TFAで処理して、N-末端のBoc-保護基を除去した。これを、繰返しDMFで洗浄し、またこの反復サイクルを、所定数のカップリング段階に対して繰返した。ペプチドの組み立て後、側鎖保護基であるFmocを、20％のピペリジンで処理することにより除去し、またアシル化を、DICを用いて行った。該合成段階全体の終了時点における該ペプチジル-樹脂を、DMCの使用により乾燥させ、該ペプチドを、無水HFを使用して該樹脂から開裂させた。

【０２７１】

ラクタム化のために、オルト(orthogonal)保護基を、GluおよびLys(例えば、Glu(Fm)、Lys(Fmoc))に対して選択した。該保護基を除去した後であって、かつHF開裂の前に、前に記載の如く環化を行った(例えば、国際特許出願公開WO2008/101017を参照のこと)。

【０２７２】

前記ペプチジル-樹脂のHF処理

【０２７３】

該ペプチジル-樹脂を、無水HFで処理したところ、これは典型的に約350mg(約50％なる収率)の粗製脱-保護ペプチドを生成した。具体的には、該ペプチジル-樹脂(30mg～200mg)を、開裂のために、フッ化水素(HF)反応容器内に入れた。500μLのp-クレゾールを、カルボニウムイオンスキャベンジャーとして該容器に添加した。該容器を、該HF装置に取付け、またメタノール/ドライアイス混合物中に浸漬させた。該容器を真空ポンプで排気させ、また10mLのHFを蒸留し、該反応容器に導いた。該ペプチジル-樹脂およびHFからなる反応混合物を、0℃にて1時間攪拌し、その後該容器内に真空を設定し、該HFを迅速に排気させた(10-15分間)。該容器を注意して取り出し、約35mLのエーテルで満たして、該ペプチドを析出させ、かつこのHF-処理の結果生じる小分子としての有機保護基および該p-クレゾールを抽出した。この混合物を、テフロンフィルタを用いて濾過し、またこれを2度繰返して、あらゆる過剰量のクレゾールを除去した。この濾液を捨てた。該析出したペプチドは、約20mLの10％酢酸(水性溶液)に溶解する。この所望のペプチドを含むこの濾液を集め、凍結乾燥処理に掛けた。

【０２７４】

前記溶解した粗製ペプチドの分析用HPLCによる分析を、以下の条件の下で行った：[4.6X30mmエックステラ(Xterra) C8、1.50mL/分、220nm、バッファーA：0.1%TFA/10%ACN、バッファーB：0.1%TFA/100%ACN、勾配溶出：5-95%B、15分間なる期間]。該抽出液を、水で2-倍に希釈し、2.2X25cmのビダック(Vydac) C4分取型逆相カラムに投入し、ウォーターズ(Waters) HPLC装置でアセトニトリル勾配を用いて溶出させた(バッファーA：0.1%TFA/10%ACN、バッファーB：0.1%TFA/10%CANおよび流量：15.00mL/分にて120分間に渡り、0-100%Bなる勾配)。該精製されたペプチドのHPLC分析は、純度が95％を越えるものであることを明らかにし、またエレクトロスプレーイオン化質量分析を、該ペプチドの同一性を確認するのに使用した。

【０２７５】

ペプチドのアシル化

【０２７６】

アシル化ペプチドは、以下のようにして製造した。ペプチドを、CSバイオ4886ペプチド合成装置(CS Bio 4886 Peptide Synthesizer)またはアプライドバイオシステムズ430Aペプチド合成装置(Applied Biosystems 430A Peptide Synthesizer)の何れかを使用して、固体担体樹脂上で合成した。その場での中和化学作用を、Schnolzer等, Int. J. Peptide Protein Res., 40: 180-193 (1992)に記載されているように利用した。アシル化された

ペプチドに対して、アシル化すべき標的アミノ酸残基(例えば、配列番号:3のアミノ酸位置番号に対して10の位置)を、Nε-FMOCリジン残基で置換した。DMF中で30分間に及ぶ、該完全にN-末端BOC-保護されたペプチドの20％ピペリジンによる処理は、FMOC/ホルミル基を除去した。該遊離ε-アミノLys残基へのカップリングは、10-倍モル過剰のFMOC-保護スペーサアミノ酸(例えば、FMOC-Glu-OtBu)またはアシル鎖(例えば、$CH_3(CH_2)_{14}$-COOH)の何れかと、PyBOPまたはDEPBTカップリング剤とを、DMF/DIEA中でカップリングすることにより実現した。該スペーサアミノ酸のFMOC基の後の除去は、アシル鎖とのカップリングの繰返しにより行われる。100％TFAによる最終的な処理は、あらゆる側鎖保護基および該N-末端BOC基の除去をもたらした。ペプチド樹脂を5％DIEA/DMFで中和し、乾燥し、また次に0℃にて1時間に渡り、95:5のHF/p-クレゾールを用いて該支持体から開裂させた。エーテル抽出に次いで、5％HOAc溶液を使用して、該粗製ペプチドを可溶化させた。次いで、該溶液のサンプルを、ESI-MSによって分析して、正確な分子量のペプチドを含むか否かを明らかにした。この正しいペプチドを、10%CH_3CN/0.1%TFA～0.1%TFA(100%CH_3CN中)なる線形勾配を利用してRP-HPLCによって精製した。ビダックC18の22mmx250mmプロテインカラムを、この精製のために利用した。アシル化ペプチド類似体は、一般的に20:80なるバッファー比による溶出で完成した。溶出画分を一緒にプールし、分析用RP-HPLC上でその純度を調べた。純粋な画分を凍結乾燥したところ、白色の固体ペプチドを得た。

