(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-536795
(P2019-536795A)
(43)公表日　令和1年12月19日(2019.12.19)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 14/605	(2006.01)	C07K	14/605	4C084
A61K 38/26	(2006.01)	A61K	38/26	4H045
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	
A61P 1/00	(2006.01)	A61P	1/00	
A61P 3/04	(2006.01)	A61P	3/04	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 69 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-529534 (P2019-529534)
(86)(22)出願日　平成29年12月1日 (2017.12.1)
(85)翻訳文提出日　令和1年7月25日 (2019.7.25)
(86)国際出願番号　PCT/EP2017/081126
(87)国際公開番号　WO2018/100135
(87)国際公開日　平成30年6月7日 (2018.6.7)
(31)優先権主張番号　16306605.3
(32)優先日　平成28年12月2日 (2016.12.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　504456798
サノフイ
ＳＡＮＯＦＩ
フランス国、エフ－７５００８・パリ、リユ・ラ・ボエテイ・５４
５４　ｒｕｅ　Ｌａ　Ｂｏ▲ｅ▼ｔｉｅ，Ｆ－７５００８　Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100140132
弁理士　竹林　則幸

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ペプチドＧＬＰ１／グルカゴン／ＧＩＰ受容体アゴニストとしての新しい化合物

(57)【要約】
本発明は、三重ＧＬＰ－１／グルカゴン／ＧＩＰ受容体アゴニスト、ならびに例えば糖尿病および肥満を含めたメタボリックシンドロームの障害の処置における、ならびに過剰な食物摂取を減少させるためのその医学的使用に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式Ｉの化合物：
H_2N－Ｈｉｓ－Ａｉｂ－Ｇｌｎ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ｘ１４－Ｇｌｕ－Ｘ１６－Ｇｌｎ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ａｉｂ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｌａ－Ｘ２９－Ｇｌｙ－Ｘ３１－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ａｉｂ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－R^1　　Ｉ
［式中、
Ｘ１４は、Ｌｙｓ、Ｏｒｎ、Ｄａｂ、もしくはＤａｐからなる群から選択される、官能化されている－NH_2側鎖基を有するアミノ酸残基を表し、ここで、－NH_2側鎖基は－Ｚ－Ｃ（Ｏ）－R^5によって官能化されており、式中、
Ｚは、全ての立体異性体型におけるリンカーを表し、
R^5は、炭素原子最大５０個、ならびにＮおよびＯから選択されるヘテロ原子を含む部分であり、
Ｘ１６は、ＧｌｕおよびＬｙｓから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
R^1は、NH_2もしくはＯＨを表す］
またはその塩もしくは溶媒和物。
【請求項２】
R^1はNH_2である、
請求項１に記載の化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物。
【請求項３】
ペプチド化合物は、グルカゴン受容体において天然のグルカゴンに比べて少なくとも１％の相対的活性を有する、
請求項１～２のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項４】
ペプチド化合物は、ＧＬＰ－１受容体においてＧＬＰ－１（７－３６）－アミドに比べて少なくとも１０％の相対的活性を示す、
請求項１～３のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項５】
ペプチド化合物は、ＧＩＰ受容体においてＧＩＰに比べて少なくとも２％の相対的活性を示す、請求項１～４のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項６】
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－NH_2側鎖基は－Ｚ－Ｃ（Ｏ）R^5基で官能化されており、式中、
Ｚは、ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ－ｇＡＡＡ－、ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ、ＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃ－ｇＧｌｕ、およびＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃから選択される基を表し、
R^5は、ペンタデカニル、またはヘプタデカニルから選択される基を表す、
請求項１～５のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項７】
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－NH_2側鎖基は－Ｚ－Ｃ（Ｏ）R^5基で官能化されており、式中、
Ｚは、ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ－ｇＡＡＡ－およびｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃから選択される基を表し；
R^5は、ペンタデカニルまたはヘプタデカニルから選択される基を表す、
請求項１～５のいずれか１項に記載の化合物。

【請求項８】
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチル－、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチル－、［２－（２－｛２－［２－（２－｛２－［２－（２－オクタデカノイルアミノ－エトキシ）－エトキシ］－アセチルアミノ｝－エトキシ）－エトキシ］－アセチルアミノ｝－エトキシ）－エトキシ］－アセチル－によって官能化されており、
Ｒ^{1}はＮＨ$_2$を表す、
請求項１～５のいずれか１項に記載の化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物。
【請求項９】
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチル、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルによって官能化されており、
Ｒ^{1}はＮＨ$_2$を表す、
請求項１～５のいずれか１項に記載の化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物。
【請求項１０】
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６はＧｌｕおよびＬｙｓから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｒ^{1}はＮＨ$_2$を表す、
請求項１～９のいずれか１項に記載の化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物。
【請求項１１】
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、ＧｌｕおよびＬｙｓから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ２９は、Ｇｌｙを表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｒ^{1}はＮＨ$_2$を表す、
請求項１～９のいずれか１項に記載の化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物。
【請求項１２】

Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、Ｌｙｓを表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｒ^{1}はＮＨ$_2$を表す、
請求項１～８のいずれか１項に記載の化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項１３】
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、ＧｌｕおよびＬｙｓから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、Ｐｒｏを表し、
Ｒ^{1}はＮＨ$_2$を表す、
請求項１～９のいずれか１項に記載の化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項１４】
配列番号６～２３の化合物から選択される、請求項１～１３のいずれか１項に記載の化合物、ならびにその塩または溶媒和物。

【請求項１５】
配列番号６によって表される、請求項１に記載の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項１６】
配列番号９によって表される、請求項１に記載の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項１７】
配列番号１１によって表される、請求項１に記載の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項１８】
ヒトの医療における使用のための、請求項１～１７のいずれか１項に記載の化合物。

【請求項１９】
医薬品としての使用のための、請求項１～１７のいずれか１項に記載の化合物。

【請求項２０】
少なくとも１つの薬学的に許容される担体と一緒に医薬組成物中に活性薬剤として存在する、請求項１８～１９のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項２１】
少なくとも１つのさらなる治療的活性薬剤と一緒になった、請求項１９～２０のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項２２】
少なくとも１つのさらなる治療的活性薬剤は、
インスリンおよびインスリン誘導体；
ＧＬＰ－１、ＧＬＰ－１類似体およびＧＬＰ－１受容体アゴニスト；
ＤＰＰ－４インヒビター；
ＳＧＬＴ２インヒビター；
二重ＳＧＬＴ２／ＳＧＬＴ１インヒビター；

