

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4616000号
(P4616000)

(45) 発行日 平成23年1月19日(2011.1.19)

(24) 登録日 平成22年10月29日(2010.10.29)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 7/64	(2006.01)
A61K 35/74	(2006.01)
A61K 38/22	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01)
A61P 1/18	(2006.01)
CO 7K	7/64
A 61 K	35/74
A 61 K	37/24
A 61 P	1/00
A 61 P	1/18

請求項の数 11 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-520641 (P2004-520641)
(86) (22) 出願日	平成15年7月15日 (2003.7.15)
(65) 公表番号	特表2006-505507 (P2006-505507A)
(43) 公表日	平成18年2月16日 (2006.2.16)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2003/007657
(87) 國際公開番号	W02004/007535
(87) 國際公開日	平成16年1月22日 (2004.1.22)
審査請求日	平成18年7月13日 (2006.7.13)
(31) 優先権主張番号	02015907.5
(32) 優先日	平成14年7月17日 (2002.7.17)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)

(73) 特許権者	503137975 ベーリンガー インゲルハイム フアルマ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンク テル ハフツング ウント コンパニー コマンディトゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国 55216 インゲル ハイム ビンガー シュトラーセ 173
(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 賢男
(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
(74) 代理人	100084663 弁理士 稲田 篤
(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

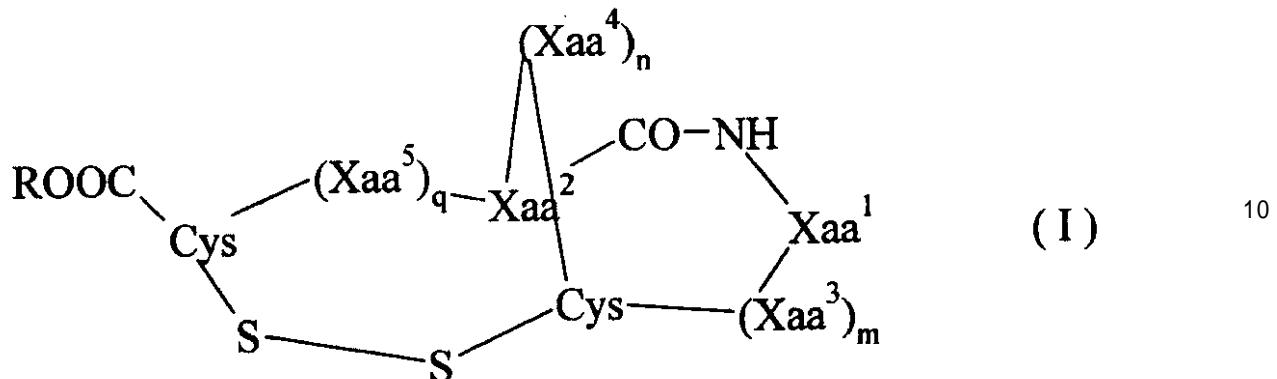
(54) 【発明の名称】二環式オリゴペプチド及びグルカゴン受容体アンタゴニストとしてのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 I により特徴づけられる、二環式オリゴペプチド。

【化 1】



(式中、

Xaa¹はグリシン、アラニン、ロイシン、ノルロイシン及びバリンからなる群から選ばれたN末端 - アミノ酸を表し、Xaa²はアスパラギン酸又はグルタミン酸を表し、Xaa³は夫々独立にグリシン、アラニン、ロイシン、ノルロイシン、バリン、プロリン及

20

びトリプトファンからなる群から選ばれた -アミノ酸を表し、

Xaa⁴は夫々独立にグリシン、アラニン、ロイシン、ノルロイシン、バリン、プロリン及びセリンからなる群から選ばれた -アミノ酸を表し、及び

Xaa⁵は夫々独立にグリシン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、ノルロイシン、バリン、プロリン、スレオニン、アスパラギン、トリプトファン及びセリンからなる群から選ばれた -アミノ酸を表し、

mは3から6までの整数を表し、

nは2から4までの整数を表し、及び

qは6から12までの整数を表し、かつ、

Rは水素原子又はC₁₋₆アルキル基を表す。)

10

【請求項2】

アクチノミセス種からの単離により得ることができるか、又は、アクチノミセス種からの単離及びさらにそのエステル化により得ることができる、請求項1記載の二環式オリゴペプチド。

【請求項3】

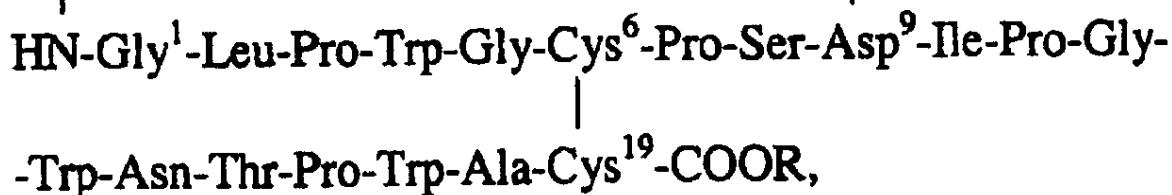
夫々のアミノ酸が(L)-配置で存在する、請求項1又は2記載の二環式オリゴペプチド。

【請求項4】

下記の配列により特徴づけられる、請求項1から3のいずれか1項記載の二環式オリゴペプチド。

【化2】

20



(式中、

Gly¹のアミノ基はアミド基を介してAsp⁹の -カルボキシレート基と結合され、かつ、システィンCys⁶及びCys¹⁹のチオール基がジスルフィドブリッジを介して結合される。)

30

【請求項5】

薬物としての使用のための請求項1から4のいずれか1項記載の二環式オリゴペプチド。

【請求項6】

請求項1から4のいずれか1項記載の少なくとも一種の二環式オリゴペプチド及び薬理学上許される担体を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項7】

請求項1から4のいずれか1項記載の少なくとも一種の二環式オリゴペプチド並びに抗糖尿病薬、脂質変調薬、抗肥満薬及び心血管薬からなる群から選ばれた活性成分を含む、請求項6記載の医薬組成物。

