

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6538665号
(P6538665)

(45) 発行日 令和1年7月3日(2019.7.3)

(24) 登録日 令和1年6月14日(2019.6.14)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 14/605	(2006.01)	C07K 14/605	Z N A
A61K 38/26	(2006.01)	A61K 38/26	
A61P 3/04	(2006.01)	A61P 3/04	
A61P 11/00	(2006.01)	A61P 11/00	
A61P 3/10	(2006.01)	A61P 3/10	

請求項の数 30 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-523202 (P2016-523202)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月17日 (2014.10.17)
 (65) 公表番号 特表2016-538831 (P2016-538831A)
 (43) 公表日 平成28年12月15日 (2016.12.15)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/072293
 (87) 國際公開番号 WO2015/055801
 (87) 國際公開日 平成27年4月23日 (2015.4.23)
 審査請求日 平成29年10月13日 (2017.10.13)
 (31) 優先権主張番号 61/892,256
 (32) 優先日 平成25年10月17日 (2013.10.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502453045
 ジーランド ファーマ アクティーゼルス
 カブ
 デンマーク国, デーコーー 2600 グロ
 ストルップ, スメデランド 36
 (73) 特許権者 503385923
 ベーリンガー インゲルハイム インター
 ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ
 シュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 55216 インゲル
 ハイム アム ライン ビンガー シュト
 ラーゼ 173
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アシル化グルカゴン類似体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 : H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3) -RAAKDFIEWLESA-NH₂ を有する化合物。

【請求項 2】

式 : H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG) -RAAKDFIEWLESA-NH₂ を有する化合物。

【請求項 3】

式 : H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3) -RAKDFIEWLESA-NH₂ を有する化合物。 10

【請求項 4】

式 : H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG) -WLESA-NH₂ を有する化合物。

【請求項 5】

式 : H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG) -WLESA-NH₂ を有する化合物。

【請求項 6】

式 : H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG) -A-NH₂ を有する化合物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物の医薬的に許容し得る塩。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物又は請求項 7 に記載の医薬的に許容し得る塩を担体との混合物中に含む組成物。

【請求項 9】

前記組成物が医薬組成物であり、前記担体が医薬的に許容し得る担体である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

体重増加を予防または体重減少を促進することが必要な個体において、体重増加を予防または体重減少を促進する方法で使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物又は請求項 7 に記載の医薬的に許容し得る塩を含む医薬組成物。

10

【請求項 11】

循環LDLレベルを低下および / またはHDL/LDL比を上昇させが必要な個体において、循環LDLレベルを低下および / またはHDL/LDL比を上昇させる方法で使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物又は請求項 7 に記載の医薬的に許容し得る塩を含む医薬組成物。

【請求項 12】

体重過多により引き起こされるかまたはこれを特徴とする症状の治療法で使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物又は請求項 7 に記載の医薬的に許容し得る塩を含む医薬組成物。

20

【請求項 13】

肥満、病的肥満、手術前の病的肥満、肥満に関連する炎症、肥満に関連する胆囊疾患、肥満誘発性睡眠時無呼吸、糖尿病、メタボリック症候群、高血圧、アテローム性脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、末梢動脈疾患、脳卒中または微小血管疾患の予防または治療方法で使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物又は請求項 7 に記載の医薬的に許容し得る塩を含む医薬組成物。

【請求項 14】

糖尿病、肥満、脂質異常症、または高血圧症の治療のための薬剤との併用療法の一部として投与される、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

30

糖尿病の治療のための前記薬剤が、ビグアニド（例えば、メトホルミン）、スルホニル尿素、メグリチニドまたはグリニド（例えばナテグリニド）、DPP-IV阻害剤、SGLT2阻害剤、グリタゾン、異なるGLP-1アゴニスト、インスリンまたはインスリン類似体である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

肥満の治療のための前記薬剤が、グルカゴン様ペプチド受容体 1 アゴニスト、ペプチド YY受容体アゴニストまたはその類似体、カンナビノイド受容体 1 アンタゴニスト、リバーゼ阻害剤、メラノコルチン受容体4アゴニスト、メラニン凝集ホルモン受容体 1 アンタゴニスト、フェンテルミン、ノルエピネフリン/ドーパミン再取り込み阻害剤とオピオイド受容体アンタゴニストとの組み合わせ（例えば、フェンテルミンとトピラメートとの組み合わせ）、ブプロピオントナルトレキソンとの組み合わせ、またはセロトニン作動薬である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 17】

高血圧の治療のための前記薬剤が、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシンII受容体遮断薬、利尿薬、ベータ遮断薬、またはカルシウムチャネル遮断薬である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

脂質異常症の治療のための前記薬剤が、スタチン、フィブラーート、ナイアシン、および / またはコレステロール吸収阻害剤である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

50

体重増加を予防または体重減少を促進することが必要な個体において、体重増加を予防または体重減少を促進するための医薬の調製における請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物又は請求項7に記載の医薬的に許容し得る塩の使用。

【請求項20】

循環LDLレベルを低下および／またはHDL/LDL比を上昇させが必要な個体において、循環LDLレベルを低下および／またはHDL/LDL比を上昇させるための医薬の調製における請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物又は請求項7に記載の医薬的に許容し得る塩の使用。

【請求項21】

10 体重過多により引き起こされるかまたはこれを特徴とする症状の治療のための医薬の調製における請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物又は請求項7に記載の医薬的に許容し得る塩の使用。

【請求項22】

肥満、病的肥満、手術前の病的肥満、肥満に関連する炎症、肥満に関連する胆囊疾患、肥満誘発性睡眠時無呼吸、糖尿病、メタボリック症候群、高血圧、アテローム性脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、末梢動脈疾患、脳卒中または微小血管疾患の予防または治療のための医薬の調製における請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物又は請求項7に記載の医薬的に許容し得る塩の使用。

【請求項23】

20 前記組成物が、糖尿病、肥満、脂質異常症、または高血圧症の治療のための薬剤との併用療法の一部として投与される、請求項19～22のいずれか1項に記載の使用。

【請求項24】

糖尿病の治療のための前記薬剤が、ビグアニド（例えば、メトホルミン）、スルホニル尿素、メグリチニドまたはグリニド（例えばナテグリニド）、DPP-IV阻害剤、SGLT2阻害剤、グリタゾン、異なるGLP-1アゴニスト、インスリンまたはインスリン類似体である、請求項23に記載の使用。

【請求項25】

肥満の治療のための前記薬剤が、グルカゴン様ペプチド受容体1アゴニスト、ペプチドYY受容体アゴニストまたはその類似体、カンナビノイド受容体1アンタゴニスト、リバーゼ阻害剤、メラノコルチン受容体4アゴニスト、メラニン凝集ホルモン受容体1アンタゴニスト、フェンテルミン、ノルエピネフリン／ドーパミン再取り込み阻害剤とオピオイド受容体アンタゴニストとの組み合わせ（例えば、フェンテルミンとトピラメートとの組み合わせ）、ブプロピオントナルトレキソンとの組み合わせ、またはセロトニン作動薬である、請求項23に記載の使用。

【請求項26】

高血圧の治療のための前記薬剤が、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシンII受容体遮断薬、利尿薬、ベータ遮断薬、またはカルシウムチャネル遮断薬である、請求項23に記載の使用。

【請求項27】

40 脂質異常症の治療のための前記薬剤が、スタチン、フィブラーント、ナイアシン、および／またはコレステロール吸収阻害剤である、請求項23に記載の使用。

【請求項28】

請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物、または請求項7に記載の医薬的に許容し得る塩、または請求項8または9に記載の組成物を含む、治療用キット。

【請求項29】

請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物または請求項7に記載の医薬的に許容し得る塩の合成方法。

【請求項30】

前駆体ペプチドをコードする核酸構築体から前駆体ペプチド配列を発現させ、発現生成物を回収し、該前駆体ペプチドを修飾し、請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物ま

たは請求項7に記載の医薬的に許容し得る塩を得ることを含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物または請求項7に記載の医薬的に許容し得る塩の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば、肥満、体重過多、糖尿病、および他の代謝障害の治療における、アシル化グルカゴン類似体、およびその医学的使用に関する。

【背景技術】

【0002】

プレプログルカゴンは、158個のアミノ酸の前駆体ポリペプチドであり、組織中で様々な処理を経て、グルカゴン(Glu)、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(0XM)を含む、多くの構造的に関連するプログルカゴン由来ペプチドを生成する。これらの分子は、グルコースホメオスタシス、インスリン分泌、胃内容排出、および腸の成長、並びに食物摂取の調節を含む多種多様な生理的機能に関与している。

【0003】

グルカゴンは、プレプログルカゴンのアミノ酸53～81位に対応する29個のアミノ酸ペプチドである。オキシントモジュリン(0XM)は、オクタペプチドであるカルボキシ末端伸張(「介在ペプチド1」またはIP-1と呼ばれるプレプログルカゴンのアミノ酸82～89位)およびグルカゴンの完全な29個のアミノ酸配列を含む37個のアミノ酸ペプチドである。GLP-1の主要な生物活性のある断片は、プレプログルカゴンのアミノ酸98～127位に対応する30個のアミノ酸のC末端アミド化ペプチドとして生成される。

【0004】

グルカゴンは肝細胞上のグルカゴン受容体に結合して、グリコーゲンの形で貯蔵されたグルコースを肝臓から放出させるグリコーゲン分解を介して、血液中のグルコースのレベルの維持に役立つ。これらの貯蔵が枯渇してくると、グルカゴンは肝臓を刺激して、糖新生によって追加のグルコースを合成させる。このグルコースは血流中に放出され、低血糖の発生を防止する。

【0005】

GLP-1は、グルコース刺激インスリン分泌を増加することにより、上昇した血中グルコースレベルを低下させ、主に食物摂取を減少させることを介して体重減少を促進する。

【0006】

0XMは、食物の消化に応答し、且つ食事カロリー量に比例して、血液中に放出される。0XMは、ヒトの食欲を抑制し、食物摂取を阻害することが示されている(Cohen et al, Journal of Endocrinology and Metabolism, 88, 4696-4701, 2003; 国際公開第2003/022304号パンフレット)。オキシントモジュリンで処置したラットは、対照のラットより体重増加が低いので、GLP-1の食欲抑制効果と同様の食欲抑制効果に加えて、0XMは別の機序によっても体重に影響しているようだ(Bloom, Endocrinology 2004, 145, 2687)。また、肥満げっ歯動物を0XMで処置すると、その耐糖能を改善(Parlevliet et al, Am J Physiol Endocrinol Metab, 294, E142-7, 2008)し、体重増加を抑制(国際公開第2003/022304号パンフレット)する。

【0007】

0XMは、グルカゴン受容体とGLP-1受容体の両方を活性化する(グルカゴン受容体に対する効力はGLP-1受容体よりも2倍高い)が、これらの各受容体上にもともと存在する天然グルカゴンおよび天然GLP-1より効力は小さい。ヒトグルカゴンもまた、両方の受容体を活性化することができ、GLP-1受容体よりグルカゴン受容体に対して強い優先性を示す。一方GLP-1は、グルカゴン受容体を活性化することができない。オキシントモジュリンの作用機序は、充分には理解されていない。特に、このホルモンの肝外作用が、部分的にGLP-1やグルカゴン受容体によって、または1つまたは複数の未同定の受容体を介するかどうかは不明である。

10

20

30

40

50

【0008】

他のペプチドは、グルカゴン受容体とGLP-1受容体の両方に結合して活性化 (Hjort et al, Journal of Biological Chemistry, 269, 30121-30124, 1994) し、体重増加を抑制し、食物摂取を低下させることが示されている（例えば、国際公開第W02006/134340号、第2007/100535号、第2008/10101号、第2008/152403号、第2009/155257号、第2009/155258号、第2010/070252号、第2010/070253号、第2010/070255号、第2010/070251号、第2011/06497号、第2011/160630号、第2011/160633号、第2013/092703号、第2014/041195号パンフレットを参照）。

【0009】

肥満は、種々の疾患、特に心血管障害 (CVD) 、II型糖尿病、閉塞性睡眠時無呼吸、ある種の癌、および骨関節炎に関連する、世界的に増大しつつある健康問題である。その結果、肥満は寿命を縮めることがわかっている。世界保健機構による2005年の予測によると、全世界で4億人の成人（15才を越える年齢の者）が肥満であると分類されている。米国では、肥満は、喫煙に次いで2番目に大きな予防可能な死因であると考えられている。

【0010】

肥満の増加は、糖尿病の増加を招き、II型糖尿病の約90%のヒトは肥満であると分類され得る。世界中には2億4600万人の糖尿病患者があり、2025年までに3億8000万人が糖尿病になると推定されている。多くの者は、高/異常LDL、高/異常トリグリセリドおよび低HDLを含む他の心血管障害危険因子も有する。

【発明の概要】

【0011】

第1の態様において、本発明は、式R¹-P¹-P²-R²を有する化合物

[式中、

R¹は、H、C₁₋₄アルキル、アセチル、ホルミル、ベンゾイル、またはトリフルオロアセチルであり；

R²は、OHまたはNH₂であり；

P¹は、配列：

H-X2-X3-GTFTSDYSKYLDS AAHDFVEWLLSAを有するペプチドであり；

X2は、Aib、Ala、D-Ala、Ser、N-Me-Ser、Ac3c、Ac4c、およびAc5cから選択され；

X3は、GlnおよびHisから選択され；

P²は、存在しないか、またはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Cys、Glu、Lys、Arg、Dbu、Dpr、およびOrnからなる群から独立に選択される1~20個のアミノ酸単位の配列；

またはその医薬的に許容し得る塩または溶媒和物であり；

は、側鎖が式-Z²-Z¹を有する置換基に結合しているLys、Arg、Orn、またはCysの残基であり；

-Z¹は、鎖の端部に極性基を有し、かつ該極性基から遠位にある鎖の端部にZ²との結合-X-を有する脂肪鎖であり；

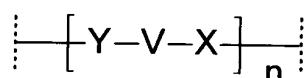
（式中、前記極性基は、カルボン酸またはカルボン酸の生物同配体（bioisostere）、ホスホン酸、またはスルホン酸基を含み；