ビグアナイド、チアゾリジンジオン、二重ＰＰＡＲアゴニスト、スルホニル尿素、メグリチニド、アルファ－グルコシダーゼインヒビター、アミリンおよびアミリン類似体；
ＧＰＲ１１９アゴニスト、ＧＰＲ４０アゴニスト、ＧＰＲ１２０アゴニスト、ＧＰＲ１４２アゴニスト、全身性または低吸収性のＴＧＲ５アゴニスト；
メシル酸ブロモクリプチン、１１－ベーター－ＨＳＤのインヒビター、グルコキナーゼのアクチベーター、ＤＧＡＴのインヒビター、プロテインチロシンホスファターゼ１のインヒビター、グルコース－６－ホスファターゼのインヒビター、フルクトース－１，６－ビスホスファターゼのインヒビター、グリコーゲンホスホリラーゼのインヒビター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼのインヒビター、グリコーゲンシンターゼキナーゼのインヒビター、ピルビン酸デヒドロキナーゼのインヒビター、アルファ２－アンタゴニスト、ＣＣＲ－２アンタゴニスト、ＳＧＬＴ－１インヒビター、グルコーストランスポーター－４のモジュレーター、ソマトスタチン受容体３アゴニスト；
脂質低下薬；
肥満を処置するための活性物質；
消化管ペプチド；
リパーゼインヒビター、血管新生インヒビター、Ｈ３アンタゴニスト、ＡｇＲＰインヒビター、トリプルモノアミン取込みインヒビター、ＭｅｔＡＰ２インヒビター、カルシウムチャネルブロッカーであるジルチアゼムの経鼻製剤、線維芽細胞成長因子受容体４の生成に対するアンチセンス分子、プロヒビチン標的化ペプチド－１；ならびに
高血圧、慢性心不全またはアテローム性動脈硬化に影響を及ぼすための薬物
からなる群から選択される、請求項２１に記載の使用のための化合物。

【請求項２３】
グルコース不耐性、インスリン抵抗性、糖尿病前症、空腹時グルコースの上昇、高血糖、２型糖尿病、高血圧、異脂肪血症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、末梢動脈疾患、脳卒中、またはこれら個々の疾患の構成成分の任意の組合せを処置するための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項２４】
食欲、摂食、およびカロリー摂取のコントロール、エネルギー支出の増大、体重増加の予防、体重減少の促進、体重過剰の減少、および病的肥満を含めた肥満の全体的な処置のための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項２５】
肝脂肪症の処置または予防のための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項２６】
高血糖、糖尿病、および肥満の処置または予防のための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項２７】
糖尿病および肥満を同時に処置するための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項２８】
２型糖尿病の処置のための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項２９】
肥満の処置のための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項３０】
患者の腸通過を低減するため、胃内容物を増大するためおよび／または食物摂取を減少させるための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項３１】
患者の血中グルコースレベルを低下させるためおよび／またはＨｂＡ１ｃレベルを低下させるための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。

【請求項３２】
患者の体重を減少させるための、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の使用のための化合物。
【請求項３３】
医薬品としての使用のための、請求項１～１７のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物またはそれらのうちのいずれかの生理学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含む医薬組成物。
【請求項３４】
請求項１～１７のいずれか１項に記載の少なくとも１つの化合物またはそれらのうちのいずれかの生理学的に許容される塩もしくは溶媒和物と、少なくとも１つのさらなる薬学的活性成分とを含む医薬組成物。
【請求項３５】
患者において高血糖、２型糖尿病または肥満を処置するための方法であって、請求項１～１７のいずれか１項に記載の少なくとも１つの式Ｉの化合物の有効量と、糖尿病、肥満、異脂肪血症または高血圧を処置するのに有用な少なくとも１つの他の化合物の有効量とを患者に投与することを含む前記方法。
【請求項３６】
少なくとも１つの式Ｉの化合物の有効量とさらなる活性成分とが同時に患者に投与される、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
少なくとも１つの式Ｉの化合物の有効量とさらなる活性成分とが連続に患者に投与される、請求項３５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、三重ＧＬＰ－１／グルカゴン／ＧＩＰ受容体アゴニストである新しい化合物、ならびに例えば糖尿病および肥満を含めたメタボリックシンドロームの障害の処置における、ならびに過剰な食物摂取を減少させるためのその医学的使用に関する。本発明の化合物は、エキセンジン－４に構造的に由来し、ｍ－クレゾールまたはフェノールのような抗微生物性保存剤の存在下において酸性条件下で高い溶解性および安定性を示し、したがって、他の抗糖尿病性化合物との併用に特に適する。
【背景技術】
【０００２】
Ｂｈａｔら（非特許文献１）、Ｂｈａｔら（非特許文献２）、Ｇａｕｌｔら（非特許文献３）ならびにＦｉｎａｎら（非特許文献４）は、ＧＬＰ－１、グルカゴンおよびＧＩＰの作用を１つの分子において組み合わせるなどによる、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）、グルカゴンおよびグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（ＧＩＰ）受容体の三重アゴニストを記載しており、この三重アゴニストは、とりわけグルカゴン受容体が媒介する満腹感およびエネルギー消費の増大ならびにＧＩＰ受容体が媒介するインスリン分泌増大のため、純粋なＧＬＰ－１アゴニストよりも優れた抗糖尿病作用および顕著な体重減少効果のある治療原理をもたらす。
【０００３】
ＧＬＰ－１（７～３６）－アミドのアミノ酸配列を配列番号１に示す。
ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲ－ＮＨ$_2$
【０００４】
リラグルチドは、市販されている化学修飾されたＧＬＰ－１類似体であり、他の修飾の中でも、脂肪酸が２０位のリジンに連結し、作用時間の延長をもたらす（非特許文献５；非特許文献６）。
【０００５】
リラグルチドのアミノ酸配列を配列番号２に示す：

ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫ（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリル）ＥＦＩＡＷＬＶＲＧＲＧ－ＯＨ

【０００６】

グルカゴンは、循環グルコースが低いと血流中に放出される、アミノ酸２９個のペプチドである。グルカゴンのアミノ酸配列を配列番号３に示す：

ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＱＤＦＶＱＷＬＭＮＴ－ＯＨ

【０００７】

低血糖の間、血中グルコースレベルが正常未満に低下すると、グルカゴンはグリコーゲンを分解し、グルコースを放出するように肝臓にシグナルを送り、血中グルコースレベルの上昇を引き起こして正常レベルに到達させる。最近の出版物は、グルカゴンには、その上、体脂肪量の減少、食物摂取の減少、およびエネルギー支出の増大に対する有益な効果があることを示唆している（非特許文献７）。

