

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6108659号
(P6108659)

(45) 発行日 平成29年4月5日 (2017.4.5)

(24) 登録日 平成29年3月17日 (2017.3.17)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/575 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/04 (2006.01)

A 6 1 P 3/04 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

C O 7 K 14/575 Z N A

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 37/43

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 3/10

請求項の数 21 (全 122 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-514735 (P2011-514735)
 (86) (22) 出願日 平成21年6月16日 (2009.6.16)
 (65) 公表番号 特表2011-524420 (P2011-524420A)
 (43) 公表日 平成23年9月1日 (2011.9.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/047447
 (87) 国際公開番号 W02010/011439
 (87) 国際公開日 平成22年1月28日 (2010.1.28)
 審査請求日 平成24年6月18日 (2012.6.18)
 審判番号 不服2015-6259 (P2015-6259/J1)
 審判請求日 平成27年4月2日 (2015.4.2)
 (31) 優先権主張番号 61/090,448
 (32) 優先日 平成20年8月20日 (2008.8.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/073,274
 (32) 優先日 平成20年6月17日 (2008.6.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507277642
 インディアナ ユニバーシティー リサー
 チ アンド テクノロジー コーポレーシ
 ョン
 INDIANA UNIVERSITY
 RESEARCH AND TECHNO
 LOGY CORPORATION
 アメリカ合衆国 46202 インディア
 ナ州 インディアナポリス インディアナ
 アベニュー 518
 (74) 代理人 110000176
 一色国際特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 代謝疾患および肥満の治療のための G I P に基づいた混合アゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G I P アゴニスト活性を有する、グルカゴン（配列番号 1）の類縁体であって；

G I P 受容体に対する E C 5 0 が、1 n M 以下であり、

G L P - 1 受容体に対する E C 5 0 が、1 n M 以下であり、

G I P 受容体に対する E C 5 0 が、G L P - 1 受容体に対する E C 5 0 より、5 0 倍未
満の差だけ低く、

下記（a）から（j）を特徴とする、類縁体：

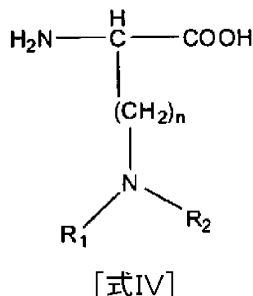
（a）位置 1 のアミノ酸が T y r、P h e、T r p、アミノ - P h e、ニトロ - P h e、
 クロロ - P h e、スルホ - P h e、4 - ピリジル - A l a、メチル - T y r、または 3 -
 アミノ T y r である；

（b）アルファ、アルファ - 二置換アミノ酸による位置 2 での置換；

（c）I l e による位置 1 2 の L y s の置換；

（d）下記の式 I V で示されるアミノ酸による位置 1 6 でのアミノ酸置換：

【化 1】



10

〔式中、 n は、1～7であり、 R_1 および R_2 は、それぞれ、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル、($\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) OH 、($\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) NH_2 、($\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) SH 、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_3 \sim \text{C}_6$)シクロアルキル、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 複素環式)、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) R_7 および($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_3 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール)から成る群から独立して選ばれ、 R_7 は、 H または OH であり、式IVのアミノ酸の側鎖は、遊離アミノ基を含む〕；

(e) アルファ、アルファ二置換アミノ酸による、位置20のGlnのアミノ酸置換；

(f) 位置27のMetがLeuで置換されている、

(g) 位置28のAsnがAlaで置換されている、

(h) 位置29のThrがGlyで置換されている、

20

(i) C末端のアミノ酸のカルボン酸のアミドによる置換、
ならびに

(j) グルカゴン配列(配列番号1)に対する、1～6個の更なるアミノ酸修飾。

【請求項2】

請求項1に記載の類縁体であって、

前記位置1のアミノ酸がTyrである、

前記アルファ、アルファ二置換アミノ酸はAIBである、

前記式IVで示されるアミノ酸は、ホモLys、Lys、Orn、または2,4-ジアミノ酪酸(Dab)である、類縁体。

【請求項3】

30

位置29のアミノ酸のC末端側に、GPS SGAPP S(配列番号95)のアミノ酸配列を更に含む、請求項1または2に記載の類縁体。

【請求項4】

前記グルカゴン配列(配列番号1)に対する、1～6個の更なるアミノ酸修飾は下記の修飾のうちの1つ以上である、請求項1～3のいずれか一項に記載の類縁体：

(a) Gluによる位置3のGlnの置換；

(b) アシル基またはアルキル基と共有結合している側鎖を含むアミノ酸による、位置10のアミノ酸Tyrの置換；

(c) アシル基またはアルキル基と共有結合している側鎖を含むアミノ酸の、類縁体のC末端アミノ酸としての付加；

40

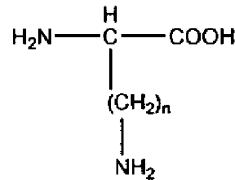
(d) Asnによる位置24のGlnの置換。

【請求項5】

請求項4に記載の類縁体であって、

前記アシル基またはアルキル基と共有結合している側鎖を含むアミノ酸が、下記の式Iで表されるアミノ酸である。

【化 2】



式中、 $n=1\sim 4$

[式I]

【請求項 6】

10

位置 2 4 のアミノ酸に結合している親水性部分を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の類縁体。

【請求項 7】

スペーサーを介して、前記類縁体のアミノ酸側鎖に結合した、アシルまたはアルキル基を含む、請求項 3 ～ 6 のいずれか一項に記載の類縁体。

【請求項 8】

前記スペーサーがジペプチドである、請求項 7 に記載の類縁体。

【請求項 9】

前記スペーサーが 2 個の負に帯電したアミノ酸を含む、請求項 8 に記載の類縁体。

【請求項 10】

20

アシル基が C 1 2 脂肪アシル基、C 1 4 脂肪アシル基、C 1 6 脂肪アシル基または C 1 8 脂肪アシル基である、請求項 7 に記載の類縁体。

【請求項 11】

C 末端において、親水性部分と共有結合している、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の類縁体。

【請求項 12】

前記親水性部分はポリエチレングリコール (PEG) である、および前記親水性部分が共有結合しているのは、Cys に対してである、請求項 11 に記載の類縁体。

【請求項 13】

PEG が 20,000 ダルトンから 40,000 ダルトンの分子量を有する、請求項 12 に記載の類縁体。

30

【請求項 14】

配列番号 105 のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 15】

配列番号 153 のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 16】

配列番号 109 のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 17】

配列番号 99 ～ 141、144 ～ 164、166、192 ～ 207、209 ～ 221、および 223 から成る群から選ばれるアミノ酸配列からなるグルカゴン (配列番号 1) の類縁体。

40

【請求項 18】

請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の類縁体もしくはペプチド、および薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の医薬組成物と、該医薬組成物を患者に投与するための装置とを含む、キット。

【請求項 20】

体重増加を低減する、減量を誘導する、糖尿病を治療する、または肥満を治療するための、請求項 18 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 2 1】

体重増加を低減する、減量を誘導する、糖尿病を治療する、または肥満を治療するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 1 7 に記載の類縁体もしくはペプチドの使用方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

プレプログルカゴン、158 アミノ酸前駆体ポリペプチドであり、異なる組織においてプロセシングされて、グルコースホメオスタシス、インスリン分泌、胃排出および腸管成長、並びに食物摂取の調節を含む多種多様な生理学的機能に関わる、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) を含む多数の異なるプログルカゴン誘導ペプチドを形成する。グルカゴンは、プレプログルカゴンのアミノ酸 33 から 61 に対応する 29 アミノ酸ペプチドであり、一方、GLP - 1 は、プレプログルカゴンのアミノ酸 72 から 108 に対応する 37 アミノ酸ペプチドとして産生される。

10

【0002】

血中グルコースが下降し始めると、膵臓により産生されるホルモンであるグルカゴンは、肝臓に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送り、血中グルコースレベルを正常なレベルに上昇させる。GLP - 1 は、グルカゴンと比較すると異なる生物学的活性を有する。その作用には、インスリン合成および分泌の刺激、グルカゴン分泌の阻害および食物摂取の阻害が含まれる。GLP - 1 は、糖尿病患者において高血糖症 (グルコースレベルの上昇) を低減することが示されている。GLP - 1 と 50 % のアミノ酸同一性を共有する、トカゲ毒液からのペプチドであるエキセンディン - 4 (Exendin-4) は、GLP - 1 受容体を活性化し、同様に糖尿病患者において高血糖症を低減することが示されている。

20

【0003】

グルコース依存性のインスリン分泌性ペプチド (GIP) は、グルコースの存在下で膵臓ベータ細胞からのインスリンの分泌を刺激する 42 アミノ酸胃腸調節ペプチドである。タンパク質分解プロセッシングにより、133 アミノ酸前駆体であるプレプロGIPから誘導される。

30

【発明の概要】

【0004】

本明細書に開示されているように、天然グルカゴン (配列番号 1) の類縁体であり、GIP 活性を示すグルカゴンペプチドが提供される。本発明は、そのようなペプチドを使用する方法も提供する。

【0005】

天然グルカゴンは、GIP 受容体を活性化せず、通常、GLP - 1 受容体に対する天然 GLP - 1 の活性の約 1 % の活性しか有さない。本明細書に記載されている天然グルカゴン配列に対する修飾は、天然グルカゴン (配列番号 1) の活性と同等な若しくはよりも良好な強力なグルカゴン活性、天然 GIP (配列番号 4) の活性と同等な若しくはよりも良好な強力な GIP 活性、および / または、天然 GLP - 1 の活性と同等な若しくはよりも良好な強力な GLP - 1 活性、を示すことができる、グルカゴンペプチドを産生する。GLP - 1 (7 - 36) アミド (配列番号 3) または GLP - 1 (7 - 37) (酸) (配列番号 2) は、GLP - 1 受容体に対して実質的に同等の活性を示す、生物学的に活性のある形態の GLP - 1 である。

40

【0006】

本明細書に記載されるデータは、GIP 活性と GLP - 1 活性の両方を有するペプチドが、減量を誘導するため、または体重増加を予防するため、また、糖尿病を含む高血糖症を治療するために、特に有利であることを示す。本明細書に開示されるインビボデータは、GIP アゴニスト活性と GLP - 1 アゴニスト活性の組み合わせが、GLP - 1 単独よ

50

りも体重低減に対して大きな効果を生じることを示す。この活性は、G I Pをアンタゴナイズすることが、毎日の食物摂取および体重を低減するため、ならびにインスリン感受性およびエネルギー消費量を増加するために望ましい、という当該技術の教示の観点から、特に予想外であった。(Irwin et al., Diabetologia 50: 1532-1540 (2007);およびAlthage et al., J Biol Chem, e-publication on April 17, 2008)。

【 0 0 0 7 】

したがって、一つの態様において、本発明は、減量を誘導する、または体重増加を予防する方法であって、G I P受容体とG L P - 1受容体の両方の活性を示し、更にグルカゴン受容体に対しても活性を示してもよい化合物、例えばグルカゴンペプチド、の治療有効量を、それを必要とする患者に登用することを含む方法を提供する。そのような化合物には、本明細書に記載されるG I P / G L P - 1コアゴニスト (co-agonist) およびグルカゴン / G I P / G L P - 1トリアゴニスト (tri-agonist) が含まれる。

10

【 0 0 0 8 】

G I P受容体に対する増加された活性は、位置1でのアミノ酸修飾によりもたらされる。例えば、位置1のH i sは、大型の芳香族アミノ酸 (T y r、P h e、T r p、アミノ - P h e、ニトロ - P h e、クロロ - P h e、スルホ - P h e、4 - ピリジル - A l a、メチル - T y r、または3 - アミノT y rでもよい) で置換されている。

【 0 0 0 9 】

G I P受容体に対する増加された活性は、グルカゴンペプチドまたはその類縁体のC末端部分 (アミノ酸12 - 29) のアルファ - ヘリックス構造を安定化する修飾によりもたらされる。例えば、分子内架橋を、位置iおよびi + 4、または位置jおよびj + 3、または位置kおよびk + 7の2つのアミノ酸の側鎖の間の共有結合により、形成することができる。例示的な実施態様において、架橋は、位置12と16、16と20、20と24、24と28または17と20の間にある。他の実施態様において、塩架橋などの非共有相互作用を、これらの位置の正および負に帯電したアミノ酸の間で形成することができる。あるいは、例えば、グルカゴンペプチドのC末端部分 (アミノ酸12 ~ 29あたり) のアルファ - ヘリックス構造の安定化は、所望の活性を保持する位置への1個以上の、
- 二置換アミノ酸の意図的な導入を介して、達成される。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドの位置16、17、18、19、20、21、24、又は29のうちの1、2、3、4つ又はそれ以上は、
- 二置換アミノ酸で置換されている。例えば、
アミノイソ酪酸 (A I B) によるグルカゴンペプチドの位置16の置換は、塩架橋又はラクタムの不在下で、安定化されたアルファ - ヘリックスをもたらし。そのようなペプチドは、本明細書において、分子内架橋を欠いているペプチドとして考慮される。特定の態様において、アルファ - ヘリックスの安定化は、共有分子内架橋、例えばラクタム架橋やジスルフィド架橋、を導入することなく、1個以上の、
- 二置換アミノ酸を導入することにより達成される。そのようなペプチドは、本明細書において共有分子内架橋を欠いているペプチドと考慮される。幾つかの実施態様において、位置16、20、21又は24のうちの1、2、3つ、又はそれ以上は、A I Bで置換されている。

20

30

【 0 0 1 0 】

G I P受容体に対する増加された活性は、位置27および/または28 (更に位置29でもよい) でのアミノ酸修飾によってもたらされる。例えば、位置27のM e tは、大型の脂肪族アミノ酸 (L e uでもよい) で置換され、位置28のA s nは、小型の脂肪族アミノ酸 (A l aでもよい) で置換され、位置29のT h rは、小型の脂肪族アミノ酸 (G l yでもよい) で置換されている。

40

【 0 0 1 1 】

G I P受容体に対する増加された活性は、また、位置12でのアミノ酸修飾によりもたらされる。例えば、位置12は、大型で脂肪族で非極性のアミノ酸 (I l eでもよい) で置換されている。

【 0 0 1 2 】

G I P受容体に対する増加された活性は、また、位置17および/または18でのアミ

50

ノ酸修飾によりもたらされる。例えば、位置 17 は、極性残基 (Gln でもよい) で置換され、位置 18 は、小型の脂肪族アミノ酸 (Ala でもよい) で置換されている。

【0013】

グルカゴン受容体に対する増加された活性は、本明細書に記載されているように、天然グルカゴン (配列番号 1) の位置 16 でのアミノ酸修飾によりもたらされる。

【0014】

GLP-1 受容体に対する低減、維持、または増加された活性は、本明細書に記載されているように、例えば位置 3 でのアミノ酸修飾によりもたらされる。

【0015】

位置 1 および / または 2 でのアミノ酸修飾により低減されたグルカゴン活性の回復は、グルカゴンペプチドまたはその類縁体の C 末端部分 (アミノ酸 12 - 29) のアルファ - ヘリックス構造を安定化する修飾により、もたらされる。例えば、分子内架橋を、位置 i および i + 4、または位置 j および j + 3、または位置 k および k + 7 の 2 つのアミノ酸の側鎖の間の共有結合により、形成することができる。他の実施態様において、塩架橋などの非共有相互作用を、これらの位置の正および負に帯電したアミノ酸の間で形成することができる。更に他の実施態様において、1 個以上の , - 二置換アミノ酸が、この C 末端部分 (アミノ酸 12 - 29) に所望の活性を保持する位置で挿入または置換される。例えば、位置 16、20、21、または 24 のうちの 1、2、3 つ、または全てが、 , - 二置換アミノ酸、例えば AIB で置換されている。

【0016】

GLP-1 受容体に対する増加された活性は、C 末端アミノ酸のカルボン酸を、アミドまたはエステルなどの電荷中性基に代えることによってもたらされる。

【0017】

GIP-1 受容体に対する増加された活性は、グルカゴンペプチドまたはその類縁体の C 末端部分 (アミノ酸 12 - 29 周辺) のアルファ - ヘリックス構造を安定化する修飾によりもたらされる。幾つかの実施態様において、分子内架橋を、位置 i および i + 4、または位置 j および j + 3、または位置 k および k + 7 の 2 つのアミノ酸の側鎖の間の共有結合により、形成することができる。他の実施態様において、塩架橋などの非共有相互作用を、これらの位置の正および負に帯電したアミノ酸の間で形成することができる。更に他の実施態様において、1 個以上の , - 二置換アミノ酸が、この C 末端部分 (アミノ酸 12 - 29) に所望の活性を保持する位置で挿入または置換される。例えば、位置 16、20、21 または 24 のうちの 1、2、3 つ、または全てが、 , - 二置換アミノ酸、例えば AIB で置換されている。

【0018】

GLP-1 受容体に対する増加された活性は、本明細書に記載されているように、位置 20 でのアミノ酸修飾によりもたらされる。

【0019】

GLP-1 受容体に対する増加された活性は、GPS SGAPPS (配列番号 95) または XGPS SGAPPS (配列番号 96) などの C 末端延長ペプチドを、C 末端に付加することによりもたらされる。そのような類似体における GLP-1 活性を、本明細書に記載されているように、位置 18、28 若しくは 29 のアミノ酸、または位置 18 および 29 のアミノ酸を修飾することにより、更に増加することができる。

【0020】

GLP-1 効力の更なる中程度の増加は、位置 10 のアミノ酸を修飾して、大型の芳香族アミノ酸残基 (Trp でもよい) にすることによりもたらされる。

【0021】

GLP-1 受容体に対する低減された活性は、本明細書に記載されるように、例えば、位置 7 でのアミノ酸修飾、位置 27 または 28 のアミノ酸の C 末端側のアミノ酸 (複数または単数) の欠失、27 または 28 アミノ酸ペプチドの生成、あるいはこれらの組み合わせ、によりもたらされる。

10

20

30

40

50

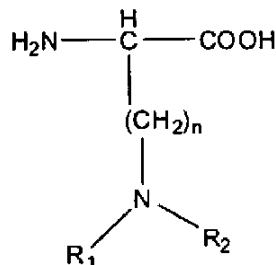
【 0 0 2 2 】

ペグ化後の活性の保存は、C末端へのG P S S G A P P P S（配列番号95）の付加によりもたらされる。

【 0 0 2 3 】

本明細書に示されているように、グルカゴン受容体、G L P - 1受容体およびG I P受容体のそれぞれに対する、維持または増加（ラクタムを含有しG I P活性がありグルカゴンに基づいた類縁体と比較して）された活性は、（ i ）下記の式I Vで示されるアミノ酸による、位置16のS e rのアミノ酸置換：

【 化 1 】



[式IV]

〔式中、nは、1～16または1～10または1～7または1～6または2～6または2若しくは3若しくは4若しくは5であり、R₁およびR₂は、それぞれ、H、C₁～C₁₈アルキル、（C₁～C₁₈アルキル）OH、（C₁～C₁₈アルキル）NH₂、（C₁～C₁₈アルキル）SH、（C₀～C₄アルキル）（C₃～C₆）シクロアルキル、（C₀～C₄アルキル）（C₂～C₅複素環式）、（C₀～C₄アルキル）（C₆～C₁₀アリール）R₇および（C₁～C₄アルキル）（C₃～C₉ヘテロアリール）から成る群から独立して選ばれ、R₇は、HまたはOHであり、式I Vのアミノ酸の側鎖は、遊離アミノ基を含む〕、ならびに（ i i ）アルファ，アルファ二置換アミノ酸、例えばA I Bによる、位置20のG l nのアミノ酸置換、によってもたらされる。幾つかの実施態様において、位置16のアミノ酸はL y sであり、位置20のアミノ酸はA I Bである。

【 0 0 2 4 】

位置16に式I Vのアミノ酸および位置20にアルファ，アルファ二置換アミノ酸を含む類縁体のグルカゴン受容体、G L P - 1受容体およびG I P受容体のそれぞれに対する活性は、ペプチドの長さを延長することにより、例えば約1 - 21、約9 - 21、約6 - 18、約9 - 12または約10若しくは11アミノ酸長さのC末端延長ペプチドと、例えば融合させることにより、更に増強することができる。幾つかの実施態様において、C末端は、G P S S G A P P P S（配列番号95）またはX G P S S G A P P P S（配列番号96）との融合により延長され、ここでXは、G l yであるか、または小型の、脂肪族若しくは非極性若しくは僅かに極性のアミノ酸である。代替的な実施態様において、C末端は、G P S S G A P P P S（配列番号95）との融合により延長され、1～11個のアミノ酸（例えば、1～5、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11個のアミノ酸）が、G P S S G A P P P S（配列番号95）のC末端に融合している。G P S S G A P P P S（配列番号95）のC末端の1～11個のアミノ酸は、例えば、A l aまたはG l yなどの1個以上の小型脂肪族アミノ酸を含むことができる。この点において、C末端延長部は、G P S S G A P P P S X_mであることができ、ここで、mは1～11（例えば、1～5）であり、そしてXは、A l aまたはG l yである。あるいは、配列番号95のC末端に融合している1～11個（例えば1～5個）のアミノ酸は、異なる小型脂肪族アミノ酸の組み合わせであることができる。例えば、1～11個（例えば、1～5個）のアミノ酸は、A l a残基とG l y残基の組み合わせであることができる。

【 0 0 2 5 】

位置16に式I Vのアミノ酸および位置20にアルファ，アルファ二置換アミノ酸を含む類縁体が含まれる、G I P活性がありグルカゴンに基づいている類縁体の、グルカゴン

10

20

30

40

50

、G L P - 1 および G I P 受容体のそれぞれに対する活性の増強を、C 末端延長部に配置されているアミノ酸または C 末端アミノ酸（例えば、C 末端延長部の C 末端に付加されたアミノ酸）のアシル化またはアルキル化によって、更に達成することができる。アシル化またはアルキル化は、例えば、位置 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 および 50 のいずれかに配置されているアミノ酸において行うことができる。幾つかの実施態様において、アシル化またはアルキル化されるアミノ酸は、位置 37、38、39、40、41、42 または 43 に配置されている。幾つかの実施態様において、アシル化またはアルキル化されるアミノ酸は、アシルまたはアルキル基、例えば C 10 ~ C 22 に結合している、L y s である。特定の実施態様において、L y s は、配列番号 95 のアミノ酸配列から構成される C 末端延長部の C 末端に配置されており、そのために L y s は類縁体の位置 40 に配置される。更に、アシル化 C 末端延長ペプチドは、例えば位置 24 でペグ化もされている。

10

【0026】

G I P 活性がありグルカゴンに基づいている類縁体の、グルカゴン、G L P - 1 および G I P 受容体のそれぞれに対する活性の増強は、スペーサー（例えば、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能スペーサー、疎水性二官能スペーサー）を介するアミノ酸のアシル化またはアルキル化によって、更に達成することができる。幾つかの実施態様において、G I P 活性がありグルカゴンに基づいている類縁体は、スペーサーを介してアシルまたはアルキル基を含み、ここでスペーサーは、類縁体の位置 10 または位置 40 のアミノ酸の側鎖に結合している。他の実施態様において、類縁体は、位置 29 のアミノ酸の C 末端側への 1 ~ 21 個のアミノ酸の C 末端延長部を含み、アシルまたはアルキル基に共有結合しているスペーサーは、配列番号 1 の位置 37 ~ 43 の 1 つに対応する位置で延長部のアミノ酸に結合している。特定の実施態様において、スペーサーは 3 ~ 10 原子長である。特定の態様において、スペーサーとアシルまたはアルキル基との全長は、約 14 ~ 約 28 原子長である。グルカゴン、G L P - 1 および G I P 受容体の 1 つ以上に対する活性を増加する目的に適したスペーサーは、本明細書において更に記載される。

20

【0027】

G I P 活性を増加又は減少する、グルカゴン受容体活性を増加又は減少する、及び G L P - 1 受容体活性を増加するような、上記に記載された修飾のいずれも、個別に又は組み合わせで適用することができる。上記に記載された修飾のいずれかを、本明細書に記載されている、溶解性及び / 又は安定性及び / 又は作用持続時間の増加のような、他の所望の特性を付与する他の修飾と組み合わせることもできる。あるいは、上記に記載された修飾のいずれかを、溶解性又は安定性又は活性に実質的に影響を与えない、本明細書に記載されている他の修飾と組み合わせることができる。例示的な修飾には以下が含まれるが、これらに限定されない：

30

（A）例えば、天然グルカゴンの C 末端部分、好ましくは位置 27 C 末端側の位置への 1、2、3 個又はそれ以上の荷電アミノ酸の導入により溶解性を向上させること。そのような荷電アミノ酸は、例えば位置 28 又は 29 で天然アミノ酸を荷電アミノ酸により置換する、あるいは位置 27、28 又は 29 の後に荷電アミノ酸を付加することによって導入することができる。例示的な実施態様において、1、2、3 個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。他の実施態様において、1、2、3 個又は全ての荷電アミノ酸は、正に荷電されている。そのような修飾は溶解性を増加し、例えば、25 で 24 時間後に測定したとき、約 5.5 ~ 8 の所定の p H、例えば p H 7 で、天然グルカゴンを基準として少なくとも 2 倍、5 倍、10 倍、15 倍、25 倍、30 倍又はそれ以上の溶解性をもたらす。

40

（B）例えばペプチドの位置 16、17、20、21、24 若しくは 29、C 末端延長内、又は C 末端アミノ酸への、本明細書に記載されているポリエチレングリコール鎖のような親水性部分の付加により、溶解性及び作用持続時間又は循環半減期を増加すること。

（C）本明細書に記載されているグルカゴンペプチドのアシル化又はアルキル化により

50

、溶解性及び／若しくは作用持続時間若しくは循環半減期を増加すること、並びに／又は作用開始を遅延すること。

(D) 本明細書に記載されている位置 1 又は 2 のアミノ酸の修飾により、ジペプチジルペプチダーゼ I V (DPP - I V) への耐性を導入することを介して、作用持続時間又は循環半減期を増加すること。

(E) 位置 15 の Asp の修飾により、例えばグルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸又はホモシステイン酸による欠失又は置換により、溶解性を増加すること。そのような修飾は、5 . 5 ~ 8 の範囲内の pH において分解又は切断を低減することができ、例えば 25 で 24 時間後に元のペプチドの少なくとも 75 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % を保持することができる。そのような修飾は、Asp 15 - Ser 16 のペプチド結合の切断を低減する。

10

(F) 位置 16 の Ser の修飾により、例えば Thr 又は AIB での置換により、安定性を増加すること。そのような修飾も、Asp 15 - Ser 16 のペプチド結合の切断を低減する。

(G) 位置 27 のメチオニンの修飾により、例えばロイシン又はノルロイシンでの置換により、安定性を増加すること。そのような修飾は酸化分解を低減することができる。安定性は、位置 20 又は 24 の Gln の修飾により、例えば、Ala 又は AIB での置換により増強することもできる。そのような修飾は、Gln の脱アミド化を介して生じる分解を低減することができる。安定性は、位置 21 の Asp の修飾により、例えば Glu での置換により増強することができる。そのような修飾は、Asp の脱水により環状スクシニミド中間体を形成し、続く異性化によりイソアスパラギン酸塩を形成することによって生じる分解を低減することができる。

20

(H) 実質的に活性に影響を与えない非保存的若しくは保存的置換、付加又は欠失、例えば、位置 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28 若しくは 29 の 1 つ以上での保存的置換；Ala によるこれらの位置の 1 つ以上での置換；位置 27、28 若しくは 29 の 1 つ以上でのアミノ酸の欠失；又は、C 末端カルボン酸基の代わりに C 末端アミド若しくはエステルと組み合わせてもよい、アミノ酸 29 の欠失；Arg による位置 12 の Lys の置換；Val 若しくは Phe による位置 10 の Tyr の置換。

【0028】

30

幾つかの実施態様において、本明細書に記載されているグルカゴンペプチドは、GIP 受容体活性化の活性において約 100 nM 以下または約 75、50、25、10、8、6、5、4、3、2 若しくは 1 nM 以下の EC50 を示す。幾つかの実施態様において、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、GIP 受容体に対して、約 0 . 001 nM、0 . 01 nM または 0 . 1 nM の EC50 を示す。幾つかの実施態様において、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、GIP 受容体に対して、約 1 nM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、8 nM、10 nM、15 nM、20 nM、25 nM、30 nM、40 nM、50 nM、75 nM または 100 nM 以下の EC50 を示す。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体活性化において約 100 nM 以下または約 75、50、25、10、8、6、5、4、3、2 若しくは 1 nM 以下の EC50 を示す。幾つかの実施態様において、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対して、約 0 . 001 nM、0 . 01 nM または 0 . 1 nM の EC50 を示す。幾つかの実施態様において、グルカゴン受容体に対する EC50 は、約 1 nM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、8 nM、10 nM、15 nM、20 nM、25 nM、30 nM、40 nM、50 nM、75 nM または 100 nM 以下である。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、GLP - 1 受容体活性化において約 100 nM 以下または約 75、50、25、10、8、6、5、4、3、2 若しくは 1 nM 以下の EC50 を示す。幾つかの実施態様において、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、GLP - 1 受容体に対して、約 0 . 001 nM、0 . 01 nM または 0 . 1 nM の EC50 を示す。幾つかの実施態様において、GLP - 1 受容体に対する EC50 は

40

50

、約 1 nM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、8 nM、10 nM、15 nM、20 nM、25 nM、30 nM、40 nM、50 nM、75 nM または 100 nM 以下である。受容体活性化は、受容体を過剰発現している HEK 293 細胞における cAMP 誘導を測定するインビトロアッセイにより、例えば、実施例 16 に記載されているように、レセプターをコードする DNA と、cAMP 応答配列に結合したルシフェラーゼ遺伝子とを同時形質移入された HEK 293 細胞をアッセイすることにより、測定することができる。

【0029】

幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、天然 GIP (GIP 効力) と比べて、GIP 受容体に対して少なくとも約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175% 若しくは 200% またはそれ以上の活性を示す。幾つかの実施態様において、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、天然 GIP と比べて、GIP 受容体に対して約 100%、1000%、10,000%、100,000% または 1,000,000% 以下の活性を示す。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、グルカゴン (グルカゴン効力) と比べて、グルカゴン受容体に対して少なくとも約 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450% 若しくは 500% またはそれ以上の活性を示す。幾つかの実施態様において、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、天然グルカゴンと比べて、グルカゴン受容体に対して、1000%、10,000%、100,000% または 1,000,000% 以下の活性を示す。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、天然 GLP-1 (GLP-1 効力) と比べて、GLP-1 受容体に対して少なくとも約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175% 若しくは 200% またはそれ以上の活性を示す。幾つかの実施態様において、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、天然 GLP-1 と比べて、GLP-1 受容体に対して、1000%、10,000%、100,000% または 1,000,000% 以下の活性を示す。受容体の天然リガンドと比べた受容体に対するグルカゴンペプチドの活性は、天然リガンドと比べたグルカゴンペプチドの EC50 の逆比として計算される。

【0030】

したがって、本発明の一つの態様は、グルカゴン受容体および GIP 受容体の両方に対して活性を示すグルカゴンペプチド (「グルカゴン / GIP コアゴニスト」) を提供する。これらのグルカゴンペプチドは、GIP 受容体と比べてグルカゴン受容体への天然グルカゴンの選択性を失っている。幾つかの実施態様において、GIP 受容体に対するグルカゴンペプチドの EC50 は、グルカゴン受容体に対する EC50 と約 50 倍、40 倍、30 倍または 20 倍未満の差がある (より高い、またはより低い)。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドの GIP 効力は、グルカゴン効力と約 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 倍未満の差 (より高い、またはより低い) がある。幾つかの実施態様において、GIP 受容体に対するグルカゴンペプチドの EC50 を、グルカゴン受容体に対するグルカゴンペプチドの EC50 で割った比は、約 100、75、60、50、40、30、20、15、10 または 5 未満である。幾つかの実施態様において、GIP 受容体に対する EC50 をグルカゴン受容体に対する EC50 で割った比は、約 1 または 1 未満 (例えば、約 0.01、0.013、0.0167、0.02、0.025、0.03、0.05、0.067、0.1、0.2) である。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドの GIP 効力を、グルカゴンペプチドのグルカゴン効力と比較した比は、約 500、450、400、350、300、250、200、150、100、75、60、50、40、30、20、15、10 または 5 未満である。

幾つかの実施態様において、G I P 受容体に対する効力をグルカゴン受容体に対する効力で割った比は、約 1 または 1 未満（例えば、約 0 . 0 1、0 . 0 1 3、0 . 0 1 6 7、0 . 0 2、0 . 0 2 5、0 . 0 3、0 . 0 5、0 . 0 6 7、0 . 1、0 . 2）である。幾つかの実施態様において、G L P - 1 活性は、例えば、位置 7 のアミノ酸修飾、位置 2 7 または 2 8 のアミノ酸の C 末端のアミノ酸（複数または単数）の欠失、2 7 または 2 8 アミノ酸ペプチドの生成あるいはこれらの組み合わせにより、有意に低減または破壊される。

【 0 0 3 1 】

本発明の別の態様は、グルカゴン、G I P および G L P - 1 受容体に対して活性を示すグルカゴンペプチド（「グルカゴン / G I P / G L P - 1 トリアゴニスト」）を提供する。これらのグルカゴンペプチドは、G L P - 1 と G I P の両方の受容体と比べてグルカゴン受容体への天然グルカゴンの選択性を失っている。幾つかの実施態様において、G I P 受容体に対するグルカゴンペプチドの E C 5 0 は、グルカゴンおよび G L P - 1 受容体に対するそれぞれの E C 5 0 と約 5 0 倍、4 0 倍、3 0 倍または 2 0 倍未満の差がある（より高い、またはより低い）。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドの G I P 効力は、グルカゴンおよび G L P - 1 効力と約 5 0 0 倍、4 5 0 倍、4 0 0 倍、3 5 0 倍、3 0 0 倍、2 5 0 倍、2 0 0 倍、1 5 0 倍、1 0 0 倍、7 5 倍、5 0 倍、2 5 倍、2 0 倍、1 5 倍、1 0 倍または 5 倍未満の差（より高い、またより低い）がある。幾つかの実施態様において、G I P 受容体に対するトリアゴニストの E C 5 0 を、G L P - 1 受容体に対するトリアゴニストの E C 5 0 で割った比は、約 1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 未満である。幾つかの実施態様において、G I P 受容体に対する E C 5 0 を G L P - 1 受容体に対する E C 5 0 で割った比は、約 1 または 1 未満（例えば、約 0 . 0 1、0 . 0 1 3、0 . 0 1 6 7、0 . 0 2、0 . 0 2 5、0 . 0 3、0 . 0 5、0 . 0 6 7、0 . 1、0 . 2）である。幾つかの実施態様において、トリアゴニストの G I P 効力をトリアゴニストの G L P - 1 効力と比較した比は、約 1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 未満である。幾つかの実施態様において、G I P 受容体に対する効力を G L P - 1 受容体に対する効力で割った比は、約 1 または 1 未満（例えば、約 0 . 0 1、0 . 0 1 3、0 . 0 1 6 7、0 . 0 2、0 . 0 2 5、0 . 0 3、0 . 0 5、0 . 0 6 7、0 . 1、0 . 2）である。関連する実施態様において、G I P 受容体に対するトリアゴニストの E C 5 0 を、グルカゴン受容体に対するトリアゴニストの E C 5 0 で割った比は、約 1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 未満である。幾つかの実施態様において、G I P 受容体に対する E C 5 0 をグルカゴン受容体に対する E C 5 0 で割った比は、約 1 または 1 未満（例えば、約 0 . 0 1、0 . 0 1 3、0 . 0 1 6 7、0 . 0 2、0 . 0 2 5、0 . 0 3、0 . 0 5、0 . 0 6 7、0 . 1、0 . 2）である。幾つかの実施態様において、トリアゴニストの G I P 効力をトリアゴニストのグルカゴン効力と比較した比は、約 5 0 0、4 5 0、4 0 0、3 5 0、3 0 0、2 5 0、2 0 0、1 5 0、1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 未満である。幾つかの実施態様において、G I P 受容体に対する効力をグルカゴン受容体に対する効力で割った比は、約 1 または 1 未満（例えば、約 0 . 0 1、0 . 0 1 3、0 . 0 1 6 7、0 . 0 2、0 . 0 2 5、0 . 0 3、0 . 0 5、0 . 0 6 7、0 . 1、0 . 2）である。幾つかの実施態様において、G L P - 1 受容体に対するトリアゴニストの E C 5 0 を、グルカゴン受容体に対するトリアゴニストの E C 5 0 で割った比は、約 1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 未満である。幾つかの実施態様において、G L P - 1 受容体に対する E C 5 0 をグルカゴン受容体に対する E C 5 0 で割った比は、約 1 または 1 未満（例えば、約 0 . 0 1、0 . 0 1 3、0 . 0 1 6 7、0 . 0 2、0 . 0 2 5、0 . 0 3、0 . 0 5、0 . 0 6 7、0 . 1、0 . 2）である。幾つかの実施態様において、トリアゴニストの G L P - 1 効力をトリアゴニストのグルカゴン効力と比較した比は、約 1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 未満である。幾つかの実施態様において、G L P - 1 受容体に対する効力をグルカゴン受容体に対する効力で割った比は、約 1 または 1 未満（例えば、約 0 . 0 1、0 . 0 1 3、0 . 0 1 6 7、0 . 0 2、0 . 0 2 5、0 . 0 3、0 . 0 5、0 . 0 6 7、0 . 1、0 . 2）である。

10

20

30

40

50

67、0.1、0.2)である。

【0032】

本発明の更に別の態様は、GLP-1およびGIP受容体に対して活性を示すが、グルカゴン活性が、例えば位置3のアミノ酸修飾により有意に低減または破壊されているグルカゴンペプチド(「GIP/GLP-1コアゴニスト」)を提供する。例えば、酸性、塩基性または疎水性アミノ酸(グルタミン酸、オルチニン、ノルロイシン)によるこの位置での置換は、グルカゴン活性を低減する。幾つかの実施態様において、GIP受容体に対するグルカゴンペプチドのEC50は、GLP-1受容体に対するEC50と約50倍、40倍、30倍または20倍未満の差(より高い、またはより低い)がある。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドのGIP効力は、GLP-1効力と約25倍、20倍、15倍、10倍または5倍未満の差(より高い、またはより低い)がある。幾つかの実施態様において、これらのグルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対して天然グルカゴンの活性の約10%以下の活性を有し、例えば、約1~10%または約0.1~10%または約0.1超であるが約10%未満である。幾つかの実施態様において、GIP受容体に対するグルカゴンペプチドのEC50を、GLP-1受容体に対するグルカゴンペプチドのEC50で割った比は、約100、75、60、50、40、30、20、15、10または5未満であり、1以上である。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドのGIP効力をグルカゴンペプチドのGLP-1効力と比較した比は、約100、75、60、50、40、30、20、15、10または5未満であり、1以上である。

【0033】

本発明の更なる態様は、GIP受容体に対する活性を示すが、グルカゴンおよびGLP-1活性が、例えば位置3および7のアミノ酸修飾により、有意に低減または破壊されている、グルカゴンペプチド(「GIPアゴニストグルカゴンペプチド」)を提供する。幾つかの実施態様において、これらのグルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対する天然グルカゴンの活性の約10%以下の活性を有し、例えば、約1~10%または約0.1~10%または約0.1、0.5%若しくは1%超であるが約1%、5%若しくは10%未満である。幾つかの実施態様において、これらのグルカゴンペプチドは、また、GLP-1受容体に対して天然GLP-1の活性の約10%以下の活性しか有さず、例えば、約1~10%または約0.1~10%または約0.1、0.5%若しくは1%超であるが約1%、5%若しくは10%未満である。

【0034】

本発明の幾つかの実施態様によると、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン(配列番号1)の類縁体は、(a)GIPアゴニスト活性を付与する位置1でのアミノ酸修飾、(b)類縁体のC末端部分(アミノ酸12-29)のアルファ-ヘリックス構造を安定化する修飾、を含み、(c)更に、1~10個(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個)の更なるアミノ酸修飾を有する配列番号1、を含んでもよい。幾つかの実施態様において、類縁体は、GIP受容体に対する天然GIPの少なくとも約1%の活性、または本明細書に記載されるGIP受容体に対する他の任意の活性レベルを示す。アルファ-ヘリックス構造を安定化する修飾は、例えば本明細書に記載されている任意のものなどの、当該技術において既知の任意のものであることができる。「アルファ-ヘリックス構造の安定化」のセクションにおける教示を参照すること。幾つかの実施態様において、アルファ-ヘリックス構造を安定化する修飾は、(i)位置iおよびi+4のアミノ酸の側鎖の間または位置jおよびj+3のアミノ酸の側鎖の間のラクタム架橋(ここで、iは、12、13、16、17、20また24であり、jは17である)、ならびに(ii)類縁体の位置16、20、21および24のうちの1、2、3つ、または全てのアミノ酸が、-二置換アミノ酸で置換されている、から成る群から選ばれる修飾である。GIPアゴニスト活性を有するグルカゴンのそのような類縁体は、本明細書において更に記載される。

【0035】

幾つかの実施態様において、本発明は、以下の修飾：

- (a) 位置 1 でのアミノ酸修飾、
- (b) (i) 位置 i および i + 4 のアミノ酸の側鎖の間または位置 j および j + 3 のアミノ酸の側鎖の間のラクタム架橋 (ここで、i は、12、13、16、17、20 または 24 であり、j は 17 である)、あるいは (ii) 位置 16、20、21 または 24 のうちの 1、2、3 つ、または全てにおける、- 二置換によるアミノ酸置換、
- (c) 位置 27、28 および 29 のうちの 1、2 つ、または全てにおけるアミノ酸修飾、ならびに
- (d) 1、2、3、4、5、6 または 8 個の更なるアミノ酸修飾を含む、GIP アゴニスト活性を有するグルカゴン (配列番号 1) の類縁体を提供し、ここで、GIP 受容体活性化における類縁体の EC50 は、約 100 nM 以下である。

10

【0036】

例示的な実施態様において、

- (a) 位置 1 でのアミノ酸修飾は、大型の芳香族アミノ酸 (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 でもよい) による位置 1 のHis の置換である、
- (b) (i) ラクタム架橋は、位置 16 および 20 のアミノ酸の間にあり、位置 16 および 20 のアミノ酸の一方はGluで置換され、位置 16 および 20 のアミノ酸の他方はLysで置換されている、または (ii) - 二置換アミノ酸はAIBである、
- (c) 位置 27 のMetは、大型の脂肪族アミノ酸 (Leu でもよい) で置換されている、
- (d) 位置 28 のAsnは、小型の脂肪族アミノ酸 (Ala でもよい) で置換されている、ならびに
- (e) 位置 29 のThrは、小型の脂肪族アミノ酸 (Gly でもよい) で置換されている。

20

【0037】

類縁体は、下記：

- (a) 位置 12 のアミノ酸修飾 (Ile による置換でもよい)、
- (b) 位置 17 および 18 のアミノ酸修飾 (位置 17 のQ による置換、および位置 18 のA による置換でもよい)、
- (c) C 末端へのGPSSGAPPPS (配列番号 95) の付加、またはこれらの任意の組み合わせを含む (但しこれらに限定されない)、更なる修飾を含むことができる。

30

【0038】

類縁体は、下記：

- (a) D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val または - アミノ-N-酪酸で置換されている位置 2 のSer；
- (b) Trp、Lys、Orn、Glu、Phe または Val で置換されている位置 10 のTyr；
- (c) 位置 10 のLys へのアシル基の結合；
- (d) Arg で置換されている位置 12 のLys；
- (e) Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、Gly または AIB で置換されている位置 16 のSer；
- (f) Gln、Lys または Glu で置換されている位置 17 のArg；
- (g) Ala、Ser、Thr または Gly で置換されている位置 18 のArg；
- (h) Ala、Ser、Lys、シトルリン、Arg、Orn または AIB で置換されている位置 20 のGln；
- (i) Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換されている位置 21 のAsp；
- (j) Ile で置換されている位置 23 のVal；

40

50

(k) Asn、Ala、Ser、Thr、Glu、LysまたはAIBで置換されている位置24のGln；ならびに

(l) 位置2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28、および29のいずれかでの保存的置換；あるいはこれらの任意の組み合わせ

を含む（但しこれらに限定されない）、更なる修飾を、代替的にまたは追加的に含むことができる。

【0039】

幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドがペグ化されていない場合、GIP受容体活性化における類縁体のEC50は、約4、2、1nM以下であるか、または類縁体は、GIP受容体に対する天然GIPの活性の少なくとも約1%、2%、3%、4%若しくは5%の活性を有する。関連する実施態様において、GLP-1受容体活性化における非ペグ化類縁体のEC50は、約4、2、1nM以下であるか、またはGLP-1受容体に対する天然GLP-1の活性の少なくとも約1%、2%、3%、4%若しくは5%の活性を有する。更に他の関連する実施態様において、グルカゴン受容体活性化における非ペグ化類縁体のEC50は、約4、2、1nM以下であるか、またはグルカゴン受容体に対する天然グルカゴンの活性の少なくとも約5%、10%、15%若しくは20%の活性である。幾つかの実施態様において、非ペグ化類縁体は、グルカゴン受容体に対する天然グルカゴンの活性の約1%未満を有する。他の実施態様において、非ペグ化類縁体は、GLP-1受容体に対する天然GLP-1の活性の約10%、5%または1%未満を有する。

【0040】

幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、C末端延長内のアミノ酸位置16、17、20、21、24若しくは29、位置29の後のC末端延長部内（例えば、位置30）の付加アミノ酸、またはC末端アミノ酸のいずれかで、親水性部分に共有結合している。例示的な実施態様において、この親水性部分は、これらの位置のいずれかにおける、Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニン残基に共有結合している。例示的な親水性部分には、例えば約1,000ダルトンから約40,000ダルトン、または約20,000ダルトンから約40,000ダルトンの分子量の、ポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。

【0041】

類縁体がPEGなどの親水性部分に結合している実施態様において、1つ以上の受容体に対する相対的EC50は、親水性部分を欠いている類縁体と比べて、より高い、例えば約10倍高い場合がある。例えば、GIP受容体活性化におけるペグ化類縁体のEC50は、約10nM以下であるか、または類縁体は、GIP受容体に対する天然GIPの活性の少なくとも約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%または0.5%の活性を有する。関連する実施態様において、GLP-1受容体活性化におけるペグ化類縁体のEC50は、約10nM以下であるか、またはGLP-1受容体に対する天然GLP-1の活性の少なくとも約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%若しくは0.5%の活性を有する。更に他の関連する実施態様において、グルカゴン受容体活性化におけるペグ化類縁体のEC50は、約10nM以下であるか、またはグルカゴン受容体に対する天然グルカゴンの活性の少なくとも約0.5%、1%、1.5%若しくは2%の活性である。幾つかの実施態様において、類縁体は、グルカゴン受容体に対する天然グルカゴンの活性の約1%未満を有する。幾つかの実施態様において、類縁体は、GLP-1受容体に対する天然GLP-1の活性の約10%、5%または1%未満の活性を有する。

【0042】

グルカゴンペプチドは、リンカーを介して結合している少なくとも2、3つまたはそれ以上のペプチドを含む二量体、三量体またはより高次な多量体の一部であることができ、ここで少なくとも1つまたは両方のペプチドはグルカゴンペプチドである。二量体は、ホモ二量体であってもよいしヘテロ二量体であってもよい。幾つかの実施態様において、リンカーは、二官能チオール架橋剤及び二官能アミン架橋剤からなる群より選択される。特

10

20

30

40

50

定の実施態様において、リンカーは、PEG、例えば5 kDaのPEG、20 kDaのPEGである。幾つかの実施態様において、リンカーはジスルフィド結合である。例えば、二量体のそれぞれのモノマーは、Cys残基（例えば、末端又は内部に位置したCys）を含むことができ、それぞれのCys残基の硫黄原子はジスルフィド結合の形成に参加する。本発明の幾つかの態様において、複数のモノマーは、複数の末端アミノ酸（例えば、N末端若しくはC末端）同士を介して、又は複数の内部アミノ酸同士を介して、又は少なくとも一方のモノマーの末端アミノ酸と少なくとももう一方のモノマーの内部アミノ酸とを介して、連結している。特定の態様において、複数のモノマーはN末端アミノ酸を介して連結してはいない。幾つかの態様において、多量体のモノマーは、各モノマーのC末端アミノ酸が互いに結合している「尾-尾」配向で互いに結合している。二量体、三量体、またはより高次の多量体を含む、本明細書に記載されているグルカゴンペプチドのいずれかに対して、結合体部分が結合していてもよい。