-X-は、結合（bond）、-CO-、SO-、または-SO₂-である）；

-Z²-は、以下の式のスペーサであり；

【0012】

【化1】



【0013】

10

20

30

40

50

〔式中、

各Yは、独立に、-NH、-NR、-S、または-Oであり（式中、Rは、アルキルもしくは保護基であるかまたはスペースZ²の別の部分へのリンクエージを形成する）；

各Xは、独立に、結合（bond）、CO-、SO-、またはSO₂-であり；

但し、Yが-Sのとき、Xは結合であることを条件とする；

各Vは、独立に、YとXとをつなぐ二価の有機部分であり；

そして、nは1~10である】

あるいはその医薬的に許容し得る塩または溶媒和物を提供する。

【0014】

P¹は、配列：

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS AAHDFVEWLLSA

例えば、

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K（[15-カルボキシ-ペントデカノイル]-isoGlu）-AAHDFVEWLLSA

を有してもよい。

【0015】

本発明の化合物は、

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS AAHDFVEWLLSA-NH₂

例えば、

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K（[15-カルボキシ-ペントデカノイル]-isoGlu）-AAHDFVEWLLSA-NH₂

であってもよい。

【0016】

第2の態様において本発明は、式R¹-P¹-P²-R²を有する化合物

〔式中、

R¹は、H、C_{1~4}アルキル、アセチル、ホルミル、ベンゾイル、またはトリフルオロアセチルであり；

R²は、OHまたはNH₂であり；

P¹は、配列：

His-X2-X3-GTFTSDYSKYL-X15-X16-X17-X18-A-X20-DF1-X24-WLE-X28-Aを有するペプチド

30

であり；

X2は、Aib、Ac3c、Ac4c、およびAc5cから選択され；

X3は、GlnおよびHisから選択され；

X15は、AspおよびGluから選択され；

X16は、Gluおよびから選択され；

X17は、Argおよびから選択され；

X18は、AlaおよびArgから選択され；

X20は、LysおよびHisから選択され；

X24は、Gluおよびから選択され；

X28は、Serおよびから選択され；

40

P²は、存在しないか、またはAla、Leu、Ser、Thr、Tyr、Cys、Glu、Lys、Arg、Dbu、Dp

r、およびOrnからなる群から独立に選択される1~20個のアミノ酸単位の配列であり；

またはその医薬的に許容し得る塩または溶媒和物であり；

は、側鎖が式-Z²-Z¹を有する置換基に結合しているLys、Arg、Orn、またはCysの残基であり；

-Z¹は、鎖の端部に極性基を有し、かつ該極性基から遠位にある鎖の端部にZ²との結合-X-を有する脂肪鎖であり；

（式中、前記極性基は、カルボン酸またはカルボン酸の生物同配体、ホスホン酸、またはスルホン酸基を含み；

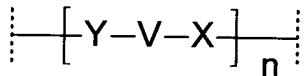
-X-は、結合、-CO-、SO-、または-SO₂-である）；

50

-Z²-は、以下の式のスペーサである；

【0017】

【化2】



【0018】

(式中、

10

各Yは、独立に、-NH、-NR、-S、または-Oであり（式中、Rは、アルキルもしくは保護基であるかまたはスペーサZ²の別の部分へのリンクエージを形成する）；

各Xは、独立に、結合、CO-、SO-、またはSO₂-であり；

但し、Yが-Sのとき、Xは結合であることを条件とする；

各Vは、独立に、YとXとをつなぐ二価の有機部分であり；

そして、nは1～10である）】

あるいはその医薬的に許容し得る塩または溶媒和物を提供する。

【0019】

第2の態様のいくつかの実施形態では、

20

X2は、AibおよびAc4cから選択され；

X3は、Glnであり；

X15は、AspおよびGluから選択され；

X16は、であり；

X17は、Argであり；

X18は、Alaであり；

X20は、LysおよびHisから選択され；

X24は、Gluであり；

X28は、Serである。

【0020】

残基の有用な組み合わせとして、以下の場合が挙げられる：

30

X2がAc4cであり、かつX20がLysである；または

X2がAibであり、かつX20がHisである。

【0021】

追加的または代替的に、以下の場合が望ましい：

X15がEの場合X2がAibである；または、

X2がAc4cの場合X15がDである。

【0022】

特に興味深い置換基Z²Z¹として、[17-カルボキシ-ヘプタデカノイル]-isoGlu-Peg3-Peg3および[17-カルボキシ-ヘプタデカノイル]-isoGlu-GSGSGGが挙げられる。

【0023】

40

P¹は、

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD RAAKDFIEWLESA

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD RAAKDFIEWLESA

H-Aib-QGTFTSDYSKYLE RAAKDFIEWLESA

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD RAAKDFIEWLESAおよび

H-Aib-QGTFTSDYSKYLE RAAHDFIEWLESA

例えば、

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル]-isoGlu-GSGSGG)-RAAK

50

DFIEWLESA

H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG) -RAAK
DFIEWLESA

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG) -RAA
KDFIEWLESAおよび

H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3) -R
AAHDFIEWLESA

から選択される配列を有してもよい。

【 0 0 2 4 】

本発明の化合物は、

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD RAAKDFIEWLESA-NH₂

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD RAAKDFIEWLESA-NH₂

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE RAAKDFIEWLESA-NH₂

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD RAAKDFIEWLESA-NH₂ および

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE RAAHDFIEWLESA-NH₂

例えれば、

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3)
-RAAKDFIEWLESA-NH₂

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG) -RA
AKDFIEWLESA-NH₂

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG) -RA
AKDFIEWLESA-NH₂ および

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3)
-RAAHDFIEWLESA-NH₂

から選択されてもよい。

【 0 0 2 5 】

第2の態様の代替的な実施形態では、

X2は、AibおよびAc4cから選択され；

X3は、GlnおよびHisから選択され；

X15は、Aspであり；

X16は、Gluであり；

X17は、Argおよび から選択され；

X18は、AlaおよびArgから選択され；

X20は、Lysであり；

X24は、Gluおよび から選択され；

X28は、Serおよび から選択される。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、X28が のとき、X2がAc4cである。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、X3がHisのとき、X2がAc4cでありかつX17が である。

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、X17が のとき、Z²Z¹が [17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3または [17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGluである。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、X24またはX28が のとき、Z²Z¹が [17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGGである。

【 0 0 3 0 】

P¹は、

10

20

30

40

50

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE AAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE RAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE RAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE AAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE RAKDFIEWLESA
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERA AKDFI WLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERA AKDFI WLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI WLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE Aおよび
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE A

10

例えば、

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -AAKDFIEWLE
SA

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3)
-RAKDFIEWLESA

H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3)
-RAKDFIEWLESA

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -AAKDFIEWL
ESA

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -RAKDFIEWL
ESA

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERA AKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSG
G) -WLESA

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERA AKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGS
GG) -WLESA

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGS
GG) -WLESA

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERA AKDFIEWLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-
GSGSGG) -Aおよび

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu
-GSGSGG) -A-NH₂

から選択される配列を有してもよい。

【 0 0 3 1 】

本発明の化合物は、

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE AAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE AAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERA AKDFI WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERA AKDFI WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE A-NH₂ および
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE A-NH₂

40

例えば、

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -AAKDFIEW
LESA-NH₂

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3
)-RAKDFIEWLESA-NH₂

H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3

50

) -RAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -AAKDFIE
 WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -RAKDFIE
 WLESA-NH₂
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSG
 SGG) -WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GS
 GSGG) -WLESA-NH₂ 10
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GS
 GSGG) -WLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu
 -GSGSGG) -A-NH₂ および
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAKDFIEWLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu
 -GSGSGG) -A-NH₂
 から選択されてもよい。

【 0 0 3 2 】

誤解を避けるために、本発明の全ての態様において、明示的に異なっていてもよいことが記載されていない位置は固定されており、従って、記載された残基のみを含むことがある。

20

【 0 0 3 3 】

全ての態様において、本発明の化合物は、残基 、 すなわち、以下に詳述するような、側鎖が置換基-Z²-Z¹-に結合したLys、Arg、OrnおよびCysから選択される残基を含む。

【 0 0 3 4 】

この置換基は、 炭素から遠位にある側鎖の端部の官能基に結合している。よって、その官能基が介在する相互作用（例えば、分子内や分子間の相互作用）に関与するLys、Arg、OrnまたはCys側鎖の通常の能力は、置換基の存在によって減少したりまたは完全に排除され得る。よって、化合物の全体的な特性は、残基 として存在する実際のアミノ酸の違いに比較的影響されないこともある。したがって、 が存在できる任意の位置に、任意の残基Lys、Arg、Orn、およびCysが存在し得ると考えられる。しかしながら、特定の実施形態では、 のアミノ酸成分がLysであることが有利なことがある。

30

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、

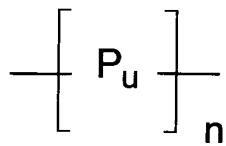
-Z¹は、式A-B-Alk-(CO)-のアシル基または、式A-B-Alk-(SO₂)-のスルホニル基であり；
 Aは、-COOHまたはカルボン酸の生物同配体であり；
 Bは、結合、C₆アリーレン、またはC₆アリーレン-0-であり；
 Alkは、長さが6~18個の炭素原子の飽和または不飽和の脂肪鎖であり、場合によりフルオロ、C_{1~4}アルキル、トリフルオロメチル、ヒドロキシメチル、アミノ、ヒドロキシル、C_{1~4}アルコキシ、オキソ、およびカルボキシルから選択される1つまたは複数の置換基により置換されており；

40

-Z²-は、-S_A-、-S_A-S_B-、または-S_B-S_A-であり；
 -S_A-は、-Glu、-Glu、-Asp、-Asp、Ala、-Ala(3-アミノプロパン酸)、およびGaba(4-アミノブタン酸)から選択される単一のアミノ酸残基であり；
 -S_B-は、以下の一般式のリンカーである。

【 0 0 3 6 】

【化 3】



【 0 0 3 7 】

上記式中、nは1～10であり、

10

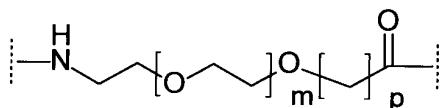
各 P_U は独立に P_U^i および P_U^{i+1} から選択され；

各 P_{11}^i は独立に天然または非天然のアミノ酸残基であり；かつ、

各 P_{11111} は、独立に、以下の一般式の残基である。

〔 0 0 3 8 〕

【化 4】



20

【 0 0 3 9 】

上記式中、 m は0～5であり、 p は1、3、4、または5である。

〔 0 0 4 0 〕

本発明のいずれの態様においても、R¹は、H、およびC₁₋₄アルキル（例えば、メチル）から選択されてもよい。

【 0 0 4 1 】

本発明の化合物は、グルカゴン類似体ペプチドである。本明細書においてグルカゴン類似体ペプチドと称する場合、本発明の化合物または本明細書の文脈により規定されるペプチドP¹またはP¹-P²のことを指すと理解されるべきである。本発明において化合物と称する場合、特に別段の指定がない、あるいは文脈から除外されていない限り、本発明の化合物の任意の医薬的に許容し得る塩（例えば、酢酸塩または塩化物塩）または溶媒和物を含むものと理解すべきである。

30

〔 0 0 4 2 〕

本発明は、本明細書で定義される本発明の化合物（既に記載されたその医薬的に許容し得る塩または溶媒和物を含む）を、担体との混合物中に含む組成物を提供する。好適な実施態様において、本組成物は医薬組成物であり、担体は医薬的に許容し得る担体である。グルカゴン類似体ペプチドは、グルカゴン類似体の医薬的に許容し得る塩の形態でもよい。

[0 0 4 3]

本明細書に記載の化合物は、特に、体重増加を防止するかまたは体重減少を促進することに利用できる。「予防する」とは、治療が無い場合と比較して抑制または低下させることを意味し、必ずしも体重増加の完全な停止を意味するものではない。本ペプチドは、食物摂取の低下および/またはエネルギー消費の上昇を引き起こし得て、結果体重への効果が観察されることがある。体重への効果とは独立して、本発明の化合物は、グルコース調節および/または循環コレステロールレベルに対し有効な効果を有し得て、循環LDLレベルを低下させ、HDL/LDL比を上昇させることもある。すなわち本発明の化合物は、体重過多により引き起こされるかまたはこれを特徴とする任意の症状の直接的または間接的治療法、例えば、肥満、病的肥満、肥満に関連する炎症、肥満に関連する胆嚢疾患、肥満誘発性睡眠時無呼吸の治療および/または予防に使用することができる。これらはまた、血糖コ

40

ントロール不良、または脂質異常症（例えば、LDLレベルの上昇またはHDL/LDL比の低下）、糖尿病（特に2型糖尿病）、メタボリック症候群、高血圧、アテローム性脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、末梢動脈疾患、脳卒中または微小血管疾患により引き起こされるかまたはこれを特徴とする症状の予防に使用できることもある。これらの症状に対する本発明の効果は、体重への当該症状に対する効果の結果としてであってもよく、または独立したものでもよい。

【0044】

本発明はまた、医学的治療方法、特に上記のような症状の治療方法で使用するための本発明の化合物を提供する。

【0045】

本発明はまた、上記のような症状の治療のための医薬の調製における本発明の化合物の使用を提供する。

【0046】

本発明の化合物は、糖尿病、肥満、脂質異常症、または高血圧症の治療のための薬剤との併用療法の一部として投与することができる。

【0047】

このような場合には、これらの2つの活性物質は、一緒にまたは別々に投与してもよく、同じ医薬製剤の一部としてまたは別個の製剤として投与してもよい。

【0048】

従って本発明の化合物は、ビグアニド（例えばメトホルミン）、スルホニル尿素、メグリチニドまたはグリニド（例えばナテグリニド）、DPP-IV阻害剤、SGLT2阻害剤、グリタゾン、インスリンまたはインスリン類似体を含むがこれらに限定されない抗糖尿病薬と組み合わせて使用することができる。インスリン類似体の例としては、Lantus（商標）、Novorapid（商標）、Humalog（商標）、Novomix（商標）、Actraphane HM（商標）、Levemir（商標）、およびApidra（商標）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0049】