【０２７７】

ペプチドがラクタム架橋およびアシル化すべき標的残基を含む場合、アシル化は、該アミノ酸を該ペプチドの主鎖に付加する際に、上記の如く行われる。

【０２７８】

ペプチドのペグ化

【０２７９】

ペプチドのペグ化のために、40kDのメトキシポリ(エチレングリコール)ヨードアセタミド（idoacetamide）(NOF)と、等モル量のペプチドとを、該ペプチドおよびPEG両者を透明溶液となるまで溶解するに要する最少量の溶媒(一般的に、2-3mgのペプチドを使用した反応に対して2mL未満)を使用して、7Mウレア、50mMトリス-HCl(Tris-HCl)中で反応させた。室温での激しい攪拌を4-6時間に渡り行い、この反応液を、分析用RP-HPLCによって分析した。ペグ化された生成物が、短い保持期間で、該出発物質からはっきりと出現した。精製は、最初のペプチドを精製するために使用したものと類似する条件を用いて、ビダックC4カラム上で行った。溶出は、50:50なるバッファー比近傍で起った。純粋なペグ化ペプチドからなる画分を見つけ出し、これを凍結乾燥した。収率は50％以上であり、これは反応毎に変動した。

【０２８０】

マススペクトルを利用した分析

【０２８１】

標準的なESIイオン源を使用し、サイエックス(Sciex)API-IIIエレクトロスプレー四極子マススペクトロメータを用いて、マススペクトルを得た。使用したイオン化条件は以下の通りである:正-イオンモードにあるESI；イオンスプレー電圧：3.9kV；オリフィス電位：60V。使用した噴霧並びにカーテンガスは、窒素ガス流であり、その流量は0.9L/分であった。マススペクトルを、ステップ当たり0.5 Th、かつ2msecなる滞留時間にて、600-1800トムソン(Thompsons)から記録した。そのサンプル(約1mg/mL)を、1％の酢酸を含む50％水性アセトニトリル溶液中に溶解し、5μL/分なる速度にて、外付けシリンジ式ポンプによって導入した。

【０２８２】

前記ペプチドを、PBS溶液内でESI MSによって分析した際に、該ペプチドを、先ず製造業者(ミリポア社(Millipore Corporation), MA,ビレリカ(Billerica, MA)、millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737における、ワールドワイドウエブのミリポアウエブサイト(Millipore website of the world wide web)を参照のこと)により与えられた指示に従って、0.6μLのC4を含有するジップチップ(ZipTip)固体相抽出チップを用いて脱塩した。