10

【0043】

グルカゴン受容体活性を増加する、部分的なグルカゴン受容体活性を保持する、溶解性を向上させる、安定性を増加する、又は分解を低減するような、上記に記載された修飾のいずれも、個別に、又は組み合わせて、グルカゴンペプチドに適用することができる。いくつかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、6～8又は6～9のpH（例えば、pH7）で25で24時間経過後、少なくとも1 mg/mLの濃度で溶解性を有し、更に、元のペプチドの少なくとも95%を保持して（例えば、元のペプチドの5%以下しか分解又は切断されない）もよい。

20

【0044】

薬学的に許容される担体または希釈剤を含む滅菌された医薬組成物、および装置を含むキットが提供される。体重増加を低減する、または減量を誘導する方法であって、体重増加を低減する、または減量を誘導するのに有効な量の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む方法が提供される。糖尿病を治療する方法であって、血中グルコースレベルを低下するのに有用な量の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む方法が提供される。

【0045】

本明細書に記載されている全ての治療方法、医薬組成物、キット、及び他の同様の実施態様は、ペプチド、アゴニスト、コアゴニスト、トリアゴニスト、又は類縁体という用語の使用には、それらの薬学的に許容される全ての塩またはエステルも含まれる、ということとを考慮する。

30

【0046】

前述の概要は、本発明の全ての態様を定義することを意図せず、追加の実施態様が発明を実施するための形態のような他の章に記載されている。この文書は全体として統一された開示として関連し、本明細書に記載されている特徴の全ての可能な組み合わせは、たとえそのような特徴の組み合わせがこの文書の同じ行、段落又は章において一緒に見あたらなくても、本明細書に記載されていると理解されるべきである。

【0047】

更に、本発明は、本明細書の特定の段落により定義された変形よりも多少なりとも狭い範囲である本発明の実施態様のうちの1つ又は全てを含む。例えば、本発明の特定の態様が属として記載される場合、その属の全ての構成要素が個別に本発明の実施態様であること、及びその属の2つ以上の構成要素の組み合わせも本発明の実施態様であることを理解するべきである。

40

【0048】

（関連出願の相互参照）

本出願は、以下に対する優先権を請求する：

米国仮出願第61/073,274号（2008年6月17日出願）、米国仮出願第61/078,171号（2008年7月3日出願）、米国仮出願第61/090,448号（2008年8月20日出願）、および米国仮出願第61/151,349号（2009

50

年2月10日出願)。それぞれの出願の開示は、その全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】図1は、ビヒクルのみ(中空逆三角)、キメラ2 AIB2 Cys24(40K PEG)(中実四角)、GIPアンタゴニスト Pro3 Cys24 GIP-NH₂(1-42)40K PEG(中空菱形)、GIPアゴニスト AIB2 Cys24 GIP(1-42)40K PEG(中空三角と点線)または無関係なペプチドホルモン(網掛逆三角)の投与後の時間(日)の関数としての、マウスの体重の変化%のグラフを表す。

10

【図2】図2は、ビヒクルのみ(中空逆三角)、キメラ2 AIB2 Cys24(40K PEG)(中実四角)、GIPアンタゴニスト Pro3 Cys24 GIP-NH₂(1-42)40K PEG(中空菱形)、GIPアゴニスト AIB2 Cys24 GIP(1-42)40K PEG(中空三角と点線)または無関係なペプチドホルモン(網掛逆三角)の投与後の時間の関数としての、マウスの食物摂取量(グラム)のグラフを表す。

【図3】図3は、ビヒクルのみ(黒色棒)、キメラ2 AIB2 Cys24(40K PEG)(白色棒)、GIPアンタゴニスト Pro3 Cys24 GIP-NH₂(1-42)40K PEG(網掛棒)、GIPアゴニスト AIB2 Cys24 GIP(1-42)40K PEG(横線棒)または無関係なペプチドホルモン(縦線棒)の投与の7日後の、マウスにおける血中グルコースレベル(mg/dL)の変化のグラフを表す。

20

【図4】図4は、ビヒクルのみ(中実逆三角)、キメラ2 AIB2(中空菱形)、キメラ2 AIB2 ラクタム(中空三角)、トリアゴニストペプチドMT-170(中空四角)、GIP/グルカゴンコアゴニストペプチドMT-182(中実菱形)、GLP-1/GIPコアゴニストペプチドMT-178(網掛三角と点線)またはGIP/グルカゴンコアゴニストペプチドMT-179(中実四角)の投与後の時間(日)の関数としての、マウスの体重の変化%のグラフを表す。ペグ化MT-179がトリアゴニストとして作用することに注意すること。

【図5】図5は、ビヒクルのみ(中実三角)、GLP-1 E16アゴニストの10nmol/kg(中実逆三角)若しくは35nmol/kg(中空四角)、トリアゴニストペプチドMT-170の10nmol/kg(中空逆三角)若しくは35nmol/kg(中実菱形)またはGLP-1/GIPコアゴニストペプチドMT-178の10nmol/kg(灰色逆三角)若しくは35nmol/kg(灰色四角)の投与後の時間(日)の関数としての、マウスの体重の変化%のグラフである。

30

【図6】図6は、ビヒクルのみ(黒色棒)、GLP-1 E16アゴニストの10nmol/kg(白色棒)若しくは35nmol/kg(灰色棒)、トリアゴニストペプチドMT-170の10nmol/kg(横線棒)若しくは35nmol/kg(縦線棒)またはGLP-1/GIPコアゴニストペプチドMT-178の10nmol/kg(右左斜線棒)若しくは35nmol/kg(左右斜線棒)の投与の7日後の、マウスにおける血中グルコースレベル(mg/dL)の変化のグラフである。

40

【図7】図7は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、ラクタムを含有し(環状)ペグ化されたGIP活性のグルカゴン類縁体(「mt-178」)またはラクタムを欠き(直鎖)ペグ化されたGIP活性のグルカゴン類縁体(「mt-274」)を1、3または10nmol/kg/週により(-60の時点で)注射されたマウスへの、グルコース注射(0時点で投与)前後の時間の関数としての、血中グルコースレベル(mg/dL)のグラフを表す。この図のデータは、4匹のマウスのデータを排除しており、それはこれらのマウスが攻撃的行動を示し、顕著な減量を示したからである。

【図8】図8は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178またはmt-274を1、3または10nmol/kg/週により(グルコース注射の24時

50

間前)に注射されたマウスの、グルコース注射(0時点で投与)前後の時間の関数としての、血中グルコースレベル(mg/dL)のグラフを表す。この図のデータは、4匹のマウスのデータを排除しており、それはこれらのマウスが攻撃的行動を示し、顕著な減量を示したからである。

【図9】図9は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178またはmt-274の1、3または10nmol/kg/週での注射の0または7日後の、マウスの血中グルコースレベル(mg/dL)のグラフを表す。この図のデータは、4匹のマウスのデータを排除しており、それはこれらのマウスが攻撃的行動を示し、顕著な減量を示したからである。

【図10】図10は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178またはmt-274の1、3または10nmol/kg/週での注射の0、1、3、5および7日後の、マウスの体重の変化率のグラフを表す。この図のデータは、4匹のマウスのデータを排除しており、それはこれらのマウスが攻撃的行動を示し、顕著な減量を示したからである。

【図11】図11は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178、mt-178(TE)、mt-247またはmt-274(TE)の10または35nmol/kg/週での注射の0または7日後の、マウスの血中グルコースレベル(mg/dL)のグラフを表す。「TE」は、位置40のCysに結合したPEG基を示す。

【図12】図12は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178、mt-178(TE)、mt-247またはmt-274(TE)の10または35nmol/kg/週での注射の7日後の、マウスの血中グルコースの変化(mg/dL)のグラフを表す。「TE」は、位置40のCysに結合したPEG基を示す。

【図13】図13は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178、mt-178(TE)、mt-274またはmt-274(TE)の10または35nmol/kg/週での注射の0、1、3、5、7および10日後の、マウスの体重の変化率のグラフを表す。「TE」は、位置40のCysに結合したPEG基を示す。

【図14】図14は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178、mt-178(TE)、mt-247またはmt-274(TE)の10または35nmol/kg/週での注射の7日後の、マウスの体重に変化率のグラフを表す。「TE」は、位置40のCysに結合したPEG基を示す。

【図15】図15は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178、mt-274、直鎖非ペグ化非アシル化ペプチド(「mt-311」)、C14脂肪アシル化直鎖ペプチド(「mt-309」)、C16脂肪アシル化直鎖ペプチド(「mt-298」)またはC18脂肪アシル化直鎖ペプチド(「mt-310」)の10nmol/kgでの注射の0または7日後の、マウスの血中グルコースレベル(mg/dL)のグラフを表す。

【図16】図16は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178、mt-274、mt-311、mt-309、mt-298またはmt-310の10nmol/kgでの注射の0、1、3、5および7日後の、マウスの体重の変化率のグラフを表す。

【図17】図17は、ビヒクル対照、GLP-1アゴニストペプチド対照、mt-178、mt-274、mt-311、mt-309、mt-298またはmt-310の10nmol/kgでの注射の7日後の、マウスの体重の変化率のグラフを表す。

【図18】図18は、ビヒクル対照、リラグルチド(liraglutide、アシル化GLP-1類縁体の一つ)、C14脂肪アシル化非ペグ化直鎖ペプチド(「mt-260」)、C16脂肪アシル化非ペグ化直鎖ペプチド(「mt-261」)、またはC18脂肪アシル化非ペグ化直鎖ペプチド(「mt-262」)を、25または125nmol/kgで7日間毎日一度ずつ注射した後の、0および7日間のマウスの血中グルコースレベル(mg/dL)の変化のグラフを表す。

【図19】図19は、ビヒクル対照、リラグルチド、mt-260、mt-261または

10

20

30

40

50

mt - 262 の 25 または 125 nmol/kg での注射の 0、1、3、5 および 7 日後の、マウスの体重の変化率のグラフを表す。

【図 20】図 20 は、ビヒクル対照、リラグルチド、mt - 260、mt - 261 または mt - 262 の 25 または 125 nmol/kg での注射の 7 日後の、マウスの体重の変化率のグラフを表す。

【図 21】図 21 は、ビヒクル対照、リラグルチド (30 nmol/kg/日) または mt - 261 (0.3、1、3、10 若しくは 30 nmol/kg/日) での最初の注射の 0、1、3、5 および 7 日後の、マウスの体重の変化 (g) のグラフを表す。

【図 22】図 22 は、ビヒクル対照、リラグルチド (30 nmol/kg/日) または mt - 261 (0.3、1、3、10 若しくは 30 nmol/kg/日) での最初の注射の 7 日後の、マウスの脂肪量のグラフを表す。

【図 23】図 23 は、ビヒクル対照、リラグルチド (30 nmol/kg/日) または mt - 261 (0.3、1、3、10 若しくは 30 nmol/kg/日) での最初の注射の 0 または 7 日後の、マウスの血中グルコースレベル (mg/dL) のグラフを表す。

【図 24】図 24 は、mt - 263、エキセンディン - 4 または ビヒクル対照を括弧に示された用量 (nmol/kg/日) で注射したマウスの時間の関数としての、体重の変化 (変化%) の線グラフを表す。

【図 25】図 25 は、mt - 263、エキセンディン - 4 または ビヒクル対照を括弧に示された用量 (nmol/kg/日) で注射したマウスの (0 日目と比較した 7 日目の測定としての)、体重の総変化 (%) の棒グラフを表す。

【図 26】図 26 は、mt - 263、エキセンディン - 4 または ビヒクル対照を括弧に示された用量 (nmol/kg/日) で注射したマウスの (0 日目と比較した 7 日目の測定としての)、血中グルコースレベルの変化 (mg/dL) の棒グラフを表す。

【図 27】図 27 は、ビヒクル対照、リラグルチド、mt - 277、mt - 278 または mt - 279 の最初の注射の 0、1、3、5 および 7 日後の、マウスの体重の変化%のグラフを表す。

【図 28】図 28 は、ビヒクル対照、リラグルチド、mt - 277、mt - 278 または mt - 279 の最初の注射の 0 および 7 日後の、マウスの血中グルコースレベル (mg/dL) のグラフを表す。

【図 29】図 29 は、mt - 331、mt - 311 または ビヒクル対照の投与の 7 日後に測定した、マウスの体重の総変化 (%) のグラフを表す。用量 (nmol/kg) は、括弧に示されている。

【図 30】図 30 は、mt - 331、mt - 311 または ビヒクル対照の投与の 7 日後に測定した、マウスの総食物摂取量 (g) のグラフを表す。用量 (nmol/kg) は、括弧に示されている。

【図 31】図 31 は、mt - 331、mt - 311 または ビヒクル対照の投与の 7 日後に測定した、マウスの血中グルコースの総変化のグラフを表す。用量 (nmol/kg) は、括弧に示されている。

【図 32】図 32 は、mt - 331、mt - 353 または ビヒクル対照の括弧に示された用量 (nmol/kg) での投与の 7 日後に測定した、マウスの体重の総変化のグラフを表す。

【図 33】図 33 は、mt - 331、mt - 353 または ビヒクル対照の括弧に示された用量 (nmol/kg) での投与の 7 日後に測定した、マウスの総食物摂取量 (g) のグラフを表す。

【図 34】図 34 は、mt - 331、mt - 353 または ビヒクル対照の括弧に示された用量 (nmol/kg) での投与の 7 日後に測定した、マウスの血中グルコースレベルの変化 (mg/dL) のグラフを表す。

【図 35】図 35 は、mt - 277、mt - 278、mt - 279 または ビヒクル対照の最初の投与の 7 日後に測定した、マウスの体重の総変化 (%) のグラフを表す。

【図 36】図 36 は、mt - 261、mt - 309 または ビヒクル対照の最初の投与の 6

10

20

30

40

50

日後に測定した、マウスの体重の総変化(%)のグラフを表す。

【図37】図37は、mt-261、mt-309またはビヒクル対照の最初の投与の6日後に測定した、マウスの血中グルコースレベル(mg/dL)のグラフを表す。同じパターンの棒の各対の1番目の棒は、0日目に測定した血中グルコースレベルであり、各対の2番目の棒は、6日目のレベルである。

【図38】図38は、本明細書において更に記載されるように、ビヒクル対照またはmt-261を注射したマウスのmt-261の最初の投与の6日後に測定した(投与初日に測定した体重と比較した)、体重の総変化(%)の棒グラフを表す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

10

<定義>

本発明を説明し、特許請求するに際し、以下に記載される定義に従って下記の語法が使用される。

【0051】

用語「約」は、本明細書で使用されるとき、記述されている値または値の範囲よりも10パーセント多いまたは少ないことを意味するが、この広義のみに対する任意の値または値の範囲を指定することを意図しない。用語「約」に続くそれぞれの値または値の範囲は、絶対値または絶対値の範囲の記述の実施態様を包含することも意図される。

【0052】

本明細書で用いる「薬学的に受容可能な担体」という用語は、標準的な製剤担体、例えば、リン酸バッファー生理食塩水、水、乳液、例えば、油/水または水/脂乳液、および種々のタイプの湿潤剤の内のいずれかを含む。本用語はさらに、ヒトを含む動物における使用に関して、米国連邦政府の規制当局によって承認されるか、または、米国薬局方に掲載されている、任意の薬剤を包含する。

20

【0053】

本明細書で用いる「薬学的に受容可能な塩」という用語は、母体化合物の生物活性を保持するが、生物学的にもまたは他の点でも有害でない、化合物の塩を指す。本明細書に開示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、それと同様の基があるために、酸性および/または塩基性塩を形成することが可能である。

【0054】

30

薬学的に受容可能な塩基添加塩は、無機および有機塩から調製することが可能である。無機塩から得られる塩としては、例示としてのみ述べると、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が挙げられる。有機塩基から得られる塩としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、一級、二級、および三級アミンの塩が挙げられる。

【0055】

薬学的に受容可能な酸添加塩は、無機および有機酸から調製されてもよい。無機酸から得られる塩としては、塩化水素酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などが挙げられる。有機酸から得られる塩としては、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、シナモン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などが挙げられる。

40

【0056】

本明細書で用いる「治療する」という用語は、特定の障害または病態の予防、または、特定の障害または病態に関連する症状の緩和、および/または、前記症状の防止または根絶を含む。例えば、本明細書で用いる「糖尿病を治療する」という用語は、一般に、血中のグルコースレベルを正常レベルに向けて変えることを指し、所定の状況に応じて血中のグルコースレベルを上昇または下降させることを含んでもよい。

【0057】

本明細書で用いる、グルカゴンペプチドの「有効」な量、または「治療的有效量」とは

50

、該ペプチドの、無害であるが、所望の作用を実現するのに十分な量を指す。例えば、所望の作用の一つとしては、例えば、血中グルコースレベルの増加によって測定される、低血糖症の予防または治療が考えられる。本開示のコアゴニスト類縁体の、別の所望の作用としては、例えば、血中グルコースレベルの正常により近づく変化によって測定される、高血糖症の治療、または、例えば、体重の低下によって測定される減量の誘導／体重増加の阻止、または、体重増加の阻止若しくは軽減、または、体脂肪分布の正常化が挙げられよう。「有効な」量は、被検体によってまちまちで、個体の年齢および一般的状態、投与方式などに応じて変動する。従って、正確な「有効量」を特定することは常に可能とは限らない。しかしながら、任意の個別の症例における適切な「有効」量は、当業者であれば、慣用的な実験手法によって定めることが可能である。

10

【 0 0 5 8 】

「非経口的」という用語は、消化管を介さず、何らかの別のルート、例えば、皮下、筋肉内、脊髄内、または静脈内によることを意味する。

【 0 0 5 9 】

本明細書で用いる「精製された」および同様の用語は、ある分子または化合物について、それが生まれた環境または天然の環境において通常それに付随するような汚染物を実質的含まない形になるように、該分子または化合物を単離することを指す。本明細書で用いる「精製」という用語は、絶対的純度を必要とせず、むしろ、相対的な定義であることが意図される。「精製ポリペプチド」という用語は、本明細書では、他の化合物、例えば、ただしこれらに限定されないが、核酸分子、脂質、および炭水化物、から分離されたポリペプチドを記載するのに用いられる。

20

【 0 0 6 0 】

「単離された」という用語は、参照される物質が、その元々の環境（例えば、それが天然産であれば、天然環境）から取り出されていることを必要とする。例えば、生きている動物の体内に存在する天然産ポリヌクレオチドは、単離されていないが、同じポリヌクレオチドが天然系において共存する物質のいくつかまたは全てから分離されていれば、単離されている。

【 0 0 6 1 】

本明細書で使用されるとき、用語「ペプチド」は、3個以上のアミノ酸、典型的には50個未満のアミノ酸の配列を包含し、ここでアミノ酸は、天然型または非天然型のアミノ酸である。非天然型のアミノ酸とは、インビボで天然に生じないが、それでも、本明細書に記載されるペプチド構造に組み込むことができるアミノ酸を意味する。

30

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸のポリマーを、ポリマーの長さに関わりなく意味するために、相互交換的に使用される用語である。典型的には、ポリペプチドおよびタンパク質は、「ペプチド」よりも長いポリマー長さを有する。

【 0 0 6 3 】

本明細書で用いる「グルカゴンペプチド」は、配列番号1のアミノ酸配列か、または、配列番号1のアミノ酸配列の類縁体であって、アミノ酸置換、付加、欠失、または翻訳後修飾（例えば、メチル化、アシル化、ユビキチン化、分子内共有結合、例えば、ラクタム架橋形成、PEG化など）を含み、例えば実施例16に記載するアッセイを用いてcAMP生産により測定した場合、グルカゴンまたはGLP-1またはGIP受容体活性を刺激するような類縁体を含む、任意のペプチドを含む。

40

【 0 0 6 4 】

「グルカゴンアゴニスト」という用語は、例えば実施例16に記載するアッセイを用いてcAMP生産により測定した場合、グルカゴン受容体活性を刺激するようなグルカゴンペプチドを含む、複合体を指す。

【 0 0 6 5 】

本明細書で用いるアミノ酸「修飾」とは、アミノ酸の置換、付加、または欠失を指し、

50

ヒトのタンパク質中に一般的に見出される20種のアミノ酸、および、異型または非天然産アミノ酸の内の任意のアミノ酸による、置換または付加を含む。本明細書を通じて、数字による、ある特定アミノ酸位置への参照（例えば、位置28）は、全て、天然グルカゴン（配列番号1）中のその位置におけるアミノ酸、または、天然グルカゴンの任意の類縁体中の、対応するアミノ酸位置におけるアミノ酸を指す。例えば、本明細書における「位置28」への参照は、配列番号1の最初のアミノ酸が欠失したグルカゴン類縁体では、対応する位置27を意味する。同様に、本明細書における「位置28」への参照は、配列番号1のN末端の前に1個のアミノ酸を付加されたグルカゴン類縁体では、対応する位置29を意味する。異型アミノ酸の商業供給源には、Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)、Chem Pep Inc. (Miami, FL) およびGenzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA) が含まれる。異型アミノ酸は、商業供給者から購入しても、新規に合成しても、または他のアミノ酸から化学的に修飾若しくは誘導体化してもよい。

10

【0066】

本明細書で使用されるとき、用語「天然グルカゴン」は、配列番号1の配列から構成されるペプチドを意味し、用語「天然GIP」は、配列番号4の配列から構成されるペプチドを意味し、用語「天然GLP-1」は、GLP-1（7-36）アミド（配列番号3の配列から構成される）、GLP-1（7-37）酸（配列番号2の配列から構成される）、またはこれら2つの化合物の混合物、を示す一般的用語である。本明細書で使用されるとき、更なる名称が不在なときの「グルカゴン」または「GIP」または「GLP-1」への一般的な参照は、それぞれ天然グルカゴンまたは天然GIPまたは天然GLP-1を意味することが意図される。

20

【0067】

本明細書で使用されるとき、アミノ酸「置換」は、1個のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基に代えることを意味する。

【0068】

本明細書で使用されるとき、用語「保存的アミノ酸置換」は、本明細書において、以下の5つの群のうちの1つの群内での交換として定義される：

I．小型で脂肪族の非極性又は僅かに極性の残基：

Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

II．極性の負荷電残基及びそれらのアミド：

Asp、Asn、Glu、Gln、システイン酸及びホモシステイン酸；

III．極性の正荷電残基：

His、Arg、Lys、オルニチン(Orn)；

IV．大型で脂肪族の非極性残基：

Met、Leu、Ile、Val、Cys、ノルロイシン(Nle)、ホモシステイン；

V．大型の芳香族残基：

Phe、Tyr、Trp、アセチルフェニルアラニン。

30

【0069】

本明細書で使用されるとき、「ポリエチレングリコール鎖」又は「PEG鎖」という総称は、一般式： $H(OCH_2CH_2)_nOH$ （nは9以上）により表される、分岐鎖又は直鎖の、エチレンオキシドと水の縮合ポリマーの混合物を意味する。更なる特定がない限り、この用語は、500～40,000ダルトンの範囲から選択される平均総分子量を有するエチレングリコールのポリマーを含むことが意図される。「ポリエチレングリコール鎖」又は「PEG鎖」は、およその平均分子量を示す数字の接尾辞と組み合わせて使用される。例えば、PEG-5,000は、平均約5,000の総分子量を有するポリエチレングリコールを意味する。

40

【0070】

本明細書で使用するとき、用語「ペグ化」及び同様の用語は、ポリエチレングリコールポリマーを結合することにより、天然の状態から修飾された化合物を意味する。「ペグ化

50

「グルカゴンペプチド」は、共有結合しているPEG鎖を有するグルカゴンペプチドである。

【0071】

本明細書で使用されるとき、ペプチドに対する一般的な参照は、修飾されたアミノ末端及びカルボキシ末端を有するペプチドも包含することが意図される。例えば、末端カルボン酸の代わりにアミド基を含むアミノ酸鎖は、標準的なアミノ酸を示すアミノ酸配列に包含されることが意図される。

【0072】

本明細書で使用されるとき、「リンカー」は、2つの別々の実体を互いに結合する結合、分子、又は分子群である。リンカーは、2つの実体の間に最適な間隔をもたらしてもよいし、更に2つの実体が互いに分離することを可能にする不安定な結合を提供してもよい。不安定な結合には、光切断基、酸不安定部分、塩基不安定部分、及び酵素切断基が含まれる。

10

【0073】

本明細書で使用されるとき「二量体」は、リンカーを介して互いに共有結合している2つのサブユニットを含む複合体である。二量体という用語は、意味を限定する言葉無しに使用される場合、ホモ二量体とヘテロ二量体の両方を包含する。ホモ二量体は、2つの同一のサブユニットを含み、一方、ヘテロ二量体は、互いに実質的に類似してはいるものの異なった2つのサブユニットを含む。

【0074】

20

本明細書で使用されるとき、用語「荷電アミノ酸」は、生理学的pHの水溶液中で負に帯電（すなわち、脱プロトン化）している、又は正に帯電（すなわち、プロトン化）している側鎖を含むアミノ酸を意味する。例えば、負荷電アミノ酸には、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、及びホモグルタミン酸が含まれ、一方、正荷電アミノ酸には、アルギニン、リシン、及びヒスチジンが含まれる。荷電アミノ酸には、ヒトタンパク質において一般的に見出される20個のアミノ酸に加え、異形又は非天然型のアミノ酸のうちの荷電アミノ酸も含まれる。

【0075】

本明細書で使用されるとき、用語「酸性アミノ酸」は、例えばカルボン酸又はスルホン酸基のような第2の酸性部分を含むアミノ酸を意味する。

30

【0076】

本明細書で使用されるとき、ある分子の、第2受容体と比べた第1受容体への「選択性」という用語は、以下の比：第2受容体に対するその分子のEC50を、第1受容体に対するその分子のEC50で割ったもの、を意味する。例えば、第1受容体に対するEC50が1nMで第2受容体に対するEC50が100nMである分子は、第2受容体に比べて第1受容体に対して100倍の選択性を有する。

【0077】

本明細書で使用されるとき、ある分子の「グルカゴン効力」は、グルカゴン受容体に対するその分子のEC50をグルカゴン受容体に対する天然グルカゴンのEC50で割った比、を意味する。

40

【0078】

本明細書で使用されるとき、ある分子の「GIP効力」は、GIP受容体に対するその分子のEC50をGIP受容体に対する天然GIPのEC50で割った比、を意味する。

【0079】

本明細書で使用されるとき、ある分子の「GLP-1効力」は、GLP-1受容体に対するその分子のEC50をGLP-1受容体に対する天然GLP-1のEC50で割った比、を意味する。

【0080】

用語「アルキル」は、示された数の炭素原子を含有する、直鎖又は分岐鎖の炭化水素を意味する。例示的アルキルには、メチル、エチル及び直鎖プロピル基が含まれる。

50

【 0 0 8 1 】

用語「ヘテロアルキル」は、示された数の炭素原子、及び少なくとも1つのヘテロ原子を構造の主鎖に含有する、直鎖又は分岐鎖の炭化水素を意味する。本明細書の目的に適したヘテロ原子には、N、S、及びOが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 2 】

本明細書で使用されるとき、用語「シクロアルキル」は、示された数の炭素原子を含有する環状炭化水素基、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロヘキシルおよびシクロペンチルを意味する。

【 0 0 8 3 】

本明細書で使用されるとき、用語「複素環式」は、示された数の炭素原子と、酸素、窒素および硫黄から成る群から独立して選ばれる1～3個のヘテロ原子とを含有する環状炭化水素基を意味する。ヘテロシクロアルキル基の非限定例には、ピペリジン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、ジヒドロフラン、モルホリン、チオフェンなどが挙げられる。

10

【 0 0 8 4 】

本明細書で使用されるとき、用語「アリール」は、示された数の炭素原子を含有する、単環式または多環式の芳香族基を意味し、好ましくは単環式または二環式芳香族基、例えばフェニルまたはナフチルを意味する。特に示されない限り、アリール基は非置換型であっても、置換されていてもよい。

【 0 0 8 5 】

20

本明細書で使用されるとき、用語「ヘテロアリール」は、示された数の炭素原子と、酸素、窒素および硫黄から成る群から選ばれる少なくとも1個のヘテロ原子とを含有する単環式または多環式芳香族基を意味する。特に示されない限り、アリール基は非置換型であっても、置換されていてもよい。

【 0 0 8 6 】

〔実施態様〕

本明細書に開示される修飾は、グルカゴン（配列番号1）の操作によって、増加されたGIP活性、グルカゴン活性および/またはGLP-1活性を示すグルカゴンペプチドを作り出すことを可能にする。本明細書に開示される他の修飾は、得られるペプチドの半減期を延長する、溶解性を増加する、または安定性を増加する。本明細書に開示される更に他の修飾は、活性に対して何も効果を有さないか、または所望の活性（単数または複数）を破壊することなく実施することができる。同じ目的を果たす（例えば、GIP活性を増加する）任意の組み合わせを、個別にまたは組み合わせて適用することができる。増強された特性を付与する単一または一連の組み合わせのいずれかを、個別にまたは組み合わせて適用することができ、例えば、GIPおよび/またはGLP-1活性の増加を、半減期の増加と組み合わせることができる。

30

【 0 0 8 7 】

例示的な実施態様において、グルカゴンペプチドは、天然グルカゴン配列に対して合計で1個、2個まで、3個まで、4個まで、5個まで、6個まで、7個まで、8個まで、9個まで、又は10個までの、アミノ酸修飾を含むことができる。幾つかの実施態様において、そのようなアミノ酸修飾は、天然グルカゴンの対応する位置の天然型アミノ酸のうちの少なくとも22、23、24、25、26、27、又は28個を保持する（天然グルカゴンに対して例えば1～7個、1～5個、又は1～3個の修飾を有する）。関連する実施態様において、アミノ酸修飾のうちの1、2、3、4、5、6個、またはそれ以上は、非保存的な置換、付加、または欠失であってもよい。幾つかの実施態様において、アミノ酸修飾のうちの1、2、3、4、5、6個、またはそれ以上は、保存的な置換であってもよい。幾つかの実施態様において、1、2、3、4又は5個の非保存的な置換が、位置2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28、又は29のいずれかにおいて実施され、5個までの更なる保存的な置換が、これらの位置のいずれかにおいて実施される。幾つかの実施態様において、1、2、又は3個のアミノ

40

50

酸修飾が位置 1 ~ 16 の範囲内のアミノ酸で実施され、1、2、又は3個のアミノ酸修飾が位置 17 ~ 26 の範囲内のアミノ酸で実施される。

【0088】

< G I P 活性に影響を与える修飾 >

G I P 受容体に対して増強された活性は、位置 1 でのアミノ酸修飾によりもたらされる。例えば、位置 1 の H i s は、大型の芳香族アミノ酸 (T y r、P h e、T r p、アミノ - P h e、ニトロ - P h e、クロロ - P h e、スルホ - P h e、4 - ピリジル - A l a、メチル - T y r、または 3 - アミノ T y r でもよい) で置換されている。予想外なことに、位置 1 の T y r と、アミノ酸 12 - 29 に対応する領域内のアルファ - ヘリックスの安定化との組み合わせは、G I P 受容体、また G L P - 1 受容体およびグルカゴン受容体を活性化するグルカゴンペプチドを提供する。アルファ - ヘリックス構造を、例えば共有若しくは非共有分子内架橋の形成によって、またはアルファ - ヘリックス安定化アミノ酸 (例えば、 γ - 二置換アミノ酸) による位置 12 ~ 29 周辺のアミノ酸の置換および/若しくは挿入によって、安定化することができる。

10

【0089】

G I P 受容体に対して増強された活性は、また、位置 27 および/または 28 のアミノ酸修飾によってもたらされ、更に位置 29 のアミノ酸修飾によってもたらされてもよい。例えば、位置 27 の M e t は、大型の脂肪族アミノ酸 (L e u でもよい) で置換され、位置 28 の A s n は、小型の脂肪族アミノ酸 (A l a でもよい) で置換され、位置 29 の T h r は、小型の脂肪族アミノ酸 (G l y でもよい) で置換されている。L A G による位置 27 ~ 29 での置換は、これらの位置において天然型の M N T 配列と比べて増加した G I P 活性をもたらす。

20

【0090】

G I P 受容体に対して増強された活性は、また、位置 12 のアミノ酸修飾によりもたらされる。例えば、位置 12 は、大型で脂肪族で非極性のアミノ酸 (I l e でもよい) で置換されている。

【0091】

G I P 受容体に対して増強された活性は、また、位置 17 および/または 18 のアミノ酸修飾によりもたらされる。例えば、位置 17 は、極性残基 (G l n でもよい) で置換され、位置 18 は、小型の脂肪族アミノ酸 (A l a でもよい) で置換されている。Q A による位置 17 および 18 での置換は、これらの位置において天然型の R R 配列に比べて増加した G I P 活性をもたらす。

30

【0092】

G I P 受容体活性を増加する上記に記載された修飾のいずれかを、個別にまたは組み合わせて適用することができる。G I P 受容体活性を増加する修飾の組み合わせは、一般に、単独で実施されるそのような修飾のいずれのものよりも高い G I P 活性をもたらす。

【0093】

< グルカゴン活性に影響を与える修飾 >

幾つかの実施態様において、増強された効力を有し、更に向上した溶解性および安定性を有してもよい、グルカゴンの類縁体が提供される。一つの実施態様において、増強されたグルカゴン効力は、天然グルカゴン (配列番号 1) の位置 16 のアミノ酸修飾によりもたらされる。非限定例によると、そのような増強された効力は、位置 16 の天然型のセリンを、グルタミン酸により置換する、または 4 原子の長さの側鎖を有する別の負に帯電したアミノ酸により置換する、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれかにより置換する、または少なくとも 1 個のヘテロ原子 (例えば、N、O、S、P) を含有し約 4 (若しくは 3 ~ 5) 原子長さの側鎖を有する荷電アミノ酸により置換することによって、もたらすことができる。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、元々の、G L P - 1 受容体と比べたグルカゴン受容体への選択性を保持する。

40

【0094】

50

グルカゴン受容体活性は、位置 3 におけるアミノ酸修飾、例えば位置 3 の天然型のグルタミンの酸性、塩基性、又は疎水性アミノ酸による置換、により低減することができる。例えば、位置 3 のアミノ酸の、グルタミン酸、オルニチン、又はノルロイシンによる置換は、グルカゴン受容体活性を実質的に低減または破壊することが示されている。

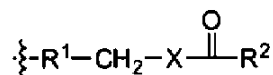
【 0 0 9 5 】

G L P - 1 受容体に対する活性の増強又は維持は、位置 3 の G l n をグルタミン類縁体により置換することで達成できる。例えば、位置 3 にグルタミン類縁体を含むグルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対する天然グルカゴン（配列番号 1）の活性の約 5 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 5 0 %、若しくは約 8 5 % またはそれ以上の活性を示すことができる。幾つかの実施態様において、位置 3 にグルタミン類縁体を含むグルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対する、位置 3 の修飾アミノ酸以外は、グルタミン類縁体を含むペプチドと同じアミノ酸配列を有するような対応するグルカゴンペプチド（例えば、配列番号 2 5 0 または配列番号 2 5 1）のグルカゴン受容体に対する活性の、約 2 0 %、約 5 0 %、約 7 5 %、約 1 0 0 %、約 2 0 0 %、若しくは約 5 0 0 % またはそれ以上の活性を示すことができる。幾つかの実施態様において、位置 3 にグルタミン類縁体を含むグルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対する増強された活性を示すが、増強された活性は、天然グルカゴンのまたは位置 3 の修飾アミノ酸以外は、グルタミン類縁体を含むペプチドと同じアミノ酸配列を有するような対応するグルカゴンペプチドの活性の、1 0 0 0 %、1 0 , 0 0 0 %、1 0 0 , 0 0 0 %、または 1 , 0 0 0 , 0 0 0 % 以下の活性である。

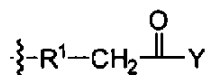
【 0 0 9 6 】

幾つかの実施態様において、グルタミン類縁体は、下記の構造 I、II、または III :

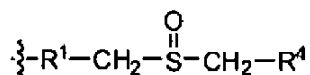
【 化 2 】



構造I



構造II



構造III

〔式中、 R^1 は、 $C_0 - 3$ アルキルまたは $C_0 - 3$ ヘテロアルキルであり； R^2 は、 NH 、 R^4 または $C_1 - 3$ アルキルであり； R^3 は、 $C_1 - 3$ アルキルであり； R^4 は、 H または $C_1 - 3$ アルキルであり； X は、 NH 、 O 、または S であり；そして Y は、 NHR^4 、 SR^3 、または OR^3 である〕で示される側鎖を含む、天然型のまたは非天然型のアミノ酸である。幾つかの実施態様において、 X は、 NH であるか、または Y は、 NHR^4 である。幾つかの実施態様において、 R^1 は、 $C_0 - 2$ アルキルまたは C_1 ヘテロアルキルである。幾つかの実施態様において、 R^2 は、 NHR^4 または C_1 アルキルである。幾つかの実施態様において、 R^4 は、 H または C_1 アルキルである。例示的な実施態様において、構造 I の側鎖を含み、以下のいずれかが成り立つアミノ酸が提供される： R^1 は $CH_2 - S$ であり、 X は NH であり、そして R^2 は CH_3 である（アセトアミドメチル - システイン、 $C(Acm)$ ）； R^1 は CH_2 であり、 X は NH であり、そして R^2 は CH_3 である（アセチルジアミノブタン酸、 $Dab(Ac)$ ）； R^1 は C_0 アルキルであり、 X は NH であり、 R^2 は NHR^4 であり、そして R^4 は H である（カルバモイルジアミノプロパ

ン酸、Dap（尿素））；または、 R^1 は CH_2-CH_2 であり、XはNHであり、そして R^2 は CH_3 である（アセチルオルニチン、Om（Ac））。例示的な実施態様において、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、そして R^4 は、 CH_3 である（メチルグルタミン、Q（Me））。例示的な実施態様において、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、そして R^4 は、Hである（メチオニン-スルホキシド、M（O））。特定の実施態様において、位置3のアミノ酸はDab（Ac）により置換されている。例えば、グルカゴンアゴニストは、配列番号243～248、250、251、および253～256のアミノ酸配列のいずれかを含むことができる。

【0097】

<GLP-1活性に影響を与える修飾>

GLP-1受容体に対する増強された活性は、また、例えば、2個のアミノ酸の側鎖の間の分子内架橋の形成を介して、またはアルファ-ヘリックス安定化アミノ酸（例えば、 α -二置換アミノ酸）による位置12～29周辺のアミノ酸置換および/若しくは挿入を介して、グルカゴンのC末端部分（アミノ酸12～29周辺）のアルファ-ヘリックス構造を安定化することによって、もたらされる。これらのアミノ酸の側鎖は、水素結合、または塩架橋の形成などのイオン相互作用、または共有結合を介して互いに結合することができる。幾つかの実施態様において、架橋は、3個の介在アミノ酸で隔てられているアミノ酸同士、すなわち位置「i」のアミノ酸と位置「i+4」のアミノ酸との間に形成され、ここでiは、12～25（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25）の任意の整数である。例示的な実施態様において、アミノ酸対12と16、13と17、16と20、17と21、20と24、または24と28（i=12、16、20または24のアミノ酸対）の側鎖は、互いに結合しており、したがってグルカゴンのアルファ-ヘリックスを安定化する。

【0098】

他の実施態様において、架橋は、2個の介在アミノ酸で隔てられているアミノ酸同士、すなわち位置「j」のアミノ酸と位置「j+3」のアミノ酸との間に形成され、ここでjは、12～26（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26）の任意の整数である。例示的な実施態様において、jは17である。更なる実施態様において、架橋は、6個の介在アミノ酸で隔てられているアミノ酸同士、すなわち位置「k」のアミノ酸と位置「k+7」のアミノ酸との間に形成され、ここでkは、12～22（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22）の任意の整数である。一つの実施態様において、kは17である。

【0099】

幾つかの実施態様において、架橋またはリンカーは、特に架橋が位置iおよびi+4の間にある場合、約8（または7～9）原子長である。幾つかの実施態様において、架橋またはリンカーは、特に架橋が位置jおよびj+3の間にある場合、約6（または5～7）原子長である。

【0100】

幾つかの実施態様において、分子内架橋は、（a）グルタミン酸による、または4原子長の側鎖を有する別の負に帯電したアミノ酸による、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のうちの1つによる、または、少なくとも1つのヘテロ原子（例えば、N、O、S、P）を含有し約4（若しくは3～5）原子長の側鎖を有するような荷電アミノ酸による、位置16の天然型のセリンの置換、ならびに（b）帯電しているか、または水素結合の能力を有し、少なくとも約5（または4～6）原子長の側鎖を有する別の親水性アミノ酸、例えば、リシン、シトルリン、アルギニンまたはオルニチンによる、位置20の天然型のグルタミンの置換によって、形成される。位置16および20のそのようなアミノ酸の側鎖は、塩架橋を形成することができるか、または共有結合することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

一つの実施態様において、2つのアミノ酸は、互いに結合してラクタム環を形成する。ラクタム環の大きさは、アミノ酸の側鎖の長さに応じて変わることができ、一つの実施態様において、ラクタムは、リシンアミノ酸の側鎖をグルタミン酸の側鎖に結合することによって形成される。ラクタム環におけるアミド結合の順番を逆転することができる（例えば、ラクタム環を、L y s 1 2 と G l u 1 6 の側鎖、あるいは G l u 1 2 と L y s 1 6 の側鎖の間に形成することができる）。

【 0 1 0 2 】

幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドのC末端部分におけるアルファ - ヘリックス構造の安定化は、ラクタム架橋以外の分子内架橋の形成によって達成される。例えば、適切な共有結合方法には、オレフィンメタセシス、ランチオニンに基づいた環化、ジスルフィド架橋または改質硫黄含有架橋形成、
、
 - ジアミノアルカン鎖の使用、金属原子架橋の形成、ペプチド環化の他の方法、のいずれかの1つ以上が含まれ、これらがアルファ - ヘリックスの安定化のために使用される。

【 0 1 0 3 】

G L P - 1 受容体に対する効力を、位置 1 8 の天然アルギニンのアラニン置換により更に増強することができる。

【 0 1 0 4 】

G L P - 1 受容体活性を増加する上記に記載された修飾のいずれかも、個別にまたは組み合わせで適用することができる。G L P - 1 受容体活性を増加する修飾の組み合わせは、一般に、単独で実施されるそのような修飾のいずれのものよりも高いG L P - 1 活性をもたらす。例えば、本発明は、
、
位置 1 6、位置 2 0 およびC末端カルボン酸基に修飾を含むグルカゴンペプチド（更に、位置 1 6 と位置 2 0 のアミノ酸の間に共有結合を有してもよい）；位置 1 6 およびC末端カルボン酸基に修飾を含むグルカゴンペプチド；位置 1 6 および位置 2 0 に修飾を含むグルカゴンペプチド（更に、位置 1 6 と位置 2 0 のアミノ酸の間に共有結合を有してもよい）；ならびに位置 2 0 およびC末端カルボン酸基に修飾を含むグルカゴンペプチド、を提供する。

【 0 1 0 5 】

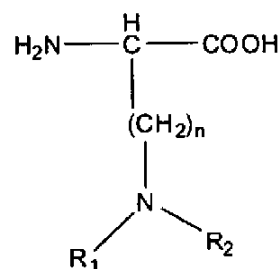
G L P - 1 活性は、（ i ）C末端アルファカルボキシレート基、（ i i ）ヒドロキシル基を欠いているアミノ酸、例えばA b u若しくはI l eによる、位置 7 のT h rの置換、（ i i i ）2 7 若しくは2 8 アミノ酸長のペプチドを生じる、位置 2 7 若しくは2 8 のアミノ酸のC末端側のアミノ酸（複数若しくは単数）の欠失（例えば、位置 2 8 のアミノ酸の欠失、位置 2 8 および2 9 のアミノ酸の欠失）、または（ i v ）これらの組み合わせ、のいずれかを含むことにより、低減することができる。

【 0 1 0 6 】

<グルカゴン、G L P - 1 およびG I P 受容体のそれぞれに対する活性に影響を与える修飾>

グルカゴン受容体、G L P - 1 受容体およびG I P 受容体のそれぞれに対して増強された活性は、（ i ）式 I V：

【 化 3 】



[式IV]

〔式中、nは、1 ~ 1 6 または 1 ~ 1 0 または 1 ~ 7 または 1 ~ 6 または 2 ~ 6 または 2

10

20

30

40

50

若しくは3若しくは4若しくは5であり、 R_1 および R_2 は、それぞれ、 H 、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_1 \sim C_{18} \text{アルキル})OH$ 、 $(C_1 \sim C_{18} \text{アルキル})NH_2$ 、 $(C_1 \sim C_{18} \text{アルキル})SH$ 、 $(C_0 \sim C_4 \text{アルキル})(C_3 \sim C_6)$ シクロアルキル、 $(C_0 \sim C_4 \text{アルキル})(C_2 \sim C_5 \text{複素環式})$ 、 $(C_0 \sim C_4 \text{アルキル})(C_6 \sim C_{10} \text{アリール})R_7$ および $(C_1 \sim C_4 \text{アルキル})(C_3 \sim C_9 \text{ヘテロアリール})$ から成る群から独立して選ばれ、 R_7 は、 H または OH であり、式IVのアミノ酸の側鎖は、遊離アミノ基を含む〕で示されるアミノ酸による、位置16のSerのアミノ酸置換、ならびに(i i)アルファ、アルファ二置換アミノ酸、例えばAIBによる、位置20のGlnのアミノ酸置換によって、もたらされる。幾つかの実施態様において、位置16のアミノ酸はOrn、Dab、LysまたはホモLysであり、位置20のアミノ酸はAIBである。特定の实施態様において、位置16のアミノ酸はLysであり、位置20のアミノ酸はAIBである。

10

【0107】

位置16に式IVのアミノ酸および位置20にアルファ、アルファ二置換アミノ酸を含む類縁体のグルカゴン受容体、GLP-1受容体およびグルカゴン受容体のそれぞれに対する活性は、ペプチドの長さを延長することにより、例えば約1~21、約9~21、約6~18、約9~12または約10若しくは11アミノ酸長さのC末端延長ペプチドに、例えば融合することにより、更に増強することができる。幾つかの実施態様において、C末端は、GPS SGAPPPS (配列番号95)またはXGPS SGAPPPS (配列番号96)への融合により延長され、ここでXは、Glyまたは小型の脂肪族若しくは非極性若しくは僅かに極性のアミノ酸である。代替的な実施態様において、C末端は、GPS SGAPPPS (配列番号95)への融合により延長され、1~11個のアミノ酸が、GPS SGAPPPS (配列番号95)のC末端に融合される。例えば、類縁体のC末端延長部は、PSS SGAPPPS (配列番号95)を、続いて配列番号95のC末端に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個の付加アミノ酸を含むことができる。1~11個の付加アミノ酸は、例えば、Alaなどの小型の脂肪族アミノ酸であることができる。この点において、C末端延長部は、例えば、GPS SGAPPPS A_m のアミノ酸配列を含むことができ、ここでmは1~11である。

20

【0108】

位置16に式IVのアミノ酸および位置20にアルファ、アルファ二置換アミノ酸を含む類縁体が含まれる、GIP活性がありグルカゴンに基づいている類縁体の、グルカゴン、GLP-1およびGIP受容体のそれぞれに対する活性の増強を、C末端延長部に配置されているアミノ酸またはC末端アミノ酸 (例えば、C末端延長部のC末端に付加されたアミノ酸)のアシル化またはアルキル化によって、更に達成することができる。アシル化またはアルキル化は、例えば、C末端延長類縁体の位置30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50のいずれかに配置されているアミノ酸において行うことができる。幾つかの実施態様において、アシル化またはアルキル化されるアミノ酸は、C末端延長類縁体の位置37、38、39、40、41、42または43に配置されている。幾つかの実施態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、式I、IIまたはIIIのアミノ酸であり、例えば、アシルまたはアルキル基に、例えば $C_{10} \sim C_{22}$ に結合している、Lysである。特定の实施態様において、Lysは、配列番号95から構成されるC末端延長部のC末端に配置されており、そのためにLys、Dab、OrnまたはホモLysは類縁体の位置40に配置される。更に、C末端延長ペプチドは、本明細書に記載される位置のいずれか (例えば、位置24)でベグ化もされていてもよい。

30

40

【0109】

GIP活性がありグルカゴンに基づいている類縁体の、グルカゴン、GLP-1およびGIP受容体のそれぞれに対する活性の増強は、スペーサー (例えば、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能スペーサー、疎水性二官能スペーサー)を介するアミノ酸のアシル化またはアルキル化によって、更に達成することができる。幾つかの実施態