40

【請求項8】

抗糖尿病薬がビグアニド、グルコシダーゼインヒビター、PPARガンマモジュレーター、二重PPARアルファ / ガンマアゴニスト、RXRモジュレーター、SGLT2インヒビター、aP2インヒビター、インスリン感作物質、GLP-1又は模倣薬、DPP4インヒビター、PTP-1Bインヒビター、GSK-3インヒビター及びメチグリニドを含む群から選ばれる、請求項7記載の医薬組成物。

【請求項9】

抗糖尿病薬がメトフォルミン、グリブリド、グリベンクラミド、グリメピリド、グリビリド、グリビジド、クロルプロパミド、グリクラジド、アカルボース、ミグリトール、ビ

50

オグリタゾン、トログリタゾン、ロシグリタゾン、インスリン、イサグリタゾン、レバグリニド、ナテグリニド、及びエキセンジン-4からなる群から選ばれる、請求項7又は8記載の医薬組成物。

【請求項10】

グルカゴン受容体が関係する、疾患の治療又は予防のための薬物の調製のための請求項1から5のいずれか1項記載の二環式オリゴペプチド又は請求項6から9のいずれか1項記載の医薬組成物の使用。

【請求項11】

真性糖尿病の治療又は予防のための薬物の調製のための請求項10記載の二環式オリゴペプチドの使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の説明

本発明はグルカゴン受容体を抑制する能力を有する二環式オリゴペプチド又はそのエヌカルテルに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

米国特許第5,919,926号は塩水系媒体中の特定の海洋放線菌(CNB-091)の発酵により生成される二環式デプシペプチドを開示している。これらの二環式デプシペプチドは抗生物質及び抗炎症薬として有益であると教示されている。

20

グルカゴンは臍臓中のA細胞により生成される29アミノ酸ペプチドホルモンであり、グルコースホメオスタシスの維持におけるインスリンに対する主要な対抗調節ホルモンである。インスリンは細胞、特に筋肉細胞によるグルコースの摂取を促進し、肝臓及び筋肉中に貯蔵されたグリコーゲンの過度の分解を防止する。血糖を低下するのに必須の抗糖尿病ホルモンとして、インスリンは強力な低血糖薬である。殆どの場合、グルカゴンの作用はインスリンの作用と逆である。その主要な機能は肝臓のグルコース生成を刺激することである。活性化グルカゴン受容体はcAMP-PKAシグナリングカスケードによりシグナルを発生し、グルコース新成によるグルコースde novo合成の速度及びグルコース新成によるグリコーゲンストアからのグルコースの放出を増大する。

30

糖尿病は不足のインスリン分泌、インスリン作用、又はその両方から生じる高血糖を特徴とする複雑な疾患である。糖尿病の代謝合併症 - 高血糖及びケトーシスはグルカゴン対インスリンの比の相対的又は絶対的な増大と関連している。こうして、グルカゴンは血糖を増加させる高血糖因子である。それ故、糖尿病を治療する手段はグルカゴン受容体を好適なアンタゴニストでブロックし、それにより肝臓によるグルコース生成を抑制し、患者のグルコースレベルを低下することである。

幾つかの刊行物がペプチド及び非ペプチドのグルカゴン受容体アンタゴニストを開示している（総説について、McCormickら, Curr. Pharm. Des. 7, 1451 (2001)を参照のこと）。ヒトにおけるグルカゴン刺激グルコース生成の抑制がBay27-9955について報告されていた（Petersenら, Diabetologia 44, 2018 (2001)を参照のこと）。

40

或る種の二環式オリゴペプチドがグルカゴン受容体の高度に有効なインヒビターであり、それ故、高血糖の治療又は予防、特に真性糖尿病（I型及びII型）の治療に潜在的に有益であることが驚くことに今発見された。

これらの二環式オリゴペプチドはまたIGT（損なわれたグルコーストレランス）、インスリン抵抗性症候群、高インスリン血症、高脂血症、脂質異常、アテローム硬化症、心血管疾患、高血圧、心臓肥大、増大された腎臓のアルブミンクレアランス、グルカゴノーマ、臍臓炎、肥満、胃腸疾患、或る種の食事障害を含むその他の疾患の治療又は予防に、また胃酸分泌を増大するための治療として潜在的に有益であると示される。

【発明の開示】

50

【課題を解決するための手段】

【0003】

発明の要約

それ故、本発明はグルカゴン受容体を抑制する能力を有する新規二環式オリゴペプチド又はそのエステルに関し、前記二環式オリゴペプチドは実質的に

(a) 少なくとも一つのシステイン基を含み、かつ、ジ酸アミノ酸の第二カルボキシレート基、特にアスパラギン酸の -カルボキシレート基又はグルタミン酸の -カルボキシレート基とのN末端アミノ酸のアミド結合により形成される第一環式基、及び

(b) 前記ジ酸アミノ酸、特にアスパラギン酸又はグルタミン酸の -カルボキシレート基とのアミノ酸のアミド結合により形成され、かつ、C末端システインと第一環式基(a)内のシステイン基のジスルフィド結合により形成される第二環式基からなる。

本発明の別の局面は薬物としての使用のための本発明の二環式オリゴペプチドである。

更に、本発明は本発明の少なくとも一種の二環式オリゴペプチド及び薬理学上許される担体を含む医薬組成物並びにグルカゴン受容体が関係する、疾患の治療又は予防のための薬物の調製のための本発明の二環式オリゴペプチドの使用に関する。

本発明の別の局面はグルカゴン受容体が関係する、疾患の治療又は予防方法であり、その方法はその治療又は予防を要する患者への有効量の本発明の二環式オリゴペプチドの投与を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0004】

発明の詳細な説明

ジ酸アミノ酸に関して先に、また以下に使用される“第二カルボキシレート基”という用語はアミノ基を有する炭素原子に結合されないカルボキシレート基に関する。それはアスパラギン酸又はグルタミン酸の -又は -カルボキシレート基に関することが好ましい。