【０２８３】
高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)分析
【０２８４】
予備分析を、これらの粗製ペプチドを用いて行って、リン酸緩衝塩水(PBS)バッファー(pH 7.2)内でのその相対的転化率の近似値を、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)およびMALDI分析を利用して得た。該粗製ペプチドサンプルを、1mg/mLなる濃度にてPBSバッファー中に溶解した。得られた溶液1mLを、1.5mL HPLCバイアルビン中に保存し、該バイアルビンを、次に封止し、37℃にてインキュベートした。100μLのアリコートを、様々な時間間隔で取出し、室温まで冷却し、HPLCで分析した。
【０２８５】
前記HPLC分析は、214nmにてUV検出器を用いて、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)装置を利用して行った。HPLC分析は、150mmx4.6mmのC18ビダックカラム上で行った。その際の流量は1mL/分であった。溶媒Aは、蒸留水中に0.1%のTFAを含むものであり、また溶媒Bは90%のCH_3CN中に0.1%のTFAを含むものであった。線形勾配(15分間で、40%～70%の溶媒B)を使用した。データを集め、ピークシンプルクロマトグラフィー(Peak Simple Chromatography)ソフトウエアを用いて分析した。
【０２８６】
加水分解の初期速度を、各プロドラッグの解離に関する速度定数を測定するために使用した。該プロドラッグおよび該薬剤の濃度は、夫々そのピーク面積から見積もった。該プロドラッグの一次解離速度定数は、様々な時間間隔にて、該プロドラッグの濃度の対数をプロットすることにより決定した。このプロットのスロープが、該速度定数「k」を与える。従って、これら様々なプロドラッグの分解に係る半減期は、以下の式：t1/2 = 0.693/kを用いて計算した。
【０２８７】
実施例2
配列番号:17のペプチドの合成
【０２８８】
このペプチド配列番号:17は、Fmoc/t-Bu化学物質を用いて、固相法により合成した。このペプチドを製造するために、0.5gの2-クロロトリチル-樹脂(100-200メッシュ、1.18mM/g)(GLバイオケム(Biochem))を、先ず0.8当量(eq.)のFmoc-Gln(Trt)-OH(乾燥DCM(ジクロロメタン)中の、アミノ酸ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)に対して4eq.)と共に2時間に渡りインキュベートすることにより誘導体化した。次いで、このペプチド配列の組立てを、ペプチドマルチ合成装置APEX396(アドバンストバイオテック(Advanced Biotech))上で行った。これらのアミノ酸全ては、DMF(N,N-ジメチルホルムアミド)中に0.5Mなる濃度にて溶解した。アシル化反応は、6-倍過剰の活性化されたアミノ酸を用いて、樹脂を含まないアミノ基について、60分間行った。二重アシル化はAib2、Aib16、Asp15、His1について行った。これらのアミノ酸は、等モル量のHATU(2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)のDMFに溶解した0.5M溶液および2-倍モル過剰のDIEA(N,N-ジイソプロピルエチルアミン)をNMP(1-メチル-2-ピロリジノン)に溶解した2M溶液により活性化した。
【０２８９】
側鎖保護基は、AspおよびGlu、Ser、ThrおよびTyrに対してはt-ブチルを；Asn、GlnおよびHisに対してはトリチルを；Lys、Trpに対してはt-ブトキシ-カルボニルを；またArgに対しては2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニルを使用し、Boc-His(Trt)-OHを合成において使用した。
【０２９０】
側鎖において誘導体化すべき、位置10におけるリジン残基は、Lys(Alloc)として組入れられる。該ペプチド組立ての終了時点において、該Alloc保護基は除去され、また該合成は、HBTU(4eq.；(O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキ

サフルオロホスフェート)、およびDIPEA(8eq.)を活性化剤として使用し、2つのγ-カルボキシグルタミン酸残基(4eq.)およびパルミチン酸(4eq.)を縮合することによって完結した。

【０２９１】

前記合成の終了時点において、該乾燥ペプチド-樹脂製品を、夫々25mLの開裂混合物、即ち88％のトリフルオロ酢酸(TFA)、5％フェノール、2％トリイソプロピルシランおよび5％の水で、室温にて2時間処理した。該樹脂を濾過し、該溶液の体積を減じ、次いで冷却したメチル-t-ブチルエーテルに加えて、該ペプチドを析出させた。遠心処理後、該ペプチドのペレットを、新鮮な冷却したメチル-t-ブチルエーテルで洗浄して、上記有機スキャベンジャーを除去した。この工程を2回繰り返した。最終的に得られたペレットを乾燥し、再度H_2O、20%アセトニトリル中に懸濁させ、凍結乾燥した。

【０２９２】

上記粗製ペプチドを、分取式ウォーターズ(Waters)エックスブリッジ(XBridge) C18(50x150mm、5μm)および溶離液(A)として0.1％TFA水溶液および溶離液(B)として0.1％TFAのアセトニトリル溶液を使用して、逆-層HPLCにより精製した。分析用UPLCを、45℃にて、ウォーターズ(Waters)のクロマトグラフィー装置上で、BEH130、C18アキティー(Aquity)、1.7μmカラム、2.1x100mm(ウォーターズ(Waters))を用い、溶媒として0.1%TFA含有H_2O(溶媒A)、および0.1%TFA含有CH_3CN(溶媒B)を使用して行った。この精製されたペプチドは、ウォーターズSQ検出器(Waters SQ Detector)で、エレクトロスプレーマススペクトル法によって特徴付けされた。

【０２９３】

実施例3

各ペプチドのcAMPを誘発する能力は、蛍のルシフェラーゼを主成分とするリポータアッセイで測定された。誘発される該cAMPの製造は、グルカゴンまたはGLP-1レセプタに結合しているグルカゴンフラグメントに直接比例する。夫々該グルカゴンまたはGLP-1レセプタおよびcAMP応答性要素に結合したルシフェラーゼ遺伝子で同時-トランスフェクションされているHEK293細胞が、このバイオアッセイのために用いられた。