50

様において、G I P 活性がありグルカゴンに基づいている類縁体は、スパーサーを介してアシルまたはアルキル基を含み、ここでスパーサーは、類縁体の位置 10 のアミノ酸の側鎖に結合している。他の実施態様において、類縁体は、位置 29 のアミノ酸の C 末端側への 1 ~ 21 個のアミノ酸の C 末端延長部（例えば、配列番号 95 または 96 のアミノ酸配列を含む延長部）を含み、アシルまたはアルキル基に共有結合しているスパーサーは、配列番号 1 の位置 37 ~ 43 の 1 つに対応する位置で延長部のアミノ酸に結合している。特定の実施態様において、スパーサーは、配列番号 1 に対して位置 40 のアミノ酸に結合している。特定の実施態様において、スパーサーは 3 ~ 10 原子長である。特定の態様において、スパーサーとアシルまたはアルキル基との全長は、約 14 ~ 約 28 原子長である。例えば、スパーサーは、本明細書に記載されるいずれかが含まれるが、これらに限定されないアミノ酸であることができる。また、例えば、スパーサーは、本明細書に記載されるアミノ酸を含むジペプチドまたはトリペプチドであることができる。スパーサーは、特定の態様において、次のジペプチド：A l a - A l a、A l a - A l a または G l u - G l u、のうちの 1 つである。グルカゴン、G L P - 1 および G I P 受容体の 1 つ以上に対して活性を増加する目的に適した追加的なスパーサーは、本明細書において更に記載される。

10

【0110】

< D P P - I V 耐性を向上させる修飾 >

位置 1 および / または 2 の修飾は、ジペプチジルペプチダーゼ I V (D P P - I V) 切断に対するペプチドの耐性を増加することができる。例えば、位置 2 のアミノ酸は、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、またはアミノイソ酪酸で置換されていることができる。幾つかの実施態様において、位置 1 のアミノ酸は、D - ヒスチジン、デスアミノヒスチジン、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、アルファ - メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、またはアルファ、アルファ - ジメチルイミダゾール酢酸 (D M I A) で置換されていることができる。

20

【0111】

位置 2 の修飾（例えば、位置 2 の A I B ）および幾つかの場合において、位置 1 の修飾（例えば、位置 1 の D M I A ）は、グルカゴン活性を（時には顕著に）低減できることが観察された、驚くべきことに、本明細書に記載されているように、このグルカゴン活性の低減は、グルカゴンの C 末端部分（アミノ酸 12 - 29 周辺）におけるアルファ - ヘリックス構造を、例えば 2 個のアミノ酸の側鎖の間の共有結合の形成を介して安定化することによって回復できる。幾つかの実施態様において、共有結合は、位置「i」と「i + 4」、または位置「j」と「j + 3」のアミノ酸の間、例えば位置 12 と 16、16 と 20、20 と 24、24 と 28、または 17 と 20 の間にある。例示的な実施態様において、この共有結合は、位置 16 のグルタミン酸と位置 20 のリシンとの間のラクタム架橋である。幾つかの実施態様において、この共有結合は、ラクタム架橋以外の分子内架橋である。例えば、適切な共有結合方法（すなわち、共有分子内架橋を形成する方法）には、オレフィンメタセシス、ランチオニンに基づいた環化、ジスルフィド架橋または改質硫黄含有架橋形成、 β - ジアミノアルカン鎖の使用、金属原子架橋の形成およびペプチド環化の他の方法、のいずれかの 1 つ以上が含まれる。

30

40

【0112】

< 分解を低減する修飾 >

なお更なる例示的な実施態様において、グルカゴンペプチドのいずれかを、配列番号 1 の位置 15 および / または 16 のアミノ酸を修飾して、特に酸性またはアルカリ性の緩衝液におけるペプチドの経時的な分解を低減することによって更に修飾して、その安定性を向上させることができる。そのような修飾は、A s p 15 - S e r 16 のペプチド結合の切断を低減する。例示的な実施態様において、位置 15 のアミノ酸修飾は、A s p の欠失、または、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸、若しくはホモシステイン酸による A s p の置換である。他の例示的な実施態様において、位置 16 のアミノ酸修飾は

50

、Serの欠失、またはThr若しくはAIBによるSerの置換である。他の例示的な実施態様において、位置16のSerは、グルタミン酸により、または4原子長の側鎖を有する別の負に帯電したアミノ酸により、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸のいずれかにより、置換されている。

【0113】

幾つかの実施態様において、天然ペプチドの位置27に存在するメチオニン残基は、例えば欠失または置換により修飾される。そのような修飾は、ペプチドの酸化分解を防止することができる。幾つかの実施態様において、位置27のMetは、ロイシン、イソロイシンまたはノルロイシンで置換されている。幾つかの特定の実施態様において、位置27のMetは、ロイシンまたはノルロイシンで置換されている。

10

【0114】

幾つかの実施態様において、位置20および/または24のGlnは、例えば欠失または置換により修飾される。そのような修飾は、Glnの脱アミド化を介して生じる分解を低減することができる。幾つかの実施態様において、位置20および/または24のGlnは、AlaまたはAIBで置換されている。幾つかの実施態様において、位置20および/または24のGlnは、Lys、Arg、Ornまたはシトルリンで置換されている。

【0115】

幾つかの実施態様において、位置21のAspは、例えば欠失または置換により修飾される。そのような修飾は、Aspの脱水により環状スクシンイミド中間体を形成し、続く異性化によりイソアスパラギン酸塩を形成することによって生じる分解を低減することができる。幾つかの実施態様において、位置21は、Glu、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸で置換されている。幾つかの実施態様において、位置21はGluで置換されている。

20

【0116】

<他の修飾>

天然グルカゴンペプチドの幾つかの位置を、母体となるペプチドの少なくとも幾つかの活性を保持しつつ、修飾することができる。したがって、出願者たちは、位置2、5、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28または29に配置された1個以上のアミノ酸を、天然グルカゴンペプチドに存在するものと異なるアミノ酸で置換し、グルカゴン受容体に対して依然として活性を保持することができる

30

【0117】

幾つかの実施態様において、位置18は、Ala、SerまたはThrから成る群から選ばれるアミノ酸で置換されている。幾つかの実施態様において、位置20のアミノ酸は、Ser、Thr、Lys、Arg、Orn、シトルリンまたはAIBで置換されている。幾つかの実施態様において、位置21は、Glu、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸で置換されている。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、位置16、17、18、20、21、23、24、27、28および29から選ばれる1~10個のアミノ酸修飾を含む。例示的な実施態様において、修飾は、Gln17、Ala18、Glu21、Ile23、Ala24、Val27およびGly29から成る群から選ばれる1個以上のアミノ酸置換である。幾つかの実施態様において、位置17~26から選ばれる1~2個のアミノ酸は、母体ペプチドと異なる。他の実施態様において、位置17~22から選ばれる1~2個のアミノ酸は、母体ペプチドと異なる。更に他の実施態様において、修飾は、Gln17、Ala18、Glu21、Ile23およびAla24である。

40

【0118】

幾つかの実施態様において、1個以上のアミノ酸がグルカゴンペプチドのカルボキシ末端に付加されている。アミノ酸は、典型的には、20個の通常のアミノ酸の1つから選ばれ、幾つかの実施態様において、アミノ酸は、天然アミノ酸のカルボン酸の代わりにアミ

50

ド基を有する。例示的な実施態様において、付加アミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグリシンから成る群から選ばれる。

【0119】

活性を破壊しない他の修飾は、W10またはR20を含む。

【0120】

幾つかの実施態様において、本明細書に開示されているグルカゴンペプチドは、1または2個のアミノ酸残基によるC末端の切断により修飾され、それでもなお、グルカゴン、GLP-1および/またはGIP受容体に対して同様の活性および効力を保持する。この点において、位置29および/または28のアミノ酸を欠失することができる。

【0121】

グルカゴンペプチドのC末端部分(アミノ酸位置12~29付近)におけるアルファ-ヘリックス構造の安定化は、GLP-1及び/又はGIP活性の増強、並びに、位置1及び/又は2でのアミノ酸修飾により低減されたグルカゴン活性の回復をもたらす。アルファ-ヘリックス構造は、例えば共有若しくは非共有分子内架橋の形成によって、又はアルファ-ヘリックス安定化アミノ酸(例えば、 α -二置換アミノ酸)による位置12~29付近のアミノ酸の置換及び/若しくは挿入によって、安定化することができる。

【0122】

幾つかの実施態様において、分子内架橋が2つのアミノ酸側鎖の間に形成されて、グルカゴンペプチドのカルボキシ末端部分(例えば、アミノ酸12~29)の三次元構造を安定化する。2つのアミノ酸側鎖は、非共有結合、例えば水素結合、塩架橋の形成のようなイオン相互作用を介して、又は共有結合により、互いに結合することができる。2つのアミノ酸側鎖が1つ以上の共有結合を介して互いに結合している場合、本明細書において、ペプチドは共有分子内架橋を含んでいると考慮することができる。2つのアミノ酸側鎖が非共有結合、例えば水素結合、イオン相互作用を介して互いに結合している場合、本明細書において、ペプチドは非共有分子内架橋を含んでいると考慮することができる。

【0123】

幾つかの実施態様において、分子内架橋は、3個のアミノ酸で離れている2個のアミノ酸、例えば*i*と*i*+4の位置のアミノ酸の間に形成され、ここで*i*は、12~25の間の任意の整数(例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24及び25)である。より詳細には、アミノ酸対の12と16、16と20、20と24、又は、24と28(*i*=12、16、20、又は24であるようなアミノ酸対)の側鎖は、互いに結合しており、したがってグルカゴンアルファ-ヘリックスを安定化する。代替的には、*i*は17であることができる。

【0124】

幾つかの特定の実施態様において、*i*と*i*+4の位置のアミノ酸が分子内架橋で結合している場合、リンカーの大きさは、約8個の原子又は約7~9個の原子である。

【0125】

他の実施態様において、分子内架橋は、2個のアミノ酸で離れている2個のアミノ酸、例えば*j*と*j*+3の位置のアミノ酸の間に形成され、ここで*j*は、12~26の間の任意の整数(例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、及び26)である。幾つかの特定の実施態様において、*j*は17である。

【0126】

幾つかの特定の実施態様において、*j*と*j*+3の位置のアミノ酸が分子内架橋で結合している場合、リンカーの大きさは、約6個の原子又は約5~7個の原子である。

【0127】

さらに他の実施態様において、分子内架橋は、6個のアミノ酸で離れている2個のアミノ酸、例えば*k*と*k*+7の位置のアミノ酸の間に形成され、ここで*k*は、12~22の間の任意の整数(例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、及び22)である。幾つかの特定の実施態様において、*k*は、12、13又は17であ

10

20

30

40

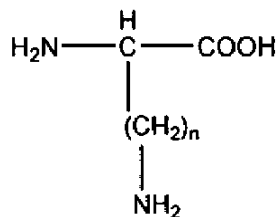
50

る。例示的な実施態様において、 k は 17 である。

【0128】

共有結合して 6 原子結合架橋を形成することができるアミノ酸対形成の例には、Orn と Asp、Glu と式 I (式中、 n は 2 である) のアミノ酸、及び、ホモグルタミン酸と式 I (式中、 n は 1 である) のアミノ酸、が挙げられ、ここで、式 I は下記である：

【化 4】



式中、 $n=1\sim 4$

[式 I]

10

【0129】

共有結合して 7 原子結合架橋を形成することができるアミノ酸対形成の例には、Orn - Glu (ラクタム環)、Lys - Asp (ラクタム)、又は、ホモSer - ホモGlu (ラクトン)、が挙げられる。8 原子リンカーを形成することができるアミノ酸対形成の例には、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)、又は Tyr - Asp (ラクトン)、が挙げられる。9 原子リンカーを形成することができるアミノ酸対形成の例には、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)、又は Tyr - Glu (ラクトン)、が挙げられる。これらのアミノ酸の側鎖のいずれも、アルファ - ヘリックスの三次元構造が妨げられない限り、追加的な化学基で更に置換することができる。当業者であれば、同様の大きさ及び所望の効果の構造の安定化を作り出すような、代替的な対形成又は化学的に修飾された誘導体を含む代替的なアミノ酸類縁体を着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、長さが 6 個の原子であり、更に修飾して所望の効果をもたらすことができる。共有結合がなくても、上記に記載されたアミノ酸対形成又は当業者が想像できる同様の対形成も、非共有結合を介して、例えば塩架橋の形成又は水素結合相互作用を介して、アルファ - ヘリックスに追加的な安定性をもたらすことができる。

20

30

【0130】

ラクタム環の大きさは、アミノ酸の側鎖の長さに応じて変わることができ、一つの実施態様において、ラクタムは、リシンアミノ酸の側鎖をグルタミン酸の側鎖に結合することによって形成される。更なる例示的な実施態様は、以下の対形成を含み、これらはラクタム架橋による対形成であってもよい：位置 12 の Glu と位置 16 の Lys；位置 12 の天然 Lys と位置 16 の Glu；位置 16 の Glu と位置 20 の Lys；位置 16 の Lys と位置 20 の Glu；位置 20 の Glu と位置 24 の Lys；位置 20 の Lys と位置 24 の Glu；位置 24 の Glu と位置 28 の Lys；位置 24 の Lys と位置 28 の Glu。あるいは、ラクタム環におけるアミド結合の順番を逆転することができる (例えば、ラクタム環を、Lys 12 と Glu 16 の側鎖、あるいは Glu 12 と Lys 16 の側鎖の間に形成することができる)。

40

【0131】

ラクタム架橋以外の分子内架橋を使用して、グルカゴン類縁体ペプチドのアルファ - ヘリックスを安定化することができる。一つの実施態様において、分子内架橋は疎水性架橋である。この場合、分子内架橋は、グルカゴン類縁体ペプチドのアルファ - ヘリックスの疎水性面の部分である 2 個のアミノ酸の側鎖の間にあってよい。例えば、疎水性架橋により結合しているアミノ酸のうちの 1 個は、位置 10、14、及び 18 のアミノ酸であることができる。

50

【 0 1 3 2 】

一つの特定の態様において、全炭化水素架橋系を使用してグルカゴンペプチドのアルファ - ヘリックスの 1 又は 2 巻きを架橋するために、オレフィンメタセシスが用いられる。この場合、グルカゴンペプチドは、多様な長さのオレフィン性側鎖を有し、R 又は S 立体化学のいずれかに配置されている - メチル化アミノ酸を、 i の位置と $i + 4$ 又は $i + 7$ の位置とに含むことができる。例えば、オレフィン性側鎖は $(CH_2)_n$ を含むことができ、ここで n は、1 ~ 6 の任意の整数である。一つの実施態様において、架橋長さが 8 個の原子では、 n は 3 である。そのような分子内架橋を形成する適切な方法は、当該技術において記載されている。例えば、Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000) 及び Walensky et al., Science 305: 1466-1470 (2004) を参照すること。あるいは、グルカゴンペプチドは、ヘリックスの隣接する 2 巻きに配置されている 2 つの O - アリル Ser 残基を含むことができ、これらはルテニウム触媒閉環メタセシスを介して互いに架橋されている。そのような架橋の手順は、例えば Blackwell et al., Angew. Chem., Int. Ed. 37: 3281-3284 (1998) に記載されている。

10

【 0 1 3 3 】

別の特定の態様において、システインのペプチド模倣体として広く採用されている、非天然チオ - ジアラニンアミノ酸であるランチオニンを、アルファ - ヘリックスの 1 巻きを架橋するために使用する。ランチオニンに基づく環化の適切な方法は、当該技術において知られている。例えば、Matteucci et al., Tetrahedron Letters 45: 1399-1401 (2004); Mayer et al., J. Peptide Res. 51: 432-436 (1998); Polinsky et al., J. Med. Chem. 35: 4185-4194 (1992); Osapay et al., J. Med. Chem. 40: 2241-2251 (1997); Fukase et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 65: 2227-2240 (1992); Harpp et al., J. Org. Chem. 36: 73-80 (1971); Goodman and Shao, Pure Appl. Chem. 68: 1303-1308 (1996); 及び Osapay and Goodman, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1599-1600 (1993) を参照すること。

20

【 0 1 3 4 】

幾つかの実施態様において、位置 i と $i + 7$ の 2 つの Glu 残基の間の γ - ジアミノアルカン鎖 (例えば 1, 4 - ジアミノプロパンや 1, 5 - ジアミノペンタン) を使用して、グルカゴンペプチドのアルファ - ヘリックスを安定化する。そのようなジアミノアルカン鎖は、鎖の長さに応じて、9 原子又はそれ以上の長さの架橋の形成をもたらす。そのような鎖で架橋されたペプチドを産生する適切な方法は、当該技術において記載されている。例えば、Phelan et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 455-460 (1997) を参照すること。

30

【 0 1 3 5 】

本発明の更に別の実施態様において、ジスルフィド架橋を使用して、グルカゴンペプチドのアルファ - ヘリックスの 1 又は 2 巻きを架橋する。あるいは、一方又は両方の硫黄原子がメチレン基に代えられて等配電子マクロ環化をもたらしている修飾ジスルフィド結合を使用して、グルカゴンペプチドのアルファ - ヘリックスを安定化する。ジスルフィド架橋又は硫黄に基づく環化により修飾する適切な方法は、例えば、Jackson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 9391-9392 (1991) 及び Rudinger and Jost, Experientia 20: 570-571 (1964) に記載されている。

40

【 0 1 3 6 】

更に別の実施態様において、グルカゴンペプチドのアルファ - ヘリックスは、 i と $i + 4$ に位置する 2 つの His 残基又は His と Cys の対による、金属原子の結合を介して安定化される。金属原子は、例えば、Ru (III)、Cu (II)、Zn (II)、又は Cd (II) であることができる。そのような金属結合に基づいたアルファ - ヘリックス安定化の方法は、当該技術において知られている。例えば、Andrews and Tabor, Tetrahedron 55: 11711-11743 (1999); Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 112: 1630-1632 (1990); 及び Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 9063-9064 (1997) を参照すること。

【 0 1 3 7 】

50

グルカゴンペプチドのアルファ - ヘリックスは、代替的には他のペプチド環化の方法により安定化することもでき、その方法は、Davies, J. Peptide. Sci. 9: 471-501 (2003) により検討されている。アルファ - 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、尿素架橋、カルバメート架橋、スルホンアミド架橋などの形成を介して、安定化することができる。例えば、チオエステル架橋を、C末端とCys残基の側鎖との間に形成することができる。あるいは、チオエステルを、チオールを有するアミノ酸 (Cys) 及びカルボン酸を有するアミノ酸 (例えば、Asp、Glu) の側鎖を介して形成することができる。別の方法において、ジカルボン酸、例えばスベリン酸 (オクタン二酸) などのような架橋剤は、遊離アミン、ヒドロキシル、チオール基、及びこれらの組み合わせのような、アミノ酸側鎖の2つの官能基の間に結合を導入することができる。

10

【0138】

一つの実施態様によると、グルカゴンペプチドのアルファ - ヘリックスは、 i と $i + 4$ の位置への疎水性アミノ酸の組み込みを介して安定化される。例えば、 i は Tyr であることができ、そして $i + 4$ は Val 又は Leu であることができる； i は Phe であることができ、そして $i + 4$ は Cys 又は Met であることができる； i は Cys であることができ、そして $i + 4$ は Met であることができる；或いは i は Phe であることができ、そして $i + 4$ は Ile であることができる。本明細書の目的のために、上記のアミノ酸対形成を逆転することができ、これにより位置 i の示されたアミノ酸を代替的に $i + 4$ の位置に配置することができ、一方、位置 $i + 4$ のアミノ酸を i に配置することができることが理解されるべきである。

20

【0139】

本発明の他の実施態様によると、アルファ - ヘリックスは、グルカゴンペプチドのC末端部分 (アミノ酸 12 ~ 29 あたり) に1個以上のアルファ - ヘリックス安定化アミノ酸を (アミノ酸の置換又は挿入のいずれかにより) 組み込むことを介して安定化される。特定の実施態様において、アルファ - ヘリックス安定化アミノ酸は、 α - 二置換アミノ酸であり、その例として、アミノイソ酪酸 (AIB) や、メチル、エチル、プロピル、及び n - ブチルから選択される同一若しくは異なる基により二置換されているアミノ酸や、シクロオクタン若しくはシクロヘプタンにより二置換されているアミノ酸 (例えば、1 - アミノシクロオクタン - 1 - カルボン酸) のいずれかが含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドの位置 16、17、18、19、20、21、24、又は29のうちの1、2、3、4つ又はそれ以上は、 α - 二置換アミノ酸で置換されている。特定の実施態様において、位置 16、20、21 及び 24 のうちの1、2、3つ又は全ては、AIBで置換されている。例えば、グルカゴンペプチドは、分子内架橋、例えば非共有分子内架橋 (例えば、塩架橋) 又は共有分子内架橋 (例えば、ラクタム) の不在下で、AIBによる位置 16 での置換を含むことができる。有利なことに、分子内架橋を欠いているそのようなペプチドは調製が容易である。

30

【0140】

幾つかの実施態様によると、分子内架橋を欠いているグルカゴンペプチドは、アミノ酸位置 12 ~ 29 の範囲において、 α - 二置換アミノ酸による1つ以上の置換と、グルカゴンペプチドのアミノ酸、例えばグルカゴンペプチドの位置 10 のアミノ酸、の側鎖に共有結合しているアシル又はアルキル基とを含む。特定の実施態様において、アシル又はアルキル基は、天然型のアミノ酸に対して非天然型である。特定の態様において、アシル又はアルキル基は、位置 10 のアミノ酸に対して非天然型である。分子内架橋を欠いているそのようなアシル化又はアルキル化グルカゴンペプチドは、非アシル化対応ペプチドの活性と比較して、GLP - 1 及びグルカゴン受容体に対して増強された活性を示す。GLP - 1 及びグルカゴン受容体に対する活性の更なる増強は、分子内架橋を欠いているアシル化グルカゴンペプチドにおいて、スペーサーをアシル又はアルキル基とペプチドの位置 10 のアミノ酸の側鎖との間に組み込むことによって達成することができる。アシル化及びアルキル化は、スペーサーの組み込みを伴う場合も伴わない場合も、本明細書において更に記載されている。

40

50

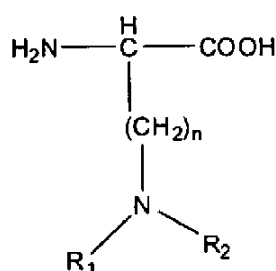
【 0 1 4 1 】

特定の実施態様において、アシル化若しくはアルキル化グルカゴンペプチド又はその類縁体は、更に、G L P - 1 受容体に対する活性を選択的に減少する修飾を含む。例えば、アシル化若しくはアルキル化グルカゴンペプチド又はその類縁体は、以下のうちの1つ又は組み合わせを含む：C末端アルファカルボキシレート、位置27又は28のC末端側のアミノ酸のアミノ酸の欠失（例えば、位置29のアミノ酸の、欠失、位置28及び29のアミノ酸の欠失）、大型で脂肪族で非極性のアミノ酸、例えばI l eによる、位置7のT h rの置換。

【 0 1 4 2 】

幾つかの実施態様において、位置16または位置20は、 R_1 - 二置換アミノ酸、例えばA I Bで置換されている。幾つかの実施態様において、位置20は、 R_2 - 二置換アミノ酸、例えばA I Bで置換されている。特定の実施態様において、位置20は、 R_1 - 二置換アミノ酸、例えばA I Bで置換され、位置16は、式I V：

【化5】



[式IV]

〔式中、nは、1～16または1～10または1～7または1～6または2～6または2若しくは3若しくは4若しくは5であり、 R_1 および R_2 は、それぞれ、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_18$ アルキル、($\text{C}_1 \sim \text{C}_18$ アルキル)OH、($\text{C}_1 \sim \text{C}_18$ アルキル)NH₂、($\text{C}_1 \sim \text{C}_18$ アルキル)SH、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_3 \sim \text{C}_6$)シクロアルキル、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 複素環式)、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) R_7 および($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_3 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール)から成る群から独立して選ばれ、 R_7 は、HまたはOHであり、式I Vのアミノ酸の側鎖は、遊離アミノ基を含む〕で示されるアミノ酸により置換されている。特定の実施態様において、式I Vのアミノ酸は、2,3-ジアミノプロピオン酸(D A P)、2,4-ジアミノ酪酸(D A B)、O r n、L y sまたはホモL y sである。位置16の式I Vのアミノ酸とアルファ、アルファ二置換アミノ酸の組み合わせは、有利には、グルカゴン、G L P - 1およびG I P受容体のそれぞれに対して改善された活性をもたらす。

【 0 1 4 3 】

< 親水性部分の結合 >

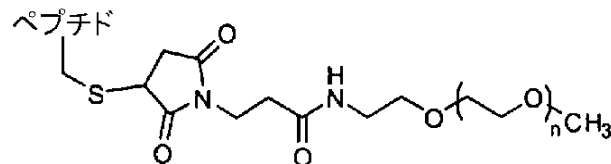
別の実施態様において、本明細書に開示されているグルカゴンペプチドの溶解性は、ペプチドへの親水性部分の共有結合により増強される。親水性部分を、タンパク質と活性化ポリマー分子との反応に使用される任意の適切な条件下でグルカゴンペプチドに結合することができる。アシル化、還元的アルキル化、マイケル付加、チオールアルキル化またはP E G部分の反応性基（例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミドまたはヒドラジノ基）と標的化合物の反応性基（例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミドまたはヒドラジノ基）とその他の化学選択的結合/連結方法を含む、当該技術において既知のあらゆる方法を使用することができる。水溶性ポリマーを1つ以上のタンパク質に結合するのに使用できる活性化基には、スルホン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート、アジリジン、オキシラン、5-ピリジルおよびアルファ-ハロゲン化アシル基（例えば、アルファ-ヨード酢酸、アルファ-プロモ酢酸、アルファ-クロロ酢酸）が含まれるが、これらに限定されない。還元的アルキル化によりペプチドに結合する場合、選ばれ

るポリマーは、重合の程度が制御されるように単一の反応性アルデヒドを有するべきである。例えば、Kinstler et al., Adv. Drug.Delivery Rev. 54: 477-485 (2002); Roberts et al., Adv.Drug Delivery Rev.54: 459-476 (2002)、およびZalipsky et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16: 157-182(1995)を参照すること。

【 0 1 4 4 】

本発明の特定の態様において、チオールを有するグルカゴンペプチドのアミノ酸残基は、PEGのような親水性部分で修飾されている。幾つかの実施態様において、チオールはマイケル付加反応においてマレイミド活性化PEGで修飾され、下記に示されるチオエーテル結合を含むペグ化ペプチドをもたらす。

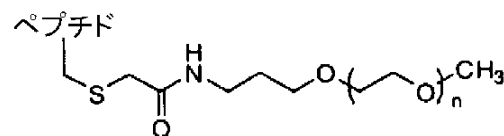
【 化 6 】



【 0 1 4 5 】

幾つかの実施態様において、チオールは核酸置換反応においてハロアセチル活性化PEGで修飾され、下記に示されるチオエーテル結合を含むペグ化ペプチドをもたらす。

【 化 7 】



【 0 1 4 6 】

適切な親水性部分には、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレン化ポリオール (例えば、POG)、ポリオキシエチレン化ソルビトール、ポリオキシエチレン化グルコース、ポリオキシエチレン化グリセロール (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のコポリマー、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-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリ(ベータ-アミノ酸) (ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、ポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、ポリプロピレン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シド、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、コロン酸または他の多糖ポリマー、フィコールまたはデキストラン、ならびにこれらの混合物が含まれる。

【 0 1 4 7 】

親水性部分、例えばポリエチレングリコール鎖は、幾つかの実施態様によると、約500から約4,000ダルトンの範囲から選ばれる分子量を有する。一つの実施態様において、親水性部分、例えばPEGは、約500から約5,000ダルトンの範囲または約1,000から約5,000ダルトンの範囲から選ばれる分子量を有する。別の実施態様において、親水性部分、例えばPEGは、約10,000から約20,000ダルトンの分子量を有する。更に他の例示的な実施態様において、親水性部分、例えばPEGは、約20,000から約40,000ダルトンの分子量を有する。

【 0 1 4 8 】

一つの実施態様において、デキストランが親水性部分として使用される。デキストランは、主に1-6結合により結合しているグルコースサブユニットの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1kD~約100kDの範囲、または約5、10、15若しくは20kDから約20、30、40、50、60、70、80若しく

10

20

30

40

50

は90kDの範囲、で入手することができる。

【0149】

直鎖または分岐鎖ポリマーが考慮される。得られる結合体の調製物は、実質的に単分散または多分散であることができ、ペプチド1つ当たり約0.5、0.7、1、1.2、1.5または2つのポリマー部分を有することができる。

【0150】

一つの実施態様において、親水性部分は、ポリエチレングリコール(PEG)鎖であり、更に、位置16、17、21、24、29の1つ以上、C末端延長部の範囲内の位置、例えば30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、またはC末端アミノ酸(例えば、40)でペプチドに結合していてもよい。幾つかの実施態様において、その位置の天然アミノ酸は、ペプチドへの親水性部分の結合を促進するために、親水性部分との架橋に適した側鎖を有するアミノ酸で置換されている。例示的な実施態様において、その位置の天然アミノ酸は、Lys、Cys、Orn、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。他の実施態様において、親水性基を含むように修飾されているアミノ酸が、ペプチドのC末端に付加される。

【0151】

<溶解性を増強する他の修飾>

別の実施態様において、グルカゴンペプチドのいずれかの溶解性を、ペプチドのC末端部分、好ましくは配列番号1の位置27のC末端側の位置、において荷電アミノ酸を導入するアミノ酸置換及び/又は付加によって、改善することができる。更に、1、2又は3個の荷電アミノ酸を、C末端部分の範囲内に、好ましくは位置27のC末端側に導入してもよい。幾つかの実施態様において、位置28及び/又は29の天然アミノ酸が1又は2個の荷電アミノ酸で置換されている、並びに/或いは更なる実施態様において、1~3個の荷電アミノ酸もまたペプチドのC末端に付加されている。例示的な実施態様において、1、2個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。幾つかの実施態様において、負荷電アミノ酸(酸性アミノ酸)は、アスパラギン酸又はグルタミン酸である。

【0152】

更なる修飾、例えば保存的置換をグルカゴンペプチドに行い、GIP活性(ならびに場合によりGLP-1活性および/またはグルカゴン活性)を依然として保持することが可能でありうる。

【0153】

<結合体及び融合体>

本開示は、本発明のグルカゴンペプチドが結合体部分に結合しているような他の結合体も包含し、この結合は、場合により共有結合を介してでもよく、場合によりリンカーを介してでもよい。結合は、共有化学結合、静電気、水素、イオン、ファンデルワールスのような物理的な力、又は疎水性若しくは親水性相互作用により達成することができる。ビオチン-アビジン、リガンド/受容体、酵素/基質、核酸/核酸結合タンパク質、脂質/脂質結合タンパク質、細胞付着分子パートナー、又は互いに親和性を有する任意の結合パートナー若しくはそのフラグメントを含む、多様な非共有結合系を使用することができる。

【0154】

ペプチドを、ペプチドの標的アミノ酸残基と、これらの標的アミノ酸の選択された側鎖又はN若しくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤との反応により、直接共有結合を介して結合体部分に結合することができる。ペプチド又は結合体部分の反応性基には、例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、-ハロアセチル、マレイミド又はヒドラジノ基が含まれる。誘導体化剤には、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介して結合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リシン残基を介して)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸又は当該技術に既知の他の作用物質が含まれる。あるいは、結合体部分を、多糖又はポリペプチド担体のような中間体担体を介してペプチドに間接的に結合することができる。多糖担体の例にはアミノデキストランが挙げられる。適切なポリペプチド担体の例には、ポリリシン、ポリグルタ

ミン酸、ポリアスパラギン酸、それらのコポリマー、及び、これらのアミノ酸と、得られる装填担体に望ましい溶解性の特性を付与する他のもの、例えばセリン、との混合ポリマーが挙げられる。

【0155】

システイニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸又はクロロアセトアミドのような - ハロアセテート (及び対応するアミン) と反応して、カルボキシメチル又はカルボキシアミドメチル誘導体を与える。システイニル残基は、プロモトリフルオロアセトン、アルファ - プロモ - (5 - イミドゾイル) 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 - クロロ水銀ベンゾエート、2 - クロロ水銀 - 4 - ニトロフェノール、又はクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールと反応させることによって、誘導体化される。

10

【0156】

ヒスチジル残基は、ジエチルピロカーボネートと pH 5 . 5 ~ 7 . 0 で反応させることによって誘導体化されるが、それはこの作用物質がヒスチジル側鎖に比較的特異性があるからである。パラ - プロモフェナシルプロミドも有用であり、反応は、好ましくは 0 . 1 M のカコジル酸ナトリウムにより pH 6 . 0 で実施される。

【0157】

リシニル及びアミノ末端残基は、無水コハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応する。これらの作用物質による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転する効果を有する。アルファ - アミノ含有残基を誘導体化するのに適した他の試薬には、メチルピコリンイミデート、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O - メチルイソ尿素、2 , 4 - ペンタンジオンのようなイミドエステル及びグリオキシレートとのトランスアミダーゼ触媒反応、が含まれる。

20

【0158】

アルギニル残基は、1つ又は幾つかの従来の試薬、なかでもフェニルグリオキサル、2 , 3 - ブタンジオン、1 , 2 - シクロヘキサジオン、及びニンヒドリンによる反応で修飾される。アルギニン残基の誘導体化の反応は、グアニジン官能基の pK_a が高いので、アルカリ条件下で実施される必要がある。更に、これらの試薬は、リシンの基、またアルギニン - イプシロン - アミノ基と反応することができる。

30

【0159】

チロシル残基の特定の修飾は、スペクトル標識をチロシル残基に導入するのに特に興味深く、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンによる反応によって行うことができる。最も一般的には、N - アセチルイミダゾール及びテトラニトロメタンを使用して、O - アセチルチロシル種及び 3 - ニトロ誘導体がそれぞれ形成される。

【0160】

カルボキシル側基 (アスパルチル又はグルタミル) は、R 及び R が異なるアルキル基であるカルボジイミド ($R - N = C = N - R$) 、例えば 1 - シクロヘキシル - 3 - (2 - モルホリニル - 4 - エチル) カルボジイミド又は 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、アスパルチル又はグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギン及びグルタミル残基に変換される。

40

【0161】

他の修飾には、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のアルファ - アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)) 、アスパラギン又はグルタミンの脱アミド化、N末端アミンのアセチル化、及び / 又は C 末端カルボン酸基のアミド化若しくはエステル化、が含まれる。

【0162】

50

別の種類の共有修飾には、ペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的結合が含まれる。糖を、(a) アルギニン及びヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) システインのような遊離スルフィド基、(d) セリン、トレオニン若しくはヒドロキシプロリンのような遊離ヒドロキシル基、(e) チロシン若しくはトリプトファンのような芳香族残基、又は(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1日に公開されたWO 87/05330及びAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0163】

本明細書に記載されているグルカゴンペプチドのいずれかに結合することができる例示的な結合体部分には、異種ペプチド又はポリペプチド(例えば、血漿タンパク質を含む)、標的作用物質、免疫グロブリン若しくはその一部(例えば、可変部領域、CDR若しくはFc領域)、放射性同位体、蛍光体若しくは酵素標識のような診断用標識、水溶性ポリマーを含むポリマー、又は他の治療若しくは診断剤、が含まれるが、これらに限定されない。一つの実施態様において、本発明のグルカゴンペプチド及び血漿タンパク質を含む結合体が提供され、ここで血漿タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、フィブリノゲン、及びグロブリンからなる群より選択される。

【0164】

幾つかの実施態様において、リンカーは、1~約60個、又は1~30個以上の原子長さ、2~5個の原子、2~10個の原子、5~10個の原子又は10~20個の原子長さの原子鎖を含む。幾つかの実施態様において、原子鎖は全て炭素原子である。幾つかの実施態様において、リンカーの主鎖の原子鎖は、C、O、N、及びSからなる群より選択される。原子鎖及びリンカーは、より溶解度の高い結合体をもたらすために、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。幾つかの実施態様において、リンカーは、酵素若しくは他の触媒による切断、又は標的組織若しくは臓器若しくは細胞において見出される加水分解の条件による切断の対象となる官能基を提供する。幾つかの実施態様において、リンカーの長さは、立体障害の潜在性を低減するのに十分な長さである。リンカーが共有結合又はペプチジル結合であり、結合体がポリペプチドである場合、結合体は全体が融合タンパク質であることができる。そのようなペプチジルリンカーは任意の長さであることができる。例示的なリンカーは、約1~50個のアミノ酸長さ、5~50個、3~5個、5~10個、5~15個又は10~30個のアミノ酸長さである。そのような融合タンパク質は、代替的には当業者に既知の組み換え遺伝子操作法により産生することもできる。

【0165】

上記に記述したように、幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、免疫グロブリン又はその一部(例えば、可変部領域、CDR又はFc領域)に結合、例えば融合している。既知の種類の免疫グロブリン(Ig)には、IgG、IgA、IgE、IgD又はIgMが含まれる。Fc領域はIg重鎖のC末端領域であり、これは、再循環(延長された半減期をもたらす)、抗体依存性細胞増殖細胞障害性(ADCC)及び補体依存性細胞障害性(CDC)のような活性を実施するFc受容体への結合に関与している。

【0166】

例えば、幾つかの定義によると、ヒトIgG重鎖Fc領域は、重鎖のCys226からC末端まで伸びている。「ヒンジ領域」は、一般に、ヒトIgG1のGlu216からPro230まで伸びている(他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、システイン結合に関わるシステインを整列することによりIgG1配列と整列させることができる)。IgGのFc領域には2つの定常部ドメイン、CH2及びCH3、が含まれる。ヒトIgGのFc領域のCH2ドメインは、通常、アミノ酸231からアミノ酸341まで伸びている。ヒトIgGのFc領域のCH3ドメインは、通常、アミノ酸342からアミノ酸447まで伸びている。免疫グロブリン又は免疫グロブリンのフラグメント若しくは領域のアミノ酸番号付けに関する参照は、全て、Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.に基づいている。

関連する実施態様において、F c 領域は、1つ以上の、C H 1 以外の免疫グロブリン重鎖の天然の又は修飾された定常部領域、例えばI g G 及びI g A のC H 2 及びC H 3 領域又はI g E のC H 3 及びC H 4 領域、を含むことができる。

【0167】

適切な結合体部分としては、F c R n 結合部位を含む免疫グロブリン配列の一部が挙げられる。サルベージ受容体であるF c R n は、免疫グロブリンを再循環して、血液循環に戻すことに関与する。F c R n 受容体に結合するI g G のF c 部分の領域は、X線結晶構造解析に基づいて記載されている (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379)。F c R n へのF c の主な接触領域は、C H 2 及びC H 3 ドメインの接合部に近接している。F c - F c R n 接触点は、全て単一I g 重鎖の範囲内である。主な接触部位には、C H 2 ドメインのアミノ酸残基248、250~257、272、285、288、290~291、308~311、及び314、並びにC H 3 ドメインのアミノ酸残基385~387、428、及び433~436が含まれる。

【0168】

幾つかの結合体部分は、F c R 結合部位を含んでもよいし含まなくてもよい。F c R は、A D C C 及びC D C に関与する。F c R と直接接触するF c 領域内の位置の例は、アミノ酸234~239 (低ヒンジ領域)、アミノ酸265~269 (B/Cループ)、アミノ酸297~299 (C/Eループ) 及びアミノ酸327~332 (F/Gループ) である (Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000)。I g E の低ヒンジ領域は、F c R I 結合にも関わっている (Henry, et al., Biochemistry 36, 15568-15578, 1997)。I g A 受容体結合に関わる残基は、Lewisらにより記載されている (J Immunol. 175: 6694-701, 2005)。I g E 受容体結合に関わるアミノ酸残基は、Sayers らにより記載されている (J Biol Chem. 279(34): 35320-5, 2004)。

【0169】

アミノ酸修飾を免疫グロブリンのF c 領域において行うことができる。そのようなF c 領域変異体は、F c 領域のC H 3 ドメイン (残基342~447) に少なくとも1つのアミノ酸修飾、及び/又はF c 領域のC H 2 ドメイン (残基231~341) に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。F c R n に親和性の増加を付与すると考えられる突然変異には、T256A、T307A、E380A及びN434Aが含まれる (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591)。他の突然変異は、F c R n の親和性を有意に低減することなく、F c R I、F c R I I A、F c R I I B 及び/又はF c R I I I A へのF c 領域の結合を低減することができる。例えば、A1a 又は他のアミノ酸によるF c 領域の位置297のA s n の置換は、高度に保存されたN - グリコシル化部位を除去し、F c 領域の延長された半減期を伴って免疫原性の低減、また、F c R への結合の低減をもたらすことができる (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591)。F c R への結合を低減する、I g G 1 の位置233~236でのアミノ酸の修飾が行われた (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 and Armour et al. 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号及び同第7,381,408号に記載されており、それぞれその全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0170】

本開示はまた、第2のペプチドまたはポリペプチドが、グルカゴンペプチドの末端、例えばカルボキシ末端に融合されている、グルカゴン融合ペプチドまたはタンパクも包含する。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドのカルボキシ末端に付加されている第2ペプチドは、グルカゴンペプチドのアミノ酸29に連結した、配列番号95 (GPS S G A P P P S)、配列番号97 (K R N R N N I A)、または配列番号98 (K R N R) である。他の実施態様において、第2ペプチドはX G P S S G A P P P S (配列番号96) であり、ここでXは、20個の通常のアミノ酸のうちの1つから選ばれ、例えばグルタミン酸、アスパラギン酸またはグリシンである。一つの実施態様において、Xは、アミ

ノ酸の側鎖に共有結合している親水性部分を更に含むアミノ酸、例えばCysを表す。そのようなC末端延長部は溶解性を改善し、GLP-1活性も向上させることができる。グルカゴンペプチドがカルボキシ末端延長を更に含む幾つかの実施態様において、延長部のカルボキシ末端アミノ酸は、カルボン酸ではなくアミド基またはエステル基で終わる。

【0171】

幾つかの実施態様において、例えばC末端延長部を含むグルカゴンペプチドにおいて、天然グルカゴンペプチドの位置29のトレオニンはグリシンに代えられている。例えば、位置29のトレオニンにグリシン置換を有し、GPS SGAPP S（配列番号95）のC末端延長部を含むグルカゴンペプチドは、同じC末端延長部を含むように修飾された天然グルカゴンと比べてGLP-1受容体に対して4倍効力がある。このT29G置換を、本明細書に開示されている他の修飾と一緒に使用して、GLP-1受容体へのグルカゴンペプチドの親和性を増強することができる。例えば、T29G置換を、S16EおよびN20Kアミノ酸置換と組み合わせることができ、更に、本明細書に記載されているように、アミノ酸16と20の間のラクタム架橋と、また、PEG鎖の付加と、組み合わせることができる。

10

【0172】

幾つかの実施態様において、アミノ酸がC末端に付加されており、付加アミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸およびグリシンから成る群から選ばれる。

【0173】

20

本開示は、本明細書に開示されている修飾グルカゴンペプチドの多量体も包含する。2つ以上の修飾グルカゴンペプチドを、標準的な結合剤および当業者に既知の手順を使用して一緒に結合することができる。例えば、二量体は、特にシステイン、リシン、オルチニン、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニン残基により置換されているグルカゴンペプチドでは、二官能チオール架橋剤および二官能アミン架橋剤の使用を介して2つの修飾グルカゴンペプチドから形成することができる。

【0174】

<アシル化およびアルキル化>

幾つかの実施態様によると、本明細書に開示されているグルカゴンペプチドは修飾されて、アシル基またはアルキル基、例えば天然型のアミノ酸に対して非天然であるアシルまたはアルキル基を含む。アシル化またはアルキル化は、循環しているグルカゴンペプチドの半減期を増加することができる。アシル化またはアルキル化は、有利には、グルカゴンおよび/若しくはGLP-受容体に対して作用の開始を遅延するおよび/若しくは作用の持続時間を延長する、ならびに/またはDPP-IVなどのプロテアーゼに対する耐性を向上させる、ならびに/または溶解性を向上させることができる。グルカゴンペプチドのグルカゴンおよび/またはGLP-1および/またはGLP受容体に対する活性を、アシル化の後で維持することができる。幾つかの実施態様において、アシル化グルカゴンペプチドの効力は、非アシル化型のグルカゴンペプチドに匹敵する。代替的な実施態様において、アシル化グルカゴンペプチドの効力は、非アシル化型のグルカゴンペプチドと比較して増加される。

30

40

【0175】

幾つかの実施態様において、本発明は、グルカゴンペプチドの位置10のアミノ酸に共有結合しているアシル基またはアルキル基を含むように修飾されているグルカゴンペプチドを提供する。グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドの位置10のアミノ酸とアシル基またはアルキル基との間にスペーサーを更に含むことができる。幾つかの実施態様において、アシル基は、脂肪酸若しくは胆汁酸またはこれらの塩であり、例えばC40~C30脂肪酸、C8~C24脂肪酸、コール酸、C4~C30アルキル、C8~C24アルキルまたは胆汁酸のステロイド部分を含むアルキルである。スペーサーは、アシルまたはアルキル基を結合するのに適した反応性基を有する任意の部分である。例示的な実施態様において、スペーサーは、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能または疎

50

水性二官能スパーサーを含む。幾つかの実施態様において、スパーサーは、 Trp 、 Glu 、 Asp 、 Cys および $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ を含むスパーサーから成る群から選ばれ、ここで m は、1～6の任意の整数であり、そして n は、2～12の任意の整数である。そ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、親水性部分（ポリエチレングリコールでもよい）を更に含むこともできる。前述のグルカゴンペプチドのいずれも、2つのアシル基若しくは2つのアルキル基またはそれらの組み合わせを含むことができる。

【0176】

アシル化は、 GLP 活性（ならびに場合により $\text{GLP}-1$ および/またはグルカゴン活性）が増強されまでも少なくとも保持される限り、位置1～29のいずれか、 C 末端延長部内の位置、または N 若しくは C 末端アミノ酸を含む、グルカゴンペプチド内の任意の位置で実施することができる。アシル化は、例えば、グルカゴン配列（配列番号1）の、例えば N または C 末端に付加される任意のアミノ酸において生じることができる。非限定例には、グルカゴンペプチドの位置1、5、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28、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が挙げられる。アシル基を、グルカゴンペプチドのアミノ基に直接的に、またはグルカゴンペプチドのアミノ基にスパーサーを介して間接的に共有結合することができ、ここでスパーサーは、グルカゴンペプチドのアミノ基とアシル基との間に位置している。グルカゴンペプチドを、親水性部分が結合している同じアミノ酸の位置または異なるアミノ酸の位置でアシル化することができる。非限定例には、グルカゴンペプチドの位置10または位置40におけるアシル化、および、 C 末端部分における1つ以上の位置、例えば位置24、28若しくは29、 C 末端延長部内、または C 末端（例えば、 C 末端 Cys の付加を介する）におけるペグ化、が挙げられる。

【0177】

幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは修飾されて、配列番号1のグルカゴンペプチドまたはその類縁体の C 末端側への約1～約21個のアミノ酸の延長部を含み、延長部の少なくとも1個のアミノ酸は、アシル化またはアルキル化されている。例えば、修飾されたグルカゴンペプチドは、配列番号1のグルカゴンペプチドまたはその類縁体の位置29のアミノ酸の C 末端側への約1～約21個のアミノ酸の延長部を含むことができる。あるいは、グルカゴンペプチドまたはその類縁体が1または2個のアミノ酸で切断されている場合、約1～約21個のアミノ酸の延長部は、グルカゴンペプチドまたはその類縁体の位置27または28のアミノ酸の C 末端側であることができる。したがって、 C 末端延長部の内のアシル化またはアルキル化アミノ酸は、例えば、 C 末端延長グルカゴンペプチドの位置28、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のいずれかのアミノ酸であることができる。 C 末端延長部は、幾つかの実施態様において、配列番号95または96のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、配列番号95のアミノ酸配列および配列番号95の C 末端への1～11個の付加アミノ酸を含む C 末端延長部を含み、付加アミノ酸（複数または単数）は、本明細書に記載されているようにアシル化またはアルキル化されている。特定の実施態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、 Dab 、 Orn 、 Lys またはホモ Lys 残基であり、 C 末端延長グルカゴンペプチドまたはその類縁体の位置40に配置されている。