アミド結合を介してN末端アミノ酸と第一環を形成するアミノ酸に関して先に、また以下に使用される“ジ酸アミノ酸”という用語は二つのカルボキシレート基を示すアミノ酸、好ましくはアスパラギン酸又はグルタミン酸に関する。

好ましい実施態様において、本発明はN末端アミノ酸と前記ジ酸アミノ酸の間に少なくとも3のアミノ酸部分を含み、かつ/又は前記ジ酸アミノ酸とC末端システインの間に少なくとも4のアミノ酸部分を含む、二環式オリゴペプチドに関する。

アクチノミセス、好ましくはストレプトミセス種、特にブダペスト条約に従って受理番号DSM14996として寄託される微生物からの単離により得ることができ、さらにエステル化により誘導体化されてもよい、このような二環式オリゴペプチドが更に好ましい。

ストレプトミセス種は大豆粉、グルコース、塩化ナトリウム、 CaCO_3 、 KH_2PO_4 、グルコース-カゼインペプトン、酵母エキス、肉エキス及び水を含む培地内で6.5から7.5まで、特に6.8から7.3までのpH値で25から35までの温度、特に約28で培養されることが好ましい。

【0005】

二環式オリゴペプチドは極性有機溶媒、好ましくはアルコール、例えば、メタノール及びエタノールもしくはジメチルスルホキシド(DMSO)又はこれらの混合物、最も好ましくはメタノールとDMSOの混合物(そのメタノール対DMSO比は1000:1から10:1まで、特に500:1から100:1までの範囲である)による抽出により前記発酵プロセスから得られることが好ましい。その抽出液は真空で濃縮されることが好ましく、濃縮された抽出液がクロマトグラフィー、特に溶離剤として、2-60%の勾配のアセトニトリル及び酢酸アンモニウム緩衝液の形態の、アセトニトリル及び酢酸アンモニウム緩衝液(pH 3-5)を使用する分取HPLCにより濃縮される。濃縮された生成物は溶離剤としてアルコール、好ましくはメタノールを使用するカラムクロマトグラフィーにより精製されることが好ましい。

任意のエステル化は通常のエステル化方法を使用して、好ましくは特に極性有機溶媒、好ましくはアセトニトリルもしくはメタノール又はその混合物中の二環式オリゴペプチド

10

20

30

40

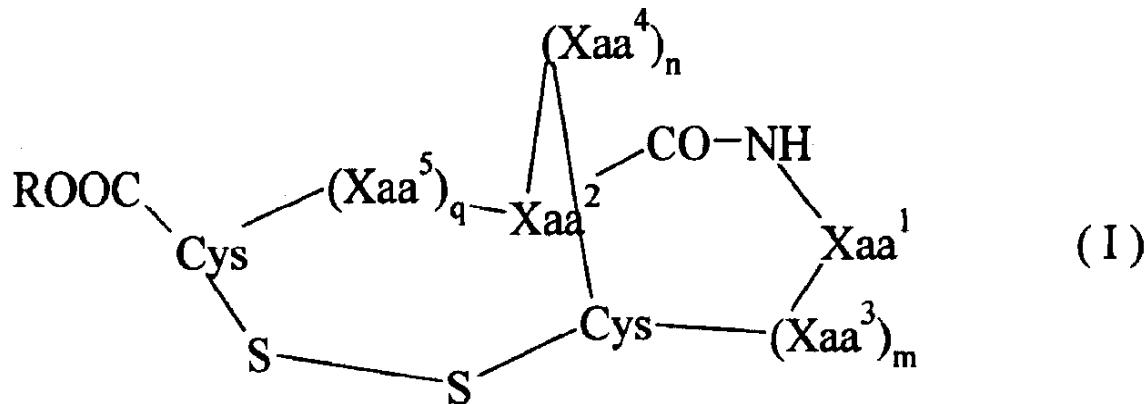
50

と、特にヘキサン中2N溶液の形態の、トリメチルシリルジアゾメタンの反応により行われる。その反応混合物は分取HPLCにより精製され、凍結乾燥されることが好ましい。

下記式Iにより特徴づけられる、二環式オリゴペプチドが特に好ましい。

【0006】

【化1】



10

20

(式中、

Xaa¹は、特にグリシン、アラニン、ロイシン、ノルロイシン及びバリン、特にグリシンからなる群から選ばれた、N末端 -アミノ酸を表し、

Xaa²はジ酸アミノ酸、特にアスパラギン酸又はグルタミン酸、特にアスパラギン酸を表し、

Xaa³、Xaa⁴及びXaa⁵は夫々独立に、好ましくはグリシン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、ノルロイシン、バリン、プロリン、スレオニン、アスパラギン、トリプトファン及びセリンからなる群から選ばれた、 -アミノ酸を表し、

m、n及びqは夫々独立に2から12までの整数を表し、好ましくはm + n + qの合計が11から22まで、特に13から17までの整数であり、かつ、

Rが水素原子又はC₁₋₆アルキル基を表す。)

30

【0007】

Xaa³が夫々独立にグリシン、アラニン、ロイシン、ノルロイシン、バリン、プロリン及びトリプトファン、特にグリシン、ロイシン、プロリン及びトリプトファンからなる群から選ばれた -アミノ酸を表し、