【０００８】

ＧＩＰ（グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド）は、食物摂取後に腸のＫ細胞から放出される、アミノ酸４２個のペプチドである。ＧＩＰおよびＧＬＰ－１は、インクレチン効果を説明する２つの腸の腸内分泌細胞由来のホルモンであり、インクレチン効果は経口糖負荷に対するインスリン反応の７０％超を占める（非特許文献８）。

【０００９】

ＧＩＰのアミノ酸配列を配列番号５に示す：

ＹＡＥＧＴＦＩＳＤＹＳＩＡＭＤＫＩＨＱＱＤＦＶＮＷＬＬＡＱＫＧＫＫＮＤＷＫＨＮＩＴＱ－ＯＨ

【００１０】

ＧＬＰ－１またはグルカゴンの構造をベースとし、ＧＬＰ－１、グルカゴンおよびＧＩＰの受容体に結合し、それらを活性化するペプチドは、特許出願である、特許文献１、特許文献２、特許文献３、特許文献４、特許文献５、特許文献６、および特許文献７に記載されている。エキセンジン－４をベースとしたさらなる三重特異性アゴニストは、特許文献８、特許文献９、特許文献１０、特許文献１１、特許文献１２および特許文献１３に記載されている。それらの中に記載されている化合物は、血糖調節の改善、膵島細胞およびベータ細胞を保持できること、および体重減少の促進をもたらすことが示されている。

【００１１】

エキセンジン－４の類似体として設計されかつ脂肪酸側鎖で置換されている、ＧＩＰおよびＧＬＰ－１両方の受容体に結合し、両者を活性化するペプチドは、特許出願である、特許文献８、特許文献１４、特許文献１５、および特許文献１６に記載されている。

【００１２】

エキセンジン－４は、アメリカドクトカゲ（Ｈｅｌｏｄｅｒｍａ　ｓｕｓｐｅｃｔｕｍの唾液腺によって生成される、アミノ酸３９個のペプチドである。エキセンジン－４は、ＧＬＰ－１受容体のアクチベーターである一方、ＧＩＰ受容体の低い活性化は示し、グルカゴン受容体は活性化しない（表１を参照されたい）。

【００１３】

【表１】

表 1:「方法」において記載した通りに、濃度を増大させながら、形成された cAMP を測定した際のヒト GLP-1、GIP、およびグルカゴン受容体でのエキセンジン-4 の作用強度(pM で示す)

配列番号	ペプチド	EC50 hGLP-1 R [pM]	EC50 hGIP R [pM]	EC50 hグルカゴン R [pM]
4	エキセンジン-4	0.4	12500.0	>10000000

【００１４】
エキセンジン－４のアミノ酸配列を配列番号４に示す。
ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＳ－ＮＨ２
【００１５】
エキセンジン－４は、ＧＬＰ－１に観察される血糖調節作用の多くを共有する。臨床試験および非臨床試験により、エキセンジン－４には、インスリンの合成および分泌におけるグルコース依存的な増強、グルカゴン分泌のグルコース依存的な抑制、胃排出の減速、食物摂取および体重の減少、ならびにベータ細胞塊およびベータ細胞機能のマーカーの増大を含めた、いくつかの有益な抗糖尿病性の性質があることが示されている。
【００１６】
これらの作用は、糖尿病患者だけでなく肥満に苦しむ患者にも有益であり得る。肥満を有する患者は、糖尿病、高血圧、高脂血症、心血管疾患、および筋骨格疾患にかかるリスクがより高い。
【００１７】
ＧＬＰ－１に比べて、エキセンジン－４は、ジペプチジルペプチダーゼ－４（ＤＰＰ４）による切断に対して抵抗性であり、ｉｎ　ｖｉｖｏで、より長時間の半減期および作用時間をもたらす（非特許文献９）。
【００１８】
エキセンジン－４は、ＧＬＰ－１、グルカゴン、またはオキシントモジュリンに比べると、中性エンドペプチダーゼ（ＮＥＰ）による分解に対してはるかにより安定であることも示された（非特許文献１０）。それにもかかわらず、エキセンジン－４は、２８位のアスパラギンの脱アミドおよび異性体化（特許文献１７）同様、１４位のメチオニンの酸化（非特許文献１１）のため、化学的に不安定である。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１９】
【特許文献１】ＷＯ２０１０／０１１４３９
【特許文献２】ＷＯ２０１０／１４８０８９
【特許文献３】ＷＯ２０１２／０８８１１６
【特許文献４】ＷＯ２０１３／１９２１２９
【特許文献５】ＷＯ２０１３／１９２１３０
【特許文献６】ＷＯ２０１４／０４９６１０
【特許文献７】ＷＯ２０１５／０６７７１６
【特許文献８】ＷＯ２０１４／０９６１４５
【特許文献９】ＷＯ２０１５／０８６７３１
【特許文献１０】ＷＯ２０１５／０８６７３２
【特許文献１１】ＷＯ２０１５／０８６７３３