【０２９４】

上記細胞は、0.25％のウシ成長血清(Bovine Growth Serum)(UT,ローガン(Logan)のハイクローン(HyClone)社)を補充した、ドゥルベコ(Dulbecco)-変性最少必須培地(CA,カールスバッド(Carlsbad)のインビトロゲン(Invitrogen)社)内で16時間培養することにより血清-欠乏状態とし、次いで96-ウエルのポリ-D-リジン被覆「バイオコート(Biocoat)」プレート(CA,サンジョーズ(San Jose)のBDバイオサイエンスズ(Biosciences)社)中で、37℃、5％CO_2条件下にて5時間に渡り、グルカゴンフラグメントを周期的に希釈しつつ、インキュベートした。このインキュベーションの終了時点において、100μLのルクライト(LucLite)発光基質試薬(MA,ウエルスレイ(Wellesley)のパーキンエルマー(Perkin Elmer)社)を各ウエルに添加した。該プレートを短期間一時的に振とうし、暗所で10分間インキュベートし、また発光量をミクロベータ(MicroBeta)-1450液体シンチレーションカウンタ(MA,ウエルスレイ(Wellesley)のパーキンエルマー(Perkin Elmer)社)で測定した。その50％有効濃度(EC50)をオリジン(Origin)ソフトウエア(MA,ノーサンプトン(Northampton)のオリジンラボ(OriginLab)社)を用いることにより計算した。

【０２９５】

実施例4

配列番号:17のペプチドのインビトロアゴニスト力価は、安定的にヒトGLP-1R、GCGRまたはGIPRを発現する、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1)を用いて測定した。該GLP-1RおよびGCGRの安定細胞系同系プールは、そのジャンプ-イン(Jump-In™)標的組込み技術を用いて、インビトロゲン(Invitrogen™)によって生成された。これに対して、該安定なCHO/GIPR細胞系を、クローンの選別のための限界希釈を伴う、古典的なクローニングおよびトランスフェクション技術(任意組込み)によって発生させた。ディスカバーRxハイサンター(DiscoveRx Hithunter™)cAMP XS+アッセイキット(カタログNo.(cat#) 90-0075L)

を使用し、キットの指示により、これらのペプチドを、これら様々な細胞系においてcAMP生産を刺激するその相対的な能力について、インビトロでテストとした。該ペプチドの50%有効濃度(EC50)を、グラフパッドプリズム4(GraphPad Prism 4)ソフトウエア(CA,サンジエゴ(San Diego)のグラフパッドソフトウエア(GraphPad Software)社)を用いて、非-線形回帰解析4-パラメータカーブ適合法に従い、ペプチド用量に対して発光値をプロットすることにより算出した。

【０２９６】

実施例5

前記配列リストに記載した如きアミノ酸配列を持つペプチドを、本質的に実施例1または2に記載の如く作成し、引続き本質的に実施例3または4において記載したように、前記グルカゴンレセプタおよびGLP-1レセプタ各々におけるインビトロアゴニスト活性についてテストした。幾つかの例においては、該GIPレセプタにおける該インビトロアゴニスト活性をもテストした。これらの結果を以下の表1に示す。

【０２９７】

【表１】

配列番号:	配列	グルカゴンレセプタにおけるEC50 (nM)	GLP-1レセプタにおけるEC50 (nM)	GIPレセプタにおける EC50 (nM)
12	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDAibRAAQDFVQWLMDTKγGlu-アミド	0.010	0.003	12.763
13	HaibQGTFTSDYSKYLDERRAaibEFVC(40K-TE PEG)WLLDTKγE-アミド	2.806	0.567	139.639
14	HsQGTFTSDK(γGlu-C16)SKYLDERAAQDFVQWLLDTKγGlu-アミド	0.003	0.003	976
15	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMornDTKQ-酸	0.006	0.005	1.901
16	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLLDTKQ-酸	0.015	0.019	1.038
17	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMNTKγGlu-アミド	0.11	0.075	> 2000

配列番号:12-16のペプチドに関するEC50の値は、実施例3の手順を利用して得た。配列番号:17のペプチドに関するEC50の値は、実施例4の手順を利用して得た。

【０２９８】

上記表1に示されているように、前記ペプチドの多くは、ナノモルまたはピコモル範囲の、前記GLP-1レセプタにおけるEC50を示す。

実施例6

食事によって誘発させた肥満(DIO)を持つマウスを、一群当たり8匹のマウスからなる群に分割し、各群の初期平均体重を測定する。各マウス群に、一定用量のペプチドまたは賦形剤コントロールを、1週間に渡り毎日皮下注射により投与する。本研究においてテストされた該ペプチドは、配列番号:12-16の配列を持つペプチドであった。該投与された用量は、テストされたペプチド各々に対して1～10nM/kgなる範囲内で変えた。体重、身体の状態、食物摂取量、および血糖値レベルを、該テスト期間全体に渡り定期的に測定した。