Xaa⁴が夫々独立にグリシン、アラニン、ロイシン、ノルロイシン、バリン、プロリン及びセリン、特にプロリン及びセリンからなる群から選ばれた -アミノ酸を表し、かつ

Xaa⁵が夫々独立にグリシン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、ノルロイシン、バリン、プロリン、スレオニン、アスパラギン、トリプトファン及びセリン、特にグリシン、アラニン、イソロイシン、プロリン、スレオニン、アスパラギン、トリプトファン及びセリンからなる群から選ばれた -アミノ酸を表し、

mが3から6までの整数、特に4を表し、

nが2から4までの整数、特に2を表し、

qが6から12までの整数、特に9を表し、かつ、

Rが水素原子又はメチル基を表す、式Iの化合物が最も特に好ましい。

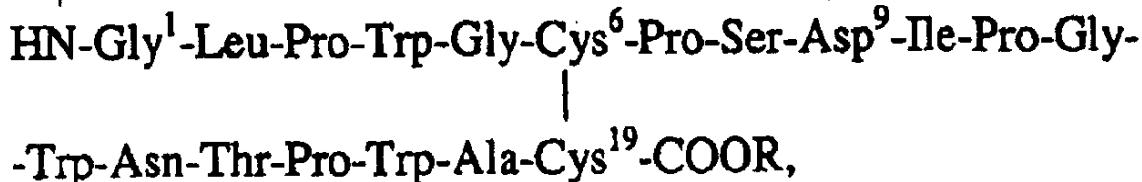
下記の配列により特徴づけられる、二環式ノナデカペプチド又はそのエステルが最も好ましい。

40

50

【0008】

【化2】



10

(式中、

Gly¹のアミノ基はアミド基を介してAsp⁹のカルボキシレート基と結合され、システィンCys⁶及びCys¹⁹のチオール基がジスルフィドブリッジを介して結合され、かつ、

Rが水素原子又はメチル基である。)

20

【0009】

ストレプトミセス種から二環式オリゴペプチドを単離する方法に加えて、本発明の化合物は通常の固相ペプチド合成を適用してアミノ酸から合成により調製し得る。

ポリマーマトリックスは市販されている源、好ましくはポリスチレン樹脂、ポリエチレングリコール樹脂、又はポリアクリルアミド樹脂から選択し得る。

リンカーは樹脂からの開裂後にC末端にカルボン酸を含むペプチドが放出される方法で選ばれる。それ故、好ましくは2-クロロトリチルリンカーを有する所謂2-クロロトリチル樹脂又は4-ヒドロキシメチルフェノキシベンジルリンカーを含む所謂ワング樹脂（これらは両方とも市販されている）が適用可能である。ジケトピペラジン生成のようなC末端システイン残基によるペプチド合成における既知の副反応のために、市販のH-Cys(Acm)-2-クロロトリチル樹脂（ノバ・バイオケム）で開始することが推奨される。

30

段階的ペプチド集合がN-Fmoc-保護(PG1)アミノ酸及びTBTUのようなin situ活性化試薬を使用して通常の条件下で行なわれることが好ましい。アミノ酸中の側鎖はFmoc/tBu-ペプチド合成について通常のように保護され、例えば、セリン及びスレオニンについてtBuで保護され、アスパラギンについてトリチルで保護され、トリプトファンについてBocで保護される(PG2)。

【0010】

システイン残基は保護基（これらは合成の終了時に選択的に除去し得る）により保護されるべきである。この目的のために、TFAに対して安定であるアセトアミドメチル(ACM)基(PG3)が選ばれることが好ましい。

40

ジ酸アミノ酸、特にAsp及びN末端アミノ酸、特にGlyの樹脂上の環化について、ジ酸アミノ酸、特にアスパラギン酸の側鎖カルボン酸は固体担体からペプチドを開裂しないで選択的に脱保護される必要がある。それ故、アリルエステル保護基が最も好適である。

ペプチド集合は原則としてN末端Fmoc-保護アミノ酸、特にFmoc-グリシン残基のカップリングの完結まで通常の条件下で行なわれる。N末端アミノ酸、特にグリシン-1及びジ酸アミノ酸、特にアスパラギン酸又はグルタル酸の環化について、両方のアミノ酸のアミノ官能基及び酸官能基を夫々脱保護することが必要である。アスパラギン酸又はグルタル酸のアリルエステルは求核基、好ましくはジメドン、バルビツール酸又はジメチルアミンの存在下でパラジウム触媒、好ましくはPd(PPh₃)₄を適用して開裂し得る。N末端基、特にグリシンのFmoc基は原則としてDMF中20%のピペリジンで除去し得る。環形成は通常のペ

50

チドカップリング試薬、好ましくはTBTUで得られる。

ポリマーからのペプチドの開裂はトリフルオロ酢酸(TFA)、好ましくはジクロロメタン中50%のTFAを用いて行ない得る。これらの条件を使用して、ペプチド中のトリチル保護基、tBu保護基及びBoc保護基がまた除去される。この段階で、ペプチドを逆相HPLCにより精製することが推奨される。システイン残基の脱保護及びジスルフィド形成は水銀(II)塩、好ましくは酢酸水銀(II)、又はヨウ素を用いて行なわれることが好ましい。下記の反応スキームは本発明の二環式オリゴペプチドの固相ペプチド合成を説明する。

[0 0 1 1]

【化 3】

固相ペプチド合成

10

PG^2
 PG1-Gly-Leu-Pro-Trp-Gly-Cys-Pro-Ser-Asp-Ile-Pro-Gly-Trp-Asn-Thr-Pro-Trp-Ala-Cys-リンクー-ポリマー
 PG^3 ↓
 1. PG¹ 及び PG² の脱保護 2. アミドカップリング PG³

Gly-Leu-Pro-Trp-Gly-Cys-Pro-Ser-Asp-Ile-Pro-Gly-Trp-Asn-Thr-Pro-Trp-Ala-Cys-リンクー-ポリマー
 PG³ | | PG³

20

ポリマーからの開裂

Gly-Leu-Pro-Trp-Gly-Cys-Pro-Ser-Asp-Ile-Pro-Gly-Trp-Asn-Thr-Pro-Trp-Ala-Cys-OH
 PG³ | PG³ の脱保護 | PG³
 ジスルコイドブリッジ形成