【特許文献１２】ＷＯ２０１５／１５５１４１
【特許文献１３】ＰＣＴ／ＥＰ２０１６／０６３３３２
【特許文献１４】ＷＯ２０１４／０９６１５０　Ａ１
【特許文献１５】ＷＯ２０１４／０９６１４９　Ａ１
【特許文献１６】ＷＯ２０１４／０９６１４８　Ａ１
【特許文献１７】ＷＯ２００４／０３５６２３
【非特許文献】
【００２０】
【非特許文献１】Ｂｈａｔら、Ｄｉａｂｅｔｏｌｏｇｉａ　２０１３、５６、１４１７～１４２４
【非特許文献２】Ｂｈａｔら、Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１３、８５、１６５５～６２
【非特許文献３】Ｇａｕｌｔら、Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２０１３、２８８、３５５８１～９１
【非特許文献４】Ｆｉｎａｎら、Ｎａｔ　Ｍｅｄ．２０１５、２１、２７～３６
【非特許文献５】Ｄｒｕｃｋｅｒら、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃ．、２０１０年、９巻、２６７～２６８頁
【非特許文献６】Ｂｕｓｅら、Ｌａｎｃｅｔ、２００９年、３７４巻、３９～４７頁
【非特許文献７】Ｈｅｐｐｎｅｒら、Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ＆Ｂｅｈａｖｉｏｒ、２０１０年、１００巻、５４５～５４８頁
【非特許文献８】Ｂａｇｇｉｏら、Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ、２００７年、１３２巻、２１３１～２１５７頁
【非特許文献９】Ｅｎｇ　Ｊ．、Ｄｉａｂｅｔｅｓ、１９９６年、４５巻（補完２）、１５２Ａ頁（抄録５５４頁）
【非特許文献１０】Ｄｒｕｃｅら、Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ、２００９年、１５０巻（４）、１７１２～１７２２頁
【非特許文献１１】Ｈａｒｇｒｏｖｅら、Ｒｅｇｕｌ．Ｐｅｐｔ．、２００７年、１４１巻、１１３～１１９頁
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２１】
Ｂｌｏｏｍら（ＷＯ２００６／１３４３４０）は、グルカゴンおよびＧＬＰ－１受容体の両者に結合し、両者を活性化するペプチドは、グルカゴンおよびエキセンジン－４からハイブリッドの分子として構築することができ、この場合、Ｎ末端部分（例えば、残基１～１４または１～２４）はグルカゴンから生じ、Ｃ末端部分（例えば、残基１５～３９または２５～３９）はエキセンジン－４から生じることを開示している。このようなペプチドは、１０～１３位にグルカゴンのアミノ酸モチーフであるＹＳＫＹを含む。Ｋｒｓｔｅｎａｎｓｋｙら（Ｋｒｓｔｅｎａｎｓｋｙら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、１９８６年、２５巻、３８３３～３８３９頁）は、グルカゴンのこれらの残基１０～１３は、アデニル酸シクラーゼの受容体の相互作用および活性化に重要であることを示している。
【００２２】
ＧＬＰ－１、グルカゴン、およびオキシントモジュリンに比べて、エキセンジン－４には、溶液中および生理学的条件下の溶解性および安定性（ＤＰＰ４またはＮＥＰなどの酵素による分解に対する酵素の安定性を含む）などの、有益な物理化学的性質があり、これによりｉｎ　ｖｉｖｏでより長期間の作用がもたらされる。
【００２３】
それにもかかわらず、エキセンジン－４も、１４位のメチオニンの酸化、ならびに２８位のアスパラギンの脱アミドおよび異性体化のため、化学的に不安定であることが示されている。１４位のメチオニンの置換により、ならびにアスパルトイミド形成、特に２８位および２９位のＡｓｐ－ＧｌｙまたはＡｓｎ－Ｇｌｙによって分解されやすいことが知ら

れている配列を避けることにより、安定性をさらに改善することができる。
【課題を解決するための手段】
【００２４】
本発明の化合物では、根底となる残基のいくつかが、グルカゴンおよびＷＯ２００６／１３４３４０に記載されるペプチドと異なる。特に、グルカゴンの原線維形成に寄与することが知られている残基Ｔｙｒ１０およびＴｙｒ１３は（ＪＳ　Ｐｅｄｅｒｓｅｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２００６年、４５巻、１４５０３～１４５１２頁）、Ｌｅｕによって置き換えられている。この置換は、特に２３位のイソロイシンおよび２４位のグルタメートと組み合わさって、溶液中の可溶性または凝集の挙動として生物物理学的性質が潜在的に改善されたエキセンジン－４誘導体をもたらす。エキセンジン－４類似体の１３位の芳香族アミノ酸を脂肪族アミノ酸で非保存的置換することで、それらのＧＬＰ－１受容体に対する活性を保ったまま、グルカゴンおよびＧＩＰ両方の受容体に対して高い活性を有するペプチドがもたらされる。
【００２５】
天然のエキセンジン－４は、グルカゴン受容体に対する活性がなく、ＧＩＰ受容体に対する活性が低い、純粋なＧＬＰ－１受容体アゴニストである。本発明の化合物は、天然のエキセンジン－４の構造をベースとするが、配列番号４に比べて１４個以上の位置において異なり、この場合、この違いがグルカゴン受容体およびＧＩＰ受容体でのアゴニスト活性の増強に寄与する。他の置換の中でも、１４位のメチオニンが、側鎖に－NH_2基を有するアミノ酸によって置換され、これが親油性残基によってさらに置換されている（例えば、リンカーと組み合わされている脂肪酸）。さらに、１３、１９、２０、３２、３４、３５および３９位のエキセンジン－４アミノ酸を１３位でＬｅｕ、１９位でＧｌｎ、２０位でＡｉｂまたはＬｙｓアミノ酸、３４位でＡｉｂ、３２位でＰｒｏ、ならびに３５および３９位でＬｙｓによって置換すると、ＧＬＰ－１受容体に対する高い活性を保ったまま、グルカゴンならびにＧＩＰ両方の受容体に対する高い活性をもたらす。これらのペプチドは、ｐＨ４．５のような、酸性ｐＨ値で高い化学的安定性、溶解性および物理的安定性も示す。
【００２６】
本発明の化合物は、以下の式Ｉを有する：
H_2N－Ｈｉｓ－Ａｉｂ－Ｇｌｎ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ｘ１４－Ｇｌｕ－Ｘ１６－Ｇｌｎ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ａｉｂ－Ｇｌｕ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ａｌａ－Ｘ２９－Ｇｌｙ－Ｘ３１－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ａｉｂ－Ｌｙｓ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－R^1　　Ｉ
［式中、
Ｘ１４は、Ｌｙｓ、Ｏｒｎ、Ｄａｂ、またはＤａｐからなる群から選択される、官能化されている－NH_2側鎖基を有するアミノ酸残基を表し、ここで、－NH_2側鎖基は－Ｚ－Ｃ（Ｏ）－R^5によって官能化されており、式中、
Ｚは、全ての立体異性体型におけるリンカーを表し、
R^5は、炭素原子最大５０個、ならびにＮおよびＯから選択されるヘテロ原子を含む部分であり、
Ｘ１６は、ＬｙｓおよびＧｌｕから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
R^1は、NH_2またはＯＨである］
またはこれらの塩もしくは溶媒和物。
【００２７】
本発明の化合物は、方法に記載するアッセイ系において細胞内ｃＡＭＰ形成を刺激することができるという観察によって決定される通り、ＧＬＰ－１、グルカゴンおよびＧＩＰ受容体アゴニストである。

【００２８】
別の一実施形態によると、特に、親油性残基でさらに置換されている１４位のリジンを有する本発明の化合物は、ＧＬＰ－１受容体のＧＬＰ－１（７－３６）アミドに比べて、相対的活性を少なくとも０．１％（すなわち、EC_{50}＜７００ｐＭ）、より好ましくは１％（すなわち、EC_{50}＜７０ｐＭ）、より好ましくは５％（すなわち、EC_{50}＜１４ｐＭ）、およびさらにより好ましくは１０％（すなわち、EC_{50}＜７ｐＭ）表す。さらに、本発明の化合物は、グルカゴン受容体において天然のグルカゴンに比べて、０．１％（すなわち、EC_{50}＜５００ｐＭ）、より好ましくは０．２５％（すなわち、EC_{50}＜２００ｐＭ）、より好ましくは０．４％（＜１２５ｐＭ）、さらにより好ましくは１％（すなわち、EC_{50}＜５０ｐＭ）の相対的活性を少なくとも示す。さらに、本発明の化合物は、ＧＩＰ受容体において天然のＧＩＰに比べて、０．１％（すなわち、EC_{50}＜４００ｐＭ）、より好ましくは０．４％（すなわち、EC_{50}＜１００ｐＭ）、より好ましくは１％（＜４０ｐＭ）、さらにより好ましくは２％（すなわち、EC_{50}＜２０ｐＭ）の相対的活性を少なくとも示す。