【０２９９】

血糖値レベルに及ぼすこれらペプチドの効果を更に良好に測定するために、db/dbマウスを用いた第二の実験を行う。この実験においては、db/dbマウスを、1群当たり8匹のマウスからなる群に分割し、各群の初期平均体重を測定する。マウスの各群に、配列配列番号:12-16の一つを持つペプチドの単一用量を皮下注射により投与する。ここで、該容量は3～30nM/kgなる範囲にある。体重、身体の状態、食物摂取量、および血糖値レベルを、前

記テスト期間全体に渡り定期的に測定した。

【０３００】

実施例7

本発明に係る幾つかのペプチドのインビボ効果を、16週間に渡り高脂肪食の摂取状態に維持し、かつ約47gなる初期体重を持たせた、食事によって誘発させた肥満(DIO)を持つマウスにおいて確認した。マウスには、賦形剤コントロールまたは一定の用量のペプチドを毎日9日間に渡り投与した。本研究においてテストした該ペプチドは、配列番号:12のペプチド、配列番号:17のペプチド、配列番号:18のペプチド、配列番号:19のペプチドを含んでいた。各ペプチドの用量は様々に変え、即ち配列番号:12、17および19のペプチド各々は、3nM/kgまたは9nM/kgの何れかの用量で投与され、一方で配列番号:18のペプチドは、1nM/kg、3nM/kgまたは9nM/kgなる用量で投与された。累積体重変化(g単位)を、該研究の夫々の日に測定し、結果を図1に示した。データは平均±SEMとして表されている。

【０３０１】

この研究においてテストされたペプチド各々は、体重-低減効果を持つことが立証された。3nM/kgまたは9nM/kgなる用量のペプチドを投与したマウスの各群は、早くも研究の1日目から、低減された体重(賦形剤-処置マウスと比較して)を示すことが立証された。本研究の第9日目に、配列番号:12を持つペプチドを3nM/kgなる用量で投与したマウスは、約5.3%なる体重減を示したが、配列番号:12を持つペプチドを9nM/kgなる用量で投与したマウスは、約29.8%なる体重減を示した。この研究の第9日目に、配列番号:17を持つペプチドを3nM/kgなる用量で投与したマウスは、約9.6%なる体重減を示し、一方で配列番号:17を持つペプチドを9nM/kgなる用量で投与したマウスは、約35.5%なる体重減を示した。この研究の第9日目に、配列番号:18を持つペプチドを3nM/kgなる用量で投与したマウスは、約12.3%なる体重減を示し、一方で配列番号:18を持つペプチドを9nM/kgなる用量で投与したマウスは、約26.8%なる体重減を示した。この研究の第9日目に、配列番号:19を持つペプチドを3nM/kgなる用量で投与したマウスは、約8.1%なる体重減を示し、一方で配列番号:19を持つペプチドを9nM/kgなる用量で投与したマウスは、約31.5%なる体重減を示した。

【０３０２】

累積体重変化に加えて、前記DIOマウスの周囲グルコースレベルを測定した。図2に示したように、配列番号:18を持つペプチドを3nM/kgまたは9nM/kgなる用量で投与したマウスは、4日目までに周囲グルコースにおける有意な減少を示すことが立証された(賦形剤投与群に対して-29% ; P<0.05)。配列番号:19を持つペプチドを9nM/kgなる用量で与えたマウスは、4日目に約40%なるグルコースレベルにおける減少(賦形剤コントロールを投与したマウス群との比較 ; P<0.05)、7日目に約39%なるグルコースレベルにおける減少(賦形剤コントロールを投与したマウス群との比較 ; P<0.05)、および9日目に約26%なるグルコースレベルにおける減少(賦形剤コントロールを投与したマウス群との比較 ; P<0.05)を示すことが立証された。

【０３０３】

配列番号:17を持つペプチドを9nM/kgなる用量で与えたマウスは、4日目および7日目に、約48%なるグルコースレベルにおける減少(賦形剤コントロールを投与したマウス群との比較 ; P<0.05)、および9日目に約45%なるグルコースレベルにおける減少(賦形剤コントロールを投与したマウス群との比較 ; P<0.05)を示すことが立証された。配列番号:17を持つペプチドを3nM/kgなる用量で与えたマウスは、7日目に約28%なるグルコースレベルにおける減少(賦形剤コントロールを投与したマウス群との比較 ; P<0.05)、および9日目に約19%なるグルコースレベルにおける減少(賦形剤コントロールを投与したマウス群との比較 ; P<0.05)を示すことが立証された。

【０３０４】

実施例8

本発明に係るペプチドのインビボにおける効果を、肥満アカゲザルにおいて、21日間に渡り毎日、賦形剤コントロール、市販品として入手し得る製品(リラグルチド(Liraglutid

e))、配列番号:20を持つペプチドまたは配列番号:17を持つペプチドを投与することにより確認した。リラグルチドは、皮下投与経路にて20μg/kgなる用量で投与し、一方配列番号:20および配列番号:17を持つペプチド各々は、皮下投与経路にて3μg/kgなる用量で投与した。全てのペプチドは、匹敵する薬物動態学的挙動(t1/2:約10時間)およびアカゲザルにおける同様な血漿タンパク質結合性(>98%)を有している。体重および食物摂取量を測定した。