【0178】

一つの実施態様によると、グルカゴンペプチドは、循環の半減期を延長する、ならびに/または作用の開始を遅延するおよび/若しくは持続時間を延長する、ならびに/または DPP-IV などのプロテアーゼに対する耐性を向上させる目的で修飾されて、エステル、チオエーテルまたはアミド結合を介してグルカゴンペプチドに結合しているアシル基を含む。

【0179】

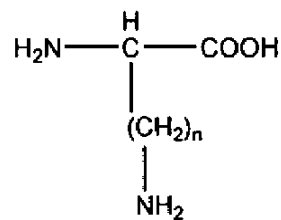
本発明の特定の態様において、グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドのアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシル、又はチオール直接的なアシル化により、アシル基を含むように修飾される。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、アミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル、又はチオールを介して直接アシル化される。幾つかの実施態様において、アシル化は位置 10、20、24、29、又は 40 において行われる。この点において、アシル化グルカゴンペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含んでもよいし、位置 10、20、24、29、及び 40 のアミノ酸の少なくとも 1 個が修飾されて側鎖アミン、ヒドロキシル、若しくはチオールを含む任意のアミノ酸となる、本明細書に記載されている 1 個以上のアミノ酸修飾を含むような、配列番号 1 の修飾アミノ酸配列を含んでもよい。本発明の幾つかの特定の態様において、グルカゴンペプチドの直接アシル化は、位置 10 又は 40 のアミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して生じる。

10

【0180】

幾つかの実施態様において、側鎖アミンを含むアミノ酸は、式 I :

【化 8】



20

式中、 $n=1\sim 4$

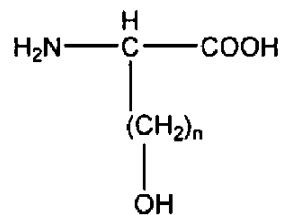
[式 I]

で示されるアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式 I のアミノ酸は、 n が 4 であるアミノ酸 (Lys) 又は n が 3 であるアミノ酸 (Orn) である。

【0181】

他の実施態様において、側鎖ヒドロキシルを含むアミノ酸は、式 II :

【化 9】



30

式中、 $n=1\sim 4$

[式 II]

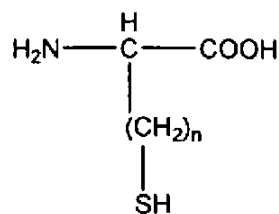
で示されるアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式 II のアミノ酸は、 n が 1 であるアミノ酸 (Ser) である。

40

【0182】

さらに他の実施態様において、側鎖チオールを含むアミノ酸は、式 III :

【化 10】



式中、 $n=1\sim 4$

[式III]

10

で示されるアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式IIIのアミノ酸は、 n が1であるアミノ酸(Cys)である。

【0183】

さらに他の実施態様において、側鎖アミン、ヒドロキシル、又はチオールを含むアミノ酸は、式I、式II、又は式IIIのアミノ酸のアルファ炭素に結合している水素が第2側鎖に代えられていること以外は、式I、式II、又は式IIIと同じ構造を含む、二置換アミノ酸である。

【0184】

本発明の一つの実施態様において、アシル化グルカゴンペプチドは、ペプチドとアシル基との間にスペーサーを含む。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、アシル基と共有結合しているスペーサーと共有結合する。

20

【0185】

スペーサーが結合しているアミノ酸は、スペーサーへの結合を可能とする部分を含むような任意のアミノ酸(例えば、一置換型の-置換アミノ酸、又は、-二置換アミノ酸)であることができる。例えば、側鎖 NH_2 、-OH、又は-COOHを含むアミノ酸(例えば、Lys、Orn、Ser、Asp又はGlu)が適している。この点に関して、アシル化グルカゴンペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を含んでもよいし、位置10、20、24、29、及び40のアミノ酸のうちの少なくとも1個が側鎖アミン、ヒドロキシル、若しくはカルボキシレートを含む任意のアミノ酸となるように修飾された、本明細書に記載されている1個以上のアミノ酸修飾を含む、修飾された配列番号1のアミノ酸配列を含んでもよい。

30

【0186】

幾つかの実施態様において、スペーサーは、側鎖アミン、ヒドロキシル、若しくはチオールを含むアミノ酸であるか、又は、側鎖アミン、ヒドロキシル、若しくはチオールを含むアミノ酸を含む、ジペプチド若しくはトリペプチドである。

【0187】

アシル化がスペーサーのアミン基を介して生じる場合、アシル化は、アミノ酸のアルファアミン又は側鎖アミンを介して生じることができる。アルファアミンがアシル化される場合、スペーサーのアミノ酸は、任意のアミノ酸であることができる。例えば、スペーサーのアミノ酸は、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-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノオクタン酸、であることができる。あるいは、スペーサーのアミノ酸は、酸性残基、例えばAsp及びGlu、であることができる。

40

【0188】

スペーサーのアミノ酸の側鎖アミンがアシル化される場合、スペーサーのアミノ酸は、側鎖アミンを含むアミノ酸、例えば式Iのアミノ酸(例えば、Lys又はOrn)である。この場合、スペーサーのアミノ酸のアルファアミンと側鎖アミンの両方ともアシル化されることが可能であり、それによりグルカゴンペプチドがジアシル化される。本発明の実施態様はそのようなジアシル化分子を含む。

【0189】

50

アシル化がスペーサーのヒドロキシル基を介して生じる場合、アミノ酸又はジペプチド若しくはトリペプチドのアミノ酸のうちの1個は、式ⅠⅠのアミノ酸であることができる。特定の例示的な実施態様において、アミノ酸はSerである。

【0190】

アシル化がスペーサーのチオール基を介して生じる場合、アミノ酸又はジペプチド若しくはトリペプチドのアミノ酸のうちの1個は、式ⅠⅠⅠのアミノ酸であることができる。特定の例示的な実施態様において、アミノ酸はCysである。

【0191】

幾つかの実施態様において、スペーサーは、親水性二官能スペーサーである。特定の実施態様において、親水性二官能スペーサーは、2つ以上の反応性基、例えば、アミン、ヒドロキシル、チオール、及びカルボキシル基、又はこれらの任意の組み合わせ、を含む。特定の実施態様において、親水性二官能スペーサーは、ヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様において、親水性二官能スペーサーは、アミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様において、親水性二官能スペーサーは、チオール基及びカルボキシレートを含む。特定の実施態様において、スペーサーは、アミノポリ(アルキルオキシ)カルボキシレートを含む。この点において、スペーサーは、例えば $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ を含むことができ(式中、mは、1~6の任意の整数であり、そしてnは、2~12の任意の整数である)、例えば、Peptides International, Inc. (Louisville, KY)により販売されている、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸であってもよい。

【0192】

幾つかの実施態様において、スペーサーは、疎水性二官能スペーサーである。疎水性二官能スペーサーは当該技術において知られている。例えば、Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)(その全体が参照として本明細書に組み込まれる)を参照すること。特定の実施態様において、疎水性二官能スペーサーは、2つ以上の反応性基、例えば、アミン、ヒドロキシル、チオール、及びカルボキシル基、又はこれらの任意の組み合わせ、を含む。特定の実施態様において、疎水性二官能スペーサーは、ヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様において、疎水性二官能スペーサーは、アミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様において、疎水性二官能スペーサーは、チオール基及びカルボキシレートを含む。カルボキシレートとヒドロキシル基又はチオール基を含む適切な疎水性二官能スペーサーは、当該技術において知られており、例えば8-ヒドロキシオクタン酸及び8-メルカプトオクタン酸が含まれる。

【0193】

幾つかの実施態様において、二官能スペーサーは、カルボキシレート基の間に1~7個の炭素を持つ非分岐鎖メチレンを含むジカルボンサンではない。幾つかの実施態様において、二官能スペーサーは、カルボキシレート基の間に1~7個の炭素を持つ非分岐鎖メチレンを含むジカルボンサンである。

【0194】

スペーサー(例えば、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性又は疎水性二官能スペーサー)は、特定の実施態様において、3~10個の原子(例えば、6~10個の原子(例えば、6、7、8、9又は10個の原子))の長さを有する。より特定の実施態様において、スペーサーは、約3~10個の原子(例えば、6~10個の原子)の長さであり、アシル基はC12~C18脂肪アシル基、例えばC14脂肪アシル基、C16脂肪アシル基、であり、これによりスペーサーとアシル基の全長は、14~28個の原子、例えば約14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27又は28個の原子の長さとなる。幾つかの実施態様において、スペーサーとアシル基の長さは、17~28個(例えば、19~26個、19~21個)の原子の長さである。

【0195】

特定の前述の実施態様によると、二官能スペーサーは、長さが3～10個の原子のアミノ酸主鎖（例えば、6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸、及び8-アミノオクタン酸）を含む、合成又は天然型のアミノ酸（本明細書に記載されているいずれもが含まれるが、これらに限定されない）であることができる。あるいは、スペーサーは、長さが3～10個の原子（例えば、6～10個の原子）のペプチド主鎖を有する、ジペプチド又はトリペプチドスペーサーであることができる。ジペプチド又はトリペプチドスペーサーのそれぞれのアミノ酸は、ジペプチド又はトリペプチドの他のアミノ酸と同一でもよいし異なってもよく、以下からなる群より独立して選択することができる：天然型のアミノ酸（Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr）のD若しくはL異性体のいずれか、又は、以下からなる群より選択される非天然型のアミノ酸のD若しくはL異性体のいずれかを含む、天然型の及び/又は非天然型のアミノ酸： -アラニン（-Ala）、N-メチル-アラニン（Me-Ala）、アミノ酪酸（Abu）、-アミノ酪酸（-Abu）、アミノヘキサン酸（-Ahx）、アミノイソ酪酸（Aib）、アミノメチルピロールカルボン酸、アミノピペリジンカルボン酸、アミノセリン（Ams）、アミノテトラヒドロピラン-4-カルボン酸、アルギニンN-メトキシ-N-メチルアミド、-アスパラギン酸（-Asp）、アゼチジンカルボン酸、3-(2-ベンゾチアゾリル)アラニン、-tert-ブチルグリシン、2-アミノ-5-ウレイド-n-吉草酸（シトルリン、Cit）、-シクロヘキシルアラニン（Cha）、アセトアミドメチル-システイン、ジアミノブタン酸（Dab）、ジアミノプロピオン酸（Dpr）、ジヒドロキシフェニルアラニン（DOPA）、ジメチルチアゾリジン（DMTA）、-グルタミン酸（-Glu）、ホモセリン（Hse）、ヒドロキシプロリン（Hyp）、イソロイシンN-メトキシ-N-メチルアミド、メチル-イソロイシン（MeIle）、イソニペコ酸（Isn）、メチル-ロイシン（MeLeu）、メチル-リシン、ジメチル-ロイシン、トリメチル-リシン、メタノプロリン、メチオニン-スルホキシド（Met(O)),メチオニン-スルホン（Met(O₂)),ノルロイシン（Nle）、メチル-ノルロイシン（Me-Nle）、ノルバリン、（Nva）、オルニチン（Orn）、パラ-アミノ安息香酸（PABA）、ペニシラミン（Pen）、メチルフェニルアラニン（MePhe）、4-クロロフェニルアラニン（Phe(4-Cl)),4-フルオロフェニルアラニン（Phe(4-F)),4-ニトロフェニルアラニン（Phe(4-NO₂)),4-シアノフェニルアラニン（Phe(4-CN)),フェニルグリシン（Phg）、ピペリジニルアラニン、ピペリジニルグリシン、3,4-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、チロシンスルフェートテトラブチルアミン、メチル-バリン（MeVal）、及びアルキル化3-メルカプトプロピオン酸。

【0196】

幾つかの実施態様において、スペーサーは、全体として負の電荷を含み、例えば1又は2個の負荷電アミノ酸を含む。幾つかの実施態様において、ジペプチドは、一般構造A-Bのジペプチドのいずれでもなく、ここで、Aは、Gly、Gln、Ala、Arg、Asp、Asn、Ile、Leu、Val、Phe及びProからなる群より選択され、Bは、Lys、His、Trpからなる群より選択される。幾つかの実施態様において、ジペプチドスペーサーは、Ala-Ala、-Ala--Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、-アミノ酪酸--アミノ酪酸、及び-Glu--Gluからなる群より選択される。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 7 】

幾つかの例示的な実施態様において、グルカゴンペプチドは、スペーサーのアミン、ヒドロキシル、又はチオールのアシル化により、アシル基を含むように修飾され、ここでスペーサーは、グルカゴンペプチドの位置 10、20、24、29、若しくは40のアミノ酸、又はC末端アミノ酸の側鎖に結合している。

【 0 1 9 8 】

さらに特定の実施態様において、アシル基は、グルカゴンペプチドの位置 10又は40のアミノ酸に結合しており、スペーサーとアシル基の長さは、14～28個の原子である。位置 10又は40のアミノ酸は、幾つかの態様において、式 I のアミノ酸、例えば Lys であるか、又は式 I に関連する、二置換アミノ酸である。より特定の実施態様において、グルカゴンペプチドは、分子内架橋、例えば共有分子内架橋、を欠いている。グルカゴンペプチドは、例えば、ペプチドのアルファ - ヘリックスの安定化のために、1個以上のアルファ、アルファ - 二置換アミノ酸、例えば AIB、を含むペプチドであることができる。従って、アシル化グルカゴンペプチドは、配列番号 555～561および610～612の配列、並びに表 20および28に記載の AIB 含有ペプチドのいずれかを含むことができる。本明細書に示されているように、位置 40のアミノ酸の側鎖に共有結合しているアシル化スペーサーを含むそのようなペプチドは、GIP、GLP-1、グルカゴンの各受容体に対する増強した効力を示す。

【 0 1 9 9 】

アミン、ヒドロキシル、及びチオールを介したペプチドアシル化に適した方法は、当該技術において知られている。例えば、実施例 19 (アミンを介したアシル化の方法)、Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 377-382 (1996); Shimohigashi and Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62 (1982);及びPreviero et al., Biochim Biophys Acta 263: 7-13 (1972) (ヒドロキシルを介したアシル化の方法);並びにSan and Silviu, J Pept Res 66: 169-180 (2005) (チオールを介したアシル化の方法); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., Pharmacuetical Res. "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。

【 0 2 0 0 】

アシル化グルカゴンペプチドのアシル基は、任意の大きさ、例えば任意の長さの炭素鎖であることができ、直鎖であっても分岐鎖であってもよい。本発明の幾つかの特定の実施態様において、アシル基は、C4～C30脂肪酸である。例えば、アシル基は、C4脂肪酸、C6脂肪酸、C8脂肪酸、C10脂肪酸、C12脂肪酸、C14脂肪酸、C16脂肪酸、C18脂肪酸、C20脂肪酸、C22脂肪酸、C24脂肪酸、C26脂肪酸、C28脂肪酸、又はC30脂肪酸のいずれかであることができる。幾つかの実施態様において、アシル基は、C8～C20脂肪酸、例えばC14脂肪酸又はC16脂肪酸、である。

【 0 2 0 1 】

代替的な実施態様において、アシル基は胆汁酸である。胆汁酸は、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、タウロコール酸、グリココール酸及びコレステロール酸が含まれるが、これらに限定されない任意の適切な胆汁酸であることができる。

【 0 2 0 2 】

本発明の幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、長鎖アルカンをアシル化することによって、アシル基を含むよう修飾される。特定の実施態様において、長鎖アルカンは、グルカゴンペプチドのカルボキシル基又はその活性化形態と反応するような、アミン、ヒドロキシル、又はチオール基 (例えば、オクタデシルアミン、テトラデカノール及びヘキサデカンチオール) を含む。グルカゴンペプチドのカルボキシル基又はその活性化形態は、グルカゴンペプチドのアミノ酸 (例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸) の側鎖の一部であってもよいし、ペプチド主鎖の一部であってもよい。

【0203】

特定の実施態様において、グルカゴンペプチドは、それに結合しているスペーサーで長鎖アルカンをアシル化することによって、アシル基を含むように修飾される。特定の実施態様において、長鎖アルカンは、スペーサーのカルボキシル基又はその活性化形態と反応するような、アミン、ヒドロキシル、又はチオール基を含む。カルボキシル基又はその活性化形態を含む適切なスペーサーは、本明細書に記載されており、例えば、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能スペーサー、又は疎水性二官能スペーサーが含まれる。

【0204】

本明細書で使用されるとき、用語「カルボキシル基の活性化形態」は、一般式 $R(C=O)X$ のカルボキシル基を意味し、ここで、 X は離脱基であり、そして R はグルカゴンペプチド又はスペーサーである。例えば、カルボキシル基の活性化形態には、塩化アシル、アシル無水物、及びアシルエステルが含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施態様において、活性化カルボキシル基は、 N -ヒドロキシスクシンイミドエステル (NHS) 離脱基のエステルである。

【0205】

長鎖アルカンがグルカゴン又はスペーサーでアシル化されている本発明のこれらの態様に関して、長鎖アルカンは、任意の大きさであることができ、任意の長さの炭素鎖を含むことができる。長鎖アルカンは、直鎖であっても分岐鎖であってもよい。特定の態様において、長鎖アルカンは、 $C_4 \sim C_{30}$ アルカンである。例えば、長鎖アルカンは、 C_4 アルカン、 C_6 アルカン、 C_8 アルカン、 C_{10} アルカン、 C_{12} アルカン、 C_{14} アルカン、 C_{16} アルカン、 C_{18} アルカン、 C_{20} アルカン、 C_{22} アルカン、 C_{24} アルカン、 C_{26} アルカン、 C_{28} アルカン、又は C_{30} アルカンのいずれかであることができる。幾つかの実施態様において、長鎖アルカンは、 $C_8 \sim C_{20}$ アルカン、例えば C_{14} アルカン、 C_{16} アルカン、又は C_{18} アルカン、を含む。

【0206】

また、幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドのアミン、ヒドロキシル、又はチオール基は、コレステロール酸によりアシル化されている。特定の実施態様において、グルカゴンペプチドは修飾された Cys スペーサーを介してコレステロール酸に結合している。

【0207】

本明細書に記載されているアシル化グルカゴンペプチドは、親水性部分を含むように更に修飾されることができる。幾つかの特定の実施態様において、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。親水性部分の組み込みは、本明細書に記載されたいずれかの方法のような任意の適切な手段によって達成することができる。この点において、アシル化グルカゴンペプチドは、本明細書に記載されている修飾のいずれかを含む配列番号 1 を含むことができ、ここで、位置 10、20、24、29、及び 40 の少なくとも 1 個のアミノ酸はアシル基を含み、位置 16、17、21、24、29、若しくは 40 の少なくとも 1 個のアミノ酸、 C 末端延長部内の位置、又は C 末端のアミノ酸は修飾されて、 Cys 、 Lys 、 Orn 、ホモ- Cys 、又は $Ac-Phe$ となり、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。幾つかの実施態様において、アシル基は、位置 10 又は 40 に結合しており (この結合は場合により Cys 、 Lys 、 Orn 、ホモ- Cys 、又は $Ac-Phe$ を含むスペーサーを介してであってもよい)、親水性部分は、位置 24 の Cys 残基に組み込まれている。

【0208】

あるいは、アシル化グルカゴンペプチドは、スペーサーを含むことができ、ここでスペーサーは、アシル化され、且つ、親水性部分を含むように修飾される。適切なスペーサーの非限定例としては、 Cys 、 Lys 、 Orn 、ホモ- Cys 、及び $Ac-Phe$ からなる群より選択される 1 個以上のアミノ酸を含むスペーサーが挙げられる。

【0209】

本発明の特定の態様において、アシル化グルカゴンペプチドは、配列番号 101 ~ 106、113 ~ 115、117 ~ 119、123 ~ 125、128 ~ 130、132 ~ 134、136 ~ 138、141 ~ 145、148、151、152、154、156、158、160、162、163、165、166、231、234 ~ 239、257、及び 258、のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0210】

幾つかの実施態様によると、グルカゴンペプチドは修飾されて、アルキル基、例えばアミノ酸において天然に生じてはいないアルキル基（例えば、天然型のアミノ酸に対して非天然型であるアルキル基）を含む。任意の特定の理論にとらわれることなく、グルカゴンペプチドのアルキル化は、グルカゴンペプチドのアシル化と比べて、もしも同一でないと

10

【0211】

アルキル化は、GIP 活性（更に GIP 及び / 又はグルカゴン活性でもよい）が、たとえ増強されないとしても少なくとも保持される限り、位置 1 ~ 29 のいずれか若しくは C 末端延長部内の位置又は N 若しくは C 末端アミノ酸を含む、グルカゴンペプチド内の任意の位置で実施することができる。アルキル化は、例えば、グルカゴン配列（配列番号 1）に付加された任意のアミノ酸において、例えば N 又は C 末端において行われてもよい。非限定例としては、位置 1、5、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は 50 が挙げられる。アルキル基を、グルカゴンペプチドのアミノ基に直接的に共有結合することもできるし、グルカゴンペプチドのアミノ基にスペーサーを介して間接的に共有結合することもでき、この場合スペーサーは、グルカゴンペプチドのアミノ基とアルキル基との間に位置している。グルカゴンペプチドを、親水性部分が結合している位置と同じアミノ酸の位置でも、異なるアミノ酸の位置でも、アルキル化することができる。非限定例としては、グルカゴンペプチドの、位置 10 又は 40 でのアルキル化、及び C 末端部分における 1 つ以上の位置、例えば位置 24、28、29、若しくは 40、C 末端延長部内、又は C 末端（例えば、C 末端 Cys の付加を介する）でのペグ化、が挙げられる。

20

30

【0212】

本発明の特定の態様において、グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドのアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシル、又はチオール直接的なアルキル化により、アルキル基を含むように修飾される。幾つかの実施態様において、アルキル化は位置 10、20、24、29、又は 40 においてである。この点において、アルキル化グルカゴンペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含んでもよいし、位置 10、20、24、29、及び 40 のアミノ酸の少なくとも 1 個が修飾されて側鎖アミン、ヒドロキシル、又はチオールを含む任意のアミノ酸となる、本明細書に記載されている 1 個以上のアミノ酸修飾を含むような、配列番号 1 の修飾アミノ酸配列を含んでもよい。本発明の幾つかの特定の態様において、グルカゴンペプチドの直接アルキル化は、位置 10 のアミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル、又はチオールを介して生じる。

40

【0213】

幾つかの実施態様において、側鎖アミンを含むアミノ酸は、式 I のアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式 I のアミノ酸は、n が 4 であるアミノ酸（Lys）か又は n が 3 であるアミノ酸（Orn）である。

【0214】

他の実施態様において、側鎖ヒドロキシルを含むアミノ酸は、式 II のアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式 II のアミノ酸は、n が 1 であるアミノ酸（Ser）である。

【0215】

50

さらに他の実施態様において、側鎖チオールを含むアミノ酸は、式ⅠⅠⅠのアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式ⅠⅠⅠのアミノ酸は、 n が1であるアミノ酸(Cys)である。

【0216】

さらに他の実施態様において、側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含むアミノ酸は、式Ⅰ、式ⅠⅠ、又は式ⅠⅠⅠのアミノ酸のアルファ炭素に結合している水素が第2側鎖に代えられていること以外は、式Ⅰ、式ⅠⅠ、又は式ⅠⅠⅠと同じ構造を含む、二置換アミノ酸である。

【0217】

本発明の一つの実施態様において、アルキル化グルカゴンペプチドは、ペプチドとアルキル基との間にスペーサーを含む。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、アルキル基と共有結合しているスペーサーと共有結合する。幾つかの例示的な実施態様において、グルカゴンペプチドは、スペーサーのアミン、ヒドロキシル又はチオールのアルキル化により修飾されてアルキル基を含み、ここでスペーサーは、グルカゴンペプチドの位置10、20、24、29、又は40のアミノ酸の側鎖に結合している。スペーサーが結合しているアミノ酸は、スペーサーへの結合を可能とする部分を含むような任意のアミノ酸(例えば、一置換アミノ酸、又は、二置換アミノ酸)であることができる。例えば、側鎖NH₂、-OH又は-COOHを含むアミノ酸(例えば、Lys、Orn、Ser、Asp、又はGlu)が適している。この点に関して、アルキル化グルカゴンペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を含んでもよいし、位置10、20、24、29、及び40のアミノ酸の少なくとも1個が修飾されて側鎖アミン、ヒドロキシル、若しくはカルボキシレートを含む任意のアミノ酸となる、本明細書に記載されている1個以上のアミノ酸修飾を含むような、配列番号1の修飾アミノ酸配列を含んでもよい。

【0218】

幾つかの実施態様において、スペーサーは、側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオールを含むアミノ酸であるか、又は側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオールを含むアミノ酸を含むジペプチド若しくはトリペプチドである。

【0219】

アルキル化がスペーサーのアミン基を介して生じる場合、アルキル化は、アミノ酸のアルファアミン又は側鎖アミンを介して生じることができる。アルファアミンがアルキル化される場合、スペーサーのアミノ酸は、任意のアミノ酸であることができる。例えば、スペーサーのアミノ酸は、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-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノオクタン酸であることができる。あるいは、スペーサーのアミノ酸は、アルキル化が酸性残基のアルファアミンで生じる限り、酸性残基、例えばAsp及びGluであることができる。スペーサーのアミノ酸の側鎖アミンがアルキル化される場合、スペーサーのアミノ酸は、側鎖アミンを含むアミノ酸、例えば式Ⅰのアミノ酸(例えば、Lys又はOrn)である。この場合、スペーサーのアミノ酸のアルファアミンと側鎖アミンの両方ともアルキル化されることが可能であり、それによりグルカゴンペプチドがジアルキル化される。本発明の実施態様はそのようなジアルキル化分子を含む。

【0220】

アルキル化がスペーサーのヒドロキシル基を介して生じる場合、アミノ酸又はジペプチド若しくはトリペプチドのアミノ酸のうちの1個は、式ⅠⅠのアミノ酸であることができる。特定の例示的な実施態様において、アミノ酸はSerである。

【0221】

アルキル化がスペーサーのチオール基を介して生じる場合、アミノ酸又はジペプチド若しくはトリペプチドのアミノ酸のうちの1個は、式ⅠⅠⅠのアミノ酸であることができる。特定の例示的な実施態様において、アミノ酸はCysである。

【0222】

10

20

30

40

50

幾つかの実施態様において、スペーサーは、親水性二官能スペーサーである。特定の実施態様において、親水性二官能スペーサーは、2つ以上の反応性基、例えば、アミン、ヒドロキシル、チオール、及びカルボキシル基、又はこれらの任意の組み合わせ、を含む。特定の実施態様において、親水性二官能スペーサーは、ヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様において、親水性二官能スペーサーは、アミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様において、親水性二官能スペーサーは、チオール基及びカルボキシレートを含む。特定の実施態様において、スペーサーは、アミノポリ(アルキルオキシ)カルボキシレートを含む。この点において、スペーサーは、例えば $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ を含むことができ(式中、 m は、1～6の任意の整数であり、そして n は、2～12の任意の整数である)、例えば、Peptides International, Inc. (Louisville, KY)により販売されている、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸であってもよい。

10

【0223】

幾つかの実施態様において、スペーサーは、疎水性二官能スペーサーである。特定の実施態様において、疎水性二官能スペーサーは、2つ以上の反応性基、例えば、アミン、ヒドロキシル、チオール、及びカルボキシル基、又はこれらの任意の組み合わせ、を含む。特定の実施態様において、疎水性二官能スペーサーは、ヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様において、疎水性二官能スペーサーは、アミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様において、疎水性二官能スペーサーは、チオール基及びカルボキシレートを含む。カルボキシレートとヒドロキシル基又はチオール基を含む適切な疎水性二官能スペーサーは、当該技術において知られており、例えば8-ヒドロキシオクタン酸及び8-メルカプトオクタン酸が含まれる。

20

【0224】

スペーサー(例えば、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性又は疎水性二官能スペーサー)は、特定の実施態様において、3～10個の原子(例えば、6～10個の原子(例えば、6、7、8、9、又は10個の原子))の長さを有する。より特定の実施態様において、スペーサーは、約3～10個の原子(例えば、6～10個の原子)の長さであり、アルキルは C_{12} ～ C_{18} アルキル基、例えば C_{14} アルキル基、 C_{16} アルキル基であり、これによりスペーサーとアルキル基の全長は、14～28個の原子、例えば約4、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、又は28個の原子の長さとなる。幾つかの実施態様において、スペーサーとアルキルの長さは、17～28個(例えば、19～26個、19～21個)の原子である。

30

【0225】

特定の前述の実施態様によると、二官能スペーサーは、長さが3～10個の原子のアミノ酸主鎖(例えば、6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸及び8-アミノオクタン酸)を含む合成又は非天然型のアミノ酸であることができる。あるいは、スペーサーは、長さが3～10個の原子(例えば、6～10個の原子)のペプチド主鎖を有するジペプチド又はトリペプチドスペーサーであることができる。ジペプチド又はトリペプチドスペーサーは、例えば本明細書に教示されているアミノ酸のいずれかを含む天然型の及び/又は非天然型のアミノ酸から構成されうる。幾つかの実施態様において、スペーサーは、全体として負の電荷を含み、例えば1又は2個の負荷電アミノ酸を含む。幾つかの実施態様において、ジペプチドスペーサーは、Ala-Ala、-Ala-Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、-アミノ酪酸、-アミノ酪酸、及び-Glu-Gluからなる群より選択される。

40

【0226】

アミン、ヒドロキシル、及びチオールを介したペプチドアルキル化に適した方法は、当該技術において知られている。例えば、ウィリアムソンエーテル合成を使用して、グルカゴンペプチドのヒドロキシル基とアルキル基との間にエーテル結合を形成することができる。また、ハロゲン化アルキルによるペプチドの求核置換反応は、エーテル、チオエーテル又はアミノ結合のいずれかをもたらすことができる。

50

【 0 2 2 7 】

アルキル化グルカゴンペプチドのアルキル基は、任意の大きさ、例えば任意の長さの炭素鎖であることができ、直鎖であっても分岐鎖であってもよい。本発明の幾つかの実施態様において、アルキル基は、C 4 ~ C 3 0 アルキルである。例えば、アルキル基は、C 4 アルキル、C 6 アルキル、C 8 アルキル、C 1 0 アルキル、C 1 2 アルキル、C 1 4 アルキル、C 1 6 アルキル、C 1 8 アルキル、C 2 0 アルキル、C 2 2 アルキル、C 2 4 アルキル、C 2 6 アルキル、C 2 8 アルキル、又はC 3 0 アルキルのいずれかであることができる。幾つかの実施態様において、アルキル基は、C 8 ~ C 2 0 アルキル、例えばC 1 4 アルキル又はC 1 6 アルキルである。

【 0 2 2 8 】

幾つかの実施態様において、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、及びコレステロール酸を含む。

【 0 2 2 9 】

本発明の幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、求核長鎖アルカンとグルカゴンペプチドとを反応させることにより、アルキル基を含むように修飾されており、ここでグルカゴンペプチドは、求核置換に適した離脱基を含む。特定の態様において、長鎖アルカンの求核基は、アミン、ヒドロキシル基、又はチオール基を含む（例えば、オクタデシルアミン、テトラデカノール、及びヘキサデカンチオールである）。グルカゴンペプチドの離脱基は、アミノ酸の側鎖の一部であってもよいし、ペプチド主鎖の一部であってもよい。適切な離脱基には、例えば、N - ヒドロキシスクシンイミド、ハロゲン、及びスルホネートエステルが含まれる。

【 0 2 3 0 】

特定の態様において、グルカゴンペプチドは、求核長鎖アルカンと、グルカゴンペプチドに結合しているスペーサーとを反応させることにより、アルキル基を含むように修飾されており、ここでスペーサーは離脱基を含む。特定の態様において、長鎖アルカンは、アミン、ヒドロキシル、又はチオール基を含む。特定の態様において、離脱基を含むスペーサーは、本明細書において考察された任意のスペーサー、例えば、適切な離脱基を更に含む、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能スペーサー又は疎水性二官能スペーサー、であることができる。

【 0 2 3 1 】

長鎖アルカンがグルカゴン又はスペーサーでアルキル化されている本発明のこれらの態様に関して、長鎖アルカンは、任意の大きさであることができ、任意の長さの炭素鎖を含むことができる。長鎖アルカンは、直鎖であってもよいし、分岐鎖であってもよい。特定の態様において、長鎖アルカンは、C 4 ~ C 3 0 アルカンである。例えば、長鎖アルカンは、C 4 アルカン、C 6 アルカン、C 8 アルカン、C 1 0 アルカン、C 1 2 アルカン、C 1 4 アルカン、C 1 6 アルカン、C 1 8 アルカン、C 2 0 アルカン、C 2 2 アルカン、C 2 4 アルカン、C 2 6 アルカン、C 2 8 アルカン又はC 3 0 アルカンのいずれかであることができる。幾つかの実施態様において、長鎖アルカンは、C 8 ~ C 2 0 アルカン、例えばC 1 4 アルカン、C 1 6 アルカン、又はC 1 8 アルカン、を含む。

【 0 2 3 2 】

また、幾つかの実施態様において、アルキル化は、グルカゴンペプチドとコレステロール部分の間で生じることができる。例えば、コレステロール酸のヒドロキシル基が長鎖アルカンの離脱基を置換して、コレステロール - グルカゴンペプチド産物を形成することができる。

【 0 2 3 3 】

本明細書に記載されているアルキル化グルカゴンペプチドは、親水性部分を含むように更に修飾されてもよい。幾つかの特定の態様において、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。親水性部分の組み込みは、本明細書に記載されたいずれかの方法のような任意の適切な手段によって達成することができる。この点

において、アルキル化グルカゴンペプチドは、配列番号1を含んでもよいし、本明細書に記載されている1個以上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んでもよく、この場合、位置10、20、24、29、及び40の少なくとも1個のアミノ酸はアルキル基を含み、位置16、17、21、24、29、若しくは40、若しくはC末端延長部内の位置の少なくとも1個のアミノ酸、又はC末端アミノ酸は修飾されて、Cys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheとなり、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。幾つかの実施態様において、アルキル基は位置10又は40に結合しており（この結合は、場合によりCys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheを含むスペーサーを介してであってもよい）、親水性部分は、位置24のCys残基に組み込まれている。

10

【0234】

あるいは、アルキル化グルカゴンペプチドは、スペーサーを含むことができ、ここでスペーサーは、アルキル化され、且つ、親水性部分を含むように修飾もされる。適切なスペーサーの非限定例には、Cys、Lys、Orn、ホモ-Cys及びAc-Pheからなる群より選択される1個以上のアミノ酸を含むスペーサーが挙げられる。

【0235】

< 例示的な実施態様 >

本発明の幾つかの実施態様によると、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号1）の類縁体は、配列番号1であって、（a）GIPアゴニスト活性を付与する位置1でのアミノ酸修飾、（b）類縁体のC末端部分（アミノ酸12-29）のアルファ-ヘリックス構造を安定化する修飾を含み、（c）更に、1~10個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個）の更なるアミノ酸修飾を有してもよい、配列番号1を含む。幾つかの実施態様において、類縁体は、GIP受容体に対する天然GIPの活性少なくとも約1%の活性、または本明細書に記載されるGIP受容体に対する他の任意の活性レベルを示す。

20

【0236】

特定の実施態様において、アルファ-ヘリックス構造を安定化する修飾は分子内架橋、例えば本明細書に記載されている任意のものなどの共有分子内架橋が含まれる分子内架橋を、もたらす、または導入するものである。分子内架橋は、幾つかの実施態様において、ラクタム架橋である。これらの実施態様の類縁体のラクタム架橋は、本明細書に記載されているラクタム架橋であることができる。例えば、「アルファ-ヘリックス構造の安定化」のセクションにおけるラクタム架橋の教示を参照すること。例えば、ラクタム架橋は、位置*i*と*i*+4のアミノ酸の側鎖の間、または位置*j*と*j*+3のアミノ酸の側鎖の間にあるものであることができ、ここで、*i*は12、13、16、17、20または24であり、*j*は17である。特定の実施態様において、ラクタム架橋は、位置16と20のアミノ酸の間にあることができ、ここで、位置16および20のアミノ酸の一方はGluで置換され、位置16および20のアミノ酸の他方はLysで置換されている。

30

【0237】

代替的な実施態様において、アルファ-ヘリックス構造を安定化する修飾は、類縁体の位置（単数または複数）の20、21および24のうちの1、2、3または4個の、
- 二置換アミノ酸の導入である。幾つかの実施態様において、
- 二置換アミノ酸はAIBである。特定の態様において、
- 二置換アミノ酸（例えば、AIB）は、位置20にあり、位置16のアミノ酸は、例えば本明細書に記載されている式IVのアミノ酸などの正に帯電しているアミノ酸で置換されている。式IVのアミノ酸は、ホモLys、Lys、Ornまたは2,4-ジアミノ酪酸（Dab）であることができる。

40

【0238】

本発明の特定の態様において、位置1でのアミノ酸修飾は、イミダゾール側鎖を欠いているアミノ酸、例えば大型の芳香族アミノ酸（例えば、Tyr）によるHisの置換である。

【0239】

50

特定の態様において、グルカゴンの類縁体は、位置 27、28 および 29 のうちの 1、2 つ、または全てにおいてアミノ酸修飾を含む。例えば、位置 27 の Met は、大型の脂肪族アミノ酸 (Leu でもよい) で置換されていることができるか、位置 28 の Asn は、小型の脂肪族アミノ酸 (Ala でもよい) で置換されていることができるか、位置 29 の Thr は、小型の脂肪族アミノ酸 (Gly でもよい) で置換されていることができるか、または前記の 2 若しくは 3 つの組み合わせであることができる。特定の態様において、グルカゴンの類縁体は、位置 27 に Leu、位置 28 に Ala および位置 29 に Gly または Thr を含む。

【0240】

本発明の特定の実施態様において、グルカゴンの類縁体は、位置 29 のアミノ酸の C 末端側に 1 ~ 21 個のアミノ酸の延長部を含む。延長部は、例えば、配列番号 95 または 96 のアミノ酸配列を含むことができる。追加的にまたは代替的に、グルカゴンの類縁体は、延長部の 1 ~ 6 個のアミノ酸が正に帯電しているアミノ酸である延長部を含むことができる。正に帯電しているアミノ酸は、Lys、ホモ Lys、Orn および Dab が含まれるが、これらに限定されない式 IV のアミノ酸であることができる。

【0241】

グルカゴンの類縁体は、幾つかの実施態様において、本明細書に記載されているようにアシル化またはアルキル化される。例えば、アシルまたはアルキル基は、本明細書において更に記載されるように、類縁体の位置 10 または 40 に、スパーサーを伴いまたは伴わないで、グルカゴンの類縁体に結合することができる。類縁体は、本明細書において更に記載されるように、追加的にまたは代替的に修飾されて親水性部分を含むことができる。更に、幾つかの実施態様において、類縁体は、以下の修飾：

- (a) D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val、または - アミノ - N - 酪酸で置換されている、位置 2 の Ser；
- (b) Trp、Lys、Orn、Glu、Phe、または Val で置換されている、位置 10 の Tyr；
- (c) 位置 10 の Lys へのアシル基の結合；
- (d) Arg または Ile で置換されている位置 12 の Lys；
- (e) Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、Gly、または AIB で置換されている、位置 16 の Ser；
- (f) Gln で置換されている位置 17 の Arg；
- (g) Ala、Ser、Thr、または Gly で置換されている、位置 18 の Arg；
- (h) Ser、Thr、Ala、Lys、シトルリン、Arg、Orn、または AIB で置換されている、位置 20 の Gln；
- (i) Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換されている、位置 21 の Asp；
- (j) Ile で置換されている位置 23 の Val；
- (k) Asn、Ser、Thr、Ala、または AIB で置換されている、位置 24 の Gln；ならびに
- (l) 位置 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28、および 29 のいずれかでの保存的置換のうちの任意の 1 つまたは組み合わせを含む。

【0242】

例示的な実施態様において、GIP アゴニスト活性を有するグルカゴン (配列番号 1) の類縁体は、以下の修飾：

- (a) GIP アゴニスト活性を付与する位置 1 でのアミノ酸修飾、
- (b) 位置 i と i + 4 のアミノ酸の側鎖の間、または位置 j と j + 3 のアミノ酸の側鎖の間のラクタム架橋 (ここで、i は 12、13、16、17、20 または 24 であり、j は 17 である)、
- (c) 位置 27、28 および 29 のうちの 1、2 つ、または全てでのアミノ酸修飾、例

10

20

30

40

50

えば位置 27 および / または 28 でのアミノ酸修飾、ならびに

(d) 1 ~ 9 個または 1 ~ 6 個の更なるアミノ酸修飾、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 個の更なるアミノ酸修飾を含み、

GIP 受容体活性化における類縁体の EC50 は、約 10 nM 以下である。

【0243】

これらの実施態様の類縁体のラクタム架橋は、本明細書に記載されているラクタム架橋であることができる。例えば、「アルファ - ヘリックス構造の安定化」のセクションにおけるラクタム架橋の教示を参照すること。例えば、ラクタム架橋は、位置 16 と 20 のアミノ酸の間にあることができ、ここで、位置 16 および 20 のアミノ酸の一方は Glu で置換され、位置 16 および 20 のアミノ酸の他方は Lys で置換されている。

10

【0244】

これらの実施態様によると、類縁体は、例えば、配列番号 5 ~ 94 のいずれかのアミノ酸配列を含むことができる。

【0245】

他の例示的な実施態様において、GIP アゴニスト活性を有するグルカゴン (配列番号 1) の類縁体は、以下の修飾：

(a) GIP アゴニスト活性を付与する位置 1 でのアミノ酸修飾、

(b) 類縁体の位置 16、20、21 および 24 のうちの 1、2、3 つ、または全てのアミノ酸が、
- 二置換アミノ酸で置換されている、

20

(c) 位置 27、28 および 29 のうちの 1、2 つ、または全てのアミノ酸修飾、例えば位置 27 および / または 28 でのアミノ酸修飾、ならびに

(d) 1 ~ 9 個または 1 ~ 6 個の更なるアミノ酸修飾、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 個の更なるアミノ酸修飾を含み、

GIP 受容体活性化における類縁体の EC50 は、約 10 nM 以下である。

【0246】

これらの実施態様の類縁体の
- 二置換アミノ酸は、メチル、エチル、プロピルおよび n - ブチルから選ばれる同一若しくは異なる基により二置換されているアミノ酸である、またはシクロオクタン若しくはシクロヘプタンにより二置換されているアミノ酸 (例えば、1 - アミノシクロオクタン - 1 - カルボン酸) であるアミノイソ酪酸 (AIB) が含まれるが、これに限定されない任意の
- 二置換アミノ酸であることができる。特定の実施態様において、
- 二置換アミノ酸は AIB である。特定の態様において、位置 20 のアミノ酸は、
- 二置換アミノ酸、例えば AIB で置換されている。

30

【0247】

これらの実施態様によると、類縁体は、例えば、配列番号 99 ~ 141、144 ~ 164、166 ~ 169 および 173 ~ 178 のいずれかのアミノ酸配列を含むことができる。

【0248】

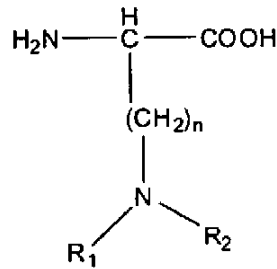
更に他の例示的な実施態様において、GIP アゴニスト活性を有するグルカゴン (配列番号 1) の類縁体は、以下の修飾：

40

(a) GIP アゴニスト活性を付与する位置 1 でのアミノ酸修飾、

(b) 式 I V：

【化 1 1】



[式IV]

10

〔式中、 n は、1～16または1～10または1～7または1～6または2～6であり、 R_1 および R_2 は、それぞれ、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル、($\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) OH 、($\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) NH_2 、($\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) SH 、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_3 \sim \text{C}_6$)シクロアルキル、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 複素環式)、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) R_7 および($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル)($\text{C}_3 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール)から成る群から独立して選ばれ、 R_7 は、 H または OH であり、式IVのアミノ酸の側鎖は、遊離アミノ基を含む〕

で示されるアミノ酸による位置26のSerのアミノ酸置換、

(c) アルファ, アルファ二置換アミノ酸による位置20のGlnのアミノ酸置換、

(d) 位置27、28および29のうちの1、2つ、または全てのアミノ酸修飾、例えば位置27および/または28のアミノ酸修飾、ならびに

20

(e) 1～9個または1～6個の更なるアミノ酸修飾、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8または9個の更なるアミノ酸修飾を含み、

GIP受容体活性化における類縁体のEC50は、約10nM以下である。

【0249】

これらの実施態様の類縁体の式IVのアミノ酸は、例えば式IVのアミノ酸などの任意のアミノ酸であることができ、ここで n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16である。特定の態様において、 n は2、3、4または5であり、この場合では、アミノ酸は、それぞれDab、Orn、LysまたはホモLysである。

30

【0250】

これらの実施態様の類縁体のアルファ, アルファ二置換アミノ酸は、任意のアルファ, アルファ二置換アミノ酸であってもよく、アミノイソ酪酸(AIB)や、メチル、エチル、プロピルおよび n -ブチルから選ばれる同一若しくは異なる基により二置換されているアミノ酸、またはシクロオクタン若しくはシクロヘプタンにより二置換されているアミノ酸(例えば、1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸)が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施態様において、アルファ, アルファ置換アミノ酸はAIBである。

【0251】

これらの実施態様によると、類縁体は、例えば、配列番号99～165のいずれかのアミノ酸配列を含むことができる。

40

【0252】

更に他の例示的な実施態様において、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン(配列番号1)の類縁体は、

(a) GIPアゴニスト活性を付与する位置1でのアミノ酸修飾、および

(b) 位置29のアミノ酸のC末端側への約1～約21個のアミノ酸の延長部(ここで延長部の少なくとも1個のアミノ酸はアシル化またはアルキル化されている)を含み、

ここで、GIP受容体活性化における類縁体のEC50は、約10nM以下である。

【0253】

50

幾つかの実施態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、式 I、I I または I I I のアミノ酸である。より特定の実施態様において、式 I のアミノ酸は、D a b、O r n、L y s またはホモ L y s である。また、幾つかの実施態様において、約 1 ~ 約 2 1 個のアミノ酸の延長部は、G P S S G A P P P S (配列番号 9 5) または X G P S S G A P P P S (配列番号 9 6) (ここで X は任意のアミノ酸である) または G P S S G A P P P K (配列番号 1 7 0) または X G P S S G A P P P K (配列番号 1 7 1) または X G P S S G A P P P S K (配列番号 1 7 2) (ここで X は、G l y または小型の脂肪族若しくは非極性若しくは僅かに極性のアミノ酸である) のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様において、前記の約 1 ~ 約 2 1 個のアミノ酸は、配列番号 9 5、9 6、1 7 0、1 7 1、または 1 7 2 に対して保存的な 1 つ以上の置換を含めた配列を含むことができる。幾つかの実施態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、C 末端延長類縁体の位置 3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2 または 4 3 に配置されている。特定の態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、C 末端延長類縁体の位置 4 0 に配置されている。

【0254】

幾つかの実施態様において、G I P アゴニスト活性を有する類縁体は、位置 2 7、2 8 および 2 9 のうちの 1、2 つ、または全てでのアミノ酸修飾、例えば位置 2 7 および / または 2 8 でのアミノ酸修飾を更に含む。

【0255】

上記の例示的な実施態様のいずれかにおいて、G I P アゴニスト活性を付与する位置 1 でのアミノ酸修飾は、イミダゾール側鎖を欠いているアミノ酸による H i s の置換であることができる。位置 1 でのアミノ酸修飾は、例えば、大型の芳香族アミノ酸による H i s の置換であることができる。幾つかの実施態様において、大型の芳香族アミノ酸は、例えば T y r を含む、本明細書に記載されている任意のものである。

【0256】

また、上記の例示的な実施態様に関して、位置 2 7、2 8 および 2 9 のうちの 1、2 つ、または全てにおけるアミノ酸修飾は、本明細書に記載されるこれらの位置の修飾のいずれかであることができる。例えば、位置 2 7 の M e t は、大型の脂肪族アミノ酸 (L e u でもよい) で置換されていることができる、位置 2 8 の A s n は、小型の脂肪族アミノ酸 (A l a でもよい) で置換されていることができる、および / または位置 2 9 の T h r は、小型の脂肪族アミノ酸 (G l y でもよい) で置換されていることができる。あるいは、類縁体は、位置 2 7 および / または 2 8 にそのようなアミノ酸修飾を含むことができる。