【００２９】
本明細書で用いる「活性」の語は、好ましくは、化合物がヒトＧＬＰ－１受容体、ヒトグルカゴン受容体およびヒトＧＩＰ受容体を活性化させる性能を意味する。より好ましくは、本明細書で用いる「活性」の語は、化合物が、細胞内ｃＡＭＰ形成を刺激する性能を意味する。本明細書で用いる「相対活性」の語は、化合物が、別の受容体アゴニストに比べて、または別の受容体に比べて、ある比率で受容体を活性化させる性能を意味すると理解される。アゴニストによる受容体の活性化は（例えば、ｃＡＭＰレベルの測定による）、実施例などに記載する通り、本明細書に記載する通りに決定される。

【００３０】
本発明の化合物は、好ましくは、ｈＧＬＰ－１受容体に対して、４５０ｐＭ以下、好ましくは２００ｐＭ以下、より好ましくは１００ｐＭ以下、より好ましくは５０ｐＭ以下、より好ましくは２５ｐＭ以下、より好ましくは１０ｐＭ以下、より好ましくは８ｐＭ以下、より好ましくは５ｐＭ以下のEC_{50}、ならびにｈグルカゴン受容体に対して、４５０ｐＭ以下、好ましくは２００ｐＭ以下、より好ましくは１００ｐＭ以下、より好ましくは５０ｐＭ以下のEC_{50}、ならびにｈＧＩＰ受容体に対して、４５０ｐＭ以下、好ましくは２００ｐＭ以下、より好ましくは１００ｐＭ以下、より好ましくは５０ｐＭ以下、より好ましくは２５ｐＭ以下のEC_{50}を有する。ｈＧＬＰ－１受容体、ｈグルカゴン受容体、およびｈＧＩＰ受容体に対するEC_{50}は、本明細書における方法に記載する通りに、および実施例に記載する結果を生成するように用いる通りに決定することができる。

【００３１】
式Ｉの化合物、特に親油性残基でさらに置換されている１４位のリジンを有する化合物は、１４位に元のメチオニン（エキセンジン－４由来）またはロイシンを有する誘導体に比べて、グルカゴン受容体活性化の上昇を示す（ＷＯ２０１４／０５６８７２も参照されたい）。さらに、メチオニンの酸化（ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ）は、これ以上可能ではない。

【００３２】
式Ｉの化合物は、グルカゴン受容体に対する高い活性を示すだけでなく、ＧＩＰ受容体に対しても同様に高い活性を示す。ＧＩＰ受容体に対するさらなる高い活性は、純粋なＧＬＰ－１受容体アゴニズムと比べて血中グルコース対照に対する高い効能を目的とし、ＧＬＰ－１部分の寄与を減少させることができるので、胃腸障害のようなＧＬＰ－１に関連する副作用の可能性を低下させることが意図される。さらなるＧＩＰ受容体活性は、グルカゴン受容体活性化による潜在的なグルコース増加を打ち消すことも意図され、したがって、式Ｉの化合物において観察されるようなより高いグルカゴン受容体活性を可能にする（非特許文献４）。

【００３３】
一実施形態において、本発明の化合物は、フェノールまたはｍ－クレゾールのような抗

微生物性保存剤の存在下において酸性のかつ／または生理学的なｐＨ値で、例えば、ｐＨ４から５までの酸性度範囲で、特に、ｐＨ４．５および／またはより生理学的なｐＨ６から８までの範囲、特に、ｐＨ７．４、２５℃または４０℃で溶解性が高く、別の一実施形態において、少なくとも１ｍｇ／ｍｌ、および特定の一実施形態において、少なくとも５ｍｇ／ｍｌである。

【００３４】

さらに、本発明の化合物は、フェノールまたはｍ－クレゾールのような抗微生物性保存剤の存在下において溶液中で保存した場合に安定性が高いのが好ましい。安定性を決定するのに好ましいアッセイ条件は、ｐＨ４から５までの酸性度範囲、特に、ｐＨ４．５の溶液中、２５℃または４０℃、２８日間の保存である。ペプチドの安定性は、方法に記載しているようなクロマトグラフィー分析によって決定する。ｐＨ４．５の溶液中、４０℃、２８日後に純度低下が、２０％以下であるのが好ましく、より好ましくは１５％以下、より好ましくは１２％以下、さらにより好ましくは１０％以下である。

【００３５】

一実施形態において、本発明の化合物は、方法に記載しているような動的光散乱によってアッセイされるように、フェノールまたはｍ－クレゾールのような抗微生物性保存剤の存在下において、例えば、ｐＨ４から５までの酸性度範囲、２５℃で、特に、ｐＨ４．５、２５℃で、≧１ｍｇ／ｍｌの濃度で５ｎｍ以下の流体力学的半径R_hを示す。

【００３６】

一実施形態において、本発明の化合物は、方法に記載しているようなＴｈｔアッセイによってアッセイされるように、フェノールまたはｍ－クレゾールのような抗微生物性保存剤の存在下において、例えば、ｐＨ４から５までの酸性度範囲、特に、ｐＨ４．５、３７℃、５時間にわたって、より好ましくは１０時間にわたって、より好ましくは２０時間にわたって、より好ましくは３０時間にわたって、より好ましくは４０時間にわたって、さらにより好ましくは４５時間にわたって、蛍光プローブとして３ｍｇ／ｍｌの濃度でチオフラビンＴを用いた蛍光強度において上昇を示さない。

【００３７】

一実施形態において、本発明の化合物は、中性エンドペプチダーゼ（ＮＥＰ）およびジペプチジルペプチダーゼ－４（ＤＰＰ４）による切断により抵抗性であり、天然のＧＬＰ－１およびグルカゴンと比べた場合、ｉｎ　ｖｉｖｏで、より長時間の半減期および作用時間をもたらす。

【００３８】

一実施形態において、本発明の化合物が、直鎖状配列の３９個のアミノカルボン酸、特にペプチド結合、すなわちカルボキサミド結合によって連結されているα－アミノカルボン酸である、ペプチド部分を含むのが好ましい。