【０３０５】

図3Aに示した如く、配列番号:17を持つペプチドが投与された肥満のサルは、リラグルチドおよび配列番号:20を持つペプチドを投与したサルと比較して、優れた体重減を示した(ベースラインおよび賦形剤投与群に対して-1.2kg；P<0.05))。

【０３０６】

食物摂取量における有意な低下(図3Bにおいて、ベースラインに対する%変化として表示)が、リラグルチド(-13.1±1.9%)または配列番号:17を持つペプチド(-25.7%±3.2%；リラグルチドに対してP<0.05)で処置した後に観測された。1週間のウォッシュアウトに引続き、配列番号:17を持つペプチドで処置した動物は、長期に渡る処置(28日間)中に失われた体重の殆どを取戻した。図3Aおよび3Bにおいて、データは平均値±SEMとして表示されている。賦形剤投与群に対して*P<0.05、リラグルチドに対する配列番号:17のペプチド：^P<0.05。

【０３０７】

実施例9

本発明に係るペプチドのインビボにおける効果を、16-26歳なる年齢を有し、また約22kgなる平均体重を持つ、糖尿病性アカゲザル(n=7)においてテストした。年齢16-26歳で、約22kgなる平均体重を持つ糖尿病性アカゲザル(n=7)に、賦形剤コントロール、皮下投与経路にて10μg/kgなる用量のリラグルチド、または皮下投与経路にて1μg/kgなる用量の配列番号:17を持つペプチドを、10日間に渡り投与した。

【０３０８】

この研究期間中、該動物の体重を測定したところ、これらの動物においては、該処置期間に渡り如何なる体重に対する効果も観測されなかった。

【０３０９】

各処置の終了時点において、先ず空腹時血糖値(FBG)を、食事負荷テスト(MTT)に従って測定して、糖耐性を評価した。図4に示したように、配列番号:17を持つペプチドで処置した糖尿病性のサルは、FBGを有意に低下させた(120±20対158±15mg/mL、配列番号:17のペプチド投与群対賦形剤投与群(-25%)、P<0.05；図4)。同様に、配列番号:17を持つペプチドで処置したこれらのサルは、賦形剤コントロール投与群のサルと比較して、MTT中に、改善された糖耐性を示すことを明らかにした。データは、図4において平均±SEMとして表示されている。賦形剤投与群に対して*P<0.05。

【０３１０】

本明細書において引用されている刊行物、特許出願、および特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個々にかつ具体的に、参考として組入れるべきものであることが示されており、またその内容全体が本明細書に示されている場合と同程度に、ここにおいて参考として組入れられている。

【０３１１】

本発明を説明する文脈における用語「不定冠詞(a)」、「不定冠詞(an)」および「定冠詞(the)」並びに同様な指示、言及(特に、添付した特許請求の範囲の文脈における)は、ここにおいて特に述べない限りまたは文脈により明確に否定されていない限り、単数および複数両者を含むものと解釈すべきである。特に述べない限り、上記用語「含む(comprising)」、「持つ(having)」、「包含する(including)」および「含有する(containing)」は、解放型の用語(即ち、「含むが、限定されない(including, but not limited to)」を意味する)として解釈すべきである。

【０３１２】

本明細書における範囲に関する叙述は、ここにおいて特に述べない限り、単に、該範囲内に入る各別々の値および各終点に対する個々の言及に係る略記、簡略法として役立てることを意図するものであり、また各別々の値および終点は、恰もここにおいて個々に記述されているかの如く、本明細書に組入れられる。

【０３１３】

本明細書において記載されている全ての方法は、ここにおいて特に述べられていない限り、あるいは文脈により明確に否定されていない限り、任意の適当な順序で実施することができる。ここに与えられている、任意のおよび全ての実施例の利用、または例示的な言語(例えば、「…等(such as)」)は、特に述べられていない限り、単に、本発明をより良好に解明することを意図するものであり、また本発明の範囲に制限を加えるものではない。本明細書における如何なる言語も、任意の特許請求されていない要素が、本発明の実施にとって必須のものとして示されていないものと解釈すべきではない。

【０３１４】

本発明の実施にとって、本発明者等に知られている最良の態様を含む、本発明の好ましい態様がここに記載されている。これら好ましい態様の変更は、上記説明を読んだ際に、当業者には明らかになるはずである。本発明者等は、当業者が、このような変更を適切なものとして使用することを予想しており、また本発明者等は、本発明が、個々に具体的に記載されたもの以外の方法により実施されることをも意図している。従って、本発明は、適用可能な法によって許されているように、ここに添付した特許請求の範囲において記載されている趣旨のあらゆる改良および等価なものを包含する。その上、ここにおいて特に述べられていない限り、あるいはまた文脈により明確に否定されていない限り、上記要素の任意の組合せが、そのあらゆる可能な変更において、本発明に含まれる。