本化合物はさらに、グルカゴン様ペプチド受容体1アゴニスト、ペプチドYYもしくはその類似体、カンナビノイド受容体1アンタゴニスト、リパーゼ阻害剤、メラノコルチン受容体4アゴニスト、メラニン濃縮ホルモン受容体1アンタゴニスト、フェンテルミン（単独で、またはトピラメートと組み合わせて）、ノルエピネフリン/ドーパミン再取り込み阻害剤とオピオイド受容体アンタゴニストとの組み合わせ（例えば、ブロピオントナルトレキソンとの組み合わせ）、またはセロトニン作動薬（例えば、ロルカセリン）を含むがこれらに限定されない抗肥満薬と組み合わせて使用することができる。

【0050】

本化合物はさらに、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシンII受容体遮断薬、利尿薬、ベータ遮断薬、またはカルシウムチャネル遮断薬を含むがこれらに限定されない抗高血圧薬と組み合わせて使用することができる。

【0051】

本化合物は、スタチン、フィブラーート、ナイアシン、またはコレステロール吸収阻害剤を含むがこれらに限定されない抗脂質異常症薬と組み合わせて使用することができる。

【0052】

すなわち本発明はさらに、本発明の化合物と、例えば上記した抗糖尿病薬、抗肥満薬、抗高血圧薬、または抗脂質異常症薬とを含む組成物または治療用キットを提供する。また、医学的治療方法における使用のための、特に上記した症状の治療のための、かかる組成物または治療用キットも提供する。

【0053】

本発明の化合物は、合成化学によって製造することができる。従って本発明は、本発明の化合物の合成方法を提供する。

【0054】

また本発明は、組換方法と合成方法の組み合わせによって製造することもできる。本方

10

20

30

40

50

法は、前駆体ペプチド配列を宿主細胞中で発現させ、場合によりその結果產生された化合物を精製し、そして1つまたは複数のアミノ酸を追加または修飾（adding or modifying）して本発明の化合物、またはアミノ酸配列P¹またはP¹-P²を含む化合物を製造することを含む。修飾工程は、Orn残基を導入すること（前駆体残基を修飾することによって）、および/または残基¹の部位に置換基Z²Z¹を導入することを含んでもよい。

【0055】

前駆体ペプチドは、細胞内で前駆体ペプチドをコードする核酸から発現させてもよく、またはかかる核酸を含む無細胞発現系内で発現させてもよい。

【発明を実施するための形態】

【0056】

本明細書を通して、天然アミノ酸には、従来の1文字コードと3文字コードを使用し、他のアミノ酸、例えばAib（-アミノイソ酪酸）、Orn（オルニチン）、DBU（2,4-ジアミノ酪酸）、Dpr（2,3-ジアミノプロパン酸）、Ac3c（1-アミノ-シクロプロパンカルボン酸）、Ac4c（1-アミノ-シクロブタンカルボン酸）およびAc5c（1-アミノ-シクロヘキサンカルボン酸）には、一般に認識されている略語を使用する。

【0057】

Ac3c、Ac4c、およびAc5cは、同様の構造を有し、ある程度交換可能であるが、Ac4cが好みことがある。

【0058】

グルカゴンは、プレプログルカゴンのアミノ酸53～81位に対応する配列を有する29個のアミノ酸ペプチドであり、配列His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thrを有する。オキシントモジュリン（OXM）は、オクタペプチドのカルボキシ末端伸張（「介在ペプチド1」またはIP-1と呼ばれるプレプログルカゴンのアミノ酸82～89位であり、配列Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Alaを有する）およびグルカゴンの完全な29個のアミノ酸配列を含む37個のアミノ酸ペプチドである；すなわち、ヒトオキシントモジュリンの全配列は、His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Asn-Ile-Alaである。GLP-1の主要な生物活性断片は、プレプログルカゴンのアミノ酸98～127位に対応する30個のアミノ酸のC末端アミド化ペプチドとして生成される。

【0059】

すなわち用語「天然のグルカゴン」は、配列H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OHを有する天然のヒトグルカゴンを指す。

【0060】

本発明の化合物の配列P¹内のアミノ酸は、通常のN末端からC末端方向へ1～29へ連続して番号を付すことが考えられる。従ってP¹内の「位置」と称する場合、天然のヒトグルカゴンや他の分子内の位置と同様であると理解すべきである。

【0061】

本発明の化合物は、例えば、グルカゴン類似体ペプチドのコンフォメーションおよび/または二次構造を安定化させるために、および/または、国際公開第99/46283号パンフレットに記載されているように、酵素的加水分解に対してグルカゴン類似体ペプチドをより耐性にするために、1～20個のアミノ酸のC末端ペプチド配列P²を含んでよい。

【0062】

存在する場合、P²は、1～20個のアミノ酸残基のペプチド配列を示し、例えば1～15個の範囲内、より好ましくは1～10個の範囲内、特に1～7個のアミノ酸残基の範囲内、例えば1、2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸残基、例えば6個のアミノ酸残基の範囲内である。ペプチド配列P²中のアミノ酸残基の各々は、Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Cys、Glu、Lys、Arg、Dbu（2,4-ジアミノ酪酸）、Dpr（2,3-ジアミノプロパン酸）、およびOrn（オルニチン）から独立して選択することができる。好ましくはアミノ酸残基は、Ser、Thr、Tyr

10

20

30

40

50

、Glu、Lys、Arg、Dbu、Dpr、およびOrnから選択され、より好ましくはGlu、Lys、およびCysからのみ選択される。上記アミノ酸は、D-またはL-配向を有することができ、ある実施態様において、L-配向を有する。特に好適な配列P²は、4、5、6、または7個の連続リジン残基の配列（すなわち、Lys₃、Lys₄、Lys₅、Lys₆、またはLys₇）であり、特に5または6個の連続リジン残基の配列である。P²の他の典型的な配列は、国際公開第01/04156号パンフレットに記載されている。代替的に、配列P²のC末端残基は、Cys残基でもよい。これは、化合物の修飾（例えば、PEG化、またはアルブミンへの結合）の助けとなりうる。かかる実施態様において、配列P²は、例えば1個のアミノ酸のみの長さ（すなわちP²=Cys）であるか、または2、3、4、5、6個、またはさらに多くのアミノ酸の長さでもよい。従って他のアミノ酸は、ペプチドP¹と末端Cys残基との間のスペーサとして機能する。

10

【0063】

ペプチド配列P²は、ヒトOXMのIP-1部分の対応する配列（これは、配列Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Alaを有する）と25%以下の配列同一性を有する。

【0064】

あるペプチドまたはポリペプチド配列の、別のポリペプチド配列（例えばIP-1）に対する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、これら2つを互いにアラインさせ、必要であれば最適なアラインのためにギャップを導入した時、あるポリペプチド配列における、別のポリペプチドの対応配列における対応位置と同一であるアミノ酸残基の数の割合パーセントとして計算される。%同一性の値は、WU-BLAST-2 (Altschulら、Methods in Enzymology, 266 : 460-480 (1996)) を用いて測定することができる。WU-BLAST-2はいくつかの検索パラメータを使用し、その大部分はデフォルト値に設定されている。調整可能なパラメータは、以下の値に設定する：オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値(T)=11。%アミノ酸配列同一性の値は、WU-BLASTによって決定されるマッチする同一残基の数を、基準配列の残基の総数で割って、100を掛けることにより決定される（アラインスコアを最大にするために、WU-BLAST-2によって基準配列に導入されたギャップは無視する）。

20

【0065】

すなわち、P²がIP-1の8個のアミノ酸と最適にアラインされた時、これが有するIP-1の対応するアミノ酸と同一であるアミノ酸は、2個以下である。

【0066】

30

ある実施態様において、P²は存在しない。

【0067】

は、側鎖が置換基Z²-Z¹に結合したLys、Arg、OrnまたはCysの残基である。特定の理論に拘束されるものではないが、この置換基は血流中の血漿タンパク質（例えば、アルブミン）に結合することで本発明の化合物を酵素分解から遮断し、これにより化合物の半減期を上昇させる。また、例えばグルカゴン受容体および/またはGLP-1受容体に対する、化合物の効力を調節することもできる。

【0068】

Z¹基

Z¹は、本明細書では、-X-と記載されるZ²との結合を有し、Z²に対する結合から遠位にある鎖の端部に極性基を有する脂肪鎖である。-X-は、例えば、結合、アシル(-CO-)、スルフィニル(-SO-)、またはスルホニル(-SO₂-)であり、極性基に対して1位、つまり、極性基から遠位の鎖の端部にある。

40

【0069】

好ましくは、極性基は、酸性または弱酸性基、例えば、カルボン酸またはカルボン酸の生物同配体、ホスホネート、またはスルホネートである。極性基は、水中において、-2~12、より好ましくは1~7、より好ましくは3~6のpK_aを有し得る。特定の好ましい極性基は、4~5のpK_aを有する。

【0070】

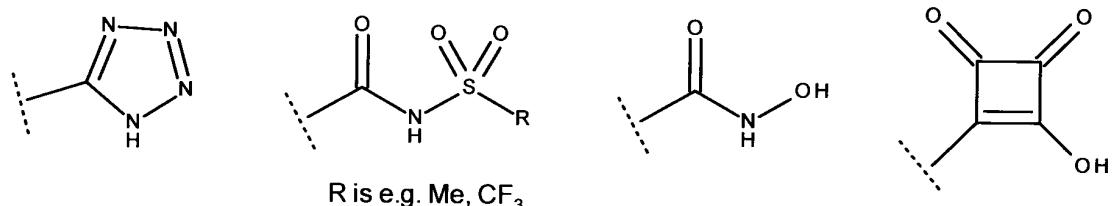
極性基は、好ましくは、カルボン酸またはカルボン酸生物同配体を含む。適切なカルボ

50

ン酸生物同配体は、当技術分野で公知である。好ましくは、生物同配体は、対応するカルボン酸と同様のpK_aを有するプロトンを有する。適切な生物同配体の例として、以下に示すようなテトラゾール、アシルスルフォミド、アシルヒドロキシルアミン、およびスクアリン酸誘導体が挙げられるが、これらに限定されない（---は、結合点を示す。Rは例えはMe, CF₃である。）。

【0071】

【化5】



10

【0072】

極性基は、式A-B-（式中、Aはカルボン酸（-COOH）またはカルボン酸の生物同配体、ホスホン酸（-P(O)(OH)₂）またはスルホン酸（-SO₃OH）基であり、Bは、Aと脂肪鎖との間の結合またはリンカーである）の基を有し得る。いくつかの実施形態では、極性基は-COOHである、つまり、Aが-COOHでBが結合である。

20

【0073】

Bがリンカーの場合、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、C₆アリーレン、またはC₅₋₆ヘテロアリーレン、またはC₆アリーレン-0-、またはC₅₋₆ヘテロアリーレン-0-であり得る。

【0074】

Bがフェニレンの場合、例えば、1,2-フェニレン、1,3-フェニレン、1,4-フェニレンから選択され得て、好ましくは、（A-B-が4-安息香酸置換基または4-安息香酸生物同配体となるように）1,4-フェニレンである。Bがフェニレン-0-の場合、例えば、1,2-フェニレン-0-、1,3-フェニレン-0-、1,4-フェニレン-0-から選択され得て、好ましくは、1,4-フェニレン-0-である。Bの各フェニレンは、場合により、フルオロ、メチル、トリフルオロメチル、アミノ、ヒドロキシル、およびC₁₋₄アルコキシ、好ましくは、メトキシから選択される1つまたは複数の置換基で置換され得る。極性基のpK_aをわずかに変更するために、置換基の同一性および位置を選択し得ることが理解される。適切な誘導的またはメソメリ-的な電子吸引または電子供与基およびそれらの位置的効果は、当該分野で公知である。いくつかの実施形態では、Bは、C₅₋₆ヘテロアリーレン、例えば、ピリジニレンまたはチオフラニレンであり得て、場合により上述のように置換され得る。

30

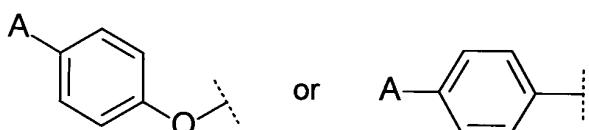
【0075】

例えば、いくつかの実施形態では、A-B-は、以下から選択され得る。

【0076】

【化6】

40



【0077】

好ましくは、Aは-COOHである。いくつかの好ましい極性基では、Aはカルボン酸であり、BはC₆アリーレン-0-である。

【0078】

50

本明細書中で使用される脂肪鎖は、炭素原子、主として水素または水素様の原子で置換された炭素原子の鎖、例えば炭化水素鎖を含む部分を指す。このような脂肪鎖は、多くの場合、親油性とされるが、分子全体の親油性の性質は置換基によって変わり得ることが理解される。

【0079】

脂肪鎖は、脂肪族であってもよい。完全に飽和されていてもよく、または1つ以上の二重または三重結合を含んでいてもよい。各二重結合は、存在する場合、EまたはZ配置であり得る。脂肪鎖は、その長さ内に1つまたは複数のシクロアルキレンまたはヘテロシクロアルキレン部分を有していてもよく、追加的または代替的に1つまたは複数のアリーレンまたはヘテロアリーレン部分を有していてもよい。例えば、以下に示すように、脂肪鎖は、その長さ内にフェニレンまたはピペラジニレン部分が組み込まれていてもよい（式中、---は、鎖内の結合点を表す）。