【0257】

上記の例示的な実施態様の類縁体は、例えば、G I P、G L P - 1 および グルカゴン 受容体のいずれかに対して活性を増加若しくは減少する、溶解性を向上させる、作用の持続時間若しくは循環半減期を向上させる、作用の開始を遅延する、または安定性を増加する本明細書の記載されている修飾のいずれかなどの、1 ~ 9 個または 1 ~ 6 個の更なる付加アミノ酸修飾、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 個の更なるアミノ酸修飾を更に含むことができる。類縁体は、例えば、位置 1 2 のアミノ酸修飾 (I l e でもよい) による置換、ならびに / あるいは 1 7 および 1 8 のアミノ酸修飾 (位置 1 7 の Q による置換および位置 1 8 の A による置換でもよい)、ならびに / あるいは G P S S G A P P P S (配列番号 9 5) 若しくは X G P S S G A P P P S (配列番号 9 6) の配列、または配列番号 9 5 若しくは 9 6 に対して保存的な 1 つ以上の置換を含めた配列の、C 末端への付加を更に含むことができる。類縁体は、以下の修飾:

- (i) D - S e r、A l a、D - A l a、G l y、N - メチル - S e r、A I B、V a l、または - アミノ - N - 酪酸で置換されている、位置 2 の S e r ;
- (ii) T r p、L y s、O r n、G l u、P h e、または V a l で置換されている、位置 1 0 の T y r ;
- (iii) 位置 1 0 の L y s へのアシル基の結合 ;
- (iv) A r g で置換されている位置 1 2 の L y s ;

(v) Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、Gly、またはAIBで置換されている、位置16のSer；

(vi) Glnで置換されている位置17のArg；

(vii) Ala、Ser、Thr、またはGlyで置換されている、位置18のArg；

(viii) Ala、Ser、Thr、Lys、シトルリン、Arg、Orn、またはAIBで置換されている、位置20のGln；

(ix) Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換されている、位置21のAsp；

(x) Ileで置換されている位置23のVal；

(xi) Asn、Ala、Ser、Thr、またはAIBで置換されている、位置24のGln；ならびに

(xii) 位置2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28、および29のいずれかでの、保存的置換、
のうちの1つ以上を含むことができる。

類縁体は、幾つかの実施態様において、(i)から(xii)の修飾の組み合わせを含む。代替的にまたは追加的に、類縁体は、位置3にアミノ酸修飾（例えば、GluによるGlnのアミノ酸置換）を含むことができ、ここで類縁体は、グルカゴン受容体に対するグルカゴンの活性の1%未満の活性を有する。代替的にまたは追加的に、類縁体は、位置7にアミノ酸修飾（例えば、ヒドロキシル基を欠いているアミノ酸、例えばAbuまたはIleによる、Thrのアミノ酸置換）を含むことができ、ここで類縁体は、GLP-1受容体に対するGLPの活性の10%未満の活性を有する。

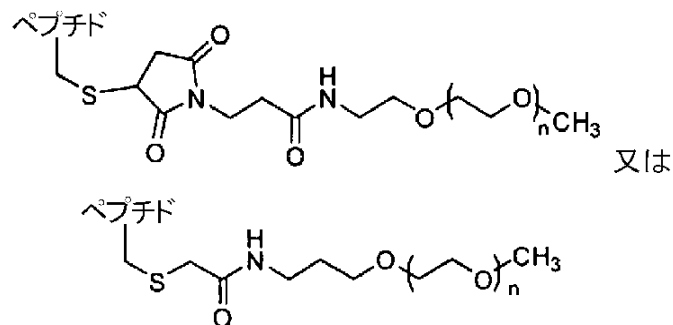
【0258】

例示的な実施態様に関して、類縁体は、親水性部分に共有結合することができる。幾つかの実施態様において、類縁体は、位置16、17、20、21、24、29、40のいずれかのアミノ酸またはC末端アミノ酸における親水性部分に共有結合している。特定の実施態様において、類縁体は、C末端延長部（例えば、配列番号95のアミノ酸配列）と、親水性部分を含むアミノ酸の付加とを含み、それにより、親水性部分が類縁体の位置40に共有結合している。

【0259】

幾つかの実施態様において、親水性部分は、類縁体のLys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニン残基に共有結合している。Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニンは、グルカゴン配列（配列番号1）に対して天然であるアミノ酸であってもよいし、配列番号1の天然アミノ酸を交換するアミノ酸であってもよい。親水性部分がCysに結合している幾つかの実施態様において、親水性部分への結合は、下記構造：

【化12】



を含むことができる。

【0260】

親水性部分を含む類縁体に関して、親水性部分は、本明細書に記載された任意のものであることができる。例えば、「親水性部分の結合」のセクションの教示を参照すること。

幾つかの実施態様において、親水性部分は、ポリエチレングリコール（PEG）である。PEGは、特定の態様において、約1,000ダルトンから約40,000ダルトン、例えば約20,000ダルトンから約40,000ダルトンの分子量を有する。

【0261】

例示的な実施態様に関して、類縁体は、側鎖がアシルまたはアルキル基（例えば、天然型のアミノ酸に対して非天然であるアシルまたはアルキル基）に共有結合している修飾アミノ酸を含むことができる。アシル化またはアルキル化類縁体は、「アシル化およびアルキル化」のセクションに記載されているアシル化またはアルキル化ペプチドによるものであることができる。幾つかの実施態様において、アシル基は、例えばC10脂肪アシル若しくはアルキル基、C12脂肪アシル若しくはアルキル基、C14脂肪アシル若しくはアルキル基、C16脂肪アシル若しくはアルキル基、C18脂肪アシル若しくはアルキル基、C20アシル若しくはアルキル基、またはC22アシル若しくはアルキル基などの、C4～C30脂肪アシル基である。アシルまたはアルキル基は、位置10若しくは40のアミノ酸またはC末端アミノ酸が含まれるが、これらに限定されない、類縁体の任意のアミノ酸に共有結合することができる。特定の態様において、類縁体は、C末端延長部（例えば、配列番号95のアミノ酸配列）と、アシルまたはアルキル基が類縁体の位置40に共有結合するように、アシルまたはアルキル基を含むアミノ酸の付加とを含む。幾つかの実施態様において、アシルまたはアルキル基は、式I、IIまたはIIIのアミノ酸、例えばLys残基の側鎖に共有結合している。アシルまたはアルキル基は、グルカゴン配列（配列番号1）に対して天然であるアミノ酸に共有結合してもよいし、配列番号1の配列若しくは配列番号95が続いている（N若しくはC末端に）配列番号1の配列に付加されているアミノ酸に結合してもよいし、配列番号1の位置10で天然アミノ酸を交換するアミノ酸、例えばTyrに結合してもよい。

【0262】

類縁体がアシルまたはアルキル基を含む上記の例示的な実施態様において、類縁体は、本明細書に記載されているように、スペーサーを介してアシルまたはアルキル基に結合することができる。スペーサーは、例えば、3～10原子長であることができ、例えば、アミノ酸（例えば、6アミノヘキサン酸、本明細書に記載される任意のアミノ酸）、ジペプチド（例えば、Ala-Ala、Ala-Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、Glu-Glu）、トリペプチドまたは親水性若しくは疎水性二官能スペーサーであることができる。特定の態様において、スペーサーとアシルまたはアルキル基との全長は、約14～約28原子である。

【0263】

さらに更なる例示的な実施態様において、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴンの類縁体は、以下の修飾：

（a）場合により、GIPアゴニスト活性を付与する位置1でのアミノ酸修飾も含んでもよく、また、

（b）位置29のアミノ酸のC末端側への約1～約21個のアミノ酸の延長部（ここで延長部の少なくとも1個のアミノ酸はアシル化またはアルキル化されている）、および

（d）6個までの更なるアミノ酸修飾
を更に含む、配列番号227、228、229または230のいずれかのアミノ酸配列を含み、

ここで、GIP受容体活性化における類縁体のEC50は、約10nM以下である。

【0264】

幾つかの態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、式I、IIまたはIIIのアミノ酸である。より特定の態様において、式Iのアミノ酸は、Dab、Orn、LysまたはホモLysである。また、幾つかの実施態様において、約1～約21個のアミノ酸は、GPS SGAPPPS（配列番号95）またはXGPS SGAPPPS（配列番号96）（ここでXは任意のアミノ酸である）またはGPS SGAPPPK（配列番号170）またはXGPS SGAPPPK（配列番号171）またはXGPS SGAPPP

P S K (配列番号 1 7 2) (ここで X は、G l y または小型の脂肪族若しくは非極性若しくは僅かに極性のアミノ酸である) のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様において、約 1 ~ 約 2 1 個のアミノ酸は、配列番号 9 5、9 6、1 7 0、1 7 1 または 1 7 2 に対して保存的な 1 つ以上の置換を含めた配列を含むことができる。幾つかの実施態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、C 末端延長類縁体の位置 3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2 または 4 3 に配置されている。特定の態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、C 末端延長類縁体の位置 4 0 に配置されている。

【 0 2 6 5 】

上記の例示的な実施態様のいずれかにおいて、G I P アゴニスト活性を付与する位置 1 のアミノ酸は、イミダゾール側鎖を欠いているアミノ酸であることができる。位置 1 のアミノ酸は、例えば、大型の芳香族アミノ酸であることができる。幾つかの実施態様において、大型の芳香族アミノ酸は、例えば T y r を含む、本明細書に記載されている任意のものであることができる。

【 0 2 6 6 】

上記の例示的な実施態様の類縁体は、1 ~ 6 個の更なる付加アミノ酸修飾、例えば、G I P、G L P - 1 およびグルカゴン受容体のいずれかに対する活性を増加若しくは減少する、溶解性を向上させる、作用の持続時間若しくは循環半減期を向上させる、作用の開始を遅延する、または安定性を増加するような、本明細書に記載されている修飾のいずれかなどを、更に含むことができる。

【 0 2 6 7 】

特定の態様において、上記の例示的な実施態様に記載されたグルカゴンの類縁体は、位置 2 7、2 8 および 2 9 のうちの 1、2 つ、または全てにおいて、更なるアミノ酸修飾を含む。これらの位置の修飾は、これらの位置に関して本明細書に記載されている修飾のいずれかであることができる。例えば、配列番号 2 2 7、2 2 8、2 2 9 または 2 3 0 に関して、位置 2 7 を大型の脂肪族アミノ酸 (例えば、L e u、I l e 若しくはノルロイシン) または M e t で置換することができる、位置 2 8 を別の小型の脂肪族アミノ酸 (例えば、G l y 若しくは A l a) または A s n で置換することができる、および/あるいは、位置 2 9 を別の小型の脂肪族アミノ酸 (例えば、A l a 若しくは G l y) または T h r で置換することができる。あるいは、類縁体は、位置 2 7 および/または 2 8 にそのようなアミノ酸修飾を含むことができる。

【 0 2 6 8 】

類縁体は、以下の追加的な修飾：

- (i) 位置 2 のアミノ酸は、D - S e r、A l a、D - A l a、G l y、N - メチル - S e r、A I B、V a l または - アミノ - N - 酪酸のいずれか 1 つである；
- (i i) 位置 1 0 のアミノ酸は、T r y、T r p、L y s、O r n、G l u、P h e または V a l である；
- (i i i) 位置 1 0 の L y s へのアシル基の結合；
- (i v) 位置 1 2 のアミノ酸は、I l e、L y s または A r g である；
- (v) 位置 1 6 のアミノ酸は、S e r、G l u、G l n、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、T h r、G l y または A I B のいずれか 1 つである；
- (v i) 位置 1 7 のアミノ酸は G l n または A r g である；
- (v i i) 位置 1 8 のアミノ酸は、A l a、A r g、S e r、T h r または G l y のいずれか 1 つである；
- (v i i i) 位置 2 0 のアミノ酸は、A l a、S e r、T h r、L y s、シトルリン、A r g、O r n 若しくは A I B または他のアルファ，アルファ二置換アミノ酸のいずれか 1 つである；
- (i x) 位置 2 1 のアミノ酸は、G l u、A s p、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸のいずれか 1 つである；
- (x) 位置 2 3 のアミノ酸は V a l または I l e である；
- (x i) 位置 2 4 のアミノ酸は、G l n、A s n、A l a、S e r、T h r または A I

10

20

30

40

50

Bのいずれか1つである；ならびに

(xii) 位置2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28、および29のいずれか1つ以上での保存的置換の1つ以上を更に含むことができる。

類縁体は、幾つかの実施態様において、(i)から(xii)の修飾の組み合わせを含む。代替的にまたは追加的に、類縁体は、位置3にアミノ酸修飾（例えば、GluによるGlnのアミノ酸修飾）を含むことができ、ここで類縁体は、グルカゴン受容体に対してグルカゴンの活性の1%未満の活性を有する。代替的にまたは追加的に、類縁体は、位置7にアミノ酸修飾（例えば、ヒドロキシル基を欠いているアミノ酸、例えばAbuまたはIleによるThrのアミノ酸置換）を含むことができ、ここで類縁体は、GLP-1受容体に対してGLPの活性の10%未満の活性を有する。

10

【0269】

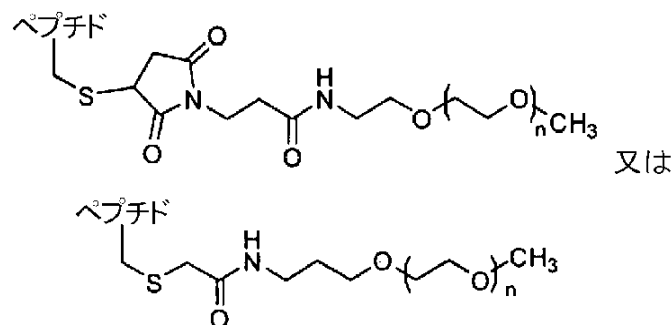
例示的な実施態様に関して、類縁体は、親水性部分に共有結合することができる。幾つかの実施態様において、類縁体は、位置16、17、20、21、24、29、40のいずれかのアミノ酸またはC末端アミノ酸における親水性部分に共有結合している。特定の態様において、類縁体は、類縁体の位置24に共有結合している親水性部分を含む。

【0270】

幾つかの実施態様において、親水性部分は、類縁体のLys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニン残基に共有結合している。Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニンは、配列番号1、227、228、229若しくは230に対して天然であるアミノ酸であってもよいし、置換アミノ酸であってもよい。親水性部分がCysに結合している幾つかの実施態様において、架橋は、下記構造：

20

【化13】



30

を含むことができる。

【0271】

親水性部分を含む類縁体に関して、親水性部分は、本明細書に記載された任意のものであることができる。例えば、「親水性部分の結合」のセクションの教示を参照すること。幾つかの実施態様において、親水性部分は、ポリエチレングリコール（PEG）である。PEGは、特定の態様において、約1,000ダルトンから約40,000ダルトン、例えば約20,000ダルトンから約40,000ダルトンの分子量を有する。

40

【0272】

例示的な実施態様に関して、類縁体は、C末端延長部内に、側鎖がアシルまたはアルキル基に共有結合している修飾アミノ酸を含むことができる。アシル化またはアルキル化類縁体は、「アシル化およびアルキル化」のセクションに記載されているアシル化またはアルキル化ペプチドによるものであることができる。幾つかの実施態様において、アシル基は、例えばC10脂肪アシル若しくはアルキル基、C12脂肪アシル若しくはアルキル基、C14脂肪アシル若しくはアルキル基、C16脂肪アシル若しくはアルキル基、C18脂肪アシル若しくはアルキル基、C20アシル若しくはアルキル基、またはC22アシル若しくはアルキル基などのC4～C30脂肪アシル基である。アシルまたはアルキル基は、位置10若しくは40のアミノ酸またはC末端アミノ酸が含まれるが、これらに限定さ

50

れない、類縁体の任意のアミノ酸に共有結合することができる。幾つかの実施態様において、アシルまたはアルキル基は、式 I、II または III のアミノ酸、例えば Lys 残基の側鎖に共有結合している。アシルまたはアルキル基は、配列番号 1、227、228、229 若しくは 230 に対して天然であるアミノ酸に共有結合しているか、または置換アミノ酸に結合することができる。アシルまたはアルキル基は、配列番号 95、96、171 若しくは 172 に対して天然であるアミノ酸に共有結合しているか、または置換アミノ酸に結合することができる。

【0273】

類縁体がアシルまたはアルキル基を含む上記の例示的な実施態様において、類縁体は、本明細書に記載されているように、スペーサーを介してアシルまたはアルキル基に結合することができる。スペーサーは、例えば、3～10 原子長であることができ、例えば、アミノ酸（例えば、6 アミノヘキサン酸、本明細書に記載される任意のアミノ酸）、ジペプチド（例えば、Ala-Ala、Ala-Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、Glu-Glu）、トリペプチドまたは親水性若しくは疎水性二官能スペーサーであることができる。特定の態様において、スペーサーとアシルまたはアルキル基との全長は、約 14～約 28 原子である。

【0274】

幾つかの極めて特定の態様において、本発明の類縁体は、配列番号 99～141、144～164、166、192～207、209～221 および 223 から成る群から選ばれるか、または配列番号 167～169、173～178 および 225 から成る群から選ばれるアミノ酸配列を含む。

【0275】

更に、本発明の類縁体の特定の例には、表 1～3 において参照される任意のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0276】

更に別の例示的な実施態様において、GIP アゴニスト活性を有するグルカゴンの類縁体は、アシルまたはアルキル基（例えば、天然型のアミノ酸に対して非天然であるアシルまたはアルキル基）を含み、ここで、アシルまたはアルキル基はスペーサーに結合しており、(i) スペーサーは、類縁体の位置 10 のアミノ酸の側鎖に結合しているか、または (ii) 類縁体は、位置 29 のアミノ酸の C 末端側への 1～21 個のアミノ酸の延長部を含み、スペーサーは、配列番号 1 の位置 37～43 の 1 つに対応するアミノ酸の側鎖に結合しており、GIP 受容体活性化における類縁体の EC50 は、約 10 nm 以下である。

【0277】

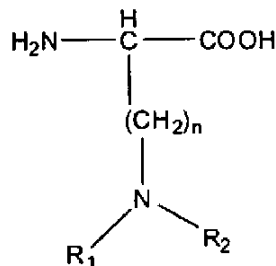
そのような実施態様において、類縁体は、下記 (i)～(iv) を有する配列番号 1 のアミノ酸配列を含むことができる：(i) GIP アゴニスト活性を付与する位置 1 でのアミノ酸修飾、(ii) 位置 27、28 および 29 のうちの 1、2 つ、または全てにおけるアミノ酸修飾、(iii) 下記 (A)～(C) のうちの少なくとも一つ：

(A) 類縁体は、位置 i と i+4 のアミノ酸の側鎖の間、または位置 j と j+3 のアミノ酸の側鎖の間のラクタム架橋（ここで、i は 12、13、16、17、20 または 24 であり、j は 17 である）を含む；

(B) 類縁体の位置 16、20、21 および 24 のうちの 1、2、3 個または全てのアミノ酸が、-二置換アミノ酸で置換されている；あるいは

(C) 類縁体は、下記 (i)～(ii) を含む、すなわち、(i) 式 IV：

【化 1 4】



[式IV]

〔式中、 n は、1～7であり、 R_1 および R_2 は、それぞれ、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) OH 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) NH_2 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) SH 、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) $(\text{C}_3 \sim \text{C}_6)$ シクロアルキル、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) $(\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 複素環式)、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) $(\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) R_7 および $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル) $(\text{C}_3 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール)から成る群から独立して選ばれ、 R_7 は、 H または OH であり、式IVのアミノ酸の側鎖は、遊離アミノ基を含む〕で示されるアミノ酸による位置16のSerのアミノ酸置換、及び(ii)アルファ、アルファ二置換アミノ酸による位置20のGlnのアミノ酸置換；
ならびに

(iv) 6個までの更なるアミノ酸修飾。

【0278】

これらの実施態様の類縁体のアルファ、アルファ二置換アミノ酸は、任意のアルファ、アルファ二置換アミノ酸であってもよく、アミノイソ酪酸(AIB)や、メチル、エチル、プロピルおよび n -ブチルから選ばれる同一若しくは異なる基により二置換されているアミノ酸、またはシクロオクタン若しくはシクロヘプタンにより二置換されているアミノ酸(例えば、1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸)が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施態様において、アルファ、アルファ置換アミノ酸はAIBである。

【0279】

これらの実施態様の類縁体の式IVのアミノ酸は、例えば式IVのアミノ酸などの任意のアミノ酸であることができ、ここで n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16である。特定の態様において、 n は2、3、4または5であり、この場合では、アミノ酸は、それぞれDab、Orn、LysまたはホモLysである。

【0280】

上記の例示的な実施態様のいずれかにおいて、GIPアゴニスト活性を付与する位置1でのアミノ酸修飾は、イミダゾール側鎖を欠いているアミノ酸によるHisの置換であることができる。位置1でのアミノ酸修飾は、例えば、大型の芳香族アミノ酸によるHisの置換であることができる。幾つかの実施態様において、大型の芳香族アミノ酸は、例えばTyrを含む、本明細書に記載されている任意のものである。

【0281】

また、上記の例示的な実施態様に関して、位置27、28および29のうちの1、2つ、または全てにおけるアミノ酸修飾は、本明細書に記載されるこれらの位置の修飾のいずれかであることができる。例えば、位置27のMetは、大型の脂肪族アミノ酸(Leuでもよい)で置換されていることができる、位置28のAsnは、小型の脂肪族アミノ酸(Alaでもよい)で置換されていることができる、および/または位置29のThrは、小型の脂肪族アミノ酸(Glyでもよい)で置換されていることができる。あるいは、類縁体は、位置27および/または28にそのようなアミノ酸修飾を含むことができる。

【0282】

上記の例示的な実施態様の類縁体は、例えば、GIP、GLP-1およびグルカゴン受容体のいずれかに対して活性を増加若しくは減少する、溶解性を向上させる、作用の持続

10

20

30

40

50

時間若しくは循環半減期を向上させる、作用の開始を遅延する、または安定性を増加する本明細書の記載されている修飾のいずれかなどの、1～9個または1～6個の更なる付加アミノ酸修飾、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8または9個の更なるアミノ酸修飾を更に含むことができる。類縁体は、例えば、位置12のアミノ酸修飾(Ileによる置換、ならびに/あるいは17および18のアミノ酸修飾(位置17のQによる置換および位置18のAによる置換でもよい)、ならびに/あるいはGPS SGAPPPS(配列番号95)若しくはXGPS SGAPPPS(配列番号96)の配列、または配列番号95若しくは96に対して保存的な1つ以上の置換を含めた配列の、C末端への付加を更に含むことができる。類縁体は、以下の修飾:

- (i) D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val、または -アミノ-N-酪酸で置換されている、位置2のSer;
- (ii) Trp、Lys、Orn、Glu、Phe、またはValで置換されている、位置10のTyr;
- (iii) 位置10のLysへのアシル基の結合;
- (iv) Argで置換されている位置12のLys;
- (v) Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、Gly、Lys、またはAIBで置換されている、位置16のSer;
- (vi) Glnで置換されている位置17のArg;
- (vii) Ala、Ser、Thr、またはGlyで置換されている、位置18のArg;
- (viii) Ala、Ser、Thr、Lys、シトルリン、Arg、Orn、またはAIBで置換されている、位置20のGln;
- (ix) Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換されている、位置21のAsp;
- (x) Ileで置換されている位置23のVal;
- (xi) Asn、Ala、Ser、Thr、またはAIBで置換されている、位置24のGln;ならびに
- (xii) 位置2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28、および29のいずれかでの、保存的置換のうちの1つ以上を含むことができる。

類縁体は、幾つかの実施態様において、(i)から(xii)の修飾の組み合わせを含む。代替的にまたは追加的に、類縁体は、位置3にアミノ酸修飾(例えば、GluによるGlnのアミノ酸置換)を含むことができ、ここで類縁体は、グルカゴン受容体に対するグルカゴンの活性の1%未満の活性を有する。代替的にまたは追加的に、類縁体は、位置7にアミノ酸修飾(例えば、ヒドロキシル基を欠いているアミノ酸、例えばAbu若しくはIleによるThrのアミノ酸置換)、27若しくは28アミノ酸ペプチドを生じる、位置27若しくは28のアミノ酸のアミノ酸(複数若しくは単数)C末端の欠失、またはこれらの組み合わせを含むことができ、ここで類縁体は、GLP-1受容体に対するGLP-1活性の約10%未満の活性を有する。

【0283】

例示的な実施態様に関して、類縁体は、親水性部分に共有結合することができる。幾つかの実施態様において、類縁体は、位置16、17、20、21、24、29、40のいずれかのアミノ酸またはC末端アミノ酸における親水性部分に共有結合している。特定の実施態様において、類縁体は、C末端延長部(例えば、配列番号95のアミノ酸配列)と、親水性部分を含むアミノ酸の付加とを含み、それにより、親水性部分が類縁体の位置40に共有結合している。

【0284】

幾つかの実施態様において、親水性部分は、類縁体のLys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニン残基に共有結合している。Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニンは、グルカゴン配列(配列番

10

20

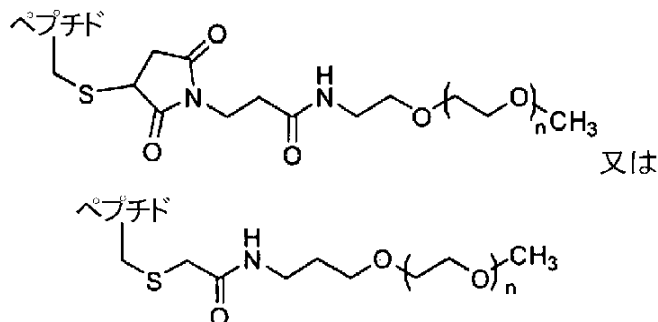
30

40

50

号 1) に対して天然のアミノ酸であってもよいし、配列番号 1 の天然アミノ酸を交換するアミノ酸であってもよい。親水性部分が C y s に結合している幾つかの実施態様において、親水性部分への結合は、下記構造：

【化 1 5】



を含むことができる。

【0285】

親水性部分を含む類縁体に関して、親水性部分は、本明細書に記載された任意のものであることができる。例えば、「親水性部分の結合」のセクションの教示を参照すること。幾つかの実施態様において、親水性部分は、ポリエチレングリコール (P E G) である。P E G は、特定の態様において、約 1 , 0 0 0 ダルトンから約 4 0 , 0 0 0 ダルトン、例えば約 2 0 , 0 0 0 ダルトンから約 4 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量を有する。

【0286】

類縁体が、スペーサーを介して類縁体に結合しているアシルまたはアルキル基を含む例示的な実施態様において、スペーサーは、本明細書に記載されている任意のスペーサーであることができる。スペーサーは、例えば、3 ~ 1 0 原子長であることができ、例えば、アミノ酸 (例えば、6 アミノヘキサン酸、本明細書に記載される任意のアミノ酸)、ジペプチド (例えば、A l a - A l a、A l a - A l a、L e u - L e u、P r o - P r o、G l u - G l u)、トリペプチドまたは親水性若しくは疎水性二官能スペーサーであることができる。特定の態様において、スペーサーとアシルまたはアルキル基との全長は、約 1 4 ~ 約 2 8 原子である。

【0287】

アシルまたはアルキル基は、天然型のアミノ酸に対して非天然であるアシルまたはアルキル基などの、本明細書に記載されている任意のアシルまたはアルキル基である。アシルまたはアルキル基は、幾つかの実施態様において、例えば C 1 0 脂肪アシル若しくはアルキル基、C 1 2 脂肪アシル若しくはアルキル基、C 1 4 脂肪アシル若しくはアルキル基、C 1 6 脂肪アシル若しくはアルキル基、C 1 8 脂肪アシル若しくはアルキル基、C 2 0 アシル若しくはアルキル基、または C 2 2 アシル若しくはアルキル基などの C 4 ~ C 3 0 脂肪アシル基、あるいは C 4 ~ C 3 0 アルキル基である。特定の態様において、アシル基は C 1 2 ~ C 1 8 脂肪アシル基 (例えば C 1 4 または C 1 6 脂肪アシル基) である。

【0288】

幾つかの実施態様において、類縁体の位置 2 9 のアミノ酸の C 末端側への約 1 ~ 約 2 1 個のアミノ酸の延長部は、G P S S G A P P P S (配列番号 9 5) または X G P S S G A P P P S (配列番号 9 6) (ここで X は任意のアミノ酸である) または G P S S G A P P P K (配列番号 1 7 0) または X G P S S G A P P P K (配列番号 1 7 1) または X G P S S G A P P P S K (配列番号 1 7 2) (ここで X は、G l y または小型の脂肪族若しくは非極性若しくは僅かに極性のアミノ酸である) のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様において、約 1 ~ 約 2 1 個のアミノ酸は、配列番号 9 5、9 6、1 7 0、1 7 1 または 1 7 2 に対して保存的な 1 つ以上の置換を含めた配列を含むことができる。幾つかの実施態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、C 末端延長類縁体の位置 3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2 または 4 3 に配置されている。特定の態様において、アシル化またはアルキル化アミノ酸は、C 末端延長類縁体の位置 4 0 に配置されている。

【 0 2 8 9 】

< 医薬組成物および治療方法 >

幾つかの態様において、本発明は、好ましくは滅菌され、好ましくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の純度レベルを有する、本明細書に開示されている任意の新規グルカゴンペプチドと、薬学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤とを含む、医薬組成物を提供する。そのような組成物は、少なくとも A の濃度でグルカゴンペプチドを含有することができ、ここで A は、0.001 mg/ml、0.01 mg/ml、0.1 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、4 mg/ml、5 mg/ml、6 mg/ml、7 mg/ml、8 mg/ml、9 mg/ml、10 mg/ml、11 mg/ml、12 mg/ml、13 mg/ml、14 mg/ml、15 mg/ml、16 mg/ml、17 mg/ml、18 mg/ml、19 mg/ml、20 mg/ml、21 mg/ml、22 mg/ml、23 mg/ml、24 mg/ml、25 mg/ml またはそれ以上である。他の実施態様において、そのような組成物は、最大でも B の濃度でグルカゴンペプチドを含有することができ、ここで B は、30 mg/ml、25 mg/ml、24 mg/ml、23 mg/ml、22 mg/ml、21 mg/ml、20 mg/ml、19 mg/ml、18 mg/ml、17 mg/ml、16 mg/ml、15 mg/ml、14 mg/ml、13 mg/ml、12 mg/ml、11 mg/ml、10 mg/ml、9 mg/ml、8 mg/ml、7 mg/ml、6 mg/ml、5 mg/ml、4 mg/ml、3 mg/ml、2 mg/ml、1 mg/ml または 0.1 mg/ml である。幾つかの実施態様において、組成物は A ~ B の mg/ml、例えば 0.001 ~ 30.0 mg/ml の濃度範囲でグルカゴンペプチドを含有することができる。一つの実施態様において、医薬組成物は、滅菌され場合より多様な容器に保存されている水性液剤を含む。本発明の化合物を、幾つかの実施態様において使用して、注射用の予備処方液剤を調製することができる。別の実施態様において、医薬組成物は凍結乾燥粉末剤を含む。医薬組成物を、患者に組成物を投与する使い捨て装置を含むキットの一部として更に包装することができる。容器またはキットにラベルを付けて周囲温度または冷蔵温度で保存することができる。

【 0 2 9 0 】

グルカゴンペプチドを、静脈内、腹腔内、皮下若しくは筋肉内などの非経口、鞘内、経皮、直腸内、経口、鼻腔内または吸入を含む、任意の標準的投与経路を使用して、患者に投与することができる。一つの実施態様において、組成物は皮下または筋肉内投与される。

【 0 2 9 1 】

一つの実施態様において、キットは、患者にグルカゴン組成物を投与する装置、例えば、シリンジニードル、ペン型装置、ジェット式注射器または他の無針注射器を備える。キットは、代替的また追加的に、1つ以上の容器、例えば、バイアル、チューブ、ボトル、単室または複室型の充填済シリンジ、カートリッジ、注入ポンプ（体外型または埋め込み型）、ジェット式注射器、充填済ペン型装置などを含むことができ、更にその中に、グルカゴンペプチドを凍結乾燥形態または水性液剤形態で含んでもよい。好ましくは、キットは使用説明書も含む。幾つかの実施態様において、キットの装置は、エアゾール・ディスペンサー装置であり、ここで組成物はエアゾール装置内に予め包装されている。別の実施態様において、キットは、シリンジおよび針を含み、一つの実施態様において、滅菌グルカゴン組成物は、シリンジの中に予め包装されている。

【 0 2 9 2 】

一つの実施態様によると、医薬組成物が提供され、組成物は本開示の G I P 活性グルカゴン類縁体またはその薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される担体とを含む。医薬組成物は、例えば以下の様な、任意の薬学的に許容される成分を含むことができる：酸化剤、添加剤、吸着剤、エアゾール噴射剤、排気剤、アルキル化剤、凝結防止剤、抗凝固剤、抗菌性保存剤、酸化防止剤、消毒剤、基剤、結合剤、緩衝剤、キレート剤、被覆剤、着色剤、乾燥剤、洗剤、希釈剤、殺菌剤、崩壊剤、分散剤、溶解促進剤、色素、緩和剤、乳

化剤、乳化安定剤、充填剤、皮膜形成剤、風味強化剤、風味剤、流動性向上剤、ゲル化剤、造粒剤、保湿剤、潤滑剤、粘膜付着剤、軟膏基剤、軟膏、油性ビヒクル、有機基剤、芳香基剤、顔料、可塑剤、研磨剤、防腐剤、金属イオン封鎖剤、皮膚浸透剤、可溶化剤、溶媒、安定剤、坐薬基剤、表面活性剤、界面活性剤、懸濁剤、甘味剤、治療剤、増粘剤、等張化剤、毒性剤、粘度増加剤、吸水剤、水混和性共溶媒、硬水軟化剤、又は、湿潤剤。

【 0 2 9 3 】

幾つかの実施態様において、医薬組成物は、以下の構成成分のうちの任意の1つ又は組み合わせを含む：アカシア、アセスルファミカリウム、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、希アルコール、アロイリチン酸、アルギニン酸、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、
- アミロース、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、アスパルテーム、注射用静菌性水、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、安息香酸ベンジル、プロノポール、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、シクラミン酸カルシウム、無水第二リン酸カルシウム、脱水第二リン酸カルシウム、第三リン酸カルシウム、プロピオン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、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、硫酸カルシウム半水和物、カノーラ油、カルボマー、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、
- カロテン、カラギーナン、ヒマシ油、硬化ヒマシ油、カチオン性乳化剤、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、エチルセルロース、微晶質セルロース、粉末セルロース、ケイ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、セトステアリルアルコール、セトリミド、セチルアルコール、クロロヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、コレステロール、酢酸クロロヘキシジン、グルコン酸クロロヘキシジン、塩酸クロロヘキシジン、クロロジフルオロエタン (H C F C)、クロロジフルオロメタン、クロロフルオロカーボン (C F C)、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物、無水クエン酸、クエン酸一水和物、カカオ脂、着色剤、トウモロコシ油、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、デキストラン、デキストリン、デキストロース、デキストロース無水物、ジアゾリジニル尿素、フタル酸ジブチル、セバシン酸ジブチル、ジエタノールアミン、フタル酸ジエチル、ジフルオロエタン (H F C)、ジメチル -
- シクロデキストリン、Captisol (登録商標) のようなシクロデキストリン型化合物、ジメチルエーテル、フタル酸ジメチル、エデト酸二カリウム、エデト酸二ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、ドキュセートカルシウム、ドキュセートカリウム、ドキュセートナトリウム、没食子酸ドデシル、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、エデト酸カルシウム二ナトリウム、エデト酸、エグルミン、エチルアルコール、エチルセルロース、没食子酸エチル、ラウリン酸エチル、エチルマルトール、オレイン酸エチル、エチルパラビン、エチルパラベンカリウム、エチルパラベンナトリウム、エチルパニリン、フルクトース、フルクトース液、粉碎フルクトース、発熱物質無含有フルクトース、粉末フルクトース、フマル酸、ゼラチン、グリコール、液状グルコース、飽和植物性脂肪酸のグリセリド混合物、グリセリン、ベヘン酸グリセリル、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 (H F C)、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、高級フルクトースシロップ、ヒト血清アルブミン、炭化水素 (H C)、希塩酸、I I 型硬化植物油、ヒドロキシエチルセルロース、2 - ヒドロキエチル -
- シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換ヒドロキシプロピルセルロース、2 - ヒドロキシプロピル -
- 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

10

20

30

40

50

オン交換体、酸化鉄、イソプロピルアルコール、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、等張食塩水、カオリン、乳酸、ラクチオール、ラクトース、ラノリン、ラノリンアルコール、脱水ラノリン、レクチン、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、炭酸マグネシウム、規定炭酸マグネシウム、炭酸マグネシウム無水物、炭酸マグネシウム水酸化物、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、ケイ酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、三ケイ酸マグネシウム、三ケイ酸マグネシウム無水物、リンゴ酸、モルト、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、マンニトール、中鎖トリグリセリド、メグルミン、メントール、メチルセルロース、メタクリル酸メチル、オレイン酸メチル、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、微晶質セルロース及びカルボキシメチルセルロースナトリウム、鉍油、軽鉍油、鉍油及びラノリンアルコール、油、オリーブ油、モノエタノールアミン、モンモリロナイト、没食子酸オクチル、オレイン酸、パルミチン酸、パラフィン、ヤシ油、ペトロラクタム、ペトロラクタム及びラノリンアルコール、製剤粗薬、フェール、液状フェノール、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、ポロキサマー、ポリデキストロース、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、ポリアクリレート、ポリエチレン - ポリプロピレンブロックポリマー、ポリメタクリレート、ポリエチレンアルキルエーテル、ポリエチレンヒマシ油誘導体、ポリエチレンソルビトール脂肪酸エステル、ポリ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、アルギン酸カリウム、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、クエン酸カリウム無水物、リン酸水素カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、リン酸二水素カリウム、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、アルギン酸プロピレングリコール、没食子酸プロピル、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、硫酸プロタミン、ナタネ油、リングル液、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、ベニバナ油、サボナイト、血清タンパク質、ゴマ油、コロイドシリカ、コロイド二酸化ケイ素、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、クエン酸ナトリウム脱水物、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、硫酸ドデシルナトリウム、硫酸ラウリルナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、第二リン酸ナトリウム、第一リン酸ナトリウム、無水第三リン酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、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（ソルビタン脂肪エステル）、ソルビトール、70%ソルビトール溶液、ダイズ油、クジラロウ、デンプン、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルファ化デンプン、滅菌トウモロコシデンプン、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、糖、圧縮性糖、粉糖、糖球体、転化糖、Sugartab、スーパーイエロー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）、カカオ脂、チメロサル、二酸化チタン、アルファトコフェロール、酢酸トコフェリル、アルファトコフェリル酸スクシネート、ベータ - トコフェロール、デルタ - トコフェロール、ガンマ - トコフェロール、トラガカント、トリアセチン、クエン酸トリブチル、トリエタノールアミン、クエン酸トリエチル、トリメチル - 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、トリス緩衝液、エデト酸三ナトリウム、バニリン、I型硬化植物油、水、軟水、硬水、二酸化炭素無含有水、発熱物質無含有水、注射用水、吸入用滅菌水、注射用滅菌水、灌注用滅菌水、ロウ、アニオン性乳化ロウ、カルナウバロウ、カチオン性乳化ロウ、セチルエステルロウ、微晶質ロウ、非イオン性乳化ロウ、坐剤用ロウ、白ロウ、黄ロウ、白色ペトロラクタム、羊毛脂、キサンタンガム、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、又は、Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A. H

10

20

30

40

50

． Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000) (その全体が参照として本明細書に組み込まれる)における任意の賦形剤。 Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) (その全体が参照として本明細書に組み込まれる)は、薬学的に許容される組成物の配合に使用される多様な構成成分及びそれらを調製する既知の技術を開示する。従来の作用物質のいずれについても、医薬組成物と不適合である場合を除いて、医薬組成物におけるその使用が考慮される。補助活性成分を組成物に組み込むこともできる。

【0294】

本明細書に開示されている医薬製剤は、下記に記載されているように、短期作用、迅速放出、長期作用、又は持続的放出であるように設計することができる。医薬製剤を即時放出、制御放出、又は徐放性放出用として配合することもできる。本組成物は、更に、保存性及び/又は送達効果の延長をもたらすために、例えばミセル若しくはリポソーム、又は他の封入形態を含んでもよいし、或いは延長放出形態で投与してもよい。開示されている医薬製剤を、任意のレジメンに従って、例えば毎日(1日あたり1回、1日あたり2回、1日あたり3回、1日あたり4回、1日あたり5回、1日あたり6回)、2日毎に1回、3日毎に1回、4日毎に1回、5日毎に1回、6日毎に1回、毎週、隔週、3週間毎に1回、毎月、又は隔月に、投与することができる。

10

【0295】

幾つかの実施態様において、前述の構成成分は、任意の濃度、例えば少なくともAの濃度、で医薬組成物に含まれてもよく、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、又は90%w/vである。幾つかの実施態様において、前述の構成成分は、任意の濃度、例えば最大でBの濃度、で医薬組成物に含まれてもよく、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、0.01%w/v、0.001%w/v、又は0.0001%である。他の実施態様において、前述の構成成分は、例えば約Aから約Bのような、任意の濃度範囲で医薬組成物に含まれることができる。幾つかの実施態様において、Aは0.0001%であり、Bは90%である。

20

【0296】

医薬組成物は、生理学的に適合するpHを達成するように配合することができる。幾つかの実施態様において、医薬組成物のpHは、製剤又は投与経路に応じて、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、又は少なくとも10.5からpH11以下であることができる。特定の実施態様において、医薬組成物は、生理学的に適合するpHを達成するために、1つ以上の緩衝剤を含むことができる。緩衝剤には、所望のpHで緩衝することが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、トリス、ピシン、TAPS、トリシン、HEPES、TES、MOPS、PIPES、カコジル酸、MES、及びその他、が含まれていてもよい。特定の実施態様において、緩衝液の強度は、少なくとも0.5mM、少なくとも1mM、少なくとも5mM、少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも30mM、少なくとも40mM、少なくとも50mM、少なくとも60mM、少なくとも70mM、少なくとも80mM、少なくとも90mM、少なくとも100mM、少なくとも120mM、少なくとも150mM、又は少なくとも200mMである。幾つかの実施態様において、緩衝液の強度は、300mM以下(例えば、最大で200mM、最大で100mM、最大で90mM、最大で80mM、最大70mM、最大で60mM、最大で50mM、最大で40mM、最大で30mM、最大で20mM、最大で10mM、最大で5mM、最大で1mM)である。

30

40

【0297】

GIP/GLP-1コアゴニスト、グルカゴン/GLPコアゴニスト、およびグルカゴン/GLP-1トリアゴニストであるようなグルカゴンペプチドを、これらそれ

50

ぞれの活性が有用であると以前に記載されている任意の適応症に使用することができる。例えば、グルカゴン活性は、インスリンを緩衝するため、または放射線検査の際に消化管の運動を減少するために、グルコースレベルを増加することができる。GLP-1活性は、グルコースレベルを低下することができ、この活性は、高血糖症、例えば糖尿病の治療に有用である。GLP-1活性は、例えば食欲を減少することによって、減量を誘導する、または体重増加を予防することもできる。GIP活性も、グルコースレベルを低下することができ、この活性は、高血糖症、例えば糖尿病の治療に有用である。

【0298】

GIP/GLP-1コアゴニストおよびグルカゴン/GIP/GLP-1トリアゴニストは、減量を誘導するため、または体重増加を予防するため、また糖尿病を含む高血糖症を治療するために特に有利である。本明細書に開示されるインビボデータは、GIPアゴニスト活性とGLP-1アゴニスト活性の組み合わせが、GLP-1単独よりも体重低減に対して大きな効果を生じることを示す。この活性は、GIPの拮抗が毎日の食物摂取および体重を低減するため、ならびにインスリン感受性およびエネルギー消費量を増加するために望ましいという当該技術の教示の観点から、特に予想外であった。(Irwin et al., Diabetologia 50: 1532-1540(2007); およびAlthage et al., J Biol Chem, e-publication on April 17, 2008)。

10

【0299】

本明細書に開示されるインビボデータは、GIPアゴニスト活性とGLP-1アゴニスト活性の組み合わせがグルコースレベルを低下することも示す。

20

【0300】

したがって、本明細書に記載されているグルカゴンペプチドは、体重を低減若しくは維持すること、または高血糖症を治療すること、または血中グルコースレベルを低減すること、または血中グルコースレベルを正常化する、および/または安定化することに使用されることが予測される。

【0301】

幾つかの実施態様において、高血糖症を治療する方法、または体重増加を低減する若しくは減量を誘導する方法であって、本発明のグルカゴンペプチドを含む水性液剤の有効量を投与することを含む方法が提供される。更なる実施態様において、従来の用量または低減された用量のインスリンと本発明のグルカゴンペプチドとを同時投与することを含む、糖尿病の治療方法が提供される。インスリンの同時投与を伴うことなく、本発明のグルカゴンペプチドにより糖尿病を治療する方法も提供される。

30

【0302】

高血糖症を治療するそのような方法は、インスリン依存性またはインスリン非依存性のいずれかの糖尿病、I型真性糖尿病、II型真性糖尿病または妊娠糖尿病を含む多様な種類の高血糖症に有用であること、ならびに腎障害、網膜症および血管疾患を含む糖尿病の合併症を低減することに有用であることが予想される。

【0303】

食欲を減退するまたは体重の減少を促進する方法は、体重を低減する、体重増加を防止する、または薬剤誘導肥満を含む多様な原因の肥満を治療する、ならびに血管疾患(冠動脈疾患、発作、末梢血管疾患、虚血再灌流など)、高血圧、II型糖尿病の発症、高脂血症および筋骨格系疾患を含む肥満に関連する合併症を低減することに有用であることが予想される。

40

【0304】

代謝症候群X、インスリン抵抗症候群、またはReaven症候群としても知られているメタボリックシンドロームは、5千万人を超えるアメリカ人が罹患している疾患である。メタボリックシンドロームは、典型的には、以下の危険因子の少なくとも3つ以上の集団により特徴付けられる:(1)腹部肥満(腹部およびその周りの過剰脂肪組織)、(2)アテローム性異脂血症(動脈の壁にプラークの蓄積を増強する、高トリグリセリド、低HDLコレステロールおよび高LDLコレステロールを含む血中脂肪障害)、(3)血

50

圧の上昇、(4) インス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、高濃度の血中フィブリノゲンまたはプラスミノゲン活性化剤阻害剤 - 1)、ならびに(6) 炎症促進性状態(例えば、血中C反応性タンパク質の上昇)。他の危険因子には、加齢、ホルモンの不均衡および遺伝的素因が含まれる。

【0305】

メタボリックシンドロームは、冠動脈性心疾患の危険性、ならびに、卒中や、アテローム性動脈硬化症(ASCVD)と呼ばれる末梢血管疾患のような、血管プラークの蓄積に関連する他の障害の危険性の増加に関連する。メタボリックシンドロームの患者は、インスリン抵抗性状態の初期段階から完全なII型糖尿病まで進行し、ASCVDの危険性を更に増加する。特定の理論に束縛されることを意図せずに、インスリン抵抗性、メタボリックシンドロームおよび血管疾患間の関係は、インスリン刺激血管拡張障害、増強された酸化ストレスに起因するNO利用能のインスリン抵抗性関連の低減、およびアジポネクチンのような脂肪細胞誘導ホルモンの異常を含む、一つ以上の同時発病機構を伴いうる(Lteif and Mather, Can. J. Cardiol. 20(suppl. B):66B-76B(2004))。

【0306】

2001年の全米コレステロール教育プログラムの成人治療パネル(ATPIII)によると、同じ個人において以下のいずれか3つの特徴がメタボリックシンドロームの基準を満たす:(a) 腹部肥満(男性では102cmを超える、女性では88cmを超える胴回り);(b) 血清トリグリセリド(150mg/dl以上);(c) HDLコレステロール(男性では40mg/dl以下、女性では50mg/dl以下);(d) 血圧(130/85以上);ならびに(e) 空腹時血糖(110mg/dl以上)。世界保健機構(WHO)によると、以下の少なくともいずれか2つの基準を有する高インスリンレベル(空腹時血糖の上昇または食後血糖の上昇)を有する個人は、メタボリックシンドロームの基準を満たす:(a) 腹部肥満(胴回りと臀部の比が0.9超、肥満指数が少なくとも30kg/m²または胴回りの寸法が37インチ超);(b) コレステロールパネルが少なくとも150mg/dlのトリグリセリドレベルまたは35mg/dlより低いHDLコレステロールを示す;(c) 血圧が140/90以上または高血圧の治療中。(Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome," ed. Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com, May 11, 2009)。

【0307】

本明細書における目的のために、ある個人が、2001年の全米コレステロール教育プログラムの成人治療パネル(ATPIII)またはWHOにより設定された基準のいずれかまたは両方の基準を満たす場合、その個人は、メタボリックシンドロームに罹患していると考慮される。