【００３９】

一実施形態において、R^1はNH_2である。

【００４０】

－Ｚ－Ｃ（Ｏ）－R^5基に特に好ましい例を以下の表２に列挙し、これらは、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル、（４Ｓ）－カルボキシ－［２－（２－｛２－［（４Ｒ）－５－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ペンタノイルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－ブチリル、（４Ｓ）－カルボキシ－［２－（２－｛２－［（４Ｒ）－５－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ペンタノイルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－ブチリル、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチル、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキ

シ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチル、［２－（２－｛２－［２－（２－｛２－［２－（２－オクタデカノイルアミノ－エトキシ）－エトキシ］－アセチルアミノ｝－エトキシ）－エトキシ］－アセチルアミノ｝－エトキシ）－エトキシ］－アセチル－から選択される。

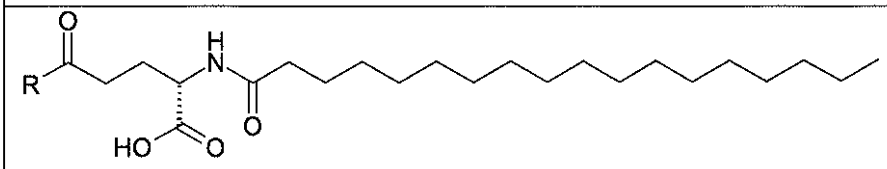
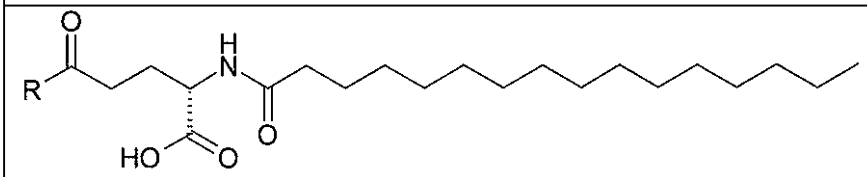
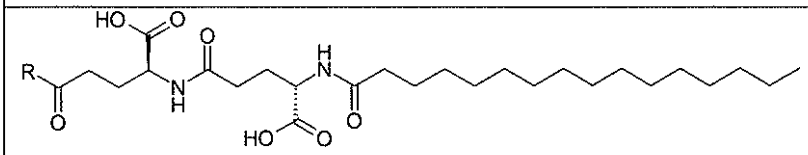
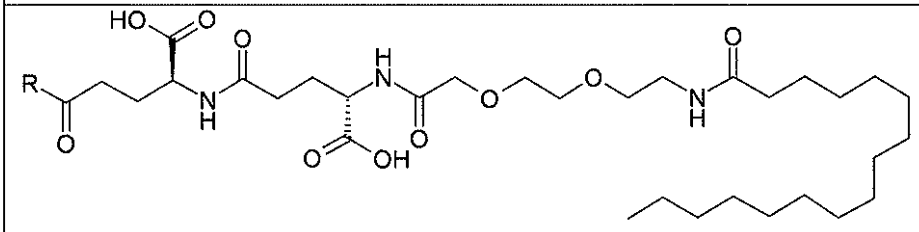
【００４１】

立体異性体、特に、Ｓ－またはＲ－エナンチオマーいずれかの、これらの基のエナンチオマーがさらに好ましい。表２における「Ｒ」の語は、ペプチドバックボーンでの－Ｚ－Ｃ（Ｏ）－Ｒ^{5}付着部位、例えば、Ｌｙｓのイプシロン－アミノ基を意味するものとされる。

【００４２】

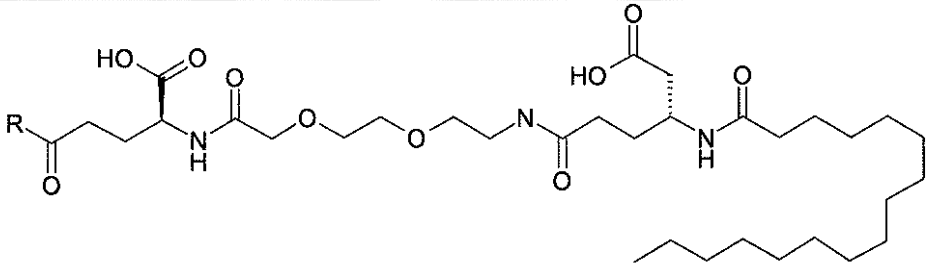
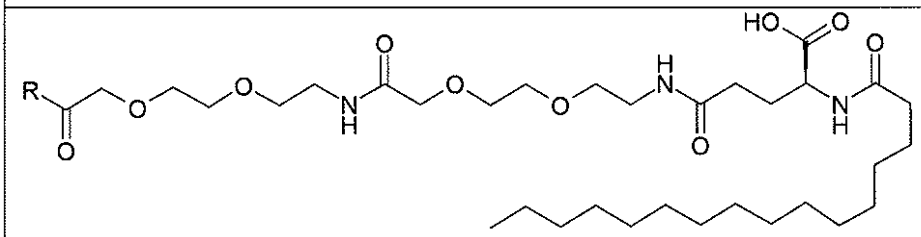
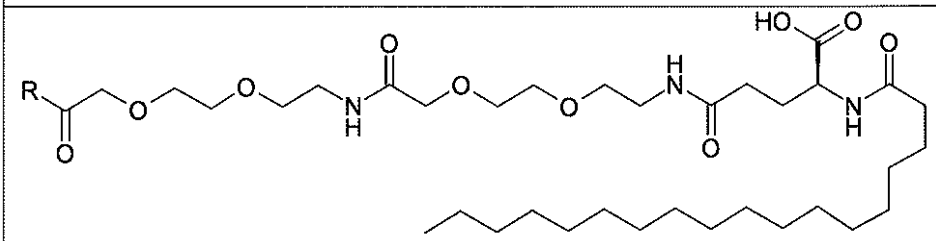
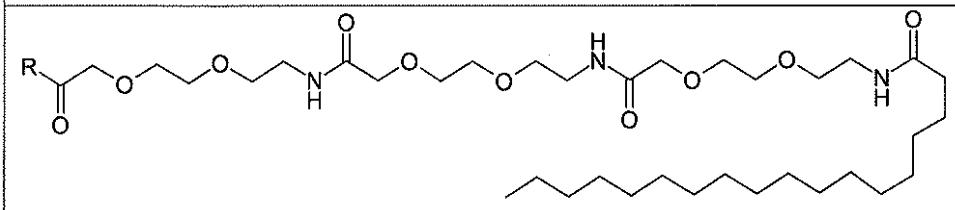
【表２】