ジスルフィドブリッジ形成

20

Gly-Leu-Pro-Trp-Gly-Cys-Pro-Ser-Asp-Ile-Pro-Gly-Trp-Asn-Thr-Pro-Trp-Ala-Cys-OH

【 0 0 1 2 】

先に示されたように、本発明はまた高血糖、高脂血症、高血圧、心血管疾患及び或る種の食事障害の治療における使用のための二環式オリゴペプチドもしくはそのエステル及び／又はその医薬上許される塩及び／又はその医薬上許される溶媒和物を提供する。

二環式オリゴペプチドもしくはそのエステル及び／又はその医薬上許される塩及び／又はその医薬上許される溶媒和物は、それ自体で投与されてもよく、又は好ましくは医薬上許される担体をまた含む医薬組成物として投与されてもよい。

それ故、本発明はまた二環式オリゴペプチドもしくはそのエステル、又はその医薬上許される塩、又はその医薬上許される溶媒和物、及びその医薬上許される担体を含む医薬組成物を提供する。

本明細書に使用される“医薬上許される”という用語はヒト用及び獣医学用の両方のための化合物、組成物及び成分を含む。例えば、“医薬上許される塩”という用語は獣医学上許される塩を含む。

組成物は、所望により、使用についての筆記又は印刷された指示により伴われたパックの形態であってもよい。

通常、本発明の医薬組成物は経口投与に適しているであろうが、その他の経路、例えば、注射及び経皮吸収による投与のための組成物がまた考えられる。

40

経口投与に特に適した組成物は単位投薬形態、例えば、錠剤及びカプセルである。その他の一定の単位投薬形態、例えば、サッシェ中に提供された粉末がまた使用されてもよい。

【0013】

通常の医薬慣例に従って、担体は希釈剤、充填剤、崩壊剤、湿潤剤、滑剤、着色剤、風味料又はその他の通常のアジュバントを含んでもよい。

典型的な担体として、例えば、微結晶性セルロース、澱粉、ナトリウム澱粉グリコレート、ポリビニルピロリドン、ポリビニルポリピロリドン、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム又は蔗糖が挙げられる。

組成物は単位投薬形態で製剤化されることが最も好適であろう。このような単位用量は通常0.01～1000mg、更に通常0.1～500mg、更に特別には0.1～250mgの範囲の量の活性成分を含むであろう。

更に、本発明は高血糖の治療及び／又は予防を要する高血糖のヒト又は非ヒト哺乳類に有効な、無毒性の、量の二環式オリゴペプチドもしくはそのエステル及び／又はその医薬上許される塩及び／又はその医薬上許される溶媒和物を投与することを特徴とするヒト又は非ヒト哺乳類の高血糖の治療及び／又は予防方法を提供する。

更に、本発明は高脂血症の治療を要する高脂血症のヒト又は非ヒト哺乳類に有効な、無毒性の、量の二環式オリゴペプチドもしくはそのエステル及び／又はその医薬上許される塩及び／又はその医薬上許される溶媒和物を投与することを特徴とする、ヒト又は非ヒト哺乳類の高脂血症の治疗方法を提供する。

都合良くは、活性成分は先に特定された医薬組成物として投与されてもよく、これが本発明の特別な局面を形成する。

高血糖のヒトの治療及び／又は予防、及び／又は高脂血症のヒトの治療及び／又は予防において、二環式オリゴペプチドもしくはそのエステル及び／又はその医薬上許される塩及び／又はその医薬上許される溶媒和物は、70kgの成人についての合計の毎日の用量が一般に0.1～6000mg、更に通常約1～1500mgの範囲であるような様式で1日に1～6回、上記の用量の如き用量で服用されてもよい。

【0014】

高血糖の非ヒト哺乳類、特にイヌの治療及び／又は予防において、活性成分は約0.025mg/kgから25mg/kgまで、例えば、0.1mg/kgから20mg/kgまでの範囲の量で通常1日に1回又は2回、口により投与されてもよい。同様の投薬養生法が非ヒト哺乳類の高脂血症の治療及び／又は予防に適している。

二環式オリゴペプチド又はそのエステルは単独で投与されてもよく、又は別の活性薬剤（これは高血糖、高脂血症、肥満及び高血圧の治療又は予防に通常使用される）と組み合わせて投与されてもよい。

特に、本発明の化合物は一種以上の抗糖尿病薬と組み合わせて使用されてもよい。抗糖尿病薬として、ビグアニド、グルコシダーゼインヒビター、PPARガンマモジュレーター、二重PPARアルファ／ガンマアゴニスト、RXRモジュレーター、SGLT2インヒビター、aP2インヒビター、インスリン感作物質、GLP-1又は模倣薬、DPP4インヒビター、PTP-1Bインヒビター、GSK-3インヒビター及び／又はメチグリニドが挙げられる。抗糖尿病薬は特別にメトフォルミン、グリブリド、グリベンクラミド、グリメピリド、グリピリド、グリビジド、クロルプロパミド、グリクラジド、アカルボース、ミグリトール、ピオグリタゾン、トログリタゾン、ロシグリタゾン、インスリン、イサグリタゾン、レパグリニド、ナテグリニド、及び／又はエキセンジン-4である。

本発明の化合物は脂質変調薬と組み合わせて使用されてもよい。脂質変調薬として、HMG CoAレダクターゼインヒビター、フィブリン酸誘導体、CETPインヒビター、ACATインヒビター、MTPインヒビター、スクアレンシクラーゼインヒビター及びスクアレンシンターゼインヒビター、LXRモジュレーター及び／又は胆汁酸イオン封鎖剤が挙げられる。脂質変調薬は特別にプラバスタチン、ロバスタチン、フルバスタチン、シムバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチン、フェノフィブレート、ゲムフィブロジル、クロフィブレ