【0308】

特定の理論に束縛されることなく、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、メタボリックシンドロームの治療に有効である。したがって、本発明は、被験者において、メタボリックシンドロームを予防若しくは治療する、またはその危険因子のうちの1、2、3つ若しくはそれ以上を低減する方法であって、メタボリックシンドロームまたはその危険因子を予防または治療するのに有効な量の本明細書に記載されるグルカゴンペプチドを、被験者に投与することを含む方法を提供する。

【0309】

非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)は、単純な脂肪肝(脂肪変性)から非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、硬変(肝臓の不可逆性進行瘢痕化)までの範囲の広範囲の肝疾患を意味する。NAFLDの全ての病期は、共通して、肝臓の細胞(肝細胞)における脂肪の蓄積(脂肪浸潤)を有する。単純な脂肪肝は、炎症または瘢痕化を有さない肝臓の細胞に特定の種類の脂肪、トリグリセリドが異常蓄積することである。NASHでは、脂肪蓄積は、肝臓の多様な程度の炎症(肝炎)および瘢痕化(線維症)に関連する。炎症性細胞は肝臓細胞を破壊することができる(肝細胞壊死)。用語「脂肪性肝炎」および「脂肪壊死」において、脂肪(steato)は、脂肪浸潤を意味し、肝炎は、肝臓における炎

10

20

30

40

50

症を意味し、壊死は、破壊された肝臓細胞を意味する。NASHは、最終的に、肝臓の瘢痕化（線維症）、次に不可逆性で進行型の瘢痕化（硬変）をもたらす可能性がある。NASHにより引き起こされる硬変は、NAFLDの範囲において最終的で最も重篤な病期である。（Mendler, Michel, "Fatty Liver: Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)," ed. Schoenfield, Leslie J., Medicine Net.com, August 29, 2005）。

【0310】

アルコール性肝疾患またはアルコール誘導肝疾患は、アルコールの過剰消費に関連するまたはより引き起こされる、3つの病理的に異なる肝臓疾患：脂肪肝（脂肪変性）、慢性または急性肝炎および硬変、を包含する。アルコール性肝炎は、実験室試験における異常が疾患の唯一の指標である中程度の肝炎から、横断（ビリルビンの保持により引き起こされる黄色皮膚）、肝性脳症（肝不全により引き起こされる神経性機能不全）、腹水症（腹部における流体の蓄積）、出血性食道静脈瘤（食道の静脈瘤）、血液凝固異常および昏睡のような合併症を伴う重篤な肝機能不全までの範囲でありうる。組織学的には、アルコール性肝炎は、肝細胞の気球状変性、好中球による、時にはマロリ小体による炎症（細胞中間体フィラメントタンパク質の異常蓄積）による特徴的な外観を有する。硬変は、線維症と組み合わせられた、肝臓に広範囲に分布した小結節により解剖学的に特徴付けられる。（Worman, Howard J., "Alcoholic Liver Disease", Columbia University Medical Center website）。

【0311】

特定の理論に束縛されることなく、本明細書に記載されるグルカゴンペプチドは、例えば、脂肪変性、脂肪性肝炎、肝炎、肝臓炎症、NASH、硬変またはこれらの合併症を含む、アルコール性肝疾患、NAFLD、またはこれらの任意の病期の治療に有用である。したがって、本発明は、被験者においてアルコール性肝疾患、NAFLDまたはこれらの任意の病期を予防または治療する方法であって、アルコール性肝疾患、NAFLDまたはこれらの任意の病期を予防または治療するのに有効な量の本明細書に記載されるグルカゴンペプチドを被験者に投与することを含む方法を提供する。そのような治療方法には、以下のうちの1、2、3つまたはそれ以上の低減が含まれる：肝臓の脂肪含有量、硬変の発症または進行、肝細胞癌の発症、炎症の兆候、例えば異常な肝酵素レベル（例えば、アスパラギン酸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）、血清フェリチンの上昇、血清ビリルビンの上昇ならびに/あるいは線維症の兆候、例えばTGF-βレベルの上昇。好ましい実施態様において、グルカゴンペプチドを使用して、単純な脂肪肝（脂肪変性）を超えて進行し、炎症または肝炎の兆候を示す患者を治療する。そのような方法は、例えば、ASTおよび/またはALTレベルの低減をもたらす場合がある。

【0312】

本発明のグルカゴンペプチドを、単独でまたは他の抗糖尿病若しくは抗肥満剤と組み合わせ投与することができる。当該技術において既知であるか、または調査中の抗糖尿病剤としては、以下のものが挙げられる：インスリン；トルブタミド（Orinase）、アセトヘキサミド（Dymelor）、トラザミド（Tolinase）、クロルプロパミド（Diabinese）、グリピジド（Glucotrol）、グリブリド（Diabeta、Micronase、Glynase）、グリメピリド（Amaryl）またはグリクラジド（Diamicron）などのスルホニル尿素；レバグリニド（Prandin）またはナテグリニド（Starlix）などのメグリチニド；メトホルミン（Glucophage）またはフェンホルミンなどのビグアナイド；ロシグリタゾン（Avandia）、ピオグリタゾン（Actos）若しくはトログリタゾン（Rezulin）または他のPPAR 阻害剤などのチアゾリジンジオン；ミグリトール（Glyset）、アルカボース（Precose/Glucobay）などの炭水化物の消化を阻害するアルファグルコシダーゼ阻害剤；エクセナチド（Byetta）またはプラムリンチド；ビルダグリプチンまたはシタグリプチンのようなジペプチジルペプチダーゼ-4（DP

10

20

30

40

50

P - 4) 阻害剤; SGLT (ナトリウム依存性グルコーストランスポーター 1) 阻害剤; グルコキナーゼ活性化剤 (GKA); グルカゴン受容体アンタゴニスト (GRA); またはFBPase (フルクトース 1, 6 - ビスホスファターゼ) 阻害剤。

【0313】

当該技術において既知であるか、または調査中の抗肥満剤としては、以下のものが挙げられる: レプチンおよび線維芽細胞成長因子 21 (FGF - 21); フェネチルアミン型刺激薬、フェンテルミン (更に、フェンフルラミンまたはデクスフェンフルラミンを伴ってもよい)、ジエチルプロピオン (Tenuate (登録商標))、フェンジメトラジン (Prelu - 2 (登録商標)、Bontрил (登録商標))、ベンズフェタミン (Didrex (登録商標))、シブトラミン (Meridia (登録商標)、Reductil (登録商標)) などの食欲抑制薬; リモナバン (Acomplia (登録商標))、他のカンナビノイドレセプターアンタゴニスト; オキシントモジュリン; 塩酸フルオキセチン (Prozac); Qnexa (トピラメートおよびフェンテルミン)、Excalia (ブプロピオンおよびゾニサミド) またはContrave (ブプロピオンおよびナルトレキソン); あるいはゼニカル (Orlistat) 若しくはCetilistat (ATL - 962としても知られている) またはGT389 - 255と類似しているリパーゼ阻害剤。

【0314】

低血糖症の患者においてグルコースを上昇させるグルカゴンの効果を保持する、本発明のグルカゴンペプチドを、低血糖症を治療すること、例えば急性、周期的または夜間低血糖症を予防または治療することに使用できる。そのようなグルカゴンペプチドを、糖尿病患者においてインスリンの作用を緩衝するため、および安定した血中グルコースレベルを維持するために、インスリンと一緒に投与することもできる。そのような実施態様では、インスリン依存性患者において血中グルコースレベルを調節する、改善された方法が提供される。本開示のグルカゴンペプチドは、単一組成物としてインスリンと同時に投与することや、別々の液剤として同時に投与することができるし、インスリンとグルカゴンペプチドを互いに異なる時間で投与することもできる。幾つかの実施態様において、この方法は、糖尿病を制御するのに治療上有効な量でインスリンを投与する工程、および低血糖症の予防に治療上有効な量で本開示の新規修飾グルカゴンペプチドを投与する工程を含み、前記投与工程は、互いに12時間以内に実施される。修飾グルカゴンペプチドと投与インスリンの正確な比は、部分的には患者のグルカゴンレベルを決定すること、および他の臨床パラメーターによって決まる。血中レベルを「正常化する」とは、血中グルコースレベルを正常に戻す (例えば、正常より高い場合は血中グルコースレベルを下げる、または正常より低い場合は血中グルコースレベルを上げる) ことを意味する。血中グルコースレベルを「安定化する」とは、血中グルコースレベルの最大変動を、一定の期間にわたって、例えば8時間、16時間、24時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間または1週間にわたって、低減することを意味する。例えば、グルカゴンペプチドの投与は、グルカゴンペプチドの投与の不在の場合よりも、血中グルコースレベルをグルコース値の正常範囲の近くに経時的に維持させる。

【0315】

所望の活性を保持する本発明のグルカゴンペプチドを、放射線用途において消化管に一過性麻痺を誘導すること、またはグルカゴンの低血中レベルによりもたらされる他の代謝疾患を治療することに使用できる。そのような実施態様において、腸管の一過性麻痺を誘導する方法が提供される。この方法は、本明細書に開示されている1つ以上のグルカゴンペプチドを患者に投与する工程を含む。

【0316】

異なる態様において、本発明は、体重増加を低減する、または減量を誘導する、または高血糖症を治療する方法であって、GIP受容体アゴニスト分子およびGLP - 1受容体アゴニスト分子を、体重増加を低減する、または減量を誘導する、または食欲を減少するのに有効な量で、それを必要とする患者に同時投与することを含む方法を提供する。2つ

の分子を同じ組成物中で一緒にまとめることができる。あるいは、G I PとG L P - 1の両方の受容体を活性化するための分子を、そのような方法において投与することができる。多様な受容体アゴニスト特性、すなわち受容体活性化特性の組み合わせは、予想外の付加的若しくは相乗的効果または他の予想外の臨床的利益（複数または単数）をもたらす。従来用量のインスリン、若しくは低減用量のインスリンを伴う投与、またはインスリンなしの投与は、そのような方法に考慮される。例示的なG I P受容体アゴニスト分子には、G I PやG I P類縁体、例えば、最大適合となるよう配列比較を行うと、可視検査により少なくとも50%、60%、70%または80%の配列相同性を保持するようなG I P類縁体が含まれる。例示的なG L P - 1受容体アゴニスト分子には、G L P - 1やG L P - 1類縁体、例えば、最大適合となるよう配列比較を行うと、可視検査により少なくとも50%、60%、70%または80%の配列相同性を保持するようなG L P - 1類縁体、最大適合となるよう配列比較を行うと、可視検査により少なくとも50%、60%、70%または80%の配列相同性を保持するようなエキセンディン - 4類縁体、またはこれらの誘導体、が含まれる。両方の活性を示す例示的な分子には、G L P - 1およびG I P受容体の両方を活性化するG L P - 1類縁体、G I PとG L P - 1との融合体、またはG I P類縁体とG L P - 1類縁体との融合体、あるいはこれらの化学的修飾された誘導体が含まれる。

10

【0317】

低血糖症の治療が含まれるが、但しこれに限定されない、本発明による治療方法は、静脈内、腹腔内、皮下若しくは筋肉内などの非経口、鞘内、経皮、直腸内、経口、鼻腔内または吸入を含む、任意の標準的投与経路を使用して、本開示のグルカゴンペプチドを患者に投与する工程を含むことができる。

20

【0318】

幾つかの実施態様によると、そのような方法から排除されているものは、各々の疾患に応じて、その特定の疾患を治療するのに有用であることが従来技術において開示されている、任意のグルカゴン類縁体またはG L P - 1類縁体である。別の実施態様において、糖尿病の治療においてG L P - 1アゴニストとグルカゴンアンタゴニストの両方として作用する米国特許第6,864,069号に記載されるペプチドも排除される。別の実施態様において、本発明は、Unson et al., J. Biol. Chem., 264: 789-794 (1989)、Ahn et al., J. Med. Chem., 44: 3109-3116(2001)およびSapse et al., Mol. Med., 8(5): 251-262 (2002)に記載されているアゴニストなどの、糖尿病を治療するグルカゴンアンタゴニストの使用を排除することができる。幾つかの実施態様において、オキシントモジュリンまたはオキシントモジュリン（配列番号97）の8C末端アミノ酸を含有するグルカゴンペプチドが排除される。

30

【0319】

小腸において見出された天然型の消化ホルモンであるオキシントモジュリンは、ラット又はヒトに投与されたときに減量を引き起こすことが報告されている（Diabetes 2005; 54:2390-2395を参照すること）。オキシントモジュリンは、グルカゴン（すなわち、配列番号1）の29アミノ酸配列と、その後続く配列番号97（K R N R N N I A）の8アミノ酸カルボキシ末端延長部とを有する、37アミノ酸ペプチドである。本発明は、本明細書に記載されているグルカゴン類縁体が、この8アミノ酸カルボキシ末端延長部（配列番号97）と結合してもよいということを考慮するが、本発明は、幾つかの実施態様において、配列番号97の8個の連続するカルボキシアミノ酸を欠いているグルカゴンペプチドも特に考慮する。

40

【0320】

以下のペプチドのいずれも本発明の化合物から排除されるが、所望のコアゴニスト又はトリアゴニスト活性を示す、それら化合物への更なる修飾、およびそのような化合物を使用する医薬組成物、キット、治療方法は、いずれも本発明に含まれてもよい：〔A r g 1 2〕置換およびC末端アミドを有する配列番号1のペプチド；〔A r g 1 2、L y s 2 0〕置換およびC末端アミドを有する配列番号1のペプチド；〔A r g 1 2、L y s 2 4〕

50

置換およびC末端アミドを有する配列番号1のペプチド；〔Arg12、Lys29〕置換およびC末端アミドを有する配列番号1のペプチド；〔Glu9〕置換を有する配列番号1のペプチド；〔Glu9、Glu16、Lys29〕置換およびC末端アミドを有する、His1を欠いている配列番号1のペプチド；〔Glu9、Glu16、Lys29〕置換およびC末端アミドを有する配列番号1のペプチド；ラクタム架橋を介して結合している〔Lys13、Glu17〕置換およびC末端アミドを有する配列番号1のペプチド；ラクタム架橋を介して結合している〔Lys17、Glu21〕置換およびC末端アミドを有する配列番号1のペプチド；ラクタム架橋を介して結合している〔Glu20、Lys24〕置換を有する、His1を欠いている配列番号1のペプチド；以下の各文献（それらの全体が参照により本出願に組み込まれる）に開示されているペプチド：2008年2月13日出願のPCT/US2008/053857；2006年5月5日出願のPCT/US2006/017494；2007年8月17日出願のPCT/US2007/018415；2005年2月25日出願のPCT/GB2005/000710；2000年3月29日出願のPCT/GB00/01089；2006年2月10日出願のPCT/US2006/005020。

【0321】

〔実施例〕

本発明の化合物を、標準的な合成方法、組み換えDNA技術またはペプチドおよび融合タンパク質を調製する他の任意の方法により調製することができる。特定の非天然アミノ酸は、標準的な組み換えDNA技術によっては発現することはできないが、それらを調製する技術は当該技術において知られている。非ペプチド部分を包含する本発明の化合物を、適用可能であれば、標準的なペプチド化学反応に加えて、標準的な有機化学反応により合成することができる。グルカゴンペプチドのグルカゴンおよびGLP-1活性についての追加的なデータは、PCT/US2008/053857、2008年2月13日出願にも開示されており、その全体は参照として本明細書に組み込まれる。

【0322】

<実施例1>

一般的合成プロトコール：

グルカゴン類縁体を、改良Applied Biosystem 430 Aペプチド合成機により、0.2 mmolのBoc Thr(OBzl)Pam樹脂から出発し、HBTU活性化「Fast Boc」単一カップリングを使用して合成した。Bocアミノ酸及びHBTUは、Midwest Biotech (Fishers, IN) から得た。使用した側鎖保護基は、Arg(Tos)、Asn(Xan)、Asp(OcHex)、Cys(pMeBzl)、His(Bom)、Lys(2Cl-Z)、Ser(OBzl)、Thr(OBzl)、Tyr(2Br-Z)及びTrp(CHO)であった。N末端Hisの側鎖保護基はBocであった。

【0323】

合成の完了したそれぞれのペプチジル樹脂を、ジメチルホルムアミド中の20%ピペリジンの溶液で処理して、トリプトファンからホルミル基を除去した。液体フッ化水素切断を、p-クレゾール及びジメチルスルフィドの存在下で実施した。切断は、HF装置(Penninsula Labs)を使用して氷浴で1時間実施した。HFを蒸発させた後、残渣をジエチルエーテルに懸濁し、固体物質を濾過した。ペプチドをそれぞれ30~70 mlの酢酸水溶液に抽出し、希釈したアリコート用HPLC(Beckman System Gold、0.46×5 cmのZorbax C8、1 ml/分、45°C、214 nm、A緩衝液=0.1% TFA、B=0.1% TFA/90% アセトニトリル、10分間かけて10%から80% Bの勾配)により分析した。

【0324】

精製を2.2×25 cmのKromasil C18カラムのFPLCにより実施し、その間、214 nmのUVでモニタリングし、5分毎の画分を収集した。均質画分をまとめ、凍結乾燥して、生成物純度>95%を得た。正確な分子量及び純度は、MALDI質量スペクトル分析を使用して確認した。

【 0 3 2 5 】

< 実施例 2 >

一般的ペグ化プロトコール：(C y s - マレイミド)

典型的には、グルカゴン C y s 類縁体をリン酸緩衝食塩水 (5 ~ 1 0 mg/ml) に溶解し、0.01 M エチレンジアミン四酢酸を加える (総容量の 1 0 ~ 1 5 %) 。過剰 (2 倍) マレイミドメトキシ P E G 試薬 (Nektar) を加え、反応を室温で撹拌し、その間、H P L C で反応進行をモニタリングする。8 ~ 2 4 時間後、反応混合物を酸性化し、精製のために、0.1 % T F A / アセトニトリル勾配を使用する分取逆相カラムに装填する。適切な画分をまとめ、凍結乾燥して、所望のペグ化類縁体を得た。

【 0 3 2 6 】

< 実施例 3 >

グルカゴン C y s ^{1 7} (1 - 2 9) 及び同様のモノ C y s 類縁体の合成

6 0 ml の反応容器中の 0.2 mmol の Boc Thr (OBzl) Pam 樹脂 (SynChem Inc) 及び以下の配列を改良 Applied Biosystems 430A ペプチド合成機に入れ、F a s t B o c H B T U 活性化単一カップリングを使用して合成を行った。

H S Q G T F T S D Y S K Y L D S C R A Q D F V Q W L M N T

以下の側鎖保護基を使用した：A r g (T o s)、A s p (O c H e x)、A s n (X a n)、C y s (p M e B z l)、G l u (O c H e x)、H i s (B o c)、L y s (2 C l - Z)、S e r (B z l)、T h r (B z l)、T r p (C H O) 及び T y r (B r - Z)。合成の完了したペプチジル樹脂を 2 0 % ピペリジン / ジメチルホルムアミドで処理して、T r p ホルミル保護を除去し、次に H F 反応容器に移し、真空下で乾燥した。1.0 ml の p - クレゾール及び 0.5 ml のジメチルスルフィドを、磁気式撹拌バーと共に加えた。容器を H F 装置 (Pennisula Labs) に取り付け、ドライアイス / メタノール浴で冷却し、排気し、およそ 1 0 ml の液体フッ化水素を圧入した。反応を氷浴で 1 時間撹拌し、次に H F を減圧留去した。残渣をエチルエーテルに懸濁し、固体を濾過し、エーテルで洗浄し、ペプチドを 5 0 ml の酢酸水溶液に抽出した。分析 H P L C [0.46 × 5 cm の Zorb ax C8、1 ml / 分、45 °C、214 nm、A 緩衝液は 0.1 % T F A、B 緩衝液は 0.1 % T F A / 9 0 % A C N、1 0 分間かけて 1 0 % B から 8 0 % B の勾配] を少量の切断抽出物試料により実施した。残りの抽出物を 2.2 × 2.5 cm の Kromasil C18 分取逆相カラムに装填し、Pharmacia F P L C システムを使用してアセトニトリル勾配を実施した。5 分毎の画分を収集し、その間、214 nm (2.0 Å) の UV でモニタリングした。A = 0.1 % T F A、B = 0.1 % T F A / 5 0 % アセトニトリル。勾配 = 4 5 0 分間かけて 3 0 % B から 1 0 0 % B。

【 0 3 2 7 】

最高純度の生成物を含有する画分 (4 8 - 5 2) をまとめ、冷凍及び凍結乾燥して、3 0.1 mg を得た。生成物の H P L C 分析は、> 9 0 % の純度を示し、M A L D I 質量スペクトル分析は、所望の質量の 3 4 2 9.7 を示した。グルカゴン C y s ^{2 1}、グルカゴン C y s ^{2 4} 及びグルカゴン C y s ^{2 9} を同様に調製した。

【 0 3 2 8 】

< 実施例 4 >

グルカゴン - C e x 及び他の C 末端延長部類縁体の合成

285 mg (0.2 mmol) のメトキシベンズヒドリルアミン樹脂 (Midwest Biotech) を 6 0 ml の反応容器に入れ、以下の配列を改良 Applied Biosystems 430A ペプチド合成機に入れ、F a s t B o c H B T U 活性化単一カップリングを使用して合成を行った。

H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T G P S S G A P P P S

以下の側鎖保護基を使用した：A r g (T o s)、A s p (O c H e x)、A s n (X a n)、C y s (p M e B z l)、G l u (O c H e x)、H i s (B o c)、L y s (2 C l - Z)、S e r (B z l)、T h r (B z l)、T r p (C H O) 及び T y r (B r - Z)。合成の完了したペプチジル樹脂を 2 0 % ピペリジン / ジメチルホルムアミドで処理して、T r p ホルミル保護を除去し、次に H F 反応容器に移し、真空下で乾燥した。1

10

20

30

40

50

、0 mlのp - クレゾール及び0 . 5 mlのジメチルスルフィドを、磁気式攪拌バーと共に加えた。容器をHF装置 (Penninsula Labs) に取り付け、ドライアイス/メタノール浴で冷却し、排気し、およそ10 mlの液体フッ化水素を圧入した。反応物を氷浴で1時間攪拌し、次にHFを減圧留去した。残渣をエチルエーテルに懸濁し、固体を濾過し、エーテルで洗浄し、ペプチドを50 mlの酢酸水溶液に抽出した。分析HPLC〔0 . 46 × 5 cmのZorbax C8、1 ml / 分、45 °C、214 nm、A緩衝液は0 . 1 % TFA、B緩衝液は0 . 1 % TFA / 90 % ACN、10分間かけて10 % Bから80 % Bの勾配〕を切断抽出物のアリコートにより実施した。残りの抽出物を2 . 2 × 2.5 cmのKromasil C18分取逆相カラムに装填し、Pharmacia FPLCシステムを溶出に使用してアセトニトリル勾配を実施した。5分毎の画分を収集し、その間、214 nm (2 . 0 A) のUVでモニタリングした。A = 0 . 1 % TFA、B = 0 . 1 % TFA / 50 % アセトニトリル。勾配 = 450分間かけて30 % Bから100 % B。画分58 ~ 65をまとめ、冷凍及び凍結乾燥して、198 . 1 mgを得た。

10

【0329】

生成物のHPLC分析は、95 %を超える純度を示した。MALDI質量スペクトル分析は、C末端アミドとして、所望の理論質量の4316 . 7を有する生成物の存在を示した。オキシントモジュリン及びオキシントモジュリン - KRNRを、適切な装填PAM樹脂から出発して、C末端カルボン酸として同様に調製した。

【0330】

<実施例5>

20

グルカゴンCys¹⁻⁷Mal - PEG - 5K

15 . 1 mgのグルカゴンCys¹⁻⁷ (1 - 29) 及び27 . 3 mgの平均分子量5000のメトキシポリ (エチレングリコール) マレイミド (mPEG - Mal - 5000、Nektar Therapeutics) を、3 . 5 mlのリン酸緩衝食塩水 (PBS) に溶解し、0 . 5 mlの0 . 01 Mエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加えた。反応物を室温で攪拌し、反応の進行をHPLC分析〔0 . 46 × 5 cmのZorbax C8、1 ml / 分、45 °C、214 nm (0 . 5 A)、A = 0 . 1 % TFA、B = 0 . 1 % TFA / 90 % ACN、勾配 = 10分間かけて10 % Bから80 % B〕によりモニターした。

【0331】

5時間後、反応混合物を2 . 2 × 2.5 cmのKromasil C18分取逆送カラムに装填した。アセトニトリル勾配をPharmacia FPLCにより実施し、その間、214 nmのUV波長でモニタリングし、5分毎の画分を収集した。A = 0 . 1 % TFA、B = 0 . 1 % TFA / 50 % アセトニトリル、勾配 = 450分間かけて30 % Bから100 % B。生成物に対応する画分をまとめ、冷凍及び凍結乾燥して、25 . 9 mgを得た。

30

【0332】

この生成物をHPLC〔0 . 46 × 5 cmのZorbax C8、1 ml / 分、45 °C、214 nm (0 . 5 A)、A = 0 . 1 % TFA、B = 0 . 1 % TFA / 90 % ACN、勾配 = 10分間かけて10 % Bから80 % B〕により分析し、およそ90 %の純度を示した。MALDI (マトリックス支援レーザー脱離イオン化) 質量スペクトル分析は、8700 ~ 9500の (PEG誘導体に典型的な) 広い質量範囲を示した。これは、出発グルカゴンペプチドの質量 (3429) へのおよそ5 , 000 amuの追加を示す。

40

【0333】

<実施例6>

グルカゴンCys²⁻¹Mal - PEG - 5K

21 . 6 mgのグルカゴンCys²⁻¹ (1 - 29) 及び24 mgのmPEG - Mal - 5000 (Nektar Therapeutics) を、3 . 5 mlのリン酸緩衝食塩水 (PBS) に溶解し、0 . 5 mlの0 . 01 Mエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加えた。反応物を室温で攪拌した。2時間後、更なる12 . 7 mgのmPEG - Mal - 5000を加えた。8時間後、反応混合物を2 . 2 × 2.5 cmのVydac C18分取逆相カラムに装填し、アセトニトリル勾配を4 ml / 分のPharmacia FPLCにより実施し、その間、5分毎の画分を収集した。A =

50

0.1% TFA、B = 0.1% TFA / 50% ACN。勾配 = 450 分間かけて 20% から 80% B。

【0334】

生成物の出現に対応する画分をまとめ、冷凍及び凍結乾燥して、34mgを得た。分析 HPLC [0.46 × 5 cm の Zorbax C8、1 ml / 分、45°C、214 nm (0.5 Å)、A = 0.1% TFA、B = 0.1% TFA / 90% ACN、勾配 = 10 分間かけて 10% B から 80% B] によるこの生成物の分析は、出発グルカゴンペプチドと異なる均質な生成物を示した。MALDI (マトリックス支援レーザー脱離イオン化) 質量スペクトル分析は、8700 ~ 9700 の (PEG 類縁体に典型的な) 広い質量範囲を示した。これは、出発グルカゴンペプチドの質量 (3470) へのおよそ 5,000 amu の追加を示す。

10

【0335】

<実施例 7>

グルカゴン Cys²⁻⁴ Mal-PEG-5K

20.1mg のグルカゴン C²⁻⁴ (1-29) 及び 39.5mg の mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) を、3.5ml の PBS に攪拌しながら溶解し、0.5ml の 0.01M EDTA を加えた。反応物を室温で 7 時間攪拌し、次に更なる 40mg の mPEG-Mal-5000 を加えた。およそ 15 時間後、反応混合物を、2.2 × 2.5 cm の Vydac C18 分取逆相カラムに装填し、アセトニトリル勾配を、Pharmacia FPLC を使用して実施した。5 分毎の画分を収集し、その間、214 nm (2.0 Å) の UV でモニタリングした。A 緩衝液 = 0.1% TFA、B 緩衝液 = 0.1% TFA / 50% ACN、勾配 = 450 分間かけて 30% B から 100% B。生成物に対応する画分をまとめ、冷凍及び凍結乾燥して、45.8mg を得た。MALDI 質量スペクトル分析は、最大値が 9175.2 の PEG に典型的な幅広いシグナルを示し、これはグルカゴン C²⁻⁴ (3457.8) よりもおよそ 5,000 amu 多い。

20

【0336】

<実施例 8>

グルカゴン Cys²⁻⁴ Mal-PEG-20K

25.7mg のグルカゴン C²⁻⁴ (1-29) 及び 40.7mg の mPEG-Mal-20K (Nektar Therapeutics) を、3.5ml の PBS に攪拌しながら室温で溶解し、0.5ml の 0.01M EDTA を加えた。6 時間後、出発物質と生成物の比率は、HPLC により決定すると、およそ 60 : 40 であった。更なる 25.1mg の mPEG-Mal-20K を加え、反応物を更に 16 時間攪拌した。生成物比率が有意に改善されなかったため、反応混合物を、2.2 × 2.5 cm の Kromasil C18 分取逆相カラムに装填し、450 分かけて 30% B から 100% B への勾配を使用する Pharmacia FPLC により精製した。A 緩衝液 = 0.1% TFA、B 緩衝液 = 0.1% TFA / 50% ACN、流量 = 4 ml / 分、5 分毎の画分を収集し、その間、214 nm (2.0 Å) の UV でモニタリングした。均質な生成物を含む画分をまとめ、冷凍及び凍結乾燥して、25.7mg を得た。分析 HPLC により決定された純度は約 90% であった。MALDI 質量スペクトル分析は、23,000 ~ 27,000 の幅広いピークを示し、これは出発グルカゴン C²⁻⁴ (3457.8) よりもおよそ 20,000 amu 多い。

30

40

【0337】

<実施例 9>

グルカゴン Cys²⁻⁹ Mal-PEG-5K

20.0mg のグルカゴン Cys²⁻⁹ (1-29) 及び 24.7mg の mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) を、3.5ml の PBS に攪拌しながら室温で溶解し、0.5ml の 0.01M EDTA を加えた。4 時間後、更なる 15.6mg の mPEG-Mal-5000 を加えて、反応の完了を促進した。8 時間後、反応混合物を、2.2 × 2.5 cm の Vydac C18 分取逆相カラムに装填し、アセトニトリル勾配を、Pharmacia FPLC システムにより実施した。5 分毎の画分を収集し、その間、214 nm (2.0 Å) の UV でモニタリングした。A = 0.1% TFA、B = 0.1% TFA / 50% ACN。画分 7

50

5 - 97を合わせ、冷凍及び凍結乾燥して、HPLCにより回収された出発物質（画分58 - 63）と異なる、40.0mgの生成物を得た。分析HPLC〔0.46×5cmのZorbax C8、1ml/分、45℃、214nm（0.5A）、A = 0.1% TFA、B = 0.1% TFA / 90% ACN、勾配 = 10分間かけて10%Bから80%B〕によるこの生成物の分析は、95%を超える純度を示した。MALDI質量スペクトル分析は、8,000 ~ 10,000（最大9025.3）の範囲の質量を有するPEG成分の存在を示し、これは出発物質（3484.8）よりも5,540 amu多い。

【0338】

<実施例10>

グルカゴンCys²⁻⁴（2 - ブチロラクトン）

10

24.7mgのグルカゴンCys²⁻⁴（1 - 29）に、4mlの0.05M重炭酸アンモニウム / 50%アセトニトリル及び5.5ulの2 - ブロモ - 4 - ヒドロキシ酪酸 - ラクトンの溶液（アセトニトリル900ul中100ul）を加えた。室温で3時間攪拌した後、更なる105ulのラクトン溶液を反応混合物に加え、更に15時間攪拌した。反応混合物を、10%酢酸水溶液で10mlに希釈し、2.2×25cmのKromasil C18分取逆相カラムに装填した。アセトニトリル勾配（450分かけて20%Bから80%B）をPharmacia FPLCにより実施し、その間、5分毎の画分を収集し、214nm（2.0A）のUVでモニタリングした。流量 = 4ml/分、A = 0.1% TFA、B = 0.1% TFA / 50% ACN。画分74 - 77を合わせ、冷凍及び凍結乾燥して、7.5mgを得た。HPLC分析は、95%の純度を示し、MALDI質量スペクトル分析は、3540.7の質量又は

20

【0339】

<実施例11>

グルカゴンCys²⁻⁴（S - カルボキシメチル）

18.1mgのグルカゴンCys²⁻⁴（1 - 29）を、9.4mlの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH = 9.2）に溶解し、0.6mlのプロモ酢酸溶液（アセトニトリル中1.3mg/ml）を加えた。反応を室温で攪拌し、反応の進行を分析HPLCにより追跡した。1時間後、更なる0.1mlのプロモ酢酸溶液を加えた。反応を更に60分間攪拌し、酢酸水溶液で酸性化し、精製のために2.2×25cmのKromasil C18分取逆相カラムに装填した。アセトニトリル勾配をPharmacia FPLC（流量 = 4ml/分）により実施し、その間、5分毎の画分を収集し、214nm（2.0A）のUVでモニタリングした。A = 0.1% TFA、B = 0.1% TFA / 50% ACN。画分26 - 29を合わせ、冷凍及び凍結乾燥して、数mgの生成物を得た。分析HPLCは、90%の純度を示し、MALDI質量スペクトル分析は、所望の生成物の質量3515を確認した。

30

【0340】

<実施例12>

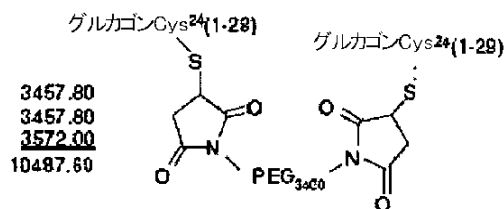
グルカゴンCys²⁻⁴マレイミド, PEG - 3.4K - 二量体

16mgのグルカゴンCys²⁻⁴及び1.02mgのMal - PEG - Mal - 3400、平均分子量3400のポリ（エチレングリコール） - ビス - マレイミド（Nektar Therapeutics）を、3.5 のリン酸緩衝食塩水及び0.5mlの0.01M EDTAに溶解し、反応を室温で攪拌した。16時間後、更なる16mgのグルカゴンCys²⁻⁴を加え、攪拌を続けた。およそ40時間後、反応混合物をPharmacia PepRPC 16/10カラムに装填し、アセトニトリル勾配をPharmacia FPLCにより実施し、その間、2分毎の画分を収集し、214nm（2.0A）のUVでモニタリングした。流量 = 2ml/分、A = 0.1% TFA、B = 0.1% TFA / 50% ACN。画分69 - 74を合わせ、冷凍及び凍結乾燥して、10.4mgを得た。分析HPLCは、90%の純度を示し、MALDI質量スペクトル分析は、9500 ~ 11,000の範囲の成分を示し、これは所望の二量体と一致する。

40

【0341】

【化 16】



【0342】

< 実施例 13 >

グルカゴンラマトムの合成

285 mg (0.2 mmol) のメトキシベンズヒドリルアミン樹脂 (Midwest Biotech) を 60 mL の反応容器に入れ、以下の配列を、Boc DEPBT 活性化単一結合を使用する改良 Applied Biosystems 430A ペプチド合成機により構築した。

HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT-NH₂ (12-16 ラクトム)

【0343】

以下の側鎖保護基を使用した：Arg (Tos)、Asp (OCH₃)、Asn (Xan)、Glu (OFm)、His (BOM)、Lys (Fmoc)、Ser (Bzl)、Thr (Bzl)、Trp (CHO)、Tyr (Br-Z)。ラクトムが 16-20、20-24 または 24-28 から構成された場合、Lyx (Cl-Z) を位置 12 で使用した。合成の完了したペプチジル樹脂を 20% ピペリジン / ジメチルホルムアミドにより回転させながら 1 時間処理して、Trp ホルミル基を、ならびに Lys 12 および Glu 16 から Fmoc および OFm 保護を除去した。陽性ニンヒドリン試験により除去を確認してから、樹脂をジメチルホルムアミド、続いてジクロロメタン、次に再びジメチルホルムアミドで洗浄した。樹脂を、ジメチルホルムアミドおよびジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 中のベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP) の 520 mg (1 mmol) で処理した。反応は 8~10 時間進行し、環化は、陰性ニンヒドリン試験により確認した。樹脂を、ジメチルホルムアミド、続いてジクロロメタンで洗浄し、その後トリフルオロ酢酸で 10 分間処理した。Boc 基の除去は、陽性ニンヒドリン反応より確認した。樹脂を、ジメチルホルムアミドおよびジクロロメタンで洗浄し、フッ化水素酸 (HF) 反応容器に移す前に乾燥した。500 μL の p-クレゾールを、磁気式攪拌バーと共に加えた。容器を HF 装置 (Penninsula Labs) に取り付け、ドライアイス / メタノール浴で冷却し、排気し、およそ 10 mL の液体フッ化水素を容器の中に圧入した。反応を氷浴で 1 時間攪拌し、次に HF を真空下で除去した。残渣をエチルエーテルに懸濁し、固体を濾過し、エーテルで洗浄し、ペプチドを 150 mL の 20% アセトニトリル / 1% 酢酸に溶解した。

【0344】

粗溶解ペプチドの分析 HPLC による分析を次の条件 [0.46 x 30 mm の Xterra C8、1.50 mL / 分、220 nm、A 緩衝液は 0.1% TFA / 10% ACN、B 緩衝液は 0.1% TFA / 100% ACN、15 分間かけて 5~95% B の勾配] で実施した。抽出物を水で 2 倍に希釈し、2.2 x 25 cm Vydac C4 分取逆相カラムに装填し、Waters HPLC 系 (A 緩衝液は 0.1% TFA / 10% ACN、B 緩衝液は 0.1% TFA / 10% ACN および流量 15.00 mL / 分で 120 分間かけて 0~100% B の勾配) によりアセトニトリル勾配を使用して溶出した。精製ペプチドの HPLC 分析は、95% を超える純度を示し、エレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析は、12-16 ラクトムで 3506 Da の質量を確認した。16-20、20-24 および 24-28 からのラクトムを同様に調製した。

【0345】

< 実施例 14 >

グルカゴン溶解性アッセイ：

グルカゴン（または類縁体）の溶液（ 1 mg/ml または 3 mg/ml ）を 0.01 N の HCl で調製する。 $100\text{ }\mu\text{l}$ の保存液を、 0.01 N の HCl で 1 ml に希釈し、UV吸光度（ 276 nm ）を決定する。残りの保存液の pH を、 $200\sim250\text{ }\mu\text{l}$ の $0.1\text{ M Na}_2\text{HOP}_4$ （ $\text{pH}9.2$ ）を使用して、 $\text{pH}7$ に調整する。溶液を4で一晩放置し、次に遠心分離する。次に $100\text{ }\mu\text{l}$ の上澄みを、 0.01 N の HCl で 1 ml に希釈し、UV吸光度を決定する（2回繰り返す）。

【0346】

初期吸光度の読み取りを容量の増加で補正し、以下の計算を使用して、溶解率を確立する。

$$\text{最終吸光度} / \text{初期吸光度} \times 100 = \text{パーセント溶解率}$$

【0347】

<実施例15>

グルカゴン受容体結合アッセイ

グルカゴン受容体へのペプチドの親和性を、シンチレーション近接アッセイ技術を利用する競争結合アッセイにより測定した。シンチレーション近接アッセイ緩衝液（ 0.05 M のトリス- HCl 、 $\text{pH}7.5$ 、 0.15 M の NaCl 、 0.1% w/vのウシ血清アルブミン）により作製したペプチドの一連の3倍希釈を、96ウェル白色/透明底プレート（Corning Inc., Acton, MA）において、 0.05 nM の（ $3\text{-}[^{125}\text{I}]\text{-}$ ヨードチロシル） $\text{Tyr}10$ グルカゴン（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）、1ウェル当たり1~6マイクログラムの、ヒトグルカゴン受容体を過剰発現している細胞から調製した原形質膜画分および 1 mg /ウェルのポリエチレンジイミド処理ムギ胚芽凝集素A型シンチレーション近接アッセイビーズ（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）と混合した。ロータリー振とう器により 800 rpm で5分間振とうしてから、プレートを室温で12時間インキュベートし、次にMicroBeta 1450液体シンチレーションカウンター（Perkin-Elmer, Wellesley, MA）で読み取った。非特異的結合（NSB）放射能を、試験サンプルの最高濃度よりも4倍高い濃度の「非放射性」天然リガンドを有するウェルで測定し、総結合放射能を、競合物質を有さないウェルで検出した。特異的結合の率を以下のように計算した：特異的結合% = $(\text{結合} - \text{NSB}) / (\text{総結合} - \text{NSB}) \times 100$ 。IC₅₀値は、Originソフトウェア（OriginLab, Northampton, MA）を使用して決定した。

【0348】

<実施例16>

機能アッセイ - cAMP合成

cAMPを誘導するグルカゴン類縁体の能力を、ホタルルシフェラーゼに基づいたレポーターアッセイにより測定した。グルカゴン受容体又はGLP-1受容体のいずれかと、cAMP応答配列に結合したルシフェラーゼ遺伝子とを同時形質移入されたHEK293細胞から、 0.25% ウシ増殖血清（HyClone, Logan, UT）が補充されたDMEM（Invitrogen, Carlsbad, CA）における16時間の培養により血清を取り除き、次にグルカゴン、GLP-1又は新規グルカゴン類縁体のいずれかによる一連の希釈と共に、96ウェルポリ-D-リシン被覆「バイオコート」プレート（BD Biosciences, San Jose, CA）において37、 5% CO₂で5時間インキュベートした。インキュベーションの終了時に、 $100\text{ }\mu\text{l}$ のLucLiteルミネセンス基質試薬（Perkin-Elmer, Wellesley, MA）を各ウェルに加えた。プレートを短時間振とうし、暗黒で10分間インキュベートし、発光をMicroBeta-1450液体シンチレーションカウンター（Perkin-Elmer, Wellesley, MA）で測定した。有効50%濃度を、Originソフトウェア（OriginLab, Northampton, MA）を使用して計算した。

【0349】

<実施例17>

グルカゴンCys-マレイミドPEG類縁体の安定性アッセイ

各グルカゴン類縁体を水又はPBSに溶解し、初期HPLC分析を実施した。pHを調整した後(4、5、6、7)、試料を37℃で特定の時間インキュベートし、HPLCにより再び分析して、ペプチドの完全性を決定した。特定の目的のペプチドの濃度を決定し、無傷のまま残っている率を初期分析と比較して計算した。

【0350】

<実施例18>

アシル化および/またはペグ化ペプチドを以下のように調製した。ペプチドは、CS Bio 4886ペプチド合成機またはApplied Biosystems 430Aペプチド合成機のいずれかを使用して、固体支持樹脂上に合成した。Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992)に記載されている現場中和化学を使用した。アシル化ペプチドでは、アシル化される標的アミノ酸残基(例えば、位置10)をN-Fmocリシン残基で置換した。DMF中の20%ピペリジンによる、合成の完了したN末端BOC保護ペプチドの30分間の処理によって、Fmoc/ホルミル基を除去した。遊離 - アミノLys残基へのカップリングは、Fmoc保護スパーサーアミノ基(例えば、Fmoc-(N-BOC)-トリプトファン-OH)またはアシル鎖(例えば、C17-COOH)のいずれかの10倍モル過剰との、およびDMF/DIEA中のPyBOPまたはDEPBTカップリング試薬とのカップリングにより達成した。その後のスパーサーアミノ酸のFmoc基の除去に続いて、アシル鎖とのカップリングを繰り返した。100%TFAによる最終処理は、あらゆる側鎖保護基および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、次にHF/p-クレゾールの95:5を0℃で1時間使用して支持体から切断した。エーテル抽出の後、5%HOAc溶液を使用して粗ペプチドを溶媒和した。次に溶液の試料を、正確な分子量のペプチドを含有しているかについてESI-MSにより確認した。正確なペプチドを、100%CH₃CN中の10%CH₃CN/0.1%TFAから0.1%TFAの直線勾配を使用してRP-HPLCにより精製した。Vydac C18の22mm×250mmタンパク質カラムを精製に使用した。アシル化ペプチド類縁体は、一般に、緩衝液比の20:80で完全に溶出した。一部と一緒にプールし、分析RP-HPLCにより純度を調べた。純粋な画分を凍結乾燥して、白色の固体ペプチドを得た。収量は、合成に応じて10mg~100mgの範囲であった。

【0351】

ペプチドがアシル化されるラクタム架橋および標的残基を含む場合、アシル化は、ペプチド主鎖へのアミノ酸の付加の直後に、上記に記載されたとおりに実施される。

【0352】

ペプチドのペグ化では、40kDaのメトキシポリ(エチレングルコール)マレイミド-プロピオンアミド(Chirotech Technology Ltd.)を、ペプチドとPEGの両方を溶解して透明な溶液にするのに必要な最小量の溶媒(一般に、2~3mgのペプチドを使用する反応において2mL未満)を使用して、7Mの尿素、50mMのトリス-HCl緩衝液中のモル当量のペプチドと反応させた。室温での激しい攪拌を開始して4~6時間行い、反応を分析RP-HPLCにより分析した。ペグ化生成物は、出発物質とは別に、より短い保持時間で出現した。精製は、初期ペプチド精製に使用した条件と同じ条件のVydac C4カラムにより実施した。溶出は、緩衝剤比が50:50のあたりで生じた。純粋なペグ化ペプチドの画分を収集し、凍結乾燥した。

【0353】

ペプチドを、生物学的活性について、前述の実施例16に記載されているようにアッセイした。アシル化ペプチドは、GLP-1に対する増強された効力を示してもよい。トリプトファンスパーサーを含めることは、グルカゴン受容体に対するより良好な効力をもたらしうる。

【0354】

アシル化は、ペプチドの半減期を1時間以上延長することができるが、数十のkDa範囲の繰り返しを有するペグ化は、さらに延長することができる。両方の種類の修飾を含む

ペプチドを調製した。これらのペプチドは、延長された循環半減期、ならびにDPP-IVおよび他のプロテアーゼに対する耐性を示すと予測される。

【0355】

<実施例20>

体重増加、食欲および血中グルコースレベルに対するインビボ効果

以下のペプチドを実質的に上記に記載されたように合成した。

(A) ペグ化グルカゴン/GLP-1コアゴニストペプチド(位置2のAIBにより、40K PEG基に結合している位置24のCysによりさらに修飾されているキメラ2ペプチド(実施例21を参照すること)である、キメラ2 AIB2 C24 40K PEG) ;

10

(B) ペグ化GIPアンタゴニスト(位置3におけるPro、40K PEG基に結合している位置24におけるCys、およびC末端カルボキシレートを置換するアミドにより修飾されている、GIPのアミノ酸1-42(天然GIPの配列は配列番号4)である、Pro3 C24 GIP NH2(1-42)40K PEG) ; ならびに

(C) GIPアゴニスト(位置2におけるAIBおよび40K PEG基に結合している位置24におけるCysにより修飾されている、GIPのアミノ酸1-42(天然GIPの配列は配列番号4)である、AIB2 C24 GIP(1-42)40K PEG)。

【0356】

多様なペプチドまたはビヒクルのみを食餌誘導肥満(DIO)マウスに毎週一度(70または210nmol/kg/週)皮下注射することによって、ペプチドをインビボで試験した。各群は、8匹のマウスを含有し、それぞれ初期平均体重の50gを有した。体重、身体組成、食物摂取および血中グルコースレベルを周期的に決定した。

20

【0357】

図1~3に示されているように、GIPアンタゴニストもGIPアゴニストペプチドも、ペグ化グルカゴン/GLP-1コアゴニストと比較して、マウスにおいて体重、累積食物摂取および血中グルコースレベルの低減に対して効果がなかった。

【0358】

<実施例21>

ペプチドのGIP、GLP-1およびグルカゴン活性

30

配列番号5~94のペプチド(それぞれC末端カルボキシレートの代わりにアミドを含む)を、実質的に上記に記載されたように合成し、実施例16によって、GIP受容体、GLP-1受容体およびグルカゴン受容体に対する活性についてインビトロで試験した。それぞれのペプチドのEC50を表1に示す。