【0080】

【化7】



10

20

【0081】

脂肪鎖は、脂肪酸、例えば、6~12個の炭素原子の脂肪族末端を有する中鎖脂肪酸（MCF A）、13~21個の炭素原子の脂肪族末端を有する長鎖脂肪酸（LCFA）、または22個以上の炭素原子の脂肪族末端を有する超長鎖脂肪酸（LCFA）から誘導してもよい。適切な脂肪鎖を誘導し得る直鎖飽和脂肪酸の例としては、トリデシル（トリデカン）、ミリスチン（テトラデカン）酸、ペンタデシル（ペンタデカン）、パルミチン（ヘキサデカン）酸、およびマルガリン（ヘプタデカン）酸が挙げられる。適切な脂肪鎖を誘導し得る直鎖不飽和脂肪酸の例としては、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、およびオレイン酸が挙げられる。

【0082】

30

脂肪鎖は、アミド結合、スルフィンアミド結合、スルホンアミド結合によって、またはエステル結合によって、またはエーテル、チオエーテル、またはアミン結合によって、Z²に接続されていてもよい。したがって、脂肪鎖は、位置に、つまり、極性基から遠位の位置に、Z²への結合またはアシル（-CO-）、スルフィニル（-SO-）、またはスルホニル（-SO₂-）基を有し得る。好ましくは、脂肪鎖は、極性基から遠位の位置にアシル基（-CO-）基を有し、アミドまたはエステル結合によってZ²に接続される。

【0083】

いくつかの実施形態では、Z¹は、式A-B-Alk-X-の基である（式中、A-B-は、先に定義した極性基であり、Xは、結合、アシル（-CO-）、スルフィニル（-SO-）、またはスルホニル（-SO₂-）であり、そして、Alkは、場合により1つまたは複数の置換基により置換されてもよい脂肪鎖である）。この脂肪鎖は、好ましくは、長さが6~18個の炭素原子（例えば、C₆₋₁₈アルキレン）、より好ましくは、長さが8~18個の炭素原子（例えば、C₈₋₁₈アルキレン）、更により好ましくは、長さが12~16個の炭素原子（例えば、C₁₂₋₁₆アルキレン）であり、飽和であっても不飽和であってもよい。好ましくは、Alkは飽和している、つまり、好ましくは、Alkはアルキレンである。

40

【0084】

いくつかの実施形態では、Z¹は、式A-B-Alk-(CO)-のアシル基、または、式A-B-Alk-(SO₂)-のスルホニル基である。

【0085】

脂肪鎖上の任意の置換基は、独立に、フルオロ、C₁₋₄アルキル、好ましくは、メチル、

50

トリフルオロメチル、ヒドロキシメチル、アミノ、ヒドロキシル、C₁₋₄アルコキシ、好ましくは、メトキシ、オキソ、およびカルボキシルから選択し得て、鎖に沿った任意の箇所に配置し得る。いくつかの実施形態では、各任意の置換基は、フルオロ、メチル、およびヒドロキシルから選択される。複数の置換基が存在する場合、これらの置換基は同じでも異なるっていてもよい。好ましくは、置換基の数は、0~3個であり、より好ましくは、脂肪鎖は非置換である。

【0086】

好ましくは、Z¹は、式A-B-アルキレン-(CO)-のアシル基である（式中、AおよびBは、先に定義した通りである）。

【0087】

いくつかの実施形態では、Z¹は、
4-カルボキシフェノキシノナノイル HOOC-C₆H₄-O-(CH₂)₈-(CO)-である。

【0088】

特定の好ましいZ¹は、式 HOOC-(CH₂)₁₂₋₁₈-COOHの長鎖飽和、-ジカルボン酸、好ましくは、脂肪族鎖中に偶数個の炭素原子を有する長鎖飽和、-ジカルボン酸から誘導される。例えば、Z¹は、

13-カルボキシトリデカノイル HOOC-(CH₂)₁₂-(CO)-

15-カルボキシペンタデカノイル HOOC-(CH₂)₁₄-(CO)-； または、

17-カルボキシヘプタデカノイル HOOC-(CH₂)₁₆-(CO)-

であり得るが、これらに限定されない。

【0089】

カルボン酸基は、本明細書に詳述する生物同配体によって置換されてもよい。

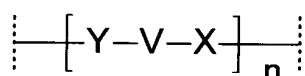
【0090】

Z²基

Z²は、Z¹を のアミノ酸成分の側鎖に結合するスペーサである。最も一般的には、Z²は、窒素、酸素、または硫黄原子であってもよいYにより一方の末端で結合し、かつ、結合(bond)、またはアシル(-CO-)、スルフィニル(-SO-)、またはスルホニル(-SO₂-)であってもよいXにより他方の末端で結合するスペーサである。従って、Z²は、以下の式のスペーサであり得る（---は、結合点を示す）。

【0091】

【化8】



【0092】

式中、

Yは、-NH、-NR、-S、または-O（式中、Rは、アルキルもしくは保護基であってもよく、あるいはスペーサの別の部分へのリンクエージを形成し得る）であってもよく、残りの原子価によりZ¹に対する結合を形成し；

Xは、結合、CO-、SO-、またはSO₂-であってもよく、残りの原子価により のアミノ酸成分の側鎖に対する結合を形成し；

Vは、YとXとをつなぐ二価の有機部分であり；

そして、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10でありうる。nが2以上のとき、各Y、V、およびXは、Y、V、およびXのいずれとも独立している。

【0093】

従って、Z²は、YとXの性質およびZ¹および側鎖上の対応する結合基に応じて、それぞれの端部において、アミド、スルフィンアミド、スルホンアミド、またはエステル結合によって、またはアミノ、エーテル、またはチオエーテル結合によって、結合されていてもよ

10

20

30

40

50

い。好ましくは、Yが-Sのとき、Xは結合 (bond) である。nが2以上のとき、各Vは、リンクエージにより各隣接するVにも、結合してもよい。好ましくは、リンクエージは、アミド、エーテル、またはスルホンアミドであり、最も好ましくはアミドである。従って、いくつかの実施形態では、各Yは-NHまたは-NRであり、各XはCO-またはSO₂-である。

【0094】

いくつかの実施形態では、Z²は、式-S_A-、-S_B-、-S_A-S_B-、または-S_B-S_A-のスペーサである（式中、S_AおよびS_Bは、以下のように定義される）。

【0095】

いくつかの実施形態では、Z²は、-S_A-または-S_B-S_A-から選択される、つまり、[側鎖]-Z²Z¹は[側鎖]-S_A-Z¹または[側鎖]-S_B-S_A-Z¹である。

【0096】

S_A基

S_Aは、単一のアミノ酸残基またはアミノ酸誘導体の残基、特に、C末端でカルボキシ部分の代わりにスルフィニルまたはスルホニルを有するアミノ酸誘導体残基であり得る。追加的または代替的に、単一のアミノ酸残基は、N末端で窒素原子の代わりに酸素または硫黄原子を有してもよい。好ましくは、S_Aは、単一のアミノ酸残基である。

【0097】

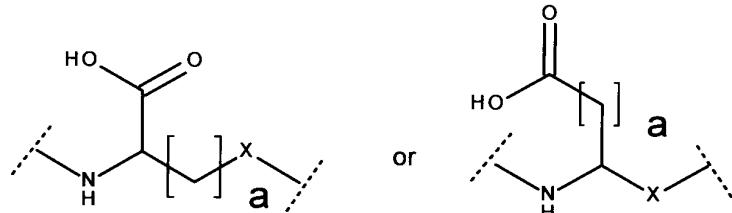
いくつかの実施形態では、アミノ酸は、-Glu、-Glu、-Asp、-Asp、Ala、-Ala (3-アミノプロパン酸)、およびGaba (4-アミノブタン酸) から選択され得る。アミノ酸は、D型またはL型、またはラセミ体 (racemic) であっても、エナンチオマ純度が高められた (enantioenriched) ものであってもあってもよいことが理解される。いくつかの実施形態では、アミノ酸はL-アミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸はD-アミノ酸である。

【0098】

いくつかの好ましい実施形態では、S_Aは、-Glu、-Glu、-Asp、および-Aspを有するカルボン酸置換基、およびそれらのスルフィニルおよびスルホニル誘導体を有することが好ましい。従って、いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、以下の式である。

【0099】

【化9】



【0100】

式中、-X-は、-CO-、-SO-、-SO₂-、好ましくは、-CO-であり、aは1または2、好ましくは、2である。いくつかの実施形態では、カルボン酸はエステルであり、アミノ酸残基は、以下の式である。

【0101】

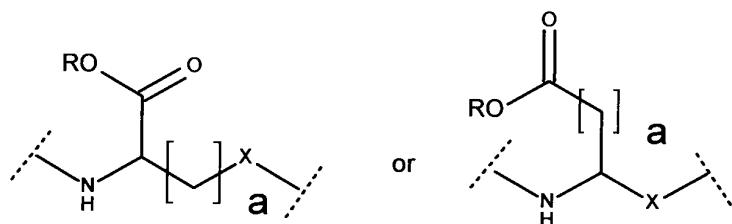
10

20

30

40

【化10】



10

【0102】

式中、-X-は、-CO-、-SO-、-SO₂-、好ましくは-CO-であり、aは1または2、好ましくは2であり、Rは、C_{1~4}アルキルまたはC₆アリールである。好ましくは、Rは、C_{1~4}アルキル、好ましくは、メチルまたはエチル、より好ましくはエチルである。

【0103】

好ましくは、S_Aは-Gluである。

【0104】

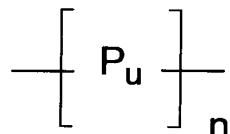
S_B基

S_Bは、以下の一般式のリンカーであり得る。

【0105】

20

【化11】



【0106】

式中、P_Uはポリマー単位であり、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。リンカ-S_Bの一方の末端は、-NH、-NR、-S、または-Oであり（式中、Rは、アルキルもしくは保護基であってもよく、あるいはポリマー単位の別の部分へのリンクを形成し得る）、一方、他方の末端は、結合、またはCO-、SO-、またはSO₂-である。従って、各ポリマー単位P_Uは、YとXの性質およびZ¹、S_A、およびLys上の対応する結合基に応じて、それぞれの端部において、アミド、スルフィンアミド、スルホンアミド、またはエステル結合によって、またはアミノ、エーテル、またはチオエーテル結合によって、結合されていてよい。

30

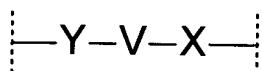
【0107】

いくつかの実施形態では、各P_Uは、独立に、以下の式の単位であってよい。

【0108】

【化12】

40



【0109】

式中、Yは、-NH、-NR、-S、または-O（式中、Rは、アルキルもしくは保護基であってもよく、あるいはスペーサの別の部分へのリンクを形成し得る）であってもよく、残りの原子価によりZ¹に対する結合を形成し；

Xは、結合、CO-、SO-、またはSO₂-であってもよく、残りの原子価によりLysに対する結

50

合を形成し；

Vは、YとXとをつなぐ二価の有機部分である。

【0110】

いくつかの実施形態では、Vは天然または非天然のアミノ酸の - 炭素、つまり、Vは-CH_{R^{AA}}-である（式中、R^{AA}はアミノ酸側鎖である）、あるいは、Vは場合により置換されたC₁~₆アルキレンである、あるいは、Vは直列に1つまたは複数のエチレンゲリコールの単位を含む鎖である。この鎖は、PEG鎖としても知られ、例えば、-CH₂CH₂- (OCH₂CH₂)_m-O-(CH₂)_p-である（式中、mは0、1、2、3、4、または5であり、pは1、2、3、4、または5であり、XがCO₂のとき、pは好ましくは、1、3、4、または5である）。任意のアルキレン置換基として、フルオロ、メチル、ヒドロキシ、ヒドロキシメチル、およびアミノが挙げられる。

10

【0111】

好ましいP_U単位として、以下の(i)~(iii)が挙げられる。

(i) 単一のアミノ酸残基 : P_Uⁱ

(ii) ジペプチド 残基 : P_Uⁱⁱ

(iii) アミノ-(PEG)_m-カルボン酸残基 : P_Uⁱⁱⁱ

これらは、いかなる組み合わせまたは順番で存在してもよい。例えば、S_Bは、1つまたは複数のP_Uⁱ、P_Uⁱⁱ、およびP_Uⁱⁱⁱのそれぞれを任意の順番で含んでもよく、あるいは1つまたは複数のP_Uⁱ、P_Uⁱⁱ、およびP_Uⁱⁱⁱの単位のみを含んでもよく、あるいはP_UⁱおよびP_Uⁱ、P_Uⁱ、およびP_Uⁱⁱⁱ、またはP_UⁱⁱおよびP_Uⁱⁱⁱから選択される1つまたは複数の単位を含んでもよい。

20

【0112】

(i) P_Uⁱ 単一のアミノ酸残基

各P_Uⁱは、独立に、天然または非天然のアミノ酸残基、例えば、Gly、Pro、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Cys、Phe、Tyr、Trp、His、Lys、Arg、Gln、Asn、-Glu、-Glu、Asp、Ser、Thr、Gaba、Aib、-Ala、5-アミノペントノイル、6-アミノヘキサノイル、7-アミノヘプタノイル、8-アミノオクタノイル、9-アミノノナノイル、および10-アミノデカノイルから選択され得る。好ましくは、P_Uⁱアミノ酸残基は、Gly、Ser、Ala、Thr、およびCys、より好ましくは、GlyおよびSerから選択される。

【0113】

30

いくつかの実施形態では、S_Bは、-(P_Uⁱ)_n-（式中、nは1~8、より好ましくは5~7、最も好ましくは6）である。いくつかの好ましい実施形態では、S_Bは-(P_Uⁱ)_n-（式中、nは6であり、各P_Uⁱは独立にGlyまたはSerから選択される）であり、好ましい配列は-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly-である。

【0114】

(ii) P_Uⁱⁱ ジペプチド残基

各P_Uⁱⁱは、独立に、アミド結合により結合した2個の天然または非天然のアミノ酸残基を含む任意のジペプチド残基から選択され得る。好ましいP_Uⁱⁱジペプチド残基として、Gly-Gly、Gly-Ser、Ser-Gly、Gly-Ala、Ala-Gly、およびAla-Ala、より好ましくは、Gly-SerおよびGly-Glyが挙げられる。