10

20

30

40

50

ート、コレステラミン、コレステポール、プロブコール、ニコチン酸、イムプリタピド及び／又はアバシミベである。

【0015】

本発明の化合物は抗肥満薬と組み合わせて使用されてもよい。抗肥満薬として、リバーゼインヒビター、セロトニン及びドーパミン再摂取インヒビター、ベータ3アドレナリン作用アゴニスト、MCHアンタゴニスト、MC4アゴニスト、レプチニン又は模倣薬、脂肪酸酸化アップレギュレーター及び／又は脂肪酸及びトリグリセリド合成インヒビターが挙げられる。抗肥満薬は特別にオルリストット、シプロラミン、トピラメート、アキソキン、デキサムフェタミン、フェンテルミン、フェニルプロパノールアミン、ファモキシン及び／又はマジンドールである。

本発明の化合物は心血管薬と組み合わせて使用されてもよい。心血管薬として、アルファ-アドレナリン作用プロッカー、アンギオテンシン変換酵素インヒビター、アンギオテンシンII受容体プロッカー、抗不整脈薬、血液凝固阻止薬、抗血小板薬、血栓溶解薬、ベータ-アドレナリン作用プロッcker、カルシウムアンタゴニスト、集中作用性昇圧薬、利尿薬、神経及び神経節プロッcker、及び／又は血管拡張薬が挙げられる。心血管薬は特別にドキサツシン、プラズシン、テラズシン、ベナゼブリル、カプトブリル、エナラブリル、エナラブリラート、フォシノブリル、リシノブリル、モエキシブリル、キナブリル、ラミブリル、トランドラブリル、イルベサルタン、ロサルタン、バルサルタン、テルミサルタン、ジソピラミド、フレカイニド、イブチリド、リドカイン、メキシレチン、モリシジン、プロカインアミド、プロパフェノン、キニジン、トカイニド、アミオダロン、ブレチリウム、アニシンジオン、ジクマロール、ヘパリン、ワルファリン、アブシキシマブ、アナグレリド、アスピリン、クロピドグレル、ジピリダモル、チクロピジン、アルテプラーゼ、アニストレプラーゼ、レテプラーゼ、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、ナドロール、プロパノロール、ソタロール、チモロール、アテノロール、ベタキソロール、ビソブロロール、エスマロール、メトプロロール、アセブトロール、カルテオロール、ベンブトロール、ピンドロール、カルベジロール、ラベタロール、アムロジピン、ベブリジル、ジルチアゼム、フェロジピン、イスラジピン、ミベフラジル、ニカルジピン、ニフェジピン、ニモジピン、ベラパミル、クロニジン、グアナベンズ、グアンファシン、メチルドーパ、ブメタニド、エタクリン酸、フロセミド、トルセミド、ベンドロフルメチアジド、ベンチアジド、クロロチアジド、クロルサリドン、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチクロチアジド、メトラゾン、ポリチアジド、キネタゾン、トリクロルメチアジド、アミロリド、スピロノラクトン、グアナドレル、グアネチジン、メカミラミン、レセルピン、シクランデレート、フェノルドバム、ヒドララジン、ミノキシジル、ペントキシフィリン、フェノキシベンザミン、エリスリチルテトラニトレート、イソソルビド、ニトログリセリン、及び／又はニトロフルシドである。

【0016】

その他の疾患（例えば、高血圧、心血管疾患及び食事障害）の治療のための投薬養生法は一般に高血糖に関して上記されたものであろう。

更なる局面において、本発明は高血糖の治療及び／又は予防のための薬物の製造のための、二環式オリゴペプチドもしくはそのエステル及び／又はその医薬上許される塩及び／又はその医薬上許される溶媒和物の使用を提供する。

本発明はまた高脂血症、高血圧、心血管疾患又は或る種の食事障害の治療及び／又は予防のための薬物の製造のための、二環式オリゴペプチドもしくはそのエステル及び／又はその医薬上許される塩及び／又はその医薬上許される溶媒和物の使用を提供する。

本発明の二環式オリゴペプチドの主要な利点はその高いグルカゴン受容体アフィニティー及び生理学的媒体中のその驚くべき安定性である。

以下の実施例は本発明を説明するのに利用できる。それらは本発明をそれらの内容に限定しないで単に実施例として示される単なる例示であると理解されるべきである。

【実施例】

【0017】

10

20

30

40

50

実施例 1

下記の配列の二環式ノナデカペプチドの調製及び単離

【 0 0 1 8 】

【 化 4 】



【 0 0 1 9 】

10

1. 調製

(a) 予備培養 :

下記の培地100mLを4シケイン(chicane)を含む300mLの三角フラスコ中で調製する。大豆粉15.0g、グルコース15.0g、塩化ナトリウム5.0g、CaCO₃ 1.0g、KH₂PO₄ 0.3g及び水1000mL添加、pH 6.9。ストレプトミセスDSM14996の良く培養されたステムを含む寒天の小薄片が接種物として利用できる。フラスコを160U/分で28℃で48時間攪拌する。

(b) 発酵

グルコース-カゼインペプトン培地250mLを1Lの三角フラスコ中で調製する：グルコース20.0g、カゼインペプトン4.0g、酵母エキス0.5g、肉エキス4.0g、塩化ナトリウム2.5g、CaCO₃ 3.0g、水1000mL添加、pH 7.2。フラスコの夫々に予備培養液20mLを接種し、160U/分で28℃で120Std.で維持する。

20

2. 単離 :

(a) 抽出

菌糸及び6Lの培養プロースからの凍結乾燥物を合わせ、MeOH(2L及び1L)及びDMSO(2x5mL)の混合物で2回抽出する。抽出液を真空で約40mLの残存容積まで濃縮する(抽出液A)。その沈殿を遠心分離して除き、MeOH(6mL)及びDMSO(3mL)の混合物に溶解し、これを濃縮抽出液(抽出液A)に添加する。

(b) クロマトグラフィー

得られる抽出液Aを予備カラム(2.5x1.0cm)を備えたC-18ノバ-パックカラム(ウォーターズ、6μm、2.5x10cm)で分取HPLCにより1.8mLづつ精製する。16分以内の1mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4)に対し5-51%のCH₃CNの勾配が溶離剤として利用できる。流量は20mL/分である。ペプチドを220nmでUV吸収により検出する。続いて、濃縮されたペプチドを、MeOH(1.0mL/分)を溶離剤として使用してセファデックスLH-20カラム(2.5x70cm)で100mgづつ精製して純粋な所望の生成物25mg/Lを得る。