【0359】

【表 1】

表 1

記号	配列 番号	グルカゴン受容体			GLP-1 受容体			GIP 受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-61	5	0.110	0.190	172.73%	0.180	0.040	22.22%	9.987	0.083	0.83%
mt-62	6	0.450	0.190	42.22%	0.100	0.040	40.00%	5.183	0.083	1.60%
mt-63	7	3.150	0.190	6.03%	0.310	0.040	12.90%	未決定		
mt-66	8	2.000	0.260	13.00%	0.130	0.050	38.46%	未決定		
mt-68	9	1.970	0.260	13.20%	0.820	0.050	6.10%	未決定		
mt-69	10	0.160	0.260	162.50%	0.410	0.050	12.20%	14.601	0.083	0.57%
mt-84	11	0.450	0.060	13.33%	0.160	0.080	50.00%	未決定		
mt-85	12	4.560	0.060	1.32%	0.660	0.080	12.12%	未決定		
mt-92	13	非該当	0.430		0.110	0.060	54.55%	未決定		
mt-93	14	3.000	0.430	14.33%	0.040	0.060	150.00%	未決定		
mt-95	15	280.31	0.100	0.04%	48.920	0.040	0.08%	0.465	0.049	10.54%
mt-96	16	61.70	0.180	0.29%	92.860	0.040	0.04%	0.058	0.049	84.48%
mt-97	17	4.080	0.130	3.19%	2.360	0.030	1.27%	1.745	0.049	2.81%
mt-98	18	957.07	0.100	0.01%	2.820	0.040	1.42%	0.196	0.049	25.00%
mt-99	19	23313	0.180	0.00%	4548.9	0.070	0.00%	0.049	0.049	100.00%
mt-100	20	1459	0.180	0.01%	552.43	0.060	0.01%	0.016	0.049	306.25%
mt-101	21	未決定			未決定			71.312	0.042	0.06%

10

20

30

40

記号	配列 番号	グルカゴン受容体			GLP-1受容体			GiP受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-102	22	798.75	0.180	0.02%	98.38	0.060	0.06%	非該当	0.025	
mt-103		>4000			26.867			242		
mt-104	23	未決定			未決定			19.069	0.042	0.22%
mt-105	24	非該当	0.046		非該当	0.046		0.552	0.042	7.61%
mt-106	25	165	0.180	0.11%	264.4	0.060	0.02%	非該当	0.025	
mt-107	26	0.070	0.130	185.71%	24.770	0.040	0.16%	3.373	0.025	0.74%
mt-108	27	0.190	0.130	68.42%	0.320	0.040	12.50%	4.781	0.025	0.52%
mt-109	28	0.130	0.100	76.92%	3.860	0.030	0.78%	0.658	0.046	6.99%
mt-110	29	0.430	0.100	23.26%	2.020	0.030	1.49%	0.478	0.046	9.62%
mt-111	30	0.270	0.230	85.19%	0.660	0.070	10.61%	6.258	0.049	0.78%
mt-113	31	335.98	0.230	0.07%	172.66	0.070	0.04%	非該当	0.049	
mt-114	32	81.25	0.230	0.28%	143.65	0.070	0.05%	非該当	0.049	
mt-115	33	0.440	0.050	11.36%	0.150	0.030	20.00%	3.576	0.047	1.31%
mt-116	34	0.787	0.147	18.68%	3.798	0.041	1.07%	0.617	0.047	7.62%
mt-118	35	0.040	0.050	125.00%	1.280	0.030	2.34%	0.736	0.047	6.39%
mt-120	36	0.074	0.192	259.46%	0.399	0.054	13.45%	2.622	0.048	1.81%
mt-124	37	2.430	0.210	8.64%	0.040	0.040	100.00%	5.793	0.055	0.95%
mt-125	38	5.740	0.520	9.06%	1.260	0.040	3.17%	0.275	0.054	19.64%
mt-127	39	0.044	0.313	718.39%	0.055	0.048	87.75%	0.518	0.054	10.51%
mt-128	40	0.773	0.086	11.13%	0.120	0.040	33.33%	14.622	0.061	0.42%
mt-129	41	0.952	0.165	17.34%	4.073	0.046	1.12%	2.879	0.059	2.06%

10

20

30

40

記号	配列 番号	グルカゴン受容体			GLP-1 受容体			GIP受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-139	42	0.072	0.404	561.11%	0.142	0.059	41.46%	0.569	0.070	12.22%
mt-140	43	0.149	0.196	131.15%	0.068	0.034	49.56%	0.366	0.047	12.85%
mt-141	44	0.150	0.404	269.33%	0.160	0.059	36.78%	0.747	0.075	10.04%
mt-142	45	非該当	0.427		0.041	0.067	163.41%	0.132	0.048	36.36%
mt-143	46	0.086	0.427	496.51%	1.478	0.067	4.53%	2.635	0.048	1.82%
mt-144	47	2.272	0.381	16.77%	0.036	0.051	141.67%	0.480	0.089	18.54%
mt-145	48	0.204	0.096	47.06%	9.936	0.033	0.33%	1.086	0.052	4.79%
mt-146	49	0.020	0.096	480.00%	13.093	0.033	0.25%	0.391	0.052	13.30%
mt-147	50	0.116	0.105	90.52%	0.105	0.036	33.87%	0.144	0.062	43.06%
mt-148	51	4.910	0.105	2.14%	0.098	0.036	36.22%	0.095	0.062	65.26%
mt-149	52	16.315	0.105	0.64%	0.036	0.036	97.53%	0.068	0.062	91.18%
mt-150	53	0.036	0.114	316.67%	3.474	0.038	1.09%	0.232	0.062	26.72%
mt-151	54	0.378	0.114	30.16%	0.126	0.038	30.16%	0.852	0.062	7.28%
mt-152	55	0.293	0.107	36.52%	0.016	0.027	168.75%	0.087	0.036	41.19%
mt-154	56	1.325	0.098	7.40%	2.733	0.019	0.70%	5.530	0.059	1.07%
mt-155	57	1.276	0.140	10.93%	0.025	0.025	98.99%	0.665	0.047	7.02%
mt-156	58	2.965	0.181	6.10%	0.246	0.030	12.20%	0.919	0.041	4.41%
mt-157	59	2.616	0.181	6.92%	0.081	0.030	37.04%	1.013	0.041	4.00%
mt-158	60	1.047	0.156	14.90%	0.034	0.035	102.94%	0.174	0.031	17.82%
mt-162	61	7.002	0.068	0.97%	0.011	0.012	109.09%	0.136	0.035	25.74%
mt-163	62	0.027	0.068	251.85%	0.040	0.012	30.00%	0.740	0.035	4.73%

10

20

30

40

記号	配列 番号	グルカゴン受容体				GLP-1受容体				GIP受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	Std.	相対活性
mt-164	63	0.151	0.166	109.93%	0.046	0.026	56.52%	0.164	0.027	16.46%		
mt-165	64	0.489	0.092	18.81%	0.023	0.034	147.83%	0.074	0.020	27.03%		
mt-166	65	0.875	0.086	9.83%	0.134	0.036	26.87%	0.320	0.019	5.94%		
mt-167	66	0.362	0.125	34.53%	0.315	0.025	7.94%	0.399	0.020	5.01%		
mt-168	67	2.607	0.125	4.79%	1.724	0.025	1.45%	6.240	0.020	0.32%		
mt-169	68	0.199	0.102	51.26%	0.057	0.031	54.39%	0.142	0.021	14.79%		
mt-170	69	3.447	0.041	1.19%	0.202	0.030	14.60%	1.285	0.019	1.44%		
mt-172	70	9.162	0.041	0.45%	0.859	0.030	3.43%	7.542	0.019	0.25%		
mt-174	71	57.546	0.037	0.06%	0.017	0.020	117.65%	0.023	0.022	95.65%		
mt-175	72	2.418	0.036	1.49%	0.220	0.013	5.91%	1.930	0.018	0.93%		
mt-176	73	0.141	0.037	26.24%	8.693	0.020	0.23%	0.055	0.022	40.00%		
mt-177	74	0.095	0.037	38.95%	21.050	0.022	0.10%	0.114	0.022	19.30%		
mt-178	75	8.251	0.035	0.42%	0.171	0.014	8.19%	0.448	0.021	4.69%		
mt-179	76	1.269	0.037	2.92%	0.260	0.020	7.50%	0.473	0.018	3.74%		
mt-182	77	0.212	0.037	17.45%	10.008	0.017	0.17%	0.080	0.018	22.13%		
mt-186	78	1.576	0.035	2.22%	0.500	0.014	2.80%	15.209	0.021	0.14%		
mt-191	79	1.460	0.063	4.32%	0.011	0.023	209.09%	0.189	0.032	16.93%		
mt-192	80	非該当	0.079		47.022	0.026	0.06%	非該当	0.023			
mt-194	81	非該当	0.079		4.157	0.026	0.63%	非該当	0.023			
mt-197	82	47.664	0.063	0.13%	35.297	0.023	0.07%	非該当	0.032			
mt-198	83	11.890	0.063	0.53%	13.219	0.023	0.17%	148.63	0.032	0.02%		

10

20

30

40

記号	配列番号	グルカゴン受容体				GLP-1受容体				GIP受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-199	84	0.214	0.067	31.31%		2.796	0.029	1.04%		0.526	0.029	5.51%
mt-200	85	0.560	0.067	11.96%		0.021	0.029	138.10%		0.631	0.029	4.60%
mt-201	86	26.680	0.063	0.24%		0.012	0.023	191.67%		0.072	0.032	44.44%
mt-202	87	2.360	0.067	2.84%		15.725	0.029	0.18%		2.198	0.029	1.32%
mt-203	88	4.840	0.067	1.38%		0.14	0.029	20.71%		12.175	0.029	0.24%
mt-204	89	108.089	0.067	0.06%		0.018	0.029	161.11%		0.147	0.029	19.73%
mt-205	90	671.760	0.067	0.01%		0.204	0.029	14.22%		1.662	0.029	1.74%
mt-206	91	331.314	0.042	0.01%		0.095	0.031	32.63%		0.115	0.015	13.04%
mt-207	92	3.204	0.042	1.31%		0.073	0.031	42.47%		0.622	0.015	2.41%
mt-208	93	447.792	0.042	0.01%		0.262	0.031	11.83%		0.313	0.015	4.79%
mt-209	94	4.656	0.042	0.90%		2.339	0.031	1.33%		1.053	0.015	1.42%

相対活性は、表示の受容体に対する天然ホルモンと比較した活性

【0360】

これらのデータに基づいて、ペプチドmt-140、mt-147、mt-151、mt-152、mt-158、mt-164、mt-165、mt-166、mt-169、mt-170、mt-172、mt-175およびmt-179は、例示的なGLP-1/GIP/グルカゴントリアゴニストペプチドであり、一方、ペプチドmt-148、mt-149、mt-162、mt-174、mt-178、mt-201およびmt-204は、例示的なGLP-1/GIPコアゴニストペプチドであり、ペプチドmt-1

10

20

30

40

50

16、mt-176、mt-177およびmt-182は、例示的なGIP/グルカゴンコアゴニストペプチドであることが決定された。

【0361】

<実施例22>

実施例21のGLP-1/GIP/グルカゴントリアゴニストペプチド(mt-170)、GLP-1/GIPコアゴニストペプチド(mt-178)、および2つのGIP/グルカゴンコアゴニストペプチド(mt-182およびmt-179)について、これらのペプチドか、グルカゴン/GLP-1コアゴニストペプチド(キメラ2 AIB2(次の修飾:位置17にGln、位置28にAla、位置20にLys、位置21にGlu、位置23にIleおよび位置24にAla、ならびに位置2にAIBの更なる修飾を有するC末端アミド(「キメラ2」)を含む天然グルカゴンアミド配列(配列番号1))か、キメラ2 AIB2 ラクタム(キメラ2 AIB2と同じであるが、位置16のGluおよび位置20のLysの更なる修飾を有し、ラクタムがGlu16とLys20の側鎖を架橋する)、またはビヒクルのみを、食餌誘導肥満(DIO)マウスに毎週一度ずつ(QW)(70または210nmol/kg/週)皮下注射することにより、インビボで試験した。各群は、8匹のマウスを含有し、それぞれ初期平均体重の50gを有した。体重を周期的に決定した。

10

【0362】

図4に示されているように、トリアゴニストおよびGLP-1/GIPコアゴニストは、キメラ2 AIB2と同様に、マウスの体重を低下するのに少しだけ効果的であったが、体重の低減に最良の能力を示したキメラ2 AIB2 ラクタムほど効果的ではなかった。対照的に、両方のGIP/グルカゴンコアゴニスト、特にmt-182は、体重の低減に対して効果が低かった。

20

【0363】

<実施例23>

GLP-1/GIP/グルカゴントリアゴニストペプチド(mt-170)およびGLP-1/GIPコアゴニストペプチド(mt-178)について、これらのペプチドか、GLPアゴニスト(位置16にGluを有する配列番号3を含む)か、またはビヒクルのみを、食餌誘導肥満(DIO)マウスに毎週一度ずつ(10nmol/kg/週を4週間または35nmol/kg/週を2週間)皮下注射することによって、インビボで試験した。各群は、8匹のマウスを含有し、マウスはそれぞれ初期平均体重の49gを有した。体重および血中グルコースレベルを周期的に決定した。図5および6に示されているように、GLP-1/GIPコアゴニストおよびトリアゴニストは両方とも、GLP-1アゴニストよりも、体重および血中グルコースレベルの低減において効果があった。

30

【0364】

<実施例24>

ラクタムの代わりにアルファ、アルファニ置換アミノ酸を有するグルカゴンに基づいた類縁体の、アルファ-ヘリックスを安定化する効果は、mt-165(配列番号64)およびmt-170(配列番号69)のラクタムを位置16のAIBに代えることによって調査した。ラクタムの代わりに位置16のAIBを有するmt-165の配列を含むペプチドは、「mt-241」と呼ばれ、配列番号167のアミノ酸配列を有し、一方、ラクタムの代わりに位置16のAIBを有するmt-170の配列を含むペプチドは、「mt-248」と呼ばれ、配列番号173のアミノ酸配列を有した。

40

【0365】

ラクタム架橋を欠いており、位置16および/または20にAIBを含む付加直鎖ペプチドも、実質的に上記に記載されたように作製した。これらのペプチドを、「mt-242」、「mt-249」、「mt-250」、「mt-251」、「mt-252」、「mt-255」、「mt-258」および「mt-259」と呼び、それぞれ配列番号168、174~176、107、108、177および258のアミノ酸配列を有した。これらのペプチドのそれぞれのグルカゴン、GLP-1およびGIP受容体に対するインビ

50

トロ生物学的活性を、実施例 16 に実質的に記載されたように試験した。結果を表 2 に示す。

【 0 3 6 6 】

【表 2】

表 2

記号	配列番号	グルカゴン受容体			GLP-1 受容体			GIP 受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-241	167	2.844	0.106	3.73%	0.023	0.030	130.43%	0.252	0.011	4.37%
mt-242	168	1.106	0.106	9.58%	0.102	0.030	29.41%	0.078	0.011	14.10%
mt-248	173	16.712	0.061	0.37%	0.103	0.010	9.71%	3.233	0.017	0.53%
mt-249	174	10.336	0.061	0.59%	0.391	0.010	2.56%	2.710	0.017	0.63%
mt-250	175	0.667	0.042	6.30%	0.033	0.021	63.64%	0.062	0.019	30.65%
mt-251	176	2.758	0.042	1.52%	0.015	0.021	140.00%	0.033	0.019	57.58%
mt-252	107	0.319	0.042	13.17%	0.018	0.021	116.67%	0.013	0.019	146.15%
mt-255	108	5.463	0.134	2.45%	0.018	0.021	116.67%	0.013	0.019	146.15%
mt-258	177	0.4873	0.0686	14.08%	0.0202	0.0119	58.91%	0.0570	0.0096	16.84%
mt-259	178	0.2967	0.0686	23.12%	0.0189	0.0119	62.96%	0.0799	0.0096	12.02%

【 0 3 6 7 】

表 2 の結果から明らかなように、ラクタムを含有しない直鎖ペプチドは、グルカゴンおよび / または GLP-1 受容体に対する活性と共に、GIP 受容体に対する活性ももたら

10

20

30

40

50

した。さらに具体的には、m t - 2 4 2、m t - 2 4 8、m t - 2 4 9、m t - 2 5 0、m t - 2 5 2、m t - 2 5 5、m t - 2 5 8およびm t - 2 5 9は、グルカゴン / G L P - 1 / G I P トリアゴニストの活性を示し、一方、m t - 2 5 1は、G L P - 1 / G I P コアゴニストの活性を示した。位置 1 6 に L y s および位置 2 0 に A I B を有するペプチド m t - 2 5 2 は、グルカゴンおよび G L P - 1 受容体に対して効力を示し、G I P 受容体に対して増強された活性を示した。

【 0 3 6 8 】

< 実施例 2 5 >

ラクタム環を欠いており、位置 1 6 に L y s または同様の残基および位置 2 0 に A I B を有する直鎖ペプチドを、実質的に上記に記載されたように作製した。ペプチドは、配列番号 9 9 ~ 1 4 1、1 4 4 ~ 1 6 4 および 1 6 6 のアミノ酸配列を有した。ペプチドを、グルカゴン、G L P - 1 および G I P 受容体に対する生物学的活性について、実施例 1 6 に実質的に記載されたようにインビトロで試験した。結果を表 3 に示す。

【 0 3 6 9 】

【表 3】

表 3

記号	配列 番号	グルカゴン受容体			GLP-1 受容体			GIP 受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-252	107	0.319	0.042	13.17%	0.018	0.021	116.67%	0.013	0.019	146.15%
mt-255	108	5.463	0.134	2.45%	0.211	0.041	19.43%	0.115	0.018	15.65%
mt-256	109	58.947	0.0686	0.12%	0.0124	0.0119	95.97%	0.0034	0.0096	282.35%
mt-257	110	0.2109	0.0686	32.53%	0.0303	0.0119	39.27%	0.0232	0.0096	41.38%
mt-260	104	0.3207	0.0213	6.64%	0.0068	0.0175	257.35%	0.0018	0.0105	583.33%
mt-261	105	0.1585	0.0213	13.44%	0.0047	0.0175	372.34%	0.0015	0.0105	700.00%
mt-262	106	0.1343	0.0213	15.86%	0.0044	0.0175	397.73%	0.0027	0.0105	388.89%
mt-263	111	3.1801	0.0213	0.67%	0.0147	0.0175	119.05%	0.0031	0.0105	338.71%
mt-264	112	非該当			非該当			非該当		
mt-265	113	6.4308	0.0436	0.68%	0.9929	0.0176	1.77%	0.0624	0.0085	13.62%
mt-266	114	18.645	0.0436	0.23%	1.5334	0.0176	1.15%	0.1639	0.0085	5.19%
mt-267	115	62.010	0.0436	0.07%	2.0936	0.0176	0.84%	1.3122	0.0085	0.65%
mt-268	116	6.5002	0.0436	0.67%	0.0155	0.0176	113.55%	0.0047	0.0085	180.85%
mt-269	117	183.4936	0.1964	0.11%	0.0136	0.0197	144.85%	0.0057	0.0080	140.35%
mt-270	118	305.77	0.1964	0.06%	0.0093	0.0197	211.83%	0.0049	0.0080	163.27%
mt-271	119	112.980	0.1964	0.17%	0.0106	0.0197	185.85%	0.0056	0.0080	142.86%
mt-272	120	1060.8	0.1964	0.02%	1.2293	0.0197	1.60%	0.0241	0.0080	33.20%
mt-274	99	69.087	0.0417	0.06%	0.0916	0.0071	7.75%	0.0350	0.0139	39.71%
mt-275	121	0.0671	0.0417	62.15%	0.0068	0.0071	104.41%	0.0124	0.0139	112.10%

10

20

30

40

記号	配列 番号	グルカゴン受容体			GLP-1 受容体			GIP受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-276	122	0.0537	0.0417	77.65%	0.0066	0.0071	107.58%	0.0080	0.0139	173.75%
mt-277	123	0.0215	0.0506	235.35%	0.0086	0.0193	224.42%	0.0052	0.0237	455.77%
mt-278	124	0.0086	0.0506	588.37%	0.0042	0.0193	459.52%	0.0028	0.0237	846.43%
mt-279	125	0.0069	0.0506	733.33%	0.0046	0.0193	419.57%	0.0045	0.0237	526.67%
mt-280	126	0.0677	0.0506	74.74%	0.0126	0.0193	153.17%	0.0149	0.0237	159.06%
mt-281	127	0.2816	0.0469	16.65%	0.2165	0.0111	5.13%	0.39996	0.0267	6.68%
mt-282	128	2.4367	0.0287	1.18%	0.0134	0.0059	44.03%	0.0133	0.0102	76.69%
mt-283	129	7.9431	0.0287	0.36%	0.0158	0.0059	37.34%	0.0122	0.0102	83.61%
mt-284	130	4.1686	0.0287	0.69%	0.0155	0.0059	38.06%	0.0186	0.0102	54.84%
mt-285	131	12.622	0.0287	0.23%	0.7844	0.0059	0.75%	0.0280	0.0102	36.43%
mt-286	132	0.0612	0.0519	84.80%	0.0225	0.0117	52.00%	0.0159	0.0109	68.55%
mt-287	133	0.0187	0.0519	277.54%	0.0124	0.0117	94.35%	0.0093	0.0109	117.20%
mt-288	134	0.0207	0.0519	250.72%	0.0138	0.0117	84.78%	0.0137	0.0109	79.56%
mt-289	135	0.0766	0.0519	67.75%	0.0144	0.0117	81.25%	0.0234	0.0109	46.58%
mt-290	136	0.0530	0.0603	113.77%	0.0117	0.0183	156.41%	0.0329	0.0078	23.71%
mt-291	137	0.0159	0.0603	379.25%	0.0057	0.0183	321.05%	0.0086	0.0078	90.70%
mt-292	138	0.0133	0.0603	453.38%	0.0044	0.0183	415.91%	0.0082	0.0078	95.12%
mt-293	139	1.6442	0.0603	3.67%	0.2223	0.0183	8.23%	0.1638	0.0078	4.76%
mt-295	140	87.2847	0.0235	0.03%	0.1143	0.0077	6.74%	0.0577	0.0110	19.06%
mt-296	141	0.4214	0.0478	11.34%	0.0124	0.0162	130.65%	0.0077	0.0163	211.69%
mt-297	142	0.0132	0.0478	362.12%	0.0129	0.0162	125.58%	0.0168	0.0163	97.02%

10

20

30

40

記号	配列 番号	ゲルカゴン受容体			GLP-1 受容体			GIP 受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-298	101	1.7571	0.0638	3.63%	0.0087	0.0157	180.46%	0.0051	0.0206	403.92%
mt-299	143	0.0260	0.0638	245.38%	0.0087	0.0157	180.46%	0.0439	0.0206	46.92%
mt-306	144	1.4950	0.0478	3.20%	0.0201	0.0162	80.60%	0.0064	0.0163	254.69%
mt-307	145	0.2878	0.0478	16.61%	0.0143	0.0162	113.29%	0.0127	0.0163	128.35%
mt-308	146	12.1920	0.0478	0.39%	0.0237	0.0162	68.35%	0.0057	0.0163	285.96%
mt-309	102	3.6109	0.0638	1.77%	0.0104	0.0157	150.96%	0.0091	0.0206	226.37%
mt-310	103	0.7747	0.0638	8.24%	0.0062	0.0157	253.23%	0.0075	0.0206	274.67%
mt-311	100	197.2482	0.0638	0.03%	0.2174	0.0157	7.22%	0.0545	0.0206	37.80%
mt-323	148	0.2169	0.0846	39.00%	0.0571	0.0203	35.55%	0.0084	0.0103	122.62%
mt-324	149	1.2332	0.0791	6.41%	0.2303	0.0223	9.68%	0.0387	0.0117	30.23%
mt-325	150	0.0915	0.0791	86.45%	2.6828	0.0223	0.83%	0.0105	0.0117	111.43%
mt-331	153	408.0393	0.0846	0.02%	0.4484	0.0203	4.53%	0.0968	0.0103	10.64%
mt-333	154	0.6905	0.0193	2.80%	0.0028	0.0024	85.71%	0.0034	0.0077	226.47%
mt-334	155	7.0725	0.0193	0.27%	0.0034	0.0024	70.59%	0.0041	0.0077	187.80%
mt-335	156	1.5956	0.0193	1.21%	0.0018	0.0024	133.33%	0.0047	0.0077	163.83%
mt-336	157	1561.65	0.0193	0.00%	0.0334	0.0024	7.19%	0.0395	0.0077	19.49%
mt-337	158	106.3826	0.0248	0.02%	0.0082	0.0061	74.39%	0.0080	0.0092	115.00%
mt-338	159	295.3407	0.0248	0.01%	0.2256	0.0061	2.70%	0.0234	0.0092	39.32%
mt-339	160	8.7218	0.0248	0.28%	0.0092	0.0061	66.30%	0.0040	0.0092	230.00%
mt-340	161	10.4694	0.0248	0.24%	0.0061	0.0061	100.00%	0.0028	0.0092	328.57%
mt-341	162	499.2008	0.0276	0.01%	0.0636	0.0093	14.62%	0.0566	0.0155	27.39%

10

20

30

40

記号	配列 番号	グルカゴン受容体			GLP-1受容体			GIP受容体		
		EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-343	163	41.0674	0.0276	0.07%	0.0224	0.0093	41.52%	0.0243	0.0155	63.79%
mt-344	164	159.2771	0.0276	0.02%	0.0890	0.0093	10.45%	0.0319	0.0155	48.59%
mt-345	165	0.0183	0.0353	192.90%	0.0036	0.0055	152.78%	0.0541	0.0027	4.99%
mt-353	166	12.5069	0.0210	0.17%	0.0049	0.0063	128.57%	0.0035	0.0036	102.86%

【 0 3 7 0 】

表3に示されているように、直鎖ペプチドは、G I P受容体に対して活性であり、多くの場合において、ペプチドは、グルカゴン受容体および/またはG L P - 1受容体に対しても活性であった。さらに具体的には、m t - 2 5 2、m t - 2 5 5、m t - 2 5 7、m t - 2 6 0、m t - 2 6 1、m t - 2 6 2、m t - 2 6 5、m t - 2 6 6、m t - 2 6 7、m t - 2 7 5、m t - 2 7 6、m t - 2 7 7、m t - 2 7 8、m t - 2 7 9、m t - 2 8 0、m t - 2 8 6、m t - 2 8 7、m t - 2 8 8、m t - 2 8 9、m t - 2 9 0、m t - 2 9 1、m t - 2 9 2、m t - 2 9 3、m t - 2 9 5、m t - 2 9 6、m t - 2 9 7、m t - 2 9 9、m t - 3 0 6、m t - 3 0 7、m t - 3 1 0、m t - 3 2 3、m t - 3 2 4およびm t - 3 4 5は、全て、G I P、G L P - 1およびグルカゴン受容体に対して活

10

20

30

40

50

性を示し、一方、表3の他のペプチドは、G I PおよびG L P - 1受容体に対して活性を示した（G I P受容体のみに対して活性を示したm t - 2 8 5、ならびにグルカゴンおよびG I P受容体に対して活性を示したがG L P - 1受容体に対しては示さなかったm t - 3 2 5を除く）。

【0371】

C末端延長部を含むm t - 2 5 2のデータを、m t - 2 5 7、m t - 2 5 8およびm t - 2 5 9（これらのペプチドはC末端延長部を含まない）のデータと比較すると、C末端延長部はグルカゴン、G L P - 1およびG I P受容体の全てに対する活性を増強したことが明らかであった。

【0372】

位置16にL y sを含むm t - 2 5 2のデータをm t - 2 7 5およびm t - 2 7 6（これらのペプチドは位置16にそれぞれO r nおよびD a b残基を含む）のデータと比較すると、L y sをL y s様残基に代えることができることが明らかであった。

【0373】

更に、位置3にG l nを含むm t - 2 5 2のデータをm t - 2 5 6およびm t - 2 7 4（これらのペプチドは位置3のG l uを含む）のデータと比較すると、G l u残基による位置3のG l nの置換は、グルカゴン受容体と比べたG L P - 1およびG I P受容体への選択性が達成されることが明らかとなった。

【0374】

C 1 4、C 1 6およびC 1 8脂肪酸によるアシル化の効果は、m t - 2 6 3に対するm t - 2 6 0およびm t - 2 7 2に対するm t - 2 6 5のデータから明らかであった。これらのデータから、C 1 6およびC 1 8脂肪酸によるアシル化は、G L P - 1およびG I P受容体に対する増加した活性をもたらすことが明らかであった。これらのペプチドのアシル化は、さらに、ペプチドがG l n 3 G l u置換を含んでいても、グルカゴン受容体に対する増加した活性を可能にした。グルカゴン受容体に対する増加した活性は、m t - 2 8 0対するトリアゴニストm t - 2 7 7のデータからも分かった。

【0375】

<実施例26>

ペグ化環状ラクタム含有ペプチドm t - 1 7 8（配列番号75）およびペグ化直鎖ラクタム欠失ペプチドm t - 2 7 4（配列番号99）のインビボ活性を、D I Oマウスで試験し、配列番号179のG L P - 1に基づいた構造を有する純粋なG L P - 1アゴニスト対照のインビボ活性と比較した。ペプチドまたはビヒクル対照を、0日目に1、3または10 n m o l / k g / 週でマウスに腹腔内注射した。

【0376】

ペプチドのうちの1つまたはビヒクル対照の注射の1時間後、マウスに25%（w / v）グルコース食塩水を腹腔内注射することによって、1時間グルコース負荷試験（G T T）をマウスに実施した。グルコース食塩水を、マウスの体重1 k g当たり1.5 gの用量でマウスに投与した。血中グルコースレベルを、ペプチドまたはビヒクル対照の注射時（- 60分）、グルコース食塩水の注射時（0分）またはグルコース食塩水の注射の15、30、60若しくは120分後に、測定した。1時間G T Tの結果を図7に示す。

【0377】

グルコース食塩水を、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の24時間後に投与したこと以外は、1時間G T Tと同様の方法で、24時間G T Tもマウスにおいて実施した。24時間G T Tの結果を図8に示す。

【0378】

各マウスの総血中グルコースレベルを、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の0および7日後に測定し、図9に示す。

【0379】

更に、各マウスの体重を、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の0、1、3、5および7日後に測定した。マウスの体重の変化%を図10に示す。

10

20

30

40

50

【0380】

図10に示されているように、mt-178およびmt-274を3または10nmol/kg/週の用量で注射したマウスは、GLPアゴニスト対照ペプチドを(10nmol/kg/週の用量で)注射したマウスと同じまたはそれ以上の程度で、減量した。

【0381】

図7および8に示されているように、mt-178、mt-274またはGLP-1アゴニスト対照を注射したマウスは、ビヒクル対照を注射したマウスと比較して、血中グルコースレベルの減少を示した。3nmol/kg/週のmt-178およびmt-274が10nmol/kg/週の用量のGLP-1アゴニスト対照ペプチドと同じ効果を達成したので、mt-178およびmt-274の効力はGLP-1アゴニスト対照ペプチドよりも大きいと思われた。1nmol/kg/週のmt-274が、10nmol/kg/週のGLP-1アゴニスト対照ペプチドと同様の結果を達成したので、このペプチドは最高の効力を有すると思われた。

10

【0382】

<実施例27>

より高い用量(10または35nmol/kg/週)のペプチドをマウスに皮下注射したこと以外は、実施例26に記載されたものと同様にして、同じペプチドをマウスにおいて試験した。以下の2つの追加的なペプチドも、これらの用量で試験した：第1のペプチドは、mt-179と同じ構造を有するが、mt-178において見出されるようなマイケル付加を介してマレイミドPEGにより形成される伝統的なチオエーテル結合を介してではなく、求核置換により形成されるより安定したチオエーテル結合(-SCH₂CO-)を介して位置40のCysに結合している、PEG基を含み、第2ペプチドは、mt-274と同じ構造を有するが、求核置換により形成されるチオエーテル結合(-SCH₂CO-)を介して位置40のCysに結合しているPEG基を含む。これらのペプチドは、本明細書において、それぞれmt-178(TE)およびmt-274(TE)と呼ばれる。

20

【0383】

マウスの総血中グルコースレベルを、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の0および7日後に測定し、図11に示す。マウスの血中グルコースレベルの総変化を、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の7日後に測定し、図12に示す。

30

【0384】

各マウスの体重を、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の0、1、3、5、7および10後に測定した。マウスの体重の変化%を時間の関数として図13に示し、一方、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の7日後に測定した、マウスの体重の総変化を図14に示す。

【0385】

図12に示されているように、試験ペプチドのいずれかを注射した全てのマウスにおいて、血中グルコースの総変化は、ビヒクル対照を注射したマウスと比較して減少した。血中グルコースの最も劇的な変化は、35nmol/kg/週のmt-274またはmt-178(TE)を注射したマウスにおいて見られた。

40

【0386】

図14に示されているように、試験ペプチドのいずれかを注射した全てのマウスにおいて、体重の総変化は、ビヒクル対照を注射したマウスと比較して減少した。血中グルコースの総変化と同様に、体重の最も劇的な変化は、35nmol/kg/週のmt-274またはmt-178(TE)を注射したマウスにおいて観察された。

【0387】

<実施例28>

実施例26に記載されたペプチドのインビボ活性を、アシル化型の直鎖mt-274ペプチドのインビボ活性と比較した。さらに具体的には、C末端アミノ酸(Lys残基)がC16脂肪アシル基、C14脂肪アシル基またはC18脂肪アシル基に共有結合している

50

3つのアシル化型のmt-274を作製し、試験した。これらのペプチドは、本明細書において、それぞれmt-298、mt-309およびmt-310と呼ばれる。母体ペプチドと同様に、アシル化ペプチドmt-274も、40kDa PEG基を含んだ。しかし、アシル化ペプチドのPEG基は、ペプチドの位置24のCys残基の側鎖に共有結合していた。アシル化ペプチドmt-298、mt-309およびmt-310のアミノ酸配列は、本明細書において、それぞれ配列番号101～103として提供される。

【0388】

非アシル化型のmt-298、mt-209およびmt-310（以下mt-311と呼ぶ）を作製し、試験した。ペプチドmt-311は、mt-311が位置24のCys残基（mt-274において見出されるようなC末端のCysと対照的に）の側鎖を介してPEGに共有結合している点、およびmt-311のC末端残基が、mt-274において見出されるようなCys残基ではなく、Lys残基である点において、mt-274と異なっていた。

【0389】

ペプチドまたはビヒクル対照を、0日目に10nmol/kgでDIOマウスに1週間皮下注射した。

【0390】

マウスの血中グルコースレベルを、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の0および7日後に測定し、図15に示す。各マウスの体重を、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の0、1、3、5および7日後に測定した。マウスの体重の変化%を時間の関数として図16に示し、一方、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の7日後に測定したマウスの体重の総変化を図17に示す。

【0391】

図17に示されているように、ペプチドのいずれかを注射したマウスは、ビヒクル対照を注射したマウスと比較して、体重の減少を示した。ペグ化環状ラムタム含有ペプチド（mt-178）を注射したマウスは、注射の7日後に最大の体重減少を示した。

【0392】

図15に示されているように、mt-178、mt-274、mt-311、またはそれらのC14若しくはC16アシル化型、を注射したマウスの血中グルコースレベルは、減少した。C18脂肪アシル基によるアシル化は、血中グルコースレベルに変化を起こさないように思われ、アシル基の大きさは、ペプチドのグルコース低下効果にとって重要でありうることを示唆した。

【0393】

<実施例29>

アシル化されているがペグ化されていない直鎖グルカゴンに基づいたラクタム欠失ペプチドを、実質的に上記に記載されたように作製した。具体的には、C末端アミノ酸（配列番号104）にC14脂肪アシル基を含むmt-260、C末端アミノ酸（配列番号105）にC16脂肪アシル基を含むmt-261、およびC末端アミノ酸（配列番号106）にC18脂肪アシル基を含むmt-262を作製した。これらのペプチドのそれぞれの構造は、mt-298、mt-309およびmt-310と同様であったが、mt-260、mt-261およびmt-262が位置24においてペグ化Cys残基の代わりにAsn残基を含む点において異なっていた。

【0394】

ペプチドmt-260、mt-261若しくはmt-262、対照ペプチド（リラグルチド、アシル化GLP-1類縁体）またはビヒクル対照を、25または125nmol/kgの用量で7日間マウスに毎日一度ずつ（QD）注射した。

【0395】

マウスの血中グルコースレベルを、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の0および7日後に測定し、図18に示す。各マウスの体重を、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の0、1、3、5および7日後に測定した。マウスの体重の変化%を時間の関数として図19

に示し、一方、ペプチドまたはビヒクル対照の注射の7日後に測定したマウスの体重の総変化を図20に示す。

【0396】

図18に示されているように、アシル化非ペグ化直鎖ペプチド(m t - 260、m t - 261およびm t - 262)が血中グルコースレベルに対して有した効果は劇的なものであった。25nmol/kgでは、これらのペプチドは、血中グルコースレベルの約50%の減少を引き起こし、より高い用量では、血中グルコースレベルの50%を超える減少を引き起こした。

【0397】

図19に示されているように、アシル化非ペグ化直鎖ペプチドのそれぞれは(低または高用量のいずれでも)、低用量のリラグルチドにより引き起こされる体重の減少よりも強力に、体重の低下を引き起こした。体重は、7日間のアッセイの期間にわたって減少し続けた。

【0398】

これらの結果は、GIPおよびGLP-1受容体に対して活性であるアシル化非ペグ化直鎖グルカゴンに基づいたペプチドが、血中グルコースレベルおよび体重を劇的に減少させ得ることを示唆しており、それにより、これらのペプチドを、糖尿病を含む代謝障害の治療および肥満の治療に使用できることを示している。

【0399】

<実施例30>

直鎖グルカゴンに基づいたペプチドm t - 261(配列番号105)を、異なる用量でDIOマウス(1群当たりN=8匹;平均初期体重=48g)において試験した。マウスには、ビヒクルのみ、リラグルチド(30nmol/kg体重)またはm t - 261(0.3、1、3、10若しくは30nmol/kg体重)を毎日一度ずつ1週間注射した。

【0400】

マウスの体重を、最初の注射の0、1、3、5および7日後に測定した。図21に示されているように、m t - 261またはリラグルチドの注射は、マウスに減量を引き起こした。3nmol/kgのm t - 261が、30nmol/kgのリラグルチドと実質的に同じ効果を達成したので(図21)、ペプチドm t - 261は、リラグルチドよりも高い効力を示した。

【0401】

マウスの脂肪量を、最初の注射の7日後に、核磁気共鳴画像法により測定した。図22に示されているように、m t - 261の増加用量は、一般に脂肪量の減少と相関した。3nmol/kgのm t - 261を注射したマウスの脂肪量は、30nmol/kgのリラグルチドを注射したマウスの脂肪量とほぼ同じであり、リラグルチドと比較して、m t - 261の高い効力が実証された。

【0402】

マウスの血中グルコースレベルを、最初の注射の0および7日後に測定した。図23に示されているように、3nmol/kgの低い用量のm t - 261は、血中グルコースレベルに有意な減少を引き起こした。脂肪量および体重アッセイの結果と一致して、3nmol/kgのm t - 261を注射したマウスの血中グルコースレベルの減少は、30nmol/kgのリラグルチドを注射したマウスの血中グルコースレベルの減少と同様であり、リラグルチドと比較して、m t - 261の高い効力が実証された。

【0403】

別個の実験において、非アシル化型のm t - 261、すなわちm t - 263(配列番号111)を、体重、食物摂取、血中グルコースレベルおよび脂肪量に対するインビボ効果について、9群のC57BI/6マウス(1群当たり8匹のマウス)で試験した。マウスは11か月齢であり、試験時には糖尿病誘発性食餌を9か月間摂っていた。マウスの平均体重は57gであった。マウスには、3、10または30nmol/kgのm t - 263を毎日、1週間皮下注射した。対照群は、ビヒクル対照または10若しくは30nmol

10

20

30

40

50

/ kg / 日のエキセンディン - 4 の投与を受けた。

【 0 4 0 4 】

体重に対するインビボ効果を評価するために、マウスの体重を 0、1、3、5 および 7 日目に測定したが、ここで 0 日目とは注射の初日のことである。図 2 4 に示されているように、3 つの用量のいずれかでの m t - 2 6 3 の注射は、7 日間の試験期間にわたって体重の一定した減少を引き起こした。体重に対する効果も、体重の総変化 (図 2 5 に示されている) が m t - 2 6 3 ペプチドの増加用量によって増加したので、用量依存的であると思われた。図 2 5 に示されているように、m t - 2 6 3 の 3 つの用量のいずれかにより達成された体重の総変化は、エキセンディン - 4 により (いずれの用量でも) 達成された体重の総変化よりも、実質的に大きかった。

10

【 0 4 0 5 】

食物摂取、脂肪量および血中グルコースに対するインビボ効果も決定した。m t - 2 6 3 を注射したマウスの 7 日目に測定した総食物摂取量および脂肪量は、ビヒクル対照およびエキセンディン - 4 と比較して、低減した。更に、m t - 2 6 3 を注射したマウスの (0 日目に測定したレベルと比較して 7 日目に測定した) 血中グルコースレベルの総変化は、ビヒクル対照またはエキセンディン - 4 のいずれかを注射したマウスと比較して、有意に低減した (図 2 6)。ペプチドの 1 0 n m o l / k g の用量は、血中グルコースレベルに最大の減少 (ほぼ - 8 0 m g / d L) を達成したので、最適な用量であると思われた。

【 0 4 0 6 】

ペプチド m t - 2 6 3 の体重、食物摂取および血中グルコースレベルに対するインビボ効果を、m t - 3 4 9 (配列番号 2 6 2)、m t - 2 8 0、m t - 3 5 6 および m t - 3 5 7、ならびにビヒクル対照とも比較した。マウスには、ペプチドのいずれか 1 つを 3 0 n m o l / k g / 日で 1 週間与えた。全てのペプチドは、ビヒクル対照と比較して、マウスの体重を低減するのに有効であった。

20

【 0 4 0 7 】

< 実施例 3 1 >

直鎖アシル化グルカゴンに基づいたペプチド m t - 2 7 7、m t - 2 7 8 および m t - 2 7 9 のインビボ効果を試験し、リラグルチドと比較した。D I O マウス (1 群当たり 8 匹のマウス ; 平均初期体重 = 5 1 . 4 g) には、ビヒクル対照、または 1 0 n m o l / k g のリラグルチド、m t - 2 7 7、m t - 2 7 8 若しくは m t - 2 7 9 を毎日、1 週間皮下注射した。

30

【 0 4 0 8 】

マウスの体重を、最初の注射の 0、1、3、5 および 7 日後に測定した。図 2 7 に示されているように、m t - 2 7 7、m t - 2 7 8 または m t - 2 7 9 の注射は、マウスに有意な減量を引き起こした。更にこれらのペプチドは、全て、リラグルチドよりも高い効力を示した。

【 0 4 0 9 】

マウスの血中グルコースレベルを、最初の注射の 0 および 7 日後に測定した。図 2 8 に示されているように、m t - 2 7 7、m t - 2 7 8 および m t - 2 7 9 は、それぞれ、血中グルコースレベルに有意な減少を引き起こし、その減少は、リラグルチドを注射したマウスにおいて見られるものよりもかなり大きかった。

40

【 0 4 1 0 】

< 実施例 3 2 >

G L P - 1 受容体活性のグルカゴンに基づいた類縁体を修飾して、配列番号 9 5 のアミノ酸配列の C 末端延長部を含ませ、更に修飾して、配列番号 9 5 の C 末端に L y s を含ませた。類縁体の位置 4 0 に配置した L y s 残基を、C 1 4 脂肪アシル基でアシル化した。このアシル化類縁体を、グルカゴン、G L P - 1 および G I P 受容体に対するインビトロ活性について、実質的に実施例 1 6 に記載されたように試験した。そのインビトロ活性は、母体である、C 末端延長部を欠き、位置 4 0 でアシル化されている、G L P - 1 受容体活性のグルカゴンに基づいた類縁体のインビトロ活性と比較した。C 末端延長アシル化類

50

縁体は、G I P 受容体に対する活性のおよそ 15 % の増加を示し、グルカゴン受容体に対する活性のおよそ 52 % の増加を示した。G L P - 1 受容体に対する活性は、C 末端延長アシル化類縁体により刺激されると、実際に減少した。しかし、活性は、依然として、G L P - 1 受容体に対する天然 G L P - 1 により達成される活性の 100 % 超であった。

【0411】

< 実施例 33 >

アシル化グルカゴン類縁体ペプチド（それぞれ、C 末端カルボキシレートの代わりにアミドを含む）を実質的に上記に記載されたように合成した。ペプチド m t - 358、m t - 367、m t - 368 および m t - 369 は、アシル化単量体であり、一方、m t - 354、m t - 376 および m t - 377 は、アシル化二量体であり、ここで二量体は、それぞれ、C 末端 C y s 残基を介して結合する 2 つの単量体を含んだ。ペプチド m t - 367、m t - 368 および m t - 369 は、アシル基を結合する目的で G l u - G l u ジペプチドスペーサーを含み、一方、m t - 358 はスペーサーの不在下でアシル化された。ペプチド m t - 225、m t - 227 および m t - 294 は、位置 16 のグルタミン酸と位置 20 のリシンの間にラクタム架橋を含む、ペグ化単量体であった。ペプチド m t - 225 および m t - 227 は、P E G を結合する目的で、ジペプチドスペーサーを含み、一方、m t - 294 は、ハロアセチルとの反応により作製されるチオエーテルを介してアシル化された。ペプチド m t - 356 および m t - 357 は、非アシル化対照ペプチドとして機能し、m t - 357 は位置 7 に I l e を含んだが、m t 356 は T h r を含んだ。全てについて、G I P 受容体、G L P - 1 受容体およびグルカゴン受容体に対するインピトロ活性を、実質的に実施例 16 に記載されたように試験した。それぞれのペプチドの天然ホルモンに関する E C 50 (n M) および活性を表 4 に示す。

【0412】

10

20

【表 4】

表 4

記号	アシル基 (スペーサー) の位置	配列 番号	グルカゴン受容体			GLP-1 受容体			GIP 受容体		
			EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-356	非該当	232	0.0869	0.1095	126.06%	0.0048	0.0108	224.02%	0.0530	0.0136	25.66%
mt-357	非該当	233	0.0420	0.1095	260.92%	1.2518	0.0108	0.86%	0.0066	0.0136	206.37%
アシル化単量体構造											
mt-358	40 (none)	234	0.0087	0.1095	1266.00%	0.0830	0.0108	13.04%	0.0045	0.0136	305.62%
mt-368	40 (γEγE)	236	0.0069	0.0337	491.82%	0.0038	0.0157	418.93%	0.00097	0.0029	296.07%
mt-367	40 (γEγE)	235	0.8201	0.0337	4.11%	0.0039	0.0157	405.94%	0.0014	0.0029	202.82%
mt-369	10 (γEγE)	237	2.1893	0.0337	1.54%	0.0041	0.0157	385.05%	0.0014	0.0029	204.26%
アシル化二量体構造											
mt-354*	40 [†] (none)	231	2.6078	0.0378	1.45%	0.0088	0.0120	136.99%	0.0046	0.0042	91.65%
mt-376**	40 [†] (none)	238	13.4644	0.0772	0.57%	0.0106	0.0134	126.82%	0.0068	0.0042	62.63%
mt-377**	40 [†] (none)	239	3.9038	0.0772	1.98%	0.0076	0.0134	177.88%	0.0031	0.0042	138.11%
ペグ化・ラクタム化構造											
mt-225	none	259	2.712	0.054	1.99%	0.098	0.029	29.59%	1.899	0.017	0.90%

10

20

30

40

記号	アシル基 (スぺーサ) の位置	配列 番号	ゲルカゴン受容体			GLP-1 受容体			GIP 受容体		
			EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性	EC ₅₀ , nM	Std.	相対活性
mt-227	なし	260	4.244	0.054	1.27%	0.080	0.029	36.25%	1.320	0.017	1.29%
mt-294	なし	261	229.996	0.0235	0.01%	0.0608	0.0077	12.66%	0.3727	0.0110	2.95%

* ~ ジスルフィド架橋構造を表し、ここで各ペプチド単量体は構造Aに示されているようにジスルフィド結合を介して結合している
* ~ PEG結合二量体構造を表し、ここで各ペプチド単量体は構造BのようにPEGを介して結合している
+ ~ 二量体の各単量体は位置40にアシル化を含む(ここで位置1はN末端アミノ酸)