40

【0115】

いくつかの実施形態では、S_Bは-(P_Uⁱⁱ)_n-（式中、nは2~4、より好ましくは3、そして各P_Uⁱⁱは、独立に、Gly-SerおよびGly-Glyから選択される）である。いくつかの好ましい実施形態では、S_Bは-(P_Uⁱⁱ)_n-であり、nは3であり、そして各P_Uⁱⁱは、独立に、Gly-SerおよびGly-Glyから選択され、好ましい配列は-(Gly-Ser)-(Gly-Ser)-(Gly-Gly)である。

【0116】

P_UⁱおよびP_Uⁱⁱ内に立体中心を有するアミノ酸は、ラセミ体（racemic）であっても、エナンチオマ純度が高められた（enantioenriched）ものであっても、またはエナンチオが純粋（enantiopure）であってもよい。いくつかの実施形態では、各アミノ酸は、独立にL

50

-アミノ酸である。いくつかの実施形態では、各アミノ酸は、独立にD-アミノ酸である。

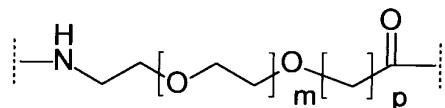
【0117】

(iii) P_U^{iii} アミノ-(PEG)_m-カルボン酸残基

各 P_U^{iii} は、独立に、以下の一般式の残基であり得る。

【0118】

【化13】



10

【0119】

式中、mは0、1、2、3、4、または5、好ましくは1または2であり、そしてpは1、3、4、または5、好ましくは1である。

【0120】

いくつかの実施形態では、mは1でありpは1である、つまり、 P_U^{iii} は、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸({2-[2-アミノエトキシ]エトキシ}酢酸や、H₂N-PEG₃-COOH)としても知られる)の残基である。この残基は、本明細書で-PEG₃-とも呼ばれる。

【0121】

20

いくつかの実施形態では、mは2でありpは1である、つまり、 P_U^{iii} は、11-アミノ-3,6,9-トリオキサウンデカン酸(H₂N-PEG₄-COOHとしても知られる)の残基である。この残基は、本明細書では-PEG₄-とも呼ばれる。

【0122】

いくつかの実施形態では、S_Bは- (P_Uⁱⁱⁱ)_n- (式中、nは1~3、より好ましくは2である)である。

【0123】

いくつかの好ましい実施形態では、S_Bは、-PEG₃-PEG₃-および-PEG₄-PEG₄-から選択される。

【0124】

30

好ましい-Z²-Z¹

上述の好ましい場合をそれぞれ組み合わせて、好ましい-Z²-Z¹の組み合わせとしてもよいことが理解されるであろう。

【0125】

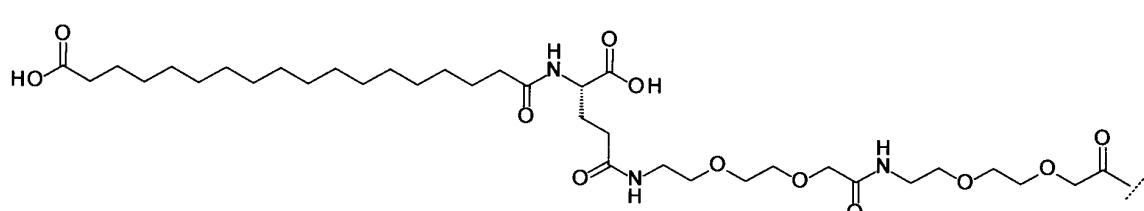
いくつかの好ましい-Z²-Z¹の組み合わせを以下に示す(各場合において、---は のアミノ酸成分の側鎖への結合点を示す)。

【0126】

【化14】

(i) [17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3

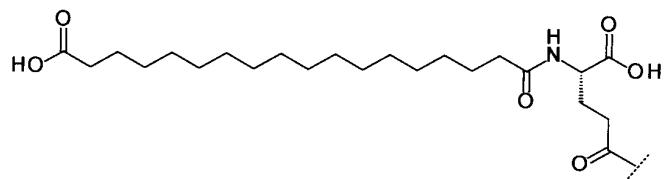
40



【0127】

【化15】

(ii) [17-カルボキシヘプタデカノイル] -isoGlu

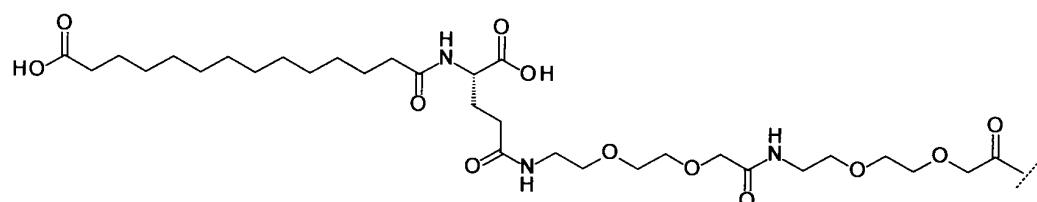


10

【0128】

【化16】

(iii) [13-カルボキシトリデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3

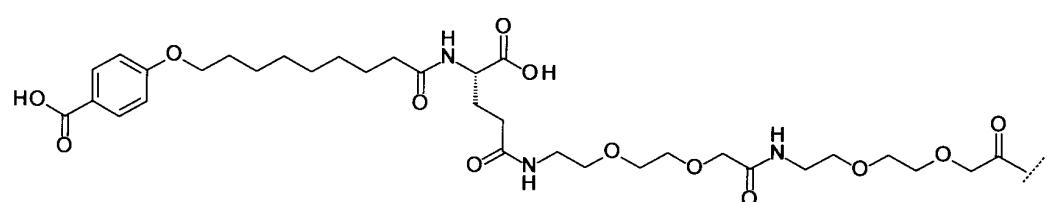


20

【0129】

【化17】

(iv) [カルボキシフェノキシノナノイル] -isoGlu-Peg3-Peg3

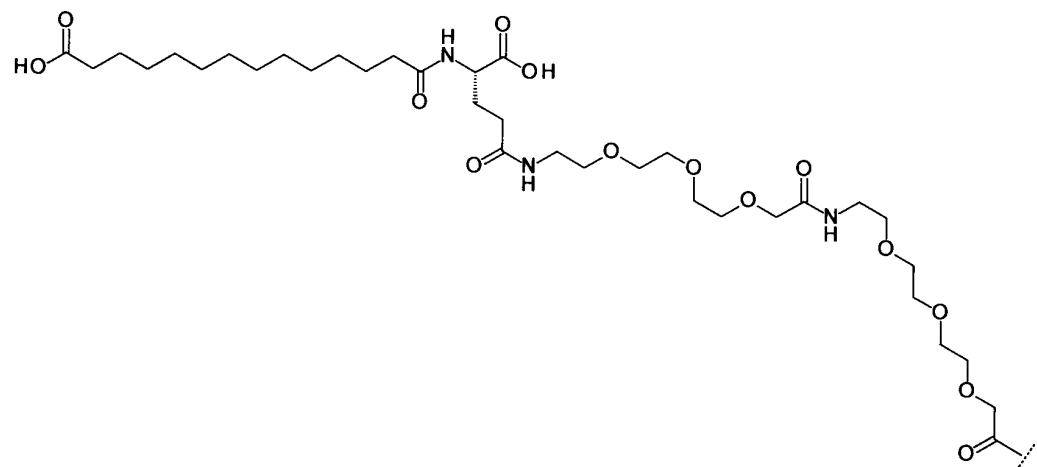


30

【0130】

【化18】

(v) [13-カルボキシトリデカノイル] -isoGlu-Peg4-Peg4



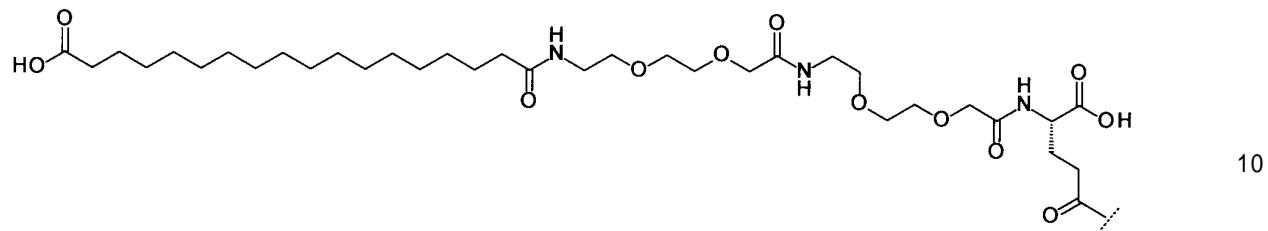
40

50

【0131】

【化19】

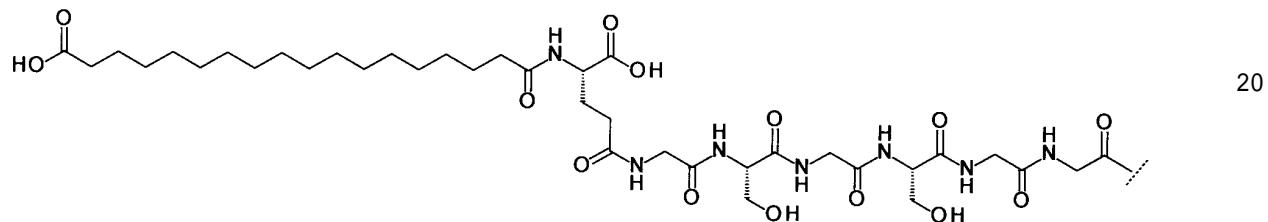
(vi) [17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -Peg3-Peg3-isoGlu



【0132】

【化20】

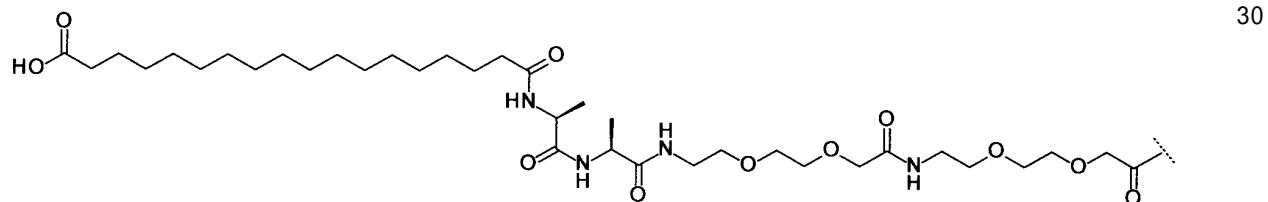
(vii) [17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG



【0133】

【化21】

(viii) [17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -AA-Peg3-Peg3



【0134】

Z^1 の末端に極性基が存在すると、例えば、半減期を増加させることおよび／または平均滞留時間、およびクリアランスを減少させることによって、化合物の薬物動態学的特性が増強されると考えられる。また、リンカーも、これらの薬物動態学的特性に寄与し得る。複数のアミノ酸単位を含むリンカー（または同様のサイズの部分）は、ただ一つのアミノ酸単位からなるもの等と比較して薬物動態特性を向上させることがある。これらの特性により、化合物を、修飾をしないまたは異なる修飾を有する同じペプチド骨格を有する同等の化合物（例えば、極性基を欠くおよび／または短いリンカー部分を有する脂肪族脂肪鎖を有する置換基）よりも少ない頻度で投与することが可能になり得る。

【0135】

いかなる特定の理論に拘束されるものではないが、本発明者らは、特に、長いリンカーが含まる場合、 Z^1 の末端の極性または荷電基が当該分子の自由N末端と望ましくない分子内相互作用に関与することがあり、これが、薬物動態上の極性基の有益な効果を損なう可能性があることを発見した。本明細書に記載の化合物のペプチド骨格は、比較的明確に規定されたヘリックス二次構造を採用すると考えられるので、このような相互作用に関与す

40

50

る極性基の能力は、分子内の位置に依存し得る。C末端の方向に位置すると、N末端との相互作用が相対的に起こりにくい。しかし、本発明者らは、置換基が必ずしも得られる薬物動態学的利点を損なうことなく、残基が分子の16および17位に位置し得るという驚くべき発見をした。

【0136】

ここで用語「結合した (conjugated)」は、1つの同定可能な化学部分の他の化学部分への物理的結合 (physical attachment)、およびかかる部分間の構造的関係を記載するために使用される。特定の合成法を指すと考えてはならない。

【0137】

当業者は、例えば、“Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations”, 2nd edition, Larock, R. C.; Wiley-VCH:New York, 1999に記載されている一般的な合成方法論を用いたカップリング反応を行うために使用できる適切な技術を認識しているであろう。このような変換は、合成プロセス中の任意の適切な段階で行うことができる。

【0138】

ペプチド合成

本発明の化合物は、標準的な合成法、組換え発現系、または他の任意の最新技術により製造することができる。すなわち、グルカゴン類似体は、例えば、以下の工程を含む方法により製造できる。

(a) 固相法または液相法を使用して、段階的にまたは断片の組み立てによりペプチドを合成し、そして、最終的なペプチド生成物を単離し精製すること、または

(b) 前駆体ペプチドをコードする核酸構築体から前駆体ペプチド配列を発現させ、発現生成物を回収し、この前駆体ペプチドを修飾し、本発明の化合物を得ること。

【0139】

典型的には、前駆体ペプチドをコードする核酸から発現させることが可能な細胞またはかかる核酸を含む無細胞発現系内で発現させる。

【0140】

本発明の類似体は、固相または液相ペプチド合成により合成することが好ましい。この点は、国際公開第98/11125号パンフレット、および、Synthetic Peptides, 2nd edition 中のFields, GB et al., 2002, “Principles and practice of solid-phase peptide synthesis”、およびその中の例を参照されたい。