30

【 0 0 2 0 】

実施例 2

実施例 1 の化合物のエステル化

トリメチルシリルジアゾメタン(ヘキサン中2N溶液、0.048mL、0.096ミリモル)及びアセトニトリル/メタノール(9/1、0.85mL)の混合物を実施例1で調製された二環式ノナデカペプチド(23.7mg、0.0116ミリモル)及びDMSO 0.85mLの混合物に添加する。20時間後に、トリメチルシリルジアゾメタンの別の部分(ヘキサン中2N溶液、0.048mL、0.096ミリモル)を添加する。次いでその反応をLC-MSにより制御し、酸(保持時間=5.84分、(M-H)⁻: 2035、(M-2H)²⁻: 1017)の75%がメチルエステル(保持時間=5.96分、(M+H)⁺: 2051、(M+2H)²⁺: 1026)に変換されたことを示す。その反応混合物を分取HPLCにより精製し、凍結乾燥させる。

40

実施例1及び2の化合物は下記の性質を示す：

実施例1 : C95H125N23024S2 MW2035.87 (モノ同位体) 2037.3 (平均)

実施例2 : C96H127N23024S2 MW2049.89 (モノ同位体) 2051.3 (平均)

また、下記の溶解性を示す：

実施例1

50

緩衝液pH 3.0 : 0.003mg/ml
 緩衝液pH 7.4 : 0.120mg/ml
 緩衝液pH 10.0 : 0.092mg/ml

実施例2

緩衝液pH 3.0 : 0.003mg/ml
 緩衝液pH 7.4 : 0.002mg/ml
 緩衝液pH 10.0 : 0.004mg/ml

【0021】

実施例3

グルカゴン結合アッセイ

10

グルカゴン受容体へのペプチドの結合をクローニングされたヒトグルカゴン受容体及び放射能標識グルカゴンを含む膜フラクションを使用する競合結合アッセイでアッセイした。

ヒトグルカゴン受容体をコードするcDNAを発現ベクターpcDNA3.1(インビトロゲン)にクローニングした。乳児ハムスター腎臓細胞(BHK-21(C-13)細胞(ATCC))をヒトグルカゴン受容体のための発現構築物でトランスフェクトし、安定にトランスフェクトされた細胞クローニングをG-418(ギブコ)による選択後に単離した。

ヒトグルカゴン受容体を含む原形質膜を安定にトランスフェクトされたBHK-21細胞から調製した。細胞を集密まで増殖させ、洗浄し、0.05%のEDTAを含む、氷冷PBS緩衝液(ギブコ)で取り外し、PBS緩衝液中に集めた。細胞を遠心分離により集め、20倍容の氷冷トリス緩衝液(10mMトリス/HCl、pH 7.2; 0.01mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド))中で懸濁させ、90分間インキュベートした。全ての更なる工程を4で行なった。懸濁液を10ストロークのドウヌスホモジナーザーにより完全に溶解した。核及び細胞デブリを10分間にわたって500gで遠心分離により分離した。次いで上澄みを100,000gで35分間遠心分離した。沈殿した膜をインキュベーション緩衝液(50mMトリス/HCl、100mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM EDTA、0.2%のウシ血清アルブミン、pH 7.2)中で懸濁させ、分割し、-80で貯蔵した。

20

解凍後、ヒトグルカゴン受容体を発現するBHK細胞膜を0.01mM PMSFで補充されたインキュベーション緩衝液中で再懸濁させた。

グルカゴン結合との競合を測定するために、膜懸濁液20μgを100μlの合計容積で50.000cpmの125I-グルカゴン(アメーシャム・ファーマシア)、及び或る濃度の試験化合物とともにカバーしたミクロタイタ・プレート(オプチプレート、パッカード・インストルメンツ)中で60分間インキュベートした。タンパク質結合放射能を濾過及びGC/Bフィルター(パッカード)を使用するマルチスクリーン-真空濾過システム(ミリポア)による洗浄により未結合リガンドから分離し、トップカウントシンチレーションカウンター(パッカード)中で20μlのミクロシント20の添加後に測定した。非特異的結合を1μMのグルカゴン(ウェールGmbH)の存在下で結合された放射能と定義する。

30

それ故、IC₅₀値を上記試験方法で得られた結果から計算することができる。二環式オリゴペプチドは下記の活性を示す。

実施例1 : IC₅₀=100nM;

実施例2 : IC₅₀=135nM.

40

【0022】

実施例4

代謝安定性:

下記の条件下のミクロソーム及びサイトゾルの製剤並びに血漿と一緒にインキュベーションは試験化合物の代謝安定性(例えば、酸化的代謝反応及びエステラーゼによる加水分解)を調べるのに好適である。実施例1及び2の試験化合物の代謝安定性をヒト、イス及びラットの肝臓ミクロソーム及びサイトゾル並びにヒト及びラットの血漿中で調べる。

ミクロソーム及びサイトゾルとの安定性

試験化合物(最終濃度: 1μM)のインキュベーションを100μlの合計容積で37で45分までにわたって37で塩化マグネシウム(5mM)を含むトリス緩衝液(トリス-(ヒドロ

50

キシメチル)-アミノメタン) pH 7.4 (0.1 M) 中の肝臓ミクロソーム及びサイトゾル (0.5mg のタンパク質/ml) を用いて行なう。その反応を -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート、還元形態 (NADPH、1mM) の添加により開始し、アセトニトリルの添加により停止した。攪拌混合及び遠心分離後に、上澄みを分析する。

血漿中の安定性

試験基質 (最終濃度 : 1 μM) のインキュベーションを0.1Mトリス緩衝液pH 7.4を含むヒト及びラットの血漿 (ヘパリン) を用いて行なう。その反応を45分までにわたって37で試験化合物の添加により開始し、アセトニトリルの添加により停止した。攪拌混合及び遠心分離後に、上澄みを分析する。