【 0 4 1 3 】

10

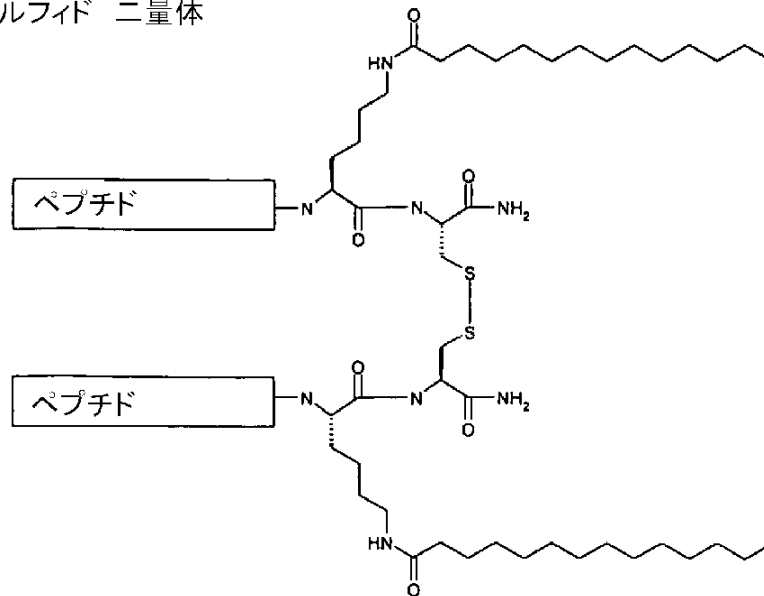
20

30

40

【化 17】

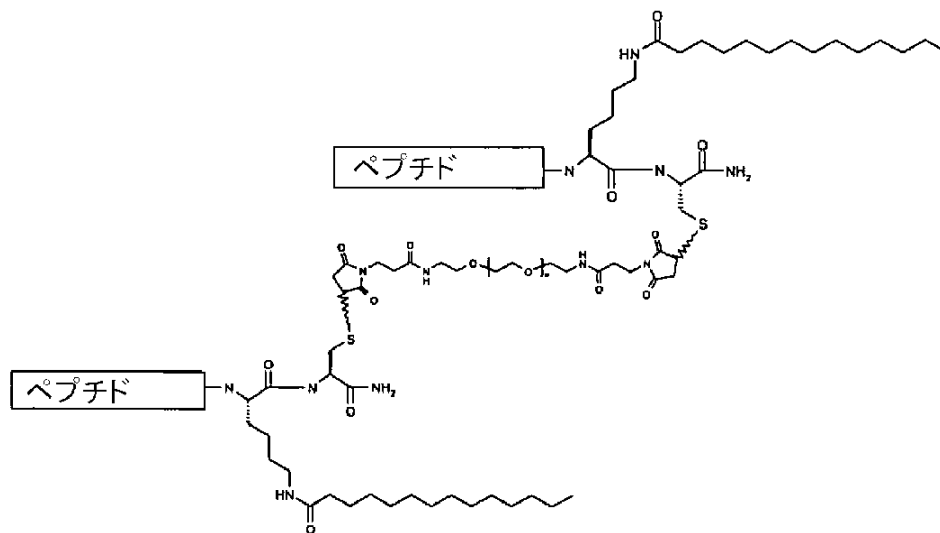
ジスルフィド 二量体



10

構造A

20



30

構造B

【0414】

表4に示されているように、3つのアシル化二量体は、全て、GLP-1およびGIP受容体に対して強力な活性を示した。また、mt-369により示されたGLP-1受容体に対する活性は、mt-358により示されたものと比較して劇的に増強され、mt-368のGIP受容体に対する活性は、mg-358と比較して実質的に維持されており、このことは、スペーサーを介したグルカゴンペプチドのアシル化が、GLP-1受容体に対する活性を増加し、同時にGIP受容体に対する強い活性を維持できることを示唆した。グルカゴン類縁体の位置10のスペーサーを介したアシル化は、GLP-1およびGIP受容体に対する相対的活性がmt-367およびmt-369とほぼ同じだったので、グルカゴン類縁体の位置40と同じほど良好な位置であると思われる。

40

【0415】

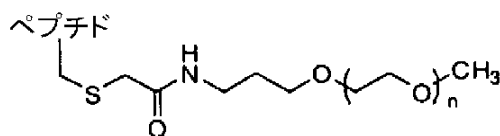
<実施例34>

同じアミノ酸配列を有するが、ペグ化リンカーが異なる、以下の2つのアシル化グルカ

50

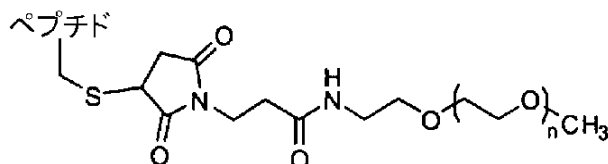
ゴン類縁体ペプチドを、実質的に本明細書に記載されたように作製した：m t - 3 3 1 (配列番号 1 5 3) は、下記構造：

【化 1 8】



の P E G への結合を含み、一方、m t - 3 3 1 (配列番号 1 0 0) は、下記構造：

【化 1 9】



の P E G への結合を含んだ。

【0 4 1 6】

2つのペプチドまたはビヒクル対照を、複数群のD I Oマウス(1群当たり6匹のマウス；平均体重 = 64.6 g)に毎週一度ずつ1週間の皮下注射により投与した。ペプチドを10または35 nmol/kgのいずれかの用量で投与した。

【0 4 1 7】

マウスの体重を、ペプチドまたはビヒクル対照の投与の0、1、3、5および7日後に測定した。高用量のm t - 3 1 1またはm t - 3 3 1のいずれかを注射したマウスの体重は、1週間にわたって一定に減少した。体重の総変化(%)を図29に示す。この図に示されているように、体重の総変化は、m t - 3 1 1を注射したマウスにおいて最大であった。

【0 4 1 8】

マウスの各群による総食物摂取量も、ペプチドまたはビヒクル対照の投与の0、1、3、5および7日後に測定した。図30に示されているように、m t - 3 1 1またはm t - 3 3 1の用量のいずれかを注射したマウスの群による総食物摂取量は、ビヒクル対照を注射したマウスと比較して減少した。

【0 4 1 9】

マウスの各群の血中グルコースレベルを、ペプチドまたはビヒクル対照の投与の0および7日後に測定した。マウスの血中グルコースレベルは、高用量のm t - 3 1 1またはm t - 3 3 1のいずれかを投与すると減少した。図31に示されているように、血中グルコースレベルの減少は、35 nmol/kgのm t - 3 3 1を注射したマウスにおいて最大であった。

【0 4 2 0】

マウスの各群の脂肪量を測定した。しかし、ペプチドの投与は、脂肪量に対して効果を有するとは思われなかった。

【0 4 2 1】

<実施例 3 5>

アミノ酸配列が同じであるが、位置40のL y sに結合しているアシル基が不在である(m t - 3 3 1 (配列番号 1 5 3))またはC 1 4脂肪アシル基が存在する(m t - 3 5 3 (配列番号 1 6 6))ことにより異なる、これら2つのペプチドの、体重、食物摂取、血中グルコースレベルおよび脂肪量に対するインビボ効果を、7か月齢のC 5 7 B I / 6マウスにおいて試験した。マウスは糖尿病誘発性食餌を5か月摂り、平均初期体重は53 gであった。ペプチドまたはビヒクル対照を、0.1、0.3、3または10 nmol/kgの用量で1週間皮下注射することによってマウスに投与した。

【0 4 2 2】

体重を、ペプチドまたはビヒクル対照の投与の0、1、3、5および7日後に測定した

10

20

30

40

50

。図32に示されているように、体重の総変化は、mt-331またはmt-353のいずれかの10nmol/kgを注射したマウスにおいて最も有意であった。

【0423】

マウスによる食物摂取を、ペプチドまたはビヒクル対照の投与の0、1、3、5および7日後に測定した。図33に示されているように、mt-331またはmt-353のいずれかの3または10nmol/kgを注射したマウスによる総食物摂取量は、ビヒクル対照を投与したマウスと比較して減少した。

【0424】

マウスの血中グルコースレベルをモニターした。図34に示されているように、mt-331は、血中グルコースレベルに用量依存的に減少を引き起こした。2つの用量のmt-353も、血中グルコースレベルに減少を引き起こした。脂肪量レベルは、いずれのペプチドの投与によっても有意に影響を受けなかった。

【0425】

<実施例36>

配列番号123、124および125の構造をそれぞれ有する3つのアシル化トリアゴニストペプチドmt-277、mt-278およびmt-279の、体重、血中グルコースレベルおよび食物摂取に対するインビボ効果を、DIOマウスの8群（1群当たり8匹のマウス）において試験した。ペプチドは、同じアミノ酸構造を有したが、それらが結合している脂肪アシル基の大きさが異なっていた。濃度が10nM/kgのリラグルチドを対照として使用した。ペプチドまたはビヒクル対照を、皮下注射により毎日、1週間投与した。

【0426】

グルカゴン、GLP-1およびGIP受容体に対するインビトロ活性を試験し、天然ホルモンと比べたそれぞれのペプチドの活性%を下記の表5に示す。

【0427】

【表5】

表5

ペプチド	グルカゴン受容体 に対する%活性	GLP-1受容体 に対する%活性	GIP受容体 に対する%活性
リラグルチド	138	0.04	n/a
Mt-277	224	235	446
Mt-278	460	588	846
Mt-279	420	733	527

【0428】

マウスの体重を、ペプチドまたはビヒクル対照の投与の0、1、3、5および7日後に測定した。1週間にわたって、アシル化トリアゴニストペプチドの1つを注射したマウスの体重は、ビヒクル対照と比較して劇的に減少した。図35に示されているように、アシル化トリアゴニストペプチドの1つを注射したマウスの体重の総変化(%)は、およそ-15%であり、一方、リラグルチドは、体重の5%未満の減少しか達成しなかった。

【0429】

<実施例37>

ペグ化アシル化ペプチド(mt-309; 配列番号102)および非ペグ化アシル化ペプチド(mt-261; 配列番号105)の効能に対する、投与頻度の効果を、平均体重の58gを有するDIOマウスマウスの7群（1群当たり8匹のマウス）により試験した。ペプチドは、5nmol/kgの用量を毎日一度ずつ、10nmol/kgの用量を2日毎に、または30nmol/kgの用量を毎週一度ずつ、マウスに皮下注射した。マウスの各群が試験期間の終了までに30nmol/kgを摂取するように、研究を6日間続

けた。体重および血中グルコースレベルを、最初の投与の0および6日後に測定した。

【0430】

図36に示されているように、mt-309を毎週一度ずつ注射したマウスの体重の総変化(%)は、同じペプチドを毎日一度ずつ注射したマウスの体重の総変化とほぼ同じであった。また、図36に示されているように、mt-261を毎日一度ずつ注射したマウスの体重の総変化は、同じペプチドを2日毎に注射したマウスの体重の総変化とほぼ同じであった。

【0431】

体重における同じ傾向が血中グルコースレベルにおいても観察され(図37)、mt-309の毎週一度ずつの注射は、このペプチドの毎日一度ずつの注射と同じ血中グルコースレベルの減少を達成し、mt-261の毎日一度ずつの注射は、このペプチドの2日毎の注射と同じ血中グルコースレベルの減少を達成した。

【0432】

<実施例38>

効能に対する投与頻度の効果を、アシル化グルカゴンアゴニストペプチドmt-261(配列番号105)について、初期体重56gを有するDIOマウスの8群(1群当たり8匹のマウス)に、各群が1週間当たり30nmol/kgの総用量を摂取するように、5nmol/kgを毎日、10nmol/kgを2日毎、15nmol/kgを3日毎、または30nmol/kgを1日、それぞれ皮下注射することにより試験した。マウスは8か月齢であり、糖尿病誘発性食餌を6か月間摂っていた。各群の体重、食物摂取、血中グルコースレベルおよび脂肪量を測定した。図38に示されているように、3日毎にペプチドを注射したマウスは、最大の体重減少を示した。興味深いことに、ペプチドを毎日注射したマウスおよびペプチドを2日毎に注射したマウスは、ほぼ同じ体重減少を示した。

【0433】

<実施例39>

グルカゴン受容体に対してのみ測定可能なアゴニスト活性を有し、GIP受容体に対しては活性を有さず、下記のペプチドJ:

HS-X-GTFTSDYSKYLDTRRAAEFVAWL(Nle)DE(配列番号240)の主鎖、または、

ペプチドK:

HS-X-GTFTSDYSKYLD(Aib)RRAADFVAWLMDE(配列番号241)

の主鎖を含み、位置3に付加的修飾を有する、グルカゴン類縁体ペプチドを、実質的に本明細書に記載されているように、固相ペプチド合成により作製した。ペプチドを、実質的に実施例16に記載されているように、グルカゴン受容体に対するインビトロ活性について試験した。それぞれのペプチドのEC50(nM)を表6に示す。

【0434】

10

20

30

【表 6】

表6

ペプチド主鎖	位置3のアミノ酸	配列番号	グルカゴン受容体 に対する EC ₅₀ (nM)	%活性*
J	Q	242	0.24	25%
J	C(Acm)	243	0.18	33%
J	Dab(Ac)	244	0.31	19%
J	Dap(尿素)	245	0.48	13%
J	Q(Me)	246	0.48	13%
J	M(O)	247	0.91	7%
J	Orn(Ac)	248	0.92	7%
K	Q	249	0.39	15%
K	Dab(Ac)	250	0.07	86%
K	Q(Me)	251	0.11	55%

Q＝グルタミン；C(Acm)＝アセトアミドメチルーシステイン；Dab(Ac)＝アセチルジアミノブタン酸；Dap(尿素)＝カルバモイルジアミノプロパン酸；Q(Me)＝メチルグルタミン；M(O)＝メチオニーンスルホキシド；Orn(Ac)＝アセチルオルニチン。

【0435】

表6に示されているように、複数のアミノ酸は、グルカゴン受容体において活性を実質的に失うことなく位置3のGlnを置換することができ、幾つかの場合、例えばペプチドK主鎖にDab(Ac)やQ(Me)を有する場合は、実際には活性は修飾により増加した。

【0436】

<実施例40>

グルカゴン受容体に対しては検出可能な活性を有するが、GIP受容体に対しては活性を有さず、多様なグルカゴン類縁体主鎖上の位置3にDab(Ac)を含む、グルカゴン類縁体ペプチドを、実質的に本明細書に記載されているように作製し、グルカゴン受容体に対するインビトロ活性を試験した。それぞれのペプチドの構造および活性を表7に示す。

【0437】

【表 7】

表7

アミノ酸配列	配列 番号	グルカゴン 受容体 に対する EC ₅₀ (nM)	%活性*
野生型グルカゴン	1	0.026	100
HSQGTFTSDYSKYLDsRRRAQDFVQWLMDT	252	0.015	173
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRRAADFVAWLLDE	253	0.069	37
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRRAADFVAWLLDTGPSSGAPPPS アミド	254	0.023	113
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRASDFVSWLLDE	255	0.048	54
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRATDFVTWLLDE	256	0.057	46

【 0 4 3 8 】

< 実施例 4 1 >

C末端カルボキシレートに代わってC末端アミドを有するグルカゴンの類縁体を実質的に本明細書に記載されたように作製した。

【 0 4 3 9 】

ペプチドmt - 367、mt - 368およびmt - 369は、それぞれ配列番号235、236および237の構造を含んだ。ペプチドmt - 384は、以下のアミノ酸修飾を有する配列番号1のアミノ酸を含んでいた：位置1にTyr、位置2にAIB、位置10にLys（ここでLysは、-Glu-Gluジペプチドスパーサーを介してC16アシル基に共有結合していた）、位置12にIle、位置16にLys、位置17にGln、位置18にAla、位置20にAIB、位置21にGlu、位置24にAsn、位置27にLeu、位置28にAlaおよび位置29にGly、続いて、位置29のアミノ酸のC末端側に、配列番号95のアミノ酸。ペプチドmt - 385は、位置7のThrがIleに交換されている以外は、ペプチドmt - 384と同じ構造を有した。

【 0 4 4 0 】

類縁体を、グルカゴン、GLP-1およびGIP受容体に対するインビトロ活性について、実質的に本明細書に記載されたように試験した。結果を表8に示す。

【 0 4 4 1 】

【表 8】

表8

ペプチド	下記の受容体に対する%相対活性		
	グルカゴン	GLP-1	GIP
mt-367	4.11	405.94	202.82
mt-368	491.82	418.93	296.07
mt-369	1.54	385.05	204.26
mt-384	227.75	349.21	807.73
mt-385	239.45	3.18	714.88

10

【0442】

8匹のDIOマウスの9群(系統:C57B16 WT)に、表8のペプチドのうちの1つの10nmol/kgを毎日、7日間皮下注射した。マウスの平均初期体重は57.6gであった。マウスは、およそ10か月齢であり、高脂肪食餌を約8か月間摂っていた。

20

【0443】

体重の総変化を7日目に測定した。表8のペプチドを注射したマウスは、全て、ビヒクル対照と比較して、体重の減少を示した。mt-369を注射したマウスが最大量の減量(約25%の減少)を示し、mt-369を注射したマウス(約22%の減少)およびmt-384を注射したマウス(約21%の減少)がその次であった。mt-367またはmt-385を注射したマウスは、低い、依然として有意な減量(mt-367:約18%の減少、およびmt-385:約15%の減少)を示した。

【0444】

本明細書に引用されている、出版物、特許出願、及び特許を含む、全ての参考文献は、まるでそれぞれの参考文献が個別にかつ明確に参照として組み込まれているように示され、その全体が本明細書に記載されているのと同じ程度で、参照として本明細書に組み込まれる。

30

【0445】

本発明を記載する文脈における(特に、後に続く請求項の文脈における)用語「a」及び「an」及び「the」、並びに類似の参照の使用は、本明細書において特に指定がない限り又は文脈において明らかに相反しない限り、単数及び複数の両方を網羅することが考慮されるべきである。用語「含む」、「有する」、「含まれる」、及び「含有する」は、特に示されない限り、非限定的用語である(すなわち、「含まれるが、これらに限定されない」を意味する)と考慮されるべきである。

40

【0446】

本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において特に指定のない限り、単に、範囲内にあるそれぞれ別個の値及びそれぞれの終点を個別に参照するための省略的な方法として機能することが意図され、それぞれの別個の値及び終点は、まるで本明細書において個別に引用されているかのように本明細書に組み込まれる。

【0447】

本明細書に記載されている全ての方法は、本明細書において特に指定のない限り又は文脈において明らかに相反しない限り、任意の適切な順番で実施することができる。本明細書において提供されている任意の又は全ての例又は例示的な言葉(例えば「のような」)は、単に本明細書をより良好に説明することだけが意図され、特に請求項に記載されてい

50

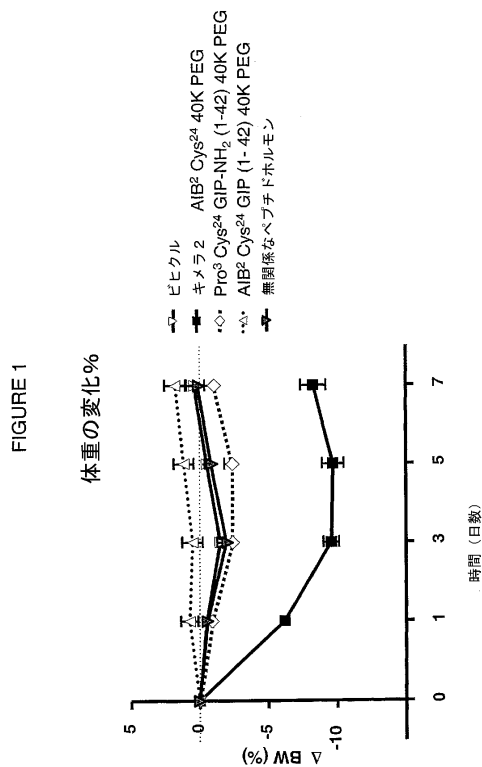
ない限り、本発明の範囲に制限を課すものではない。本明細書における言葉も、請求項に記載されていない何らかの要素が本発明の実施に必須であることを示している、と考慮されるべきではない。

【 0 4 4 8 】

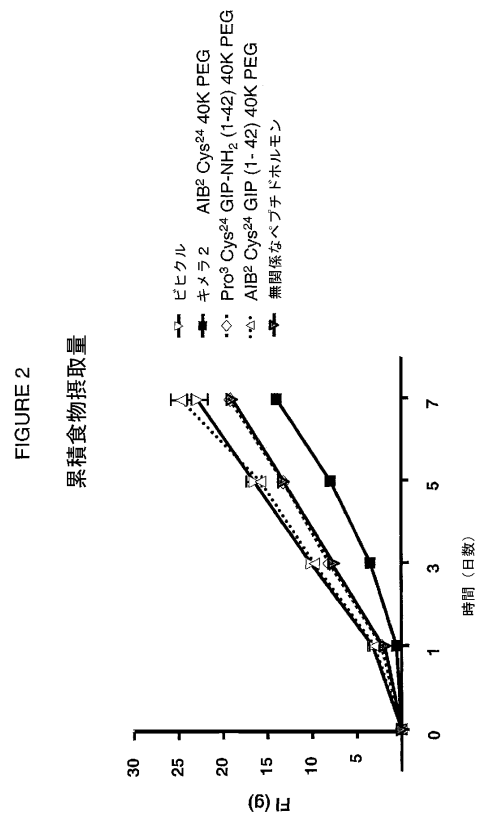
本発明を実施するために、発明者たちが知っている最良の形態を含む、本発明の好ましい実施態様が本明細書に記載されている。これらの好ましい実施態様の変更は、前述の記載を読むことにより当業者に明らかとなりうる。発明者たちは、当業者がそのような変更を適切な場合に用いることを予想し、発明者たちは、発明が本明細書に特定的に記載されている以外の方法で実施されることを意図している。したがって、本発明は、適用法令が許す限り、添付の請求項に引用されている主題の全ての修正及び等価物を含む。更に、全ての可能な変更における上記記載の要素の任意の組み合わせは、本明細書において特に指定のない限り又は文脈において明らかに相反しない限り、本明細書に包含される。

10

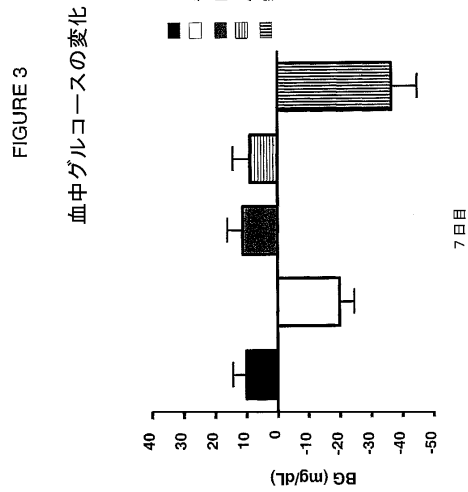
【 図 1 】



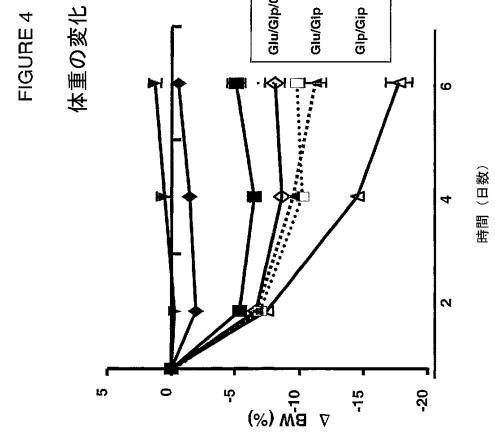
【 図 2 】



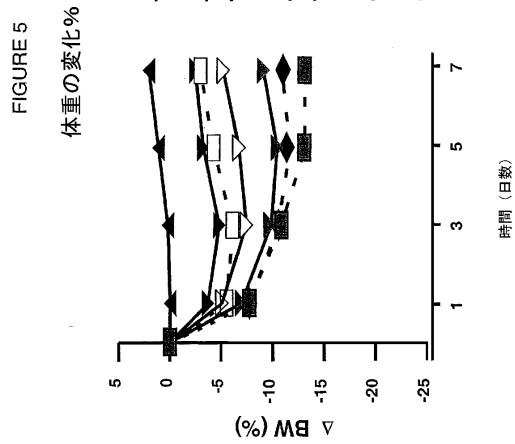
【図 3】



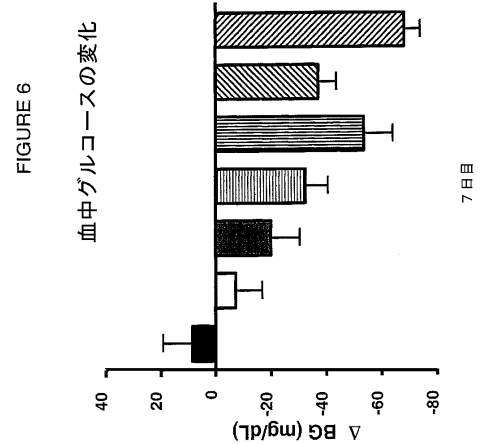
【図 4】



【図 5】



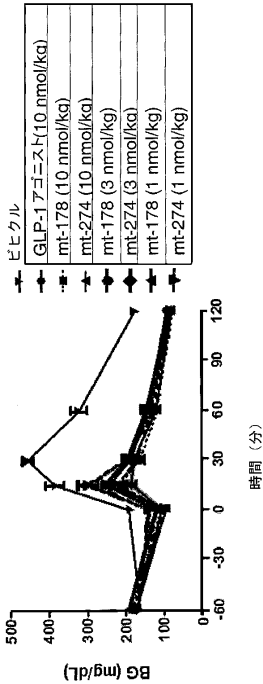
【図 6】



【 図 7 】

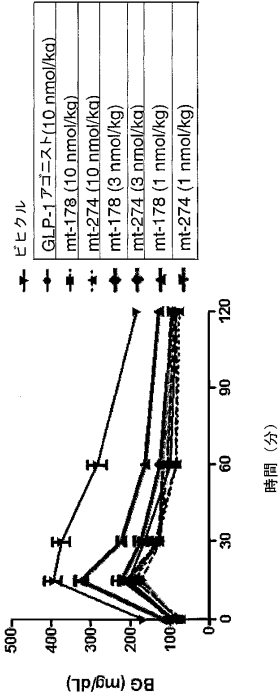
FIGURE 7

1 時間グルコース負荷試験
*マウス 4 匹を除く



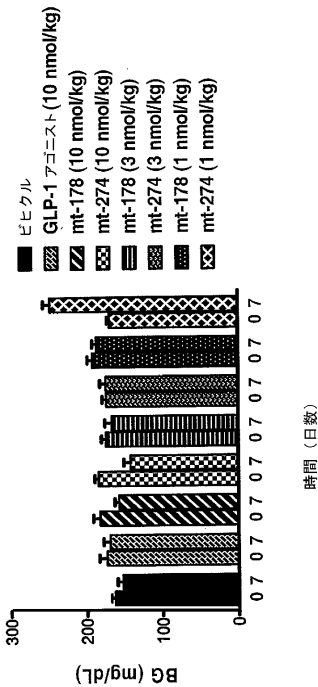
【 図 8 】

FIGURE 8



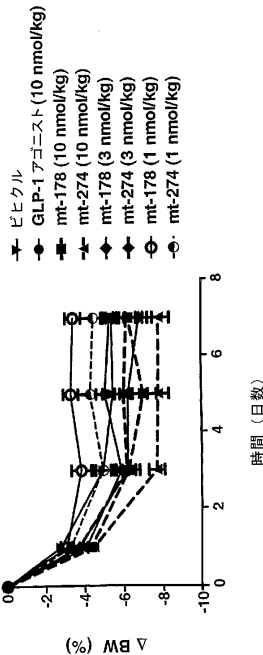
【 図 9 】

FIGURE 9



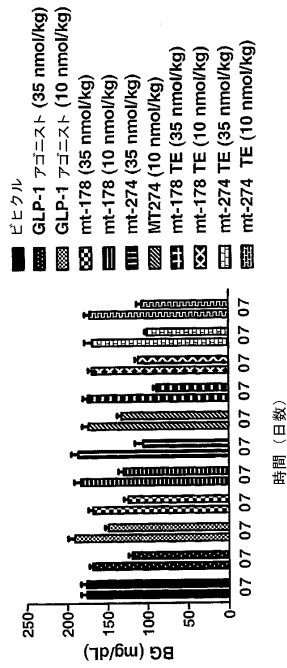
【 図 10 】

FIGURE 10



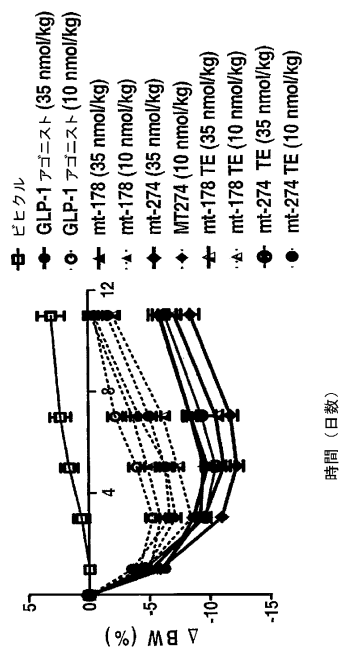
【図 1 1】

FIGURE 11



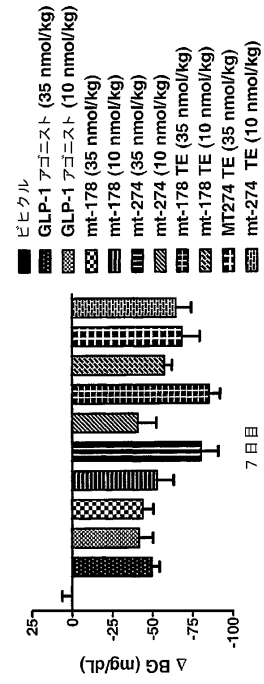
【図 1 3】

FIGURE 13



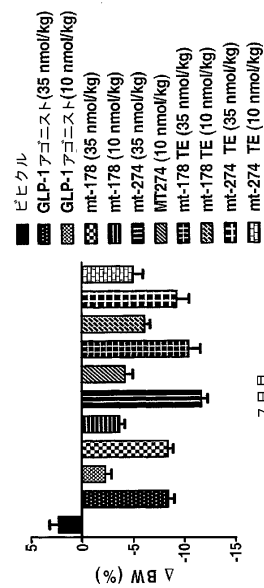
【図 1 2】

FIGURE 12



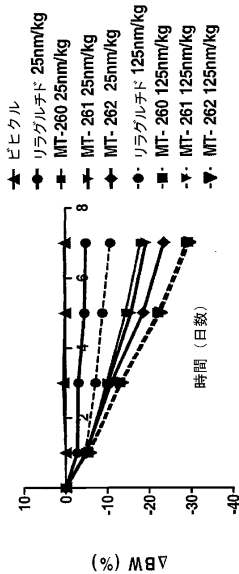
【図 1 4】

FIGURE 14



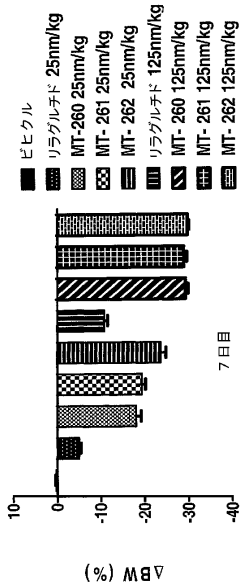
【 図 1 9 】

FIGURE 19



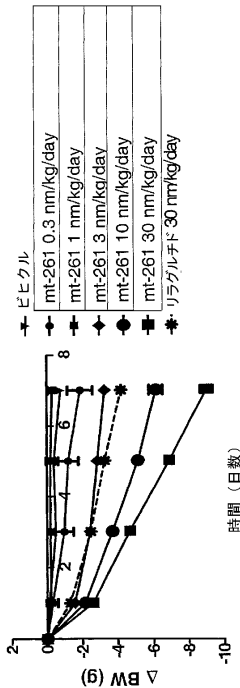
【 図 2 0 】

FIGURE 20



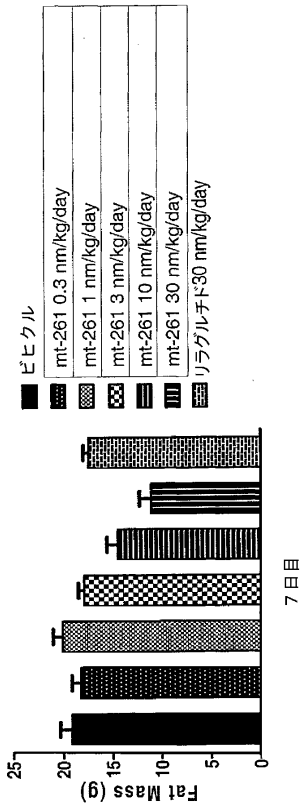
【 図 2 1 】

FIGURE 21



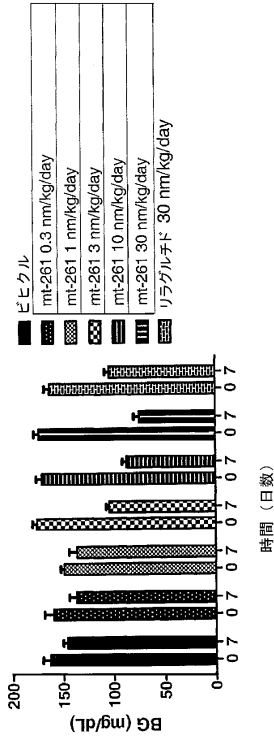
【 図 2 2 】

FIGURE 22



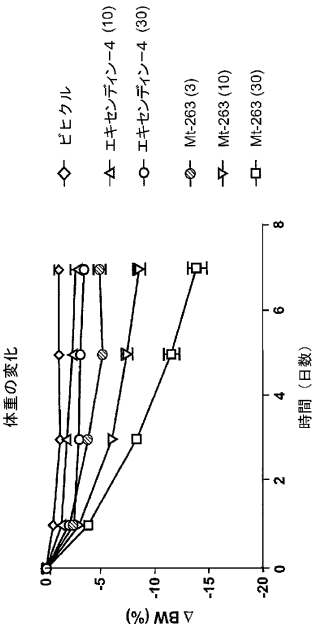
【 図 2 3 】

FIGURE 23



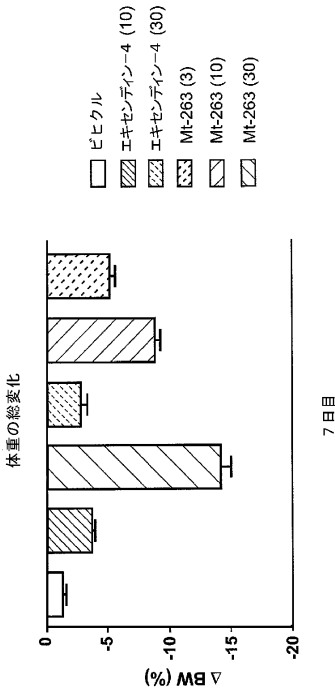
【 図 2 4 】

FIGURE 24



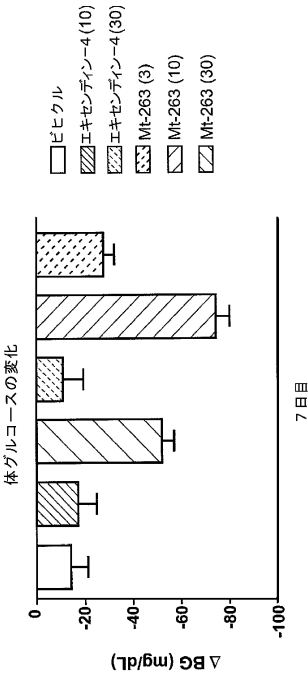
【 図 2 5 】

FIGURE 25



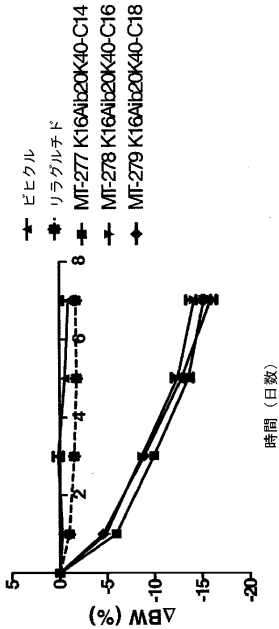
【 図 2 6 】

FIGURE 26



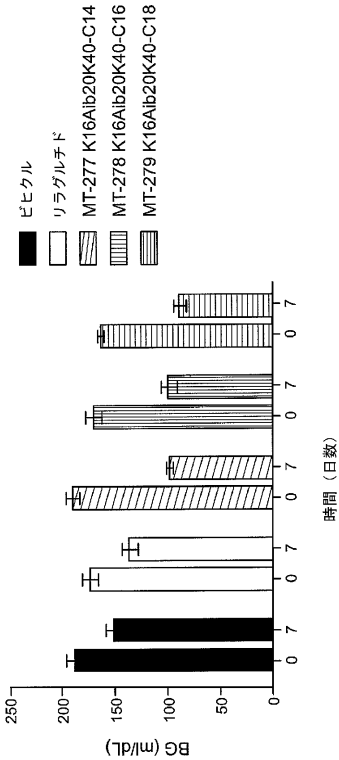
【 図 2 7 】

FIGURE 27



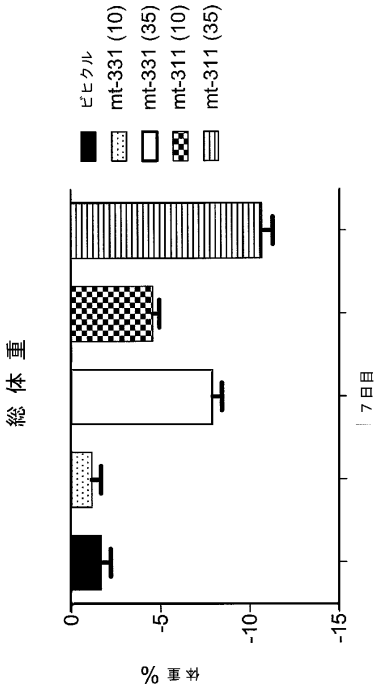
【 図 2 8 】

FIGURE 28



【 図 2 9 】

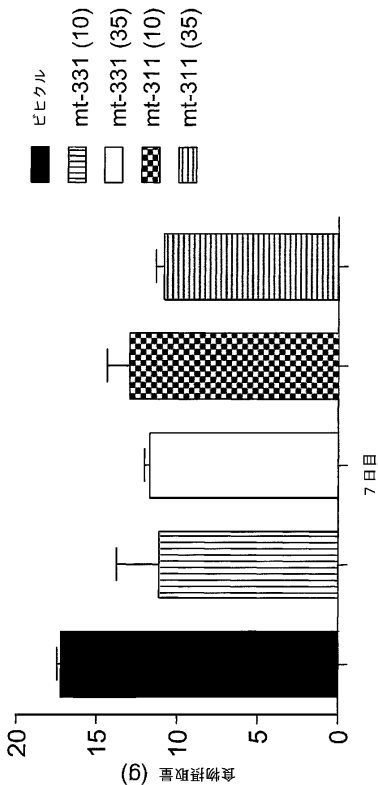
FIGURE 29



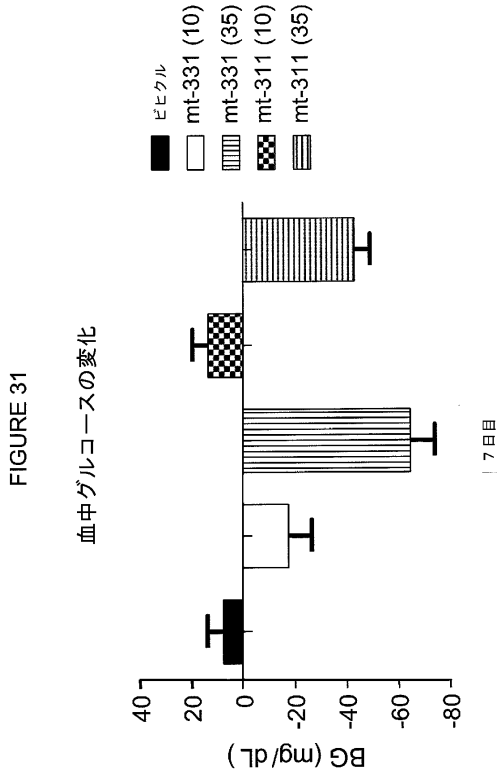
【 図 3 0 】

FIGURE 30

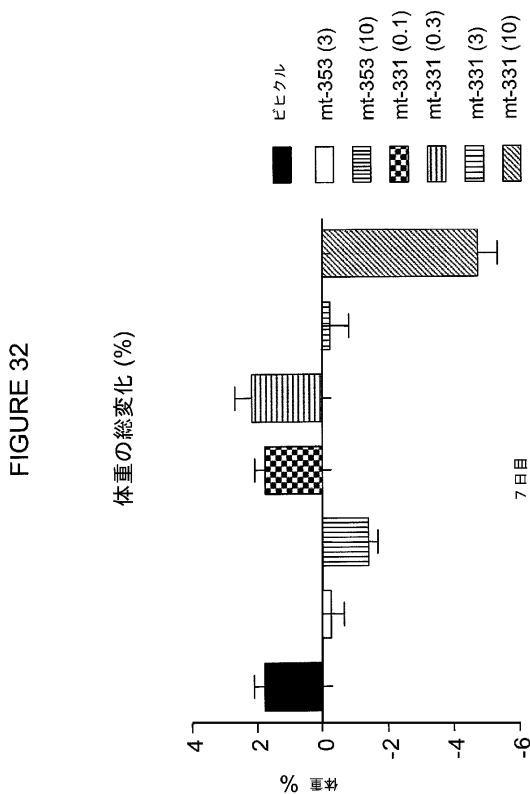
総食物摂取量



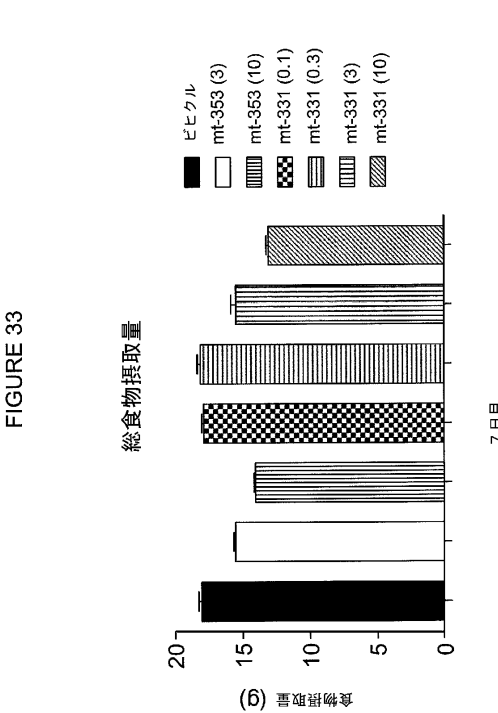
【 図 3 1 】



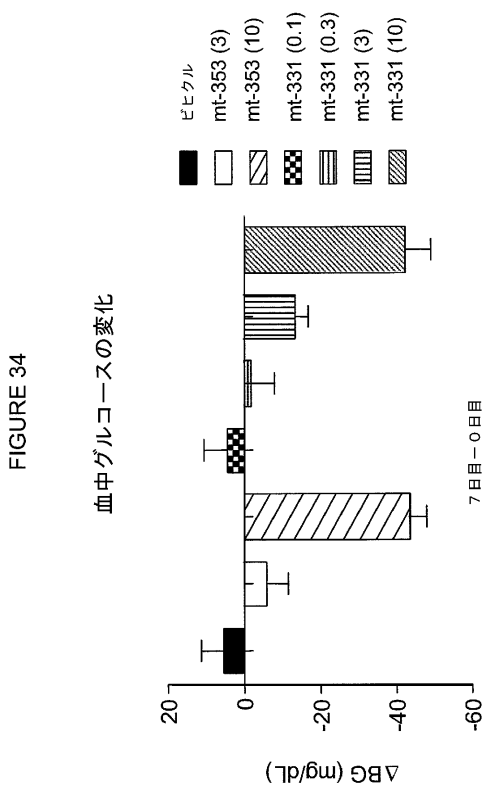
【 図 3 2 】



【 図 3 3 】

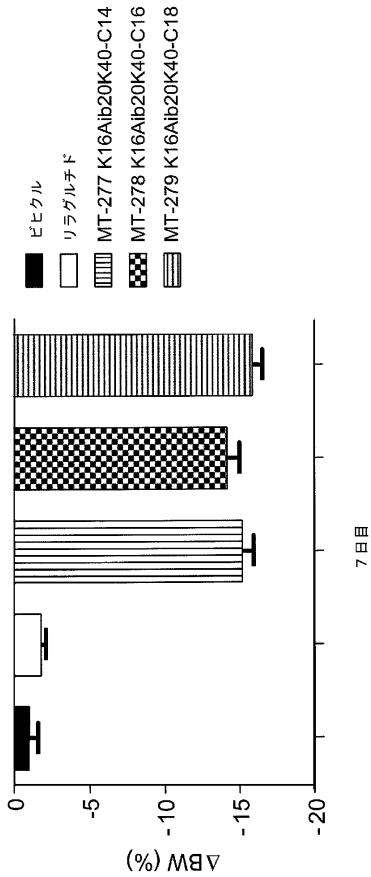


【 図 3 4 】



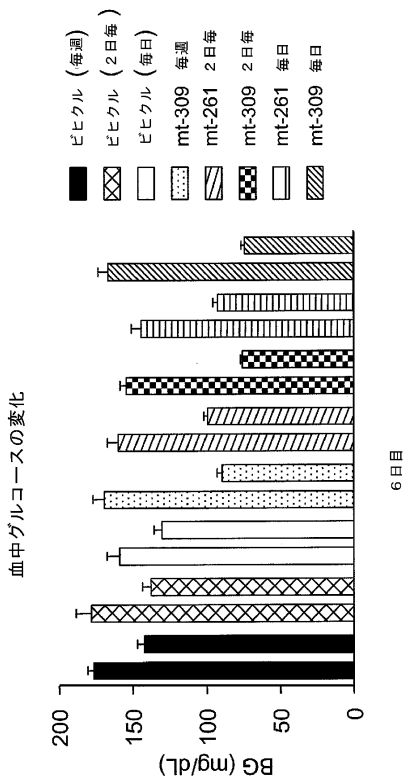
【図 3 5】

FIGURE 35



【図 3 7】

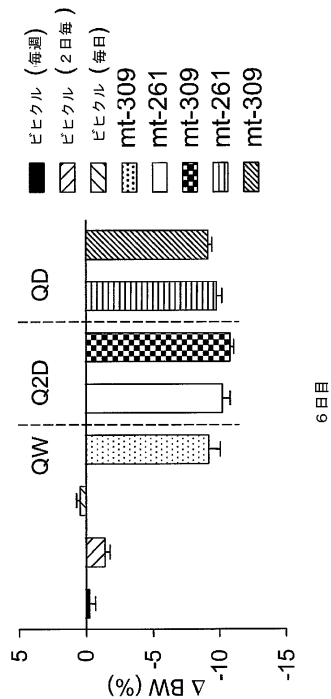
FIGURE 37



【図 3 6】

FIGURE 36

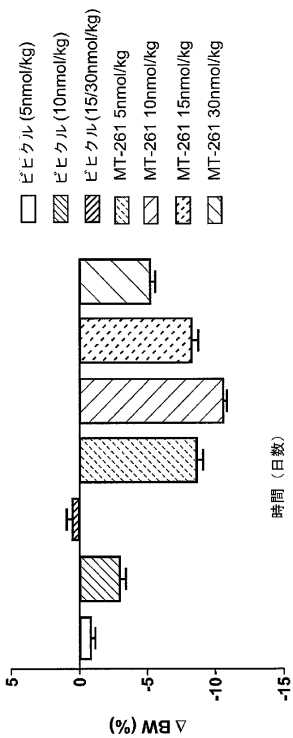
体重の総変化



【図 3 8】

FIGURE 38

体重の総変化



【配列表】

0006108659000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00

(31)優先権主張番号 61/151,349

(32)優先日 平成21年2月10日(2009.2.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/078,171

(32)優先日 平成20年7月3日(2008.7.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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 4 6 0 3 3 ・カーメル・ウィルミントン ドライブ 1 0 8 9
0

(72)発明者 マ, タオ

アメリカ合衆国・インディアナ州 4 7 4 0 1 ・ブルーミントン・アトウォーター アヴェニュー
1 0 0 2 イースト

合議体

審判長 關 政立

審判官 清野 千秋

審判官 齋藤 恵

(56)参考文献 特開平09-040699(JP,A)

特表2008-509692(JP,A)

国際公開第2007/056362(WO,A1)

Arch.biochem.Biophys.,300(2),1993,p.747-750

J.Med.Chem.,27,1984,p.310-315

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C07K14/00-14/825

C A p l u s / R e g i s t r y / B I O S I S / E M B A S E / M E D L I N E / W P I D S
/ W P I X (S T N)