【0141】

組換え発現のために、前駆体ペプチドをコードする核酸断片は、通常、適切なベクターに挿入され、クローニングベクターまたは発現ベクターを形成する。ベクターは、目的や適用する種類に応じて、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体、またはウイルスの形態であり得るが、特定の細胞において一過性でのみ発現される裸のDNAが重要なベクターである。好適なクローニングおよび発現ベクター（プラスミドベクター）は、自己複製が可能なので、それによってその後のクローニングにとって高レベルの発現または高レベルの複製を目的とする高いコピー数を可能にする。

【0142】

概要として、発現ベクターは、5'、3'方向および作動可能なリンクエージにおいて、本発明の核酸フラグメントの発現を駆動するプロモーター；場合により、分泌（細胞外への分泌、または可能な場合ペリプラズム内への分泌）を可能にするリーダーペプチドをコードする核酸配列；前駆体ペプチドをコードする核酸断片；場合によりターミネーターをコードする核酸配列、を含む。これらのベクターは、選択マーカーおよび複製起点などの追加機能を含んでもよい。生産株または細胞株における発現ベクターを用いて操作する場合、ベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込み可能であることが好ましいことがある。当業者は、適切なベクターに精通し、それらの特定の要件に応じて設計することができる。

【0143】

本発明のベクターは、前駆体ペプチドを產生するための宿主細胞を形質転換するために

10

20

30

40

50

使用される。このような形質転換細胞は、核酸断片およびベクターの増殖のために使用される、および/または前駆体ペプチドの組換え体の生産のために使用される培養細胞または細胞株であり得る。

【0144】

好適な形質転換細胞は、細菌 [例えば、エシェリヒア種 (例えれば、大腸菌 (*E. coli*) 、バシラス種 (例えれば、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)) 、サルモネラ種] 、またはマイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 種 (好ましくは、非病原性、例えればエム・ボビス BSG) 、酵母 (例えれば、サッカロミセス・セレビッシェ (*Saccharomyces cerevisiae*) 、およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)) 、および原生動物などの微生物である。あるいは、形質転換細胞は多細胞生物から得ることができ、すなわち、これは、真菌細胞、昆虫細胞、藻類細胞、植物細胞、または動物細胞 (例えれば、哺乳動物細胞) でもよい。クローニングおよび/または最適化発現の目的のために、形質転換細胞は本発明の核酸断片を複製することができることが好ましい。核酸断片を発現する細胞は、本発明のペプチドの小規模または大規模調製のために使用することができる。

【0145】

形質転換細胞を用いて前駆体ペプチドを製造する場合、必須ではないもののその発現産物は培養培地中に分泌されると便利である。

【0146】

効力

GLP-1またはグルカゴン (Glu) 受容体への対応化合物の結合は、アゴニスト活性の指標として使用し得るが、一般的には、化合物が対応する受容体へ結合すると引き起こされる細胞内シグナル伝達を測定する生物学的アッセイを使用することが好ましい。例えれば、グルカゴンアゴニストによりグルカゴン受容体を活性化すると、細胞性サイクリックAMP (cAMP) の生成が刺激されるであろう。同様に、GLP-1アゴニストによりGLP-1受容体を活性化すると、細胞のcAMPの生成が刺激されるであろう。すなわち、これらの2つの受容体の1つを発現する適切な細胞におけるcAMPの生成を利用して、対応する受容体の活性をモニターできる。従って、それぞれ1つの受容体を発現し他の受容体は発現しない種類の細胞を適切に対しで使用して、両方の種類の受容体に対するアゴニスト活性を測定できる。

【0147】

当業者は適切なアッセイ形式を熟知しているであろうが、以下に例示する。GLP-1受容体および/またはグルカゴン受容体は、実施例に記載するような受容体の配列を有し得る。例えれば、アッセイは、一次受託番号GI:4503947を有するヒトグルカゴン受容体 (Glucagon-R) 、および/または一次受託番号GI:166795283を有するヒトグルカゴン様ペプチド1受容体 (GLP-1R) を使用することができる (前駆体タンパク質の配列について言及する時、もちろん、アッセイでシグナル配列の欠如した成熟タンパク質を使用してもよいことを理解すべきである) 。

【0148】

EC_{50} は、ある受容体におけるアゴニストの効力の数値的尺度として使用し得る。 EC_{50} 値は、ある特定のアッセイにおいて、その化合物の最大活性の半分を達成するために必要な化合物の濃度の測定値である。すなわち、例えはある特定のアッセイにおいて、グルカゴンの EC_{50} [GLP-1] より低い EC_{50} [GLP-1] を有する化合物は、グルカゴンより高いGLP-1受容体アゴニストの効力を有すると考えることができる。

【0149】

本明細書に記載の化合物は、グルカゴン受容体とGLP-1受容体の両方でcAMPの生成を刺激できるという観察事項により決定されるように、典型的にはGlucagonGLP-1二重アゴニストである。各受容体の刺激は、独立したアッセイで測定し、その後に互いに比較できる。

【0150】

GLP-1受容体についての EC_{50} 値 (EC_{50} [GLP-1-R]) をグルカゴン受容体についての EC_{50} 値 (EC_{50} [GlucagonR]) と比較することにより、ある化合物に対する相対的GLP-1R選択性は以下の式のように計算できる。

10

20

30

40

50

相対的GLP-1R選択性 [化合物] = (EC₅₀ [GLP-1-R]) / (EC₅₀ [Glucagon-R])

【 0 1 5 1 】

用語「EC₅₀」は、典型的にはある特定の受容体における、または受容体機能に対する特定のマーカーレベルの最大反応の50%を示す濃度を意味し、特定の生化学的状況により、阻害またはアンタゴニスト活性を指すことがある。

【 0 1 5 2 】

特定の理論に拘束されるものではないが、ある化合物の相対的な選択性により、GLP-1受容体またはグルカゴン受容体に対するその効力と、他の受容体に対するその効力を、直接比較することが可能になることがある。例えば、ある化合物の相対的GLP-1選択性が高いほど、その化合物は、グルカゴン受容体よりもGLP-1受容体に対してより有効となり得る。典型的には、この結果は、同じ種由来のグルカゴン受容体およびGLP-1受容体（例えば、ヒトグルカゴン受容体とヒトGLP-1受容体、またはマウスグルカゴン受容体とマウスGLP-1受容体）間で比較する。

10

【 0 1 5 3 】

特定レベルのグルカゴン-Rアゴニスト活性について、本化合物は、グルカゴンより高レベルのGLP-1Rアゴニスト活性（すなわち、GLP-1受容体でのより大きな効力）を示すことができるという点で、本発明の化合物は、ヒトグルカゴンより高い相対的GLP-1R選択性を有することができる。グルカゴン受容体およびGLP-1受容体に対する特定の化合物の絶対的な効力は、相対的なGLP-1R選択性が適切である限り、天然のヒトグルカゴンの効力よりも高くて、低くても、またはほぼ等しくてもよいことは、理解されるであろう。

20

【 0 1 5 4 】

しかし本発明の化合物は、ヒトグルカゴンより低いEC₅₀ [GLP-1R] を有してもよい。本化合物は、ヒトグルカゴンのEC₅₀ [グルカゴン-R] より10倍未満高い、ヒトグルカゴンのEC₅₀ [グルカゴン-R] より5倍未満高い、またはヒトグルカゴンのEC₅₀ [グルカゴン-R] より2倍未満高い、EC₅₀ [グルカゴン-R] を維持しながら、グルカゴンより低いEC₅₀ [GLP-1-R] を有してもよい。

【 0 1 5 5 】

本発明の化合物は、ヒトグルカゴンのEC₅₀ [グルカゴン-R] より2倍未満であるEC₅₀ [グルカゴン-R] を有してもよい。本化合物は、ヒトグルカゴンのEC₅₀ [グルカゴン-R] の2倍未満のEC₅₀ [グルカゴン-R] を有し、かつ、ヒトグルカゴンのEC₅₀ [GLP-1-R] の半分未満のEC₅₀ [GLP-1-R] 、ヒトグルカゴンのEC₅₀ [GLP-1-R] の5分の1倍未満のEC₅₀ [GLP-1-R] 、またはヒトグルカゴンのEC₅₀ [GLP-1-R] の10分の1倍未満のEC₅₀ [GLP-1-R] を有してもよい。

30

【 0 1 5 6 】

本化合物の相対的GLP-1R選択性は、0.05~20でもよい。例えば本化合物は、0.05~0.20、0.1~0.30、0.2~0.5、0.3~0.7、または0.5~1.0；1.0~2.0、1.5~3.0、2.0~4.0、または2.5~5.0；または、0.05~20、0.075~15、0.1~10、0.15~5、0.75~2.5、または0.9~1.1の相対的な選択性を有してもよい。

【 0 1 5 7 】

ある実施態様において、グルカゴン-RおよびGLP-1Rの両方、例えばヒトグルカゴン受容体とヒトGLP-1受容体に対する、ある特定の化合物のEC₅₀は、1nM未満であることが望ましいことがある。

40

【 0 1 5 8 】

治療用途

本発明の化合物は、後述されるように、特に肥満および糖尿病を含む代謝疾患に対する魅力的な治療および/または予防の選択肢を提供することができる。

【 0 1 5 9 】

糖尿病は、インスリン分泌、インスリン作用、またはその両方の欠陥に起因する高血糖により特徴付けられる代謝疾患の群が含まれる。糖尿病の急性兆候は、過度の尿產生、結果として起きる代償渴きと水分摂取の増加、視力障害、原因不明の体重減少、倦怠感、工

50

エネルギー代謝の変化が含まれる。糖尿病の慢性高血糖は、種々の器官、特に眼、腎臓、神経、心臓および血管の長期損傷、機能障害、および機能不全に関連する。糖尿病は、病因的特徴に基づいて、1型糖尿病、2型糖尿病、および妊娠糖尿病に分類される。

【0160】

1型糖尿病は、すべての糖尿病症例の5~10%を占め、インスリンを分泌する膵臓の細胞の自己免疫破壊によって引き起こされる。

【0161】

2型糖尿病は、糖尿病症例の90%~95%を占め、代謝障害が複雑に組み合わさった結果として起こる。2型糖尿病は、内因性インスリン産生が不十分となり、血漿グルコースレベルが診断閾値以下に維持できなくなった結果起こる。

10

【0162】

妊娠糖尿病は、妊娠中に見られるあらゆる程度の耐糖能異常を指す。

【0163】

糖尿病前症は、空腹時血糖障害および耐糖能障害を含み、血糖レベルが上昇しているものの、糖尿病の臨床診断を起こすレベルよりは低いときに発生する状態を指す。

【0164】

2型糖尿病および糖尿病前症を持つ人の大部分は、腹部肥満（腹部内臓の周りの過剰な脂肪組織）、アテローム性脂質異常症（動脈壁におけるplaques蓄積を促進する、高トリグリセリド、低HDLコレステロール、および/または高LDLコレステロールを含む血中脂肪障害）、血圧上昇（高血圧）、前血栓状態（例えば、血中のフィブリノーゲンまたはプラスミノーゲン活性化因子阻害物質1の上昇）、および前炎症性状態（例えば、血中のC反応性蛋白の上昇）を含む、追加的な代謝危険因子が高頻度に存在するため、罹患率と死亡率のリスクが高くなっている。

20

【0165】

逆に肥満は、糖尿病前症、2型糖尿病、並びにある種の癌、閉塞性睡眠時無呼吸、および胆囊パライダーブを発症するリスクを増加させる。

【0166】

脂質異常症は、心血管疾患のリスク上昇と関連している。血漿高密度リポタンパク質（HDL）濃度とアテローム性動脈硬化症のリスクとの間には逆相関が存在するため、HDLは臨床的に重要である。アテローム性動脈硬化plaquesに貯蔵されているコレステロールの大部分は低密度リポタンパク質（LDL）に由来するため、高濃度のLDLは、アテローム性動脈硬化症と密接に関連している。HDL/LDL比は、アテローム性動脈硬化症、特に冠動脈アテローム性動脈硬化症の臨床的リスクの指標である。

30

【0167】

メタボリック症候群は、一人のヒトが一群の代謝危険因子を有するという特徴がある。これらは、腹部肥満（腹部内臓の周りの過剰な脂肪組織）、アテローム性脂質異常症（動脈壁内のplaques蓄積を促進する、高トリグリセリド、低HDLコレステロール、および/または高LDLコレステロールを含む血中脂肪障害）、血圧上昇（高血圧）、インスリン抵抗性と耐糖能異常、前血栓状態（例えば、血中のフィブリノーゲンまたはプラスミノーゲン活性化因子阻害物質1の上昇）、および前炎症性状態（例えば、血中のC反応性蛋白の上昇）を含む。

40

【0168】

メタボリック症候群を有する個人は、冠動脈性心疾患や動脈硬化症の他の症状（例えば、脳卒中および末梢血管疾患）に関連する他の疾患のリスクが高い。この症候群の主要なリスク要因は、腹部肥満であるように思われる。

【0169】

特定の理論に拘束されるものではないが、本発明の化合物は、ヒトグルカゴン受容体およびヒトGLP1受容体の両方に対する二重アゴニストとして作用すると考えられる（ここで、二重GluGLP-1アゴニストと略記する）。二重アゴニストとは、例えば脂肪代謝に対するグルカゴンの効果と、例えば血中グルコースレベルおよび食物摂取に対するGLP-1の効果

50

との組合せである。従ってこれらは、過剰な脂肪組織の除去を加速し、持続性の体重減少を誘発し、血糖コントロールを改善するような作用を有し得る。また、二重GluGLP-1アゴニストは、高コレステロール、高LDLコレステロール、低HDL/LDLコレステロール比などの心血管危険因子を減少させるような作用を有することもある。

【0170】

従って本発明の化合物は、それを必要とする対象において、体重増加を防止し、体重減少を促進し、過剰な体重を減少させるか、または肥満（病的肥満を含む）並びに関連する疾患および健康状態（限定されるものではないが、肥満関連炎症、肥満関連胆囊疾患、および肥満誘発性睡眠時無呼吸を含む）を（例えば、食欲、摂食、食物摂取、カロリー摂取、および/またはエネルギー消費の制御により）治療するための薬剤として使用し得る。