分析

10

サンプルをオンライン固相抽出及び電子噴霧イオン化タンデム質量分析装置に結合された逆相HPLCにより分析する。測定をトリブルカッド質量スペクトロメータークアットロII (ミクロマス、マンチェスター、UK) で行なう。その装置はSIR様式で公称の質量分解で作動する。分析物をそれらの準分子イオン [M+2H]²⁺ m/z 1019 (実施例1) 及びm/z 1026 (実施例2) の検出により定量する。

下記の安定性を得る。

基質 (初期濃度) : 1 μM

半減期 (t_{1/2} [分])

【0023】

【表1】

20

種	ラット			イヌ			ヒト		
	ミクロ	サイト	血漿	ミクロ	サイト	ゾーム	ゾル	サイト	血漿
実施例1	安定	安定	安定	安定	安定	安定	安定	安定	182
実施例2	安定	73	安定	安定	140		安定	122	180

【0024】

実施例5

医薬製剤の実施例

A)	錠剤	錠剤当り
	活性物質 (実施例1)	50mg
	ラクトース	170mg
	トウモロコシ澱粉	260mg
	ポリビニルピロリドン	15mg
	ステアリン酸マグネシウム	5mg
		500mg

30

微粉碎した活性物質、ラクトース及びトウモロコシ澱粉の一部と一緒に混合する。その混合物を篩分け、次いで水中ポリビニルピロリドンの溶液で湿らせ、混練し、湿式造粒し、乾燥させる。顆粒、残りのトウモロコシ澱粉及びステアリン酸マグネシウムを篩分け、一緒に混合する。その混合物を圧縮して好適な形状及びサイズの錠剤を製造する。

40

B)	錠剤	錠剤当り
	活性物質 (実施例1)	40mg
	トウモロコシ澱粉	210mg
	ラクトース	65mg
	微結晶性セルロース	40mg
	ポリビニルピロリドン	20mg
	ナトリウム-カルボキシメチル澱粉	23mg
	ステアリン酸マグネシウム	2mg
		400mg

微粉碎した活性物質、トウモロコシ澱粉の一部、ラクトース、微結晶性セルロース及び

50

ポリビニルピロリドンと一緒に混合し、その混合物を篩分け、残りのトウモロコシ澱粉及び水で処理して顆粒を形成し、これを乾燥させ、篩分ける。ナトリウム-カルボキシメチル澱粉及びステアリン酸マグネシウムを添加し、混合し、混合物を圧縮して好適なサイズの錠剤を形成する。

【0025】

C)	<u>被覆錠剤</u>	<u>被覆錠剤当り</u>	10
	活性物質（実施例1）	5mg	
	トウモロコシ澱粉	41.5mg	
	ラクトース	30mg	
	ポリビニルピロリドン	3mg	
	ステアリン酸マグネシウム	0.5mg	
		80mg	

活性物質、トウモロコシ澱粉、ラクトース及びポリビニルピロリドンを充分に混合し、水で湿らせる。湿った塊を1mmのメッシュサイズを有する篩に押しやり、約45°で乾燥させ、次いで顆粒を同篩に通す。ステアリン酸マグネシウムを混入した後、6mmの直径を有する凸形錠剤コアを錠剤製造機中で圧縮する。こうして製造した錠剤コアを実質的に糖及びタルクからなるカバーで既知の様式で被覆する。完成した被覆錠剤をワックスで研磨する。

D)	<u>カプセル</u>	<u>カプセル当り</u>	20
	活性物質（実施例1）	25mg	
	トウモロコシ澱粉	283.5mg	
	ステアリン酸マグネシウム	1.5mg	
		310mg	

その物質及びトウモロコシ澱粉を混合し、水で湿らせる。湿った塊を篩分け、乾燥させる。その乾燥顆粒を篩分け、ステアリン酸マグネシウムと混合する。完成混合物をサイズ1の硬質ゼラチンカプセルに詰める。

【0026】

E)	<u>アンプル溶液</u>		30
	活性物質（実施例1）	0.5mg	
	塩化ナトリウム	50mg	
	注射用の水	5ml	

その活性物質を水にそれ自体のpH又は必要によりpH 5.5-6.5で溶解し、塩化ナトリウムを添加してそれを等張性にする。得られた溶液を濾過して発熱物質を除き、濾液を無菌条件下でアンプルに移し、次いでこれらを滅菌し、融着によりシールする。アンプルは活性物質0.5mg、2.5mg及び5.0mgを含む。

F)	<u>座薬</u>		40
	活性物質（実施例2）	30mg	
	固形脂肪	1670mg	
		1700mg	

固形脂肪を融解する。粉碎した活性物質を40°で均一に分散させる。それを38°に冷却し、わずかに冷却した座薬金型に注入する。

フロントページの続き

			F I	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	5/48	(2006.01)	A 6 1 P	5/48
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10 101
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 111

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 ポッテラ オリヴィエ

ドイツ連邦共和国 88441 ミッテルビベラッハ シュタイネックカーシュトラーセ 7

(72)発明者 シュトライヒャー リューディガー

ドイツ連邦共和国 88400 ビベラッハ カスターインヴェーク 31

(72)発明者 ヴァーグナー クラウス

ドイツ連邦共和国 88447 ヴァルトハウゼン エルレンヴェーク 31 / 1

(72)発明者 マウラー ティル

ドイツ連邦共和国 89613 オーバーシュタディオン アイヒャーヴェーク 26

(72)発明者 マック ユールゲン

ドイツ連邦共和国 88400 ビベラッハ アムリスヴィルシュトラーセ 7

(72)発明者 ペテルス シュテファン

ドイツ連邦共和国 88400 ビベラッハ ウルメンヴェーク 12

審査官 山中 隆幸

(56)参考文献 特開昭54-095591(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K1/00-19/00

PubMed

Science Direct

JSTPlus(JDreamII)

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)