表2

構造/IUPAC	名称
 (S)-4-カルボキシ-4-オクタデカノイルアミノ-ブチリル-	gGlu-Stea
 (S)-4-カルボキシ-4-ヘキサデカノイルアミノ-ブチリル-	gGlu-Palm
 (S)-4-カルボキシ-4-((S)-4-カルボキシ-4-ヘキサデカノイルアミノ-ブチリルアミノ)-ブチリル-	gGlu-gGlu-Palm
 [[(4S)-4-カルボキシ-4-[[(4S)-4-カルボキシ-4-[[2-[2-[2-(ヘキサデカノイルアミノ)エトキシ]エトキシ]アセチル]アミノ]ブチリルアミノ]-ブチリル-	gGlu- gGlu-AEEAc-Palm

【００４３】

【表３】

 (4S)-カルボキシ- [2-(2-{2-[(4R)-5-カルボキシ-4-ヘキサデカノイルアミノ-ペンタノイルアミノ]-エトキシ}-エトキシ)-アセチルアミノ]-ブチリル	gGlu-AEEAc-gAAA-Palm
 (2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-カルボキシ-4-ヘキサデカノイルアミノ-ブチリルアミノ]-エトキシ}-エトキシ)-アセチルアミノ]-エトキシ}-エトキシ)-アセチル	AEEAc-AEEAc-gGlu-Palm
 (2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-カルボキシ-4-オクタデカノイルアミノ-ブチリルアミノ]-エトキシ}-エトキシ)-アセチルアミノ]-エトキシ}-エトキシ)-アセチル	AEEAc-AEEAc-gGlu-Stea
 [2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-オクタデカノイルアミノ-エトキシ)-エトキシ]-アセチルアミノ}-エトキシ)-エトキシ]-アセチルアミノ}-エトキシ)-エトキシ]-アセチル-	AEEAc-AEEAc-AEEAc-Stea

【００４４】

さらなる一実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は－Ｚ－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{5}基で官能化されており、式中、
Ｚは、ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ－ｇＡＡＡ－、ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ、ＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃ－ｇＧｌｕ、およびＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃから選択される基を表し、
Ｒ^{5}は、ペンタデカニル、またはヘプタデカニルから選択される基を表す、
式Ｉの化合物に関する。

【００４５】

さらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は－Ｚ－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{5}基で官能化されており、式中、
Ｚは、ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ－ｇＡＡＡ－およびｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃから選択される基を表し；
Ｒ^{5}は、ペンタデカニルまたはヘプタデカニルから選択される基を表す、
式Ｉの化合物に関する。

【００４６】

さらなる一実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチル－、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチル－、［２－（２－｛２－［２－（２－｛２－［２－（２－オクタデカノイルアミノ－エトキシ）－エトキシ］－アセチルアミノ｝－エトキシ）－エトキシ］－アセチルアミノ｝－エトキシ）－エトキシ］－アセチル－によって官能化されており、
Ｒ^{1}はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはこれらの塩もしくは溶媒和物に関する。

【００４７】

さらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチル、（２－｛２－［２－（２－｛２－［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルアミノ］－エトキシ｝－エトキシ）－アセチルによって官能化されており、
Ｒ^{1}はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはこれらの塩もしくは溶媒和物に関する。

【００４８】

さらなる一実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－に

よって官能化されており、
Ｘ１６は、ＧｌｕおよびＬｙｓから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
R^1はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはこれらの塩もしくは溶媒和物に関する。
【００４９】
さらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、ＧｌｕおよびＬｙｓから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ２９は、Ｇｌｙを表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
R^1はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物
に関する。
【００５０】
さらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、Ｇｌｕを表し、
Ｘ２９は、ＤｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、Ｈｉｓを表し、
R^1はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物
に関する。
【００５１】
さらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、Ｇｌｕを表し、
Ｘ２９は、Ｇｌｙを表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
R^1はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物
に関する。
【００５２】
さらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－によって官能化さ

れており、
Ｘ１６は、Ｌｙｓを表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
R^1はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物
に関する。
【００５３】
さらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、ＧｌｕおよびＬｙｓから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、Ｐｒｏを表し、
R^1はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物
に関する。
【００５４】
さらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－オクタデカノイルアミノ－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、Ｌｙｓを表し、
Ｘ２９は、Ｄ－ＡｌａおよびＧｌｙから選択されるアミノ酸残基を表し、
Ｘ３１は、Ｐｒｏを表し、
R^1はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物
に関する。
【００５５】
なおさらなる実施形態は、
Ｘ１４はＬｙｓを表し、ここで、－ＮＨ$_2$側鎖基は、（Ｓ）－４－カルボキシ－４－（（Ｓ）－４－カルボキシ－４－ヘキサデカノイルアミノ－ブチリルアミノ）－ブチリル－によって官能化されており、
Ｘ１６は、Ｌｙｓを表し、
Ｘ２９は、Ｄ－Ａｌａを表し、
Ｘ３１は、ＨｉｓおよびＰｒｏから選択されるアミノ酸残基を表し、
R^1はＮＨ$_2$を表す、
式Ｉの化合物、
またはその塩もしくは溶媒和物
に関する。
【００５６】
式Ｉの化合物の具体的な例は、配列番号６～２３の化合物、ならびにその塩または溶媒和物である。
【００５７】

式Ｉの化合物の具体的な例は、配列番号６、９および１１の化合物、ならびにその塩または溶媒和物である。

【００５８】

式Ｉの化合物の特定の例は、配列番号６の化合物、ならびにその塩または溶媒和物である。

【００５９】

式Ｉの化合物の特定の例は、配列番号９の化合物、ならびにその塩または溶媒和物である。

【００６０】

式Ｉの化合物の特定の例は、配列番号１１のペプチド化合物、ならびにその塩または溶媒和物である。

【００６１】

さらなる一態様において、本発明は、担体との混合物における本発明の化合物を含む組成物に関する。好ましい実施形態において、組成物は薬学的に許容される組成物であり、担体は薬学的に許容される担体である。本発明の化合物は、薬学的に許容される塩などの塩、または水和物などの溶媒和物の形態におけるものでよい。なおさらなる一態様において、本発明は、医療処置の方法における、特にヒトの医療における使用のための組成物に関する。

【００６２】

式Ｉの化合物は、さらなる治療的に有効な薬剤なしでのヒトの治療に適する。しかし、他の実施形態において、「併用治療」において記載する通り、化合物を、少なくとも１つのさらなる治療的活性薬剤と一緒に用いてもよい。