本発明の化合物はまた、治療を必要とする対象において、メタボリック症候群、インスリン抵抗性、耐糖能異常、糖尿病前症、空腹時グルコースの増加、2型糖尿病、高血圧、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、末梢動脈疾患、および脳卒中を含む、グルコース調節障害により引き起こされるかまたはこれに関連する症状の治療に使用することもできる。これらの状態のいくつかは、肥満に関連していることがある。しかし、これらの状態に対する本発明の化合物の効果は、体重に対する効果が、全体的にまたは部分的に介在していてもよく、または独立していてもよい。

【0171】

二重GluGLP-1アゴニストの相乗効果は、高コレステロールおよびLDLなどの心血管危険因子の減少をもたらすことがあり、これは、体重に対するそれらの作用からは完全に独立しててもよい。

【0172】

従って上記したように、本発明は、それを必要とする個体において、上記した症状の治療における本発明の化合物の使用を提供する。

【0173】

本発明はまた、医学的治療方法、特に上記のような症状の治療方法で使用するための本発明の化合物を提供する。

【0174】

好適な態様において、記載した化合物は、糖尿病、特に2型糖尿病を治療するのに使用することができる。

【0175】

特定の実施態様において本発明は、それを必要とする個体において、糖尿病、特に2型糖尿病を治療するための化合物の使用を含む。

【0176】

好適な態様において、記載した化合物は、体重増加を防止するか、または体重減少を促進するのに使用することができる。

【0177】

特定の実施態様において本発明は、それを必要とする個体において、体重増加を防止するか、または体重減少を促進するための化合物の使用を含む。

【0178】

特定の実施態様において本発明は、それを必要とする個体において、体重過多により引き起こされるかまたはこれを特徴とする症状の治療法、例えば、肥満、病的肥満、手術前の病的肥満、肥満に関連する炎症、肥満に関連する胆囊疾患、肥満誘発性睡眠時無呼吸、糖尿病前症、糖尿病、特に2型糖尿病、高血圧、アテローム性脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、末梢動脈疾患、脳卒中または微小血管疾患の治療および/または予防法における、化合物の使用を含む。

【0179】

別の態様において、記載した化合物は、循環LDLレベルを低下させるか、および/またはHDL/LDL比を上昇させる方法で使用することができる。

【0180】

10

20

30

40

50

特定の実施態様において本発明は、それを必要とする個体において、循環LDLレベルを低下させるか、および/またはHDL/LDL比を上昇させる方法における、化合物の使用を含む。

【0181】

別の態様において、記載した化合物は、循環トリグリセリドレベルを低下させる方法で使用することができる。

【0182】

医薬組成物

本発明の化合物は、保存または投与用に調製される医薬組成物として製剤化することができる。このような組成物は、典型的には、本発明の化合物の治療有効量を、適切な形態で、医薬的に許容し得る担体中に含む。

10

【0183】

本発明の化合物の治療有効量は、投与経路、治療される哺乳動物の種類、および検討下にある哺乳動物の特定の身体的特徴に依存するであろう。これらの因子および量の決定におけるこれらの関係は、医学分野の当業者にとって良く理解される。この量および投与方法は、最適の効力を達成するために調整することができ、体重、食事、併用薬剤、および他の因子（医学分野の当業者は熟知している）に依存し得る。ヒトへの使用のために最も適切な投与サイズおよび投与計画は、本発明によって得られた結果から導かれててもよく、適切に計画された臨床試験で確認してもよい。本発明の化合物は、ヒトの治療のために特に有用であり得る。

20

【0184】

効果的な投与量および治療プロトコルは、実験動物において低用量から開始し、効果を追跡しながら投与量を増加させ、そして、同様に全体的な投与計画を変化させる従来法によって決定することができる。ある対象について最適な用量を決定する際、臨床医は多くの要因を考慮することができる。このような考慮事項は、当業者には公知である。

【0185】

用語「医薬的に許容し得る担体」は、任意の標準的な医薬担体を含む。治療用途の医薬的に許容し得る担体は医薬分野で公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) に記載されている。例えば、酸性pHまたは生理学的pHの無菌食塩水およびリン酸緩衝化食塩水を使用することができる。pH緩衝剤は、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS）、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-3-アミノプロパンスルホン酸（TAPS）、重炭酸アンモニウム、ジエタノールアミン、ヒスチジン（これは好適な緩衝剤である）、アルギニン、リジン、もしくは酢酸塩、またはそれらの混合物でもよい。この用語はさらに、ヒトを含む動物での使用のための、米国薬局方に記載されている任意の薬剤を包含する。

30

【0186】

用語「医薬的に許容し得る塩」は、本発明の化合物のいずれかの塩を指す。塩は、酸付加塩および塩基性塩のような医薬的に許容し得る塩を含む。酸付加塩の例としては、塩酸塩、クエン酸塩、および酢酸塩が挙げられる。塩基性塩の例としては、陽イオンが、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、カルシウムおよびアンモニウムイオン $N(R^3)_3^+(R^4)$ （式中、R³およびR⁴は、場合により置換されたC₁₋₆アルキル、場合により置換されたC₂₋₆アルケニル、場合により置換されたアリール、場合により置換されたヘテロアリールを独立して示す）などのアルカリ土類金属から選択される塩が挙げられる。医薬的に許容し得る塩の他の例は、“Remington's Pharmaceutical Sciences”, 17th edition. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985、およびより最近の版、並びにEncyclopaedia of Pharmaceutical Technologyに記載されている。

40

【0187】

「治療」は、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目

50

的のために、有益なまたは所望の臨床結果としては、限定されるものではないが、症状の緩和、疾患の程度の低減、疾患状態の安定化（すなわち、悪化しない）状態、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の改善または緩和、および寛解（部分的または全体的）を含み、これらは検出可能または検出不可能であってもよい。「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較して生存期間を延長することを意味することもある。「治療」は、障害の発症を予防するか、または障害の病状を変化させる意図で行われる介入である。したがって、「治療」は、ある実施態様において、治療的処置および予後のまたは予防的手段の両方を指す。治療を必要とする者は、すでに障害を有する者、並びに障害が予防されるべき者を含む。治療は、治療が存在しない時と比較して、病状または症状の拡大（例えば、体重増加、高血糖）を阻害または低減することを意味し、必ずしも関連する症状の完全な停止を意味するものではない。

10

【0188】

医薬組成物は、単位剤型であってもよい。かかる剤型において組成物は、適切量の活性成分を含む単位用量に分割される。単位剤型は、個別量の調製物を含むパッケージ化された調製物、例えば、パケット化錠剤、カプセル剤、およびバイアルまたはアンプル中の粉末でもよい。単位剤型はまた、それ自体がカプセル剤、カシェ剤、または錠剤でもよく、または適切な数のこれらの剤をパッケージにした形態のいずれかでもよい。これは、単回投与用の注射形態で、例えばペンの形態で提供してもよい。ある実施態様において、パッケージの形態に、使用説明を有するラベルまたは挿入物を含めてもよい。組成物は、任意の適切な投与経路および投与手段用に製剤化することができる。医薬的に許容し得る担体または希釈剤は、経口、直腸、経鼻、局所的（口腔および舌下を含む）、経膣、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内、皮内、および経皮を含む）投与に適した調製物で使用されるものを含む。この調製物は、単位剤型で提供されると便利であり、薬剤学の分野で公知の任意の方法により調製することができる。

20

【0189】

本明細書に記載の化合物について、皮下または経皮的投与が特に適している場合もあり得る。

【0190】

本発明の組成物はさらに、化合物の安定性を増強するために、生物学的利用能を上昇させるために、溶解度を上昇させるために、副作用を低下させるために、当業者に公知の時間療法を達成するために、および患者コンプライアンスを上昇させるために、またはこれらの任意の組合せのために、例えば、共有結合、疎水的および静電的相互作用を介して、薬剤担体、薬剤送達システム、および進化型薬剤送達システムに調合するか、またはこれに結合させることができる。担体、薬剤送達システム、および進化型薬剤送達システムの例は、限定されるものではないが、ポリマー、例えばセルロースおよび誘導体、多糖、例えばデキストランおよび誘導体、デンプンおよび誘導体、ポリ（ビニルアルコール）、アクリレートおよびメタクリレートポリマー、ポリ乳酸とポリグリコール酸、およびこれらのプロックコポリマー、ポリエチレングリコール、担体タンパク質、例えばアルブミン、ゲル、例えば、熱ゲル化システム、例えば当業者に公知のプロックコポリマー系、ミセル、リポソーム、微小球、ナノ粒子、液晶およびこれらの分散物、液体-水系の相挙動が当業者に公知のL2相およびその分散物、ポリマーミセル、多相エマルション、自己乳化性、自己ミクロ乳化性、シクロデキストリンおよびその誘導体、およびデンドリマーを含む。

30

【0191】

併用療法

本発明の化合物または組成物は、肥満、高血圧、脂質異常症、または糖尿病の治療のための薬剤との併用療法の一部として投与してもよい。

【0192】

このような場合には、これらの2つの活性物質は、一緒にまたは別々に投与してもよく、同じ医薬製剤の一部としてまたは別個の製剤として投与してもよい。

【0193】

40

50

すなわち本発明の化合物または組成物は、限定されるものではないが、グルカゴン様ペプチド受容体1アゴニスト、ペプチドYYまたはその類似体、カンナビノイド受容体1アンタゴニスト、リパーゼ阻害剤、メラノコルチン受容体4アゴニスト、メラニン凝集ホルモン受容体1アンタゴニスト、フェンテルミン（単独で、またはトピラメートと組み合わせて）、ノルエピネフリン/ドーパミン再取り込み阻害剤とオピオイド受容体アンタゴニストとの組み合わせ（例えば、ブプロピオンとナルトレキソンとの組み合わせ）、またはセロトニン作動薬（例えば、ロルカセリン）を含む抗肥満薬と組み合わせて使用することができる。

【0194】

本発明の化合物または組成物は、限定されるものではないが、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシンII受容体遮断薬、利尿薬、ベータ遮断薬、またはカルシウムチャネル遮断薬を含む抗高血圧薬と組み合わせて使用することができる。 10

【0195】

本発明の化合物または組成物は、限定されるものではないが、スタチン、フィブロート、ナイアシン、および/またはコレステロール吸収阻害剤を含む脂質異常症薬と組み合わせて使用することができる。

【0196】

さらに、本発明の化合物または組成物は、限定されるものではないが、ビグアニド（例えば、メトホルミン）、スルホニル尿素、メグリチニドまたはグリニド（例えばナテグリニド）、DPP-IV阻害剤、SGLT2阻害剤、グリタゾン、異なるGLP-1アゴニスト、インスリンまたはインスリン類似体を含む抗糖尿病薬と組み合わせて使用することができる。好適な実施態様において、化合物またはその塩は、適切な血糖コントロールを達成するために、インスリンまたはインスリン類似体、DPP-IV阻害剤、スルホニル尿素またはメトホルミン、特にスルホニル尿素またはメトホルミンと組み合わせて使用される。インスリン類似体の例は、限定されるものではないが、ランタス、ノボラピッド、ヒューマログ、ノボミックス、およびアクトラファンHM、レベミル、およびアピドラを含む。 20

【実施例】

【0197】

実施例1

グルカゴン類似体の一般的な合成

標準Fmoc法を用いて、ポリスチレン樹脂（TentaGel S Ram）上でNMP中において、マイクロ波支援合成機にて固相ペプチド合成（SPPS）を行った。塩基としてのDIPEAとともに、HATUを結合試薬として使用した。脱保護用に、ピペリジン（NMP中20%）を使用した。シユードプロリン：Fmoc-Phe-Thr（psiMe, Mepro）-OH、およびFmoc-Asp-Ser（psiMe, Mepro）-OH（NovaBiochemから購入）は、適切な場合使用した。 30

【0198】

以下の略語を使用した。

Boc : tert-ブチルオキシカルボニル

ivDde : 1- (4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)3-メチル-ブチル

Dde : 1- (4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン) -エチル

DCM : ジクロロメタン

DMF : N,N-ジメチルホルムアミド

DIPEA : ジイソプロピルエチルアミン

EDT : 1,2-エタンジオール

EtOH : エタノール

Et₂O : ジエチルエーテル

HATU : N- [(ジメチルアミノ) -1H-1,2,3-トリアゾール [4,5-b] ピリジン-1-イルメチレン] -N-メチルメタナミニウムヘキサフルオロホスフェートN-オキシド

MeCN : アセトニトリル

NMP : N-メチルピロリドン

10

20

30

40

50

TFA : トリフルオロ酢酸

TIS : トリイソプロピルシラン

【 0 1 9 9 】

切断 :

95/2.5/2.5% (v/v) TFA/TIS/水を用いて室温 (r.t.) で2時間処理することにより、粗ペプチドを樹脂から切断した。TFAの大部分を減圧下で除去し、粗ペプチドを沈殿させ、ジエチルエーテルで洗浄し、周囲温度で一定重量になるまで乾燥させた。

【 0 2 0 0 】

以下の化合物が合成された。

【 0 2 0 1 】

1 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K ([15-カルボキシ-ペンタデカノイル] -isoGlu) -AAHDF
VEWLLSA-NH₂.