【図１】

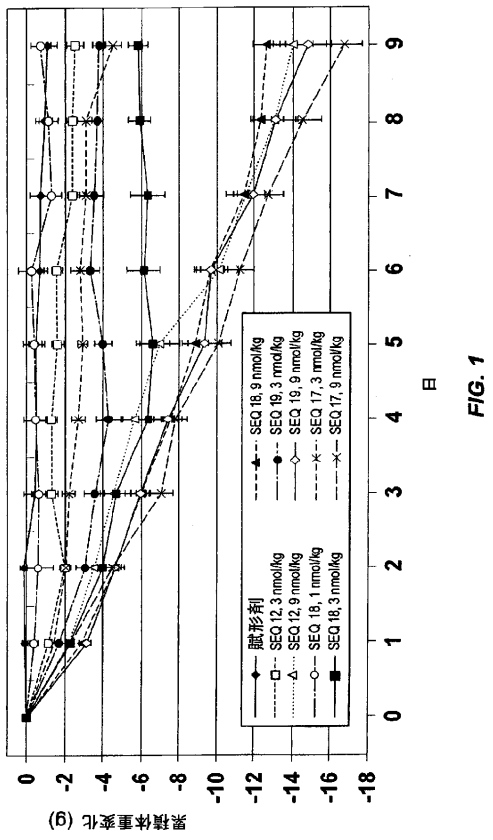


FIG. 1

【図２】

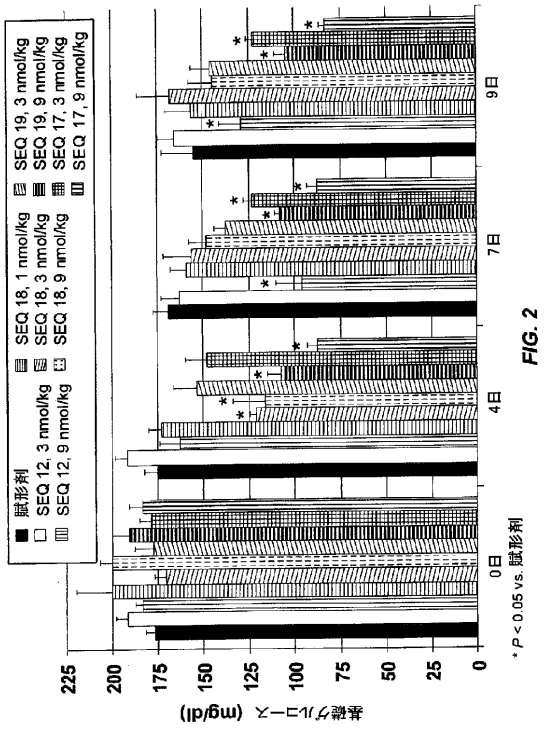
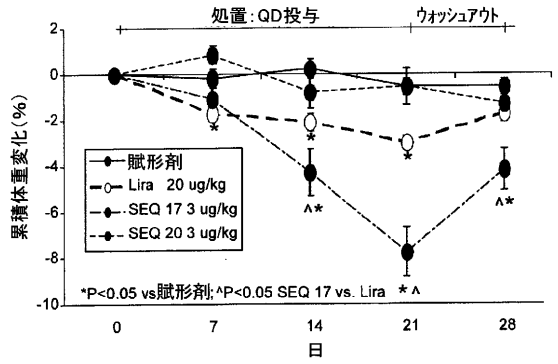


FIG. 2

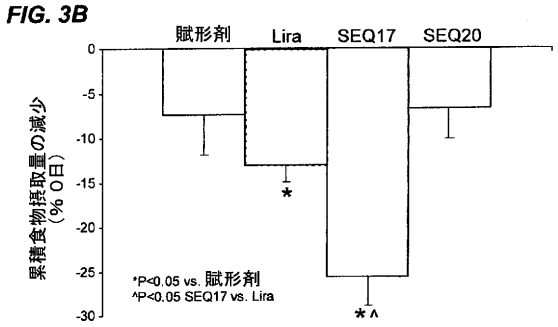
【図３Ａ】

FIG. 3A



【図３Ｂ】

FIG. 3B



【図４】

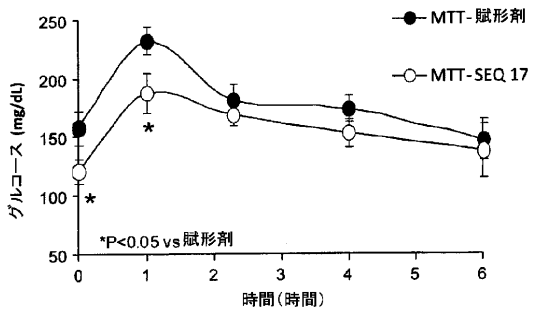


FIG. 4

【配列表】

2014525901000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/042084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/26(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/26; A61P 3/10; A61K 38/00; C07K 14/605; C07D 241/00

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

Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: acylation, alkylation, glucagon, GLP-1, GIP, activity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010-0190701 A1 (DAY et al.) 29 July 2010 See the abstract and claims 66-91.	1-11
A	WO 2009-155258 A2 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 23 December 2009 See the abstract and claims 1-50.	1-11
A	WO 2009-155257 A1 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 23 December 2009 See the abstract and claims 1-43.	1-11
A	WO 2000-042026 A1 (NOVO NORDISK et al.) 20 July 2000 See the abstract and claims 1-48.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 FEBRUARY 2013 (20.02.2013)	**21 FEBRUARY 2013 (21.02.2013)**
Name and mailing address of the ISA/KR Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. 82-42-481-3371

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/042084

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

- ☐ on paper
- ☒ in electronic form

b. time of filing or furnishing

- ☐ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/042084

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 26, 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 26 and 27 are directed to a treatment method of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 15, 19-22, 25, 27
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 15, 19-22, 25, 27 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 12-14, 16-18, 23, 24, 26, 28-30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2012/042084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0190701 A1	29.07.2010	AR 065349 A1	03.06.2009
		AU 2008-216265 A1	21.08.2008
		CA 2677932 A1	21.08.2008
		CL 4792008 A1	22.08.2008
		CN 101790538 A	28.07.2010
		CR 11028 A	29.10.2009
		EA 200901108 A1	26.02.2010
		EP 2111414 A2	28.10.2009
		EP 2487184 A1	15.08.2012
		IL 200396 D0	29.04.2010
		JP 2011-511753 A	14.04.2011
		KR 10-2009-0119876 A	20.11.2009
		MA 31242 B1	01.03.2010
		MX 2009008241 A	08.10.2009
		PA 8769301 A1	18.12.2008
		PE 01082009 A1	15.02.2009
		TW 200848423 A	16.12.2008
		WO 2008-101017 A2	21.08.2008
		WO 2008-101017 A3	18.12.2008
WO 2009-155258 A2	23.12.2009	AR 072160 A1	11.08.2010
		AU 2009-260302 A1	23.12.2009
		CA 2728284 A1	23.12.2009
		CN 102123723 A	13.07.2011
		EA 201100038 A1	30.08.2011
		EP 2300037 A2	30.03.2011
		EP 2300037 A4	06.07.2011
		IL 209750 D0	28.02.2011
		JP 2011-524419 A	01.09.2011
		MX 2010013454 A	21.01.2011
		PA 8830501 A1	27.07.2010
		PE 02552010 A1	25.04.2010
		TW 201010716 A	16.03.2010
		US 2011-257092 A1	20.10.2011
		WO 2009-155258 A3	18.02.2010
WO 2009-155257 A1	23.12.2009	AU 2009-260301 A1	23.12.2009
		CA 2727161 A1	23.12.2009
		CN 102088989 A	08.06.2011
		EP 2307037 A1	13.04.2011
		EP 2307037 A4	03.08.2011
		IL 209287 D0	31.01.2011
		JP 2011-524418 A	01.09.2011
		KR 10-2011-0039230 A	15.04.2011
		TW 201010730 A	16.03.2010
		US 2011-190200 A1	04.08.2011
WO 2000-042026 A1	20.07.2000	AU 2000-30335 A1	01.08.2000
		EP 1147094 A1	24.10.2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2012/042084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2002-534512 A	15.10.2002
		US 06927214 B1	09.08.2005

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ	*3/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/04	
Ａ６１Ｐ	*3/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/06	
Ａ６１Ｐ	*25/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28	
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	*25/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/08	
Ａ６１Ｐ	*25/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/14	
Ａ６１Ｐ	*25/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/16	
Ａ６１Ｐ	*31/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	
Ａ６１Ｋ	*47/48*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/48	
Ａ６１Ｋ	*47/34*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．テフロン

(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 スマイリー デイヴィッド エル
アメリカ合衆国 インディアナ州 ４７４０１ ブルーミントン シェアブルック ドライブ １０１３

Ｆターム(参考) 4C076 AA94 AA95 CC30 CC41 EE23M EE59 FF31
4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA08 BA19 BA42 CA59 DB35 MA02
NA05 ZA021 ZA022 ZA061 ZA062 ZA161 ZA162 ZA221 ZA222 ZA451
ZA452 ZA701 ZA702 ZA751 ZA752 ZC331 ZC332 ZC351 ZC352 ZC751
4H045 AA10 AA30 BA13 BA14 BA16 BA17 DA30 EA20 FA10 FA33