2 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg
3) -RAAKDFIEWLESA-NH₂

3 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAALKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-
GSGSGG) -WLESA-NH₂

4 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg
3) -RAKDFIEWLESA-NH₂

5 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG)
-RAAKDFIEWLESA-NH₂

6 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG)
-RAAKDFIEWLESA-NH₂

7 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-GSGSGG)
-RAAKDFIEWLESA-NH₂

8 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg
3) -RAAHDFIEWLESA-NH₂

9 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-Peg3-Peg
3) -RAKDFIEWLESA-NH₂

10 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -AAKDF
IEWLESA-NH₂

11 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -AAKD
FIEWLESA-NH₂

12 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu) -RAKD
FIEWLESA-NH₂

13 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAALKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-
GSGSGG) -WLESA-NH₂

14 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-
GSGSGG) -WLESA-NH₂

15 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAALKDFIEWLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-
GSGSGG) -A-NH₂

16 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-
GSGSGG) -A-NH₂

【 0 2 0 2 】

アシル化 GLP-1の類似体であるセマグルチド (semaglutide) も合成した。これは、H-H
- [2-メチル-Ala] -EGTFTSDVSSYLEGQAA-K ([17-カルボキシ-ヘプタデカノイル] -isoGlu-
Peg3-Peg3) -EFIAWLVRGRG-OHの構造を有していた。

【 0 2 0 3 】

実施例 2

グルカゴン受容体およびGLP-1受容体の効力アッセイ

ヒトグルカゴン受容体 (グルカゴン-R) (一次受託番号P47871) またはヒトグルカゴン

10

20

30

40

50

様ペプチド-1受容体 (GLP-1R) (一次受託番号P43220) をコードするcDNAを合成し、Zeocin耐性マーカーを含む哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。

【0204】

グルカゴン-RまたはGLP-1-Rをコードする哺乳動物発現ベクターを、Attractene法によりチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞中にトランスフェクトした。選択圧力に耐性的細胞の限界希釀によるZeocin選択 (250 µg/ml) により、安定に発現しているクローンを得た。発現しているグルカゴン-RおよびGLP-1-R細胞クローンをピックアップし、増殖させ、後述のグルカゴン-RおよびGLP-1-R効力アッセイで試験した。1つのグルカゴン-R発現クローンと1つのGLP-1-R発現クローンを、化合物のプロファイリング用に選択した。

10

【0205】

ヒトグルカゴン-RまたはヒトGLP-1-Rを発現するCHO細胞を播種して、24時間後に、96ウェルのマイクロタイターブレートを用いてウェル当たり100 µLの増殖培地の培養物中30,000個の細胞でアッセイした。分析の日に、増殖培地を除去し、細胞を200 µLのアッセイ緩衝液 (クレブス-リングル-緩衝液-KRBH) で1回洗浄した。緩衝液を除去し、脱イオン水中に0.1mM IBMXを有する10 µLのKRBH (KRBH+10mM HEPES、5mM NaHCO3、0.1% (v/v) BSA) 中で、各濃度の試験ペプチドとともに室温で15分インキュベートした。溶解バッファー (0.1%w/v BSA、5mM HEPES、0.3%v/v Tween20) の添加により、反応を停止させた。室温で10分間、細胞を溶解後、溶解物を384ウェルブレートに移し、AlphaScreen (商標) cAMP Functional Assay Kitの10 µLのアクセプター/ドナービーズ混合物を加えた。暗所で室温で1時間インキュベーション後、cAMP含量を、Perkin-ElmerのAlphaScreen (商標) cAMP Functional Assay Kitを適用して、製造業者の説明書に従って測定した。コンピューター支援曲線フィッティングを適用して、基準化合物 (グルカゴンとGLP-1) と比較したEC₅₀と相対的効力を計算した。GLP-1/グルカゴン比を上述のように計算した。表1を参照されたい。

20

【0206】

【表1】

化合物	EC ₅₀ hGCGR CHO-K1 [nM]	EC ₅₀ hGLP-1R CHO-K1 [nM]	GLP-1/ グルカゴン比
1	0.21 nM	0.38 nM	1.81
2	0.13 nM	1.76 nM	13.54
3	1.48 nM	0.70 nM	0.47
4	0.45 nM	0.70 nM	1.56
5	0.18 nM	0.83 nM	4.61
6	0.44 nM	1.43 nM	3.25
7	0.11 nM	0.97 nM	8.82
8	0.31 nM	0.80 nM	2.58
9	0.07 nM	0.97 nM	13.86
10	1.08 nM	0.41 nM	0.38
11	0.28 nM	0.56 nM	2.00
12	0.07 nM	0.48 nM	6.86
13	0.52 nM	0.33 nM	0.63
14	0.18 nM	0.60 nM	3.33
15	0.92 nM	0.61 nM	0.65
16	0.16 nM	0.53 nM	3.31

30

40

50

【0207】

実施例3

内因性GLP-1受容体に対するアゴニスト活性

内因性GLP-1受容体に対する試験化合物のアゴニスト活性を、マウスインスリノーマ細胞株を使用して決定した。受容体の活性化の指標として、細胞内cAMPを使用した。

【0208】

細胞を384ウェルプレート中で10,000細胞/ウェルの密度で24時間培養した。培地を除去し、試験化合物またはGLP-1 (0.1pM ~ 100nMの各濃度) または溶媒対照 (0.1% (v/v) DMSO) を含有する10 μ LのKRBH緩衝液 (NaCl 130mM、KCl 3.6mM、NaH₂PO₄ 0.5mM、MgSO₄ 0.5mM、CaCl₂ 1.5mM) を、26 °C の温度で15分間ウェルに加えた。

10

【0209】

細胞性cAMP含量を、AlphaScreen cAMP Functional Assay Kit (Perkin Elmer) を使用して測定した。測定は、Envision (Perkin Elmer) を使用して製造業者の推奨に従って行った。

【0210】

結果は、0.1% (v/v) DMSOを含有するKRBH緩衝液中で調製したcAMP標準曲線を使用して、cAMP濃度に変換した。得られたcAMP曲線を、絶対cAMP濃度 (nM) としてlogでプロットし (試験化合物濃度) 、曲線フィッティングプログラムXLfitを使用して解析した。

【0211】

内因性GLP-1受容体に対する各試験化合物の効力並びにアゴニスト活性を説明するために算出したパラメータは、pEC₅₀ (EC₅₀の負のlog値、cAMPレベルの半最大上昇を与える濃度、試験化合物の効力を反映する)、並びに対照に対する割合パーセント (%CTL) は、(GLP-1誘導性の最大cAMP応答 (100%CTL) に基づいて標準化された各試験化合物濃度についての%cAMP上昇) である。表2を参照のこと。

20

【0212】

【表2】

化合物	EC ₅₀ [nM]
1	0.60 nM
2	0.69 nM
3	0.15 nM
4	0.40 nM
5	0.65 nM
6	0.54 nM
7	0.47 nM
8	0.36 nM
9	0.84 nM
10	0.60 nM
11	0.72 nM
12	0.81 nM
13	0.37 nM
14	0.38 nM
15	0.25 nM
16	0.34 nM

30

【0213】

実施例4

内因性グルカゴン受容体に対するアゴニスト活性

40

50

内因性グルカゴン受容体に対する試験化合物のアゴニスト活性を、初代培養肝細胞中のグリコーゲン合成速度に対するこれらの作用を測定することにより決定した。グリコーゲン受容体の活性化の際に、グリコーゲン合成速度の阻害が予測される。一定時間で細胞性グリコーゲン貯蔵中へ取り込まれる放射能標識グルコースの量を計測することにより、グリコーゲン合成速度を測定した。

【0214】

初代ラット肝細胞を、24ウェルプレート中で40,000細胞/ウェルの密度で、37℃で5%CO₂で24時間培養した。

【0215】

培地を廃棄し、細胞をPBSで洗浄した。次に、0.1%BSAと22.5mM濃度のグルコースを含有する180 μLのKRBHベースの緩衝液をウェルに加え、次に試験化合物と40 μCi/mlのD-[U¹⁴C]グルコース(各20 μL)を加えた。インキュベーションを3時間続けた。 10

【0216】

インキュベーション時間の最後に、インキュベーション緩衝液を吸引し、細胞を氷冷PBSで1回洗浄した後、100 μLの1mol/l NaOHで室温で30分間インキュベートして、溶解させた。

【0217】

細胞溶解物を96ウェルのフィルタープレートに移し、フィルタープレートを4℃で120分間インキュベートすることによりグリコーゲンを沈殿させ、次にフィルタープレートを氷冷エタノール(70%)で4回洗浄した。生じた沈殿物をろ過して乾燥させ、取り込まれた¹⁴C-グルコースの量を、Topcountシンチレーションカウンターを使用して製造業者の推奨に従って測定した。 20

【0218】

ビヒクル対照(KRBH緩衝液中0.1% (v/v) DMSO)を含むウェルを、阻害されない場合のグリコーゲン合成についての標準物質として含めた(100%CTL)。D-[U¹⁴C]グルコースを添加していないウェルを、非特異的バックグラウンドシグナルの対照(すべての値からこの値を除算する)として含めた。内因性グルカゴンペプチドを陽性対照として使用した。

【0219】

すべての処理は、少なくとも二重測定を行った。

【0220】

内因性グルカゴン受容体に対する各試験化合物の効力並びにアゴニスト活性を説明するために算出したパラメータは、pEC₅₀および%CTLである。 30

【0221】

背景CPM/ウェルを除算した後で、ビヒクル対照のCPM/ウェルに対する試験化合物の存在下でのCPM/ウェルの率として算出して%CTLを決定する:

$$\%CTL = [CPM/\text{ウェル(ベース)} - CPM/\text{ウェル(試料)}] * 100 / [CPM/\text{ウェル(ベース)} - CPM/\text{ウェル(対照)}]$$

【0222】

グルカゴン受容体のアクチベーターによりグリコーゲン合成速度が阻害され、0% CTL(完全な阻害)と100% CTL(観察できる阻害無)の間の%CTL値が得られる。 40

【0223】

得られた活性曲線は、絶対カウント数(単位: cpm/試料)としてlogでプロットし(試験化合物濃度)、曲線フィッティングプログラムXLfitを使用して解析した。

【0224】

pEC₅₀(EC₅₀の負の対数値)は、試験化合物の効力を反映する。

【0225】

【表3】

化合物	EC ₅₀ [nM]
1	0.85 nM
2	0.11 nM
3	0.94 nM
4	1.79 nM
5	0.21 nM
6	0.80 nM
7	0.34 nM
8	0.29 nM
9	0.11 nM
10	1.53 nM
11	0.95 nM
12	0.45 nM
13	0.43 nM
14	0.19 nM
15	3.63 nM
16	0.19 nM

10

20

【0226】

GLP-1R活性化について使用する用語EC₅₀およびpEC₅₀は、同様にグリコーゲン合成についてのIC₅₀およびpIC₅₀とすることができます。

【0227】

実施例5

薬物動態パラメータの推定

試験化合物の薬物動態パラメータを、Han/Wistarラットへの静脈内投与後に測定した。アシル化 GLP-1 類似体であるセマグルチドも、比較のために検査した。

30

【0228】

雄WistarラットをCharles River (ドイツ) から入手した。試験施設への到着時の体重は約180~210 gであった。ラットを欧洲の標準的なラットケージIV型に入れ、12時間の暗および12時間の明の光周期に曝した。試験中、ラットは、標準的なラットケージIII型に収容した。Altromin 1324の餌 (Altromin、ドイツ) および水の両方を、実験期間全体にわたって自由に摂取させた。確実に適切に順応させるために、動物は少なくとも4日間、試験設備に収容した。

【0229】

化合物は、まず0.1%アンモニア水に溶解し2mg / mlの公称濃度にして、次いで、25 mMリン酸緩衝液 (pH7.4) を含む滅菌PBS中で所望の投与力価 (10 μl) に希釈した。20 nmol / kgに対応する静脈内注射を、外側尾静脈を介して投与した。

40

【0230】

K₃EDTA管に投与した後0.08、0.25、0.5、1、2、4、8、24、32、および48時間後の時点での血液試料 (200 μl) を眼窩周囲叢から採取して、サンプリングの20分のうち5分間は4で遠心分離した。血漿サンプル (> 100 μl) は、96ウェルPCRプレートに移し、直ちに凍結し、LC-MS / MSを用いる各GLP-1グルカゴン化合物についての血漿濃度の分析まで-20で保持した。個々の血漿濃度対時間プロファイルを、ToxKinTMバージョン3.2 (Unilog IT Services) を使用して、非コンパートメントアプローチによって解析し、得られた薬物動態パラメータを決定した。表4を参照のこと。

【0231】

50

【表4】

化合物	クリアランス (ml/min/kg)	終末相半減期 (h)	平均滞留時間 (h)
2	0.11	9.1	13.6
3	0.056	23.4	28.7
4	0.11	13.7	17.6
セマグルチド	0.10	9.0	11.4

【配列表】

0006538665000001.app

フロントページの続き

(51)Int.CI.			F I		
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	38/28	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	31/155	(2006.01)	A 6 1 K	38/28	
A 6 1 K	31/64	(2006.01)	A 6 1 K	31/155	
A 6 1 K	31/195	(2006.01)	A 6 1 K	31/64	
A 6 1 K	31/198	(2006.01)	A 6 1 K	31/195	
A 6 1 K	31/426	(2006.01)	A 6 1 K	31/198	
C 1 2 N	15/16	(2006.01)	A 6 1 K	31/426	
			C 1 2 N	15/16	

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72)発明者 ディッテ リベル

デンマーク国, デーコー - 2 6 0 0 グロストルップ, スメデランド 3 6 , ジーランド ファーマ アクティーゼルスカブ

(72)発明者 ヤコブ リンド トルボルウ

デンマーク国, デーコー - 2 6 0 0 グロストルップ, スメデランド 3 6 , ジーランド ファーマ アクティーゼルスカブ

(72)発明者 ディーター ボルフガング ハンプレヒト

ドイツ連邦共和国, 5 5 2 1 6 イングルハイム アム ライン, ピンガー シュトラーセ 1 7 3 , ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング

(72)発明者 ボルフガング リスト

ドイツ連邦共和国, 5 5 2 1 6 イングルハイム アム ライン, ピンガー シュトラーセ 1 7 3 , ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表2 0 1 2 - 5 1 1 9 0 1 (JP, A)

国際公開第2 0 1 1 / 0 8 8 8 3 7 (WO, A1)

国際公開第2 0 1 2 / 1 5 0 5 0 3 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C07K 14/605
JSTPLus/JMEDPLus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)