【００６３】

式Ｉの化合物は、炭水化物および／または脂質の代謝における障害によって引き起こされ、障害に関連し、および／または障害を伴う疾患または障害の処置または予防に、例えば、高血糖、２型糖尿病、耐糖能障害、１型糖尿病、肥満、メタボリックシンドロームの処置または予防に特に適する。さらに、本発明の化合物は、変性疾患、特に神経変性疾患の処置または予防に特に適することがある。

【００６４】

記載する化合物は、とりわけ、体重増加の予防、または体重減少の促進における使用を見出すものである。「予防する」とは、処置の非存在に比べた場合の阻害または低減を意味するものであり、障害の完全な中止をほのめかすことを必ずしも意味するものではない。

【００６５】

本発明の化合物は、食物摂取における減少および／またはエネルギー支出における増大を引き起こし、体重に対する観察される効果をもたらし得る。

【００６６】

体重に対するこれらの効果とは無関係に、本発明の化合物は、循環コレステロールレベルに対する有益な効果があり得、脂質レベル、特にＬＤＬ、およびＨＤＬレベルを改善する（例えば、ＨＤＬ／ＬＤＬ比を上げる）ことができる。

【００６７】

このように、本発明の化合物は、体重過剰によって引き起こされ、または体重過剰を特徴とする任意の状態の直接的または間接的な治療、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、肥満誘発性の睡眠時無呼吸の処置および／または予防に用いてもよい。本発明の化合物はまた、メタボリックシンドローム、糖尿病、高血圧、アテローム生成的な異脂肪血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈心疾患、または脳卒中の処置および予防に用いてもよい。これらの状態における本発明の化合物の効果は、本発明の化合物の体重に対する効果の結果として、または効果に関連するものでもよく、またはこれらに無関係でもよい。

【００６８】

医学的使用は、食物摂取を減少させ、エネルギー支出を増大し、体重を減少させ、耐糖能障害（ＩＧＴ）から２型糖尿病への進行を遅らせるための２型糖尿病における疾患の進行の遅延または予防、メタボリックシンドロームの処置、肥満の処置、または過体重の予防；２型糖尿病からインスリン要求性糖尿病；および肝臓脂肪症への進行の遅延を含む。

【００６９】

定義

本発明のアミノ酸配列は、天然に存在するアミノ酸に対する慣例的な１文字コードおよび３文字コード、ならびに他のアミノ酸に対して一般的に認められる３文字コード、例えば、Ａｉｂ（α－アミノイソ酪酸）を含む。

【００７０】

「天然エキセンジン－４」の語は、配列：ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＳ－NH_2（配列番号４）を有する天然のエキセンジン－４を意味する。

【００７１】

本発明は、式Ｉに規定したペプチド化合物に関する。

【００７２】

本発明のペプチド化合物は、ペプチド、すなわちカルボキサミド結合によって連結されるアミノカルボン酸の直鎖状のバックボーンを含む。別段の指摘がなければ、アミノカルボン酸はα－アミノカルボン酸であるのが好ましく、Ｌ－α－アミノカルボン酸であるのがより好ましい。ペプチド化合物が、３９アミノカルボン酸のバックボーン配列を含むのが好ましい。

【００７３】

ペプチド部分（式Ｉ）内のアミノ酸は、慣例的なＮ－末端からＣ－末端方向において１から３９まで連続的に番号付けするものと考えることができる。ペプチド部分Ｉ内の「位置」に対する言及は、したがって、エキセンジン－４において１位のＨｉｓ、２位のＧｌｙ、・・・、１４位のＭｅｔ、・・・および３９位のＳｅｒなど、天然エキセンジン－４および他の分子内の位置に対する言及として解釈すべきである。

【００７４】

$-NH_2$側鎖基を有するアミノ酸残基、例えば、Ｌｙｓ、Ｏｒｎ、Ｄａｂ、またはＤａｐを、$-NH_2$側鎖基の少なくとも１個のＨ原子が$-Z-C(O)-R^5$によって置き換えられるように官能化し、式中、R^5は、親油性部分、例えば、非環式の直鎖または分枝（C_8～C_{30}）飽和または不飽和炭化水素基を含み、不飽和炭化水素基は、非置換、またはハロゲン（Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｊ）、－ＯＨ、および／もしくはCO_2Hなどにより置換されており、Ｚは、全ての立体異性体におけるリンカー、例えば、１個またはそれ以上の、例えば、１から５個、好ましくは１、２、または３個の、ガンマ－グルタメート（ｇＧｌｕ）、ｇＡＡＡおよびＡＥＥＡｃの群から選択されるアミノ酸リンカー基を含むリンカーを含む。好ましいR^5基は、親油性部分、例えば、非環式の直鎖または分枝（C_{12}～C_{20}）飽和または不飽和炭化水素基、例えば、ペンタデカニル、ヘキサデカニル、またはヘプタデカニル（これらは非置換、またはCO_2Hにより置換されており）を含み、より好ましくは、ペンタデカニル、またはヘプタデカニルである。一実施形態において、アミノ酸リンカー基は、ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ、ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ、ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ－ｇＡＡＡ、ＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃ－ｇＧｌｕ、およびＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃから選択される。別の一実施形態において、アミノ酸リンカー基はｇＧｌｕである。別の一実施形態において、アミノ酸リンカー基はｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃである。別の一実施形態において、アミノ酸リンカー基はｇＧｌｕ－ＡＥＥＡｃ－ｇＡＡＡである。別の一実施形態において、アミノ酸リンカー基はｇＧｌｕ－ｇＧｌｕである。別の一実施形態において、アミノ酸リンカー基はＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃ－ｇＧｌｕである。別の一実施形態において、アミノ酸リンカー基はＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃ－ＡＥＥＡｃである。

【００７５】

さらなる一態様において、本発明は、担体との混合における、本明細書に記載する本発明の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を含む組成物に関する。

【００７６】

本発明は、医薬としての使用のための、特に、本明細書に記載のような状態の処置のための本発明の化合物の使用にも関する。

【００７７】

本発明は、組成物が薬学的に許容される組成物であり、担体が薬学的に許容される担体である、組成物にも関する。

【００７８】

ペプチド合成

当業者であれば、本発明に記載するペプチドを調製する、多様な異なる方法を知っている。これらの方法には、それだけには限定されないが、合成手法、および組換え遺伝子発現が含まれる。したがって、これらのペプチドを調製する一方法は、溶液中または固体支持体上で合成し、引き続き単離および精製することである。ペプチドを調製する異なる一方法は、ペプチドをコードするＤＮＡ配列を導入する宿主細胞における遺伝子発現である。あるいは、細胞系を利用しないで、遺伝子発現を実現することができる。上記に記載する方法を何らかの方法で組み合わせてもよい。

【００７９】

本発明の化合物を調製するのに好ましい方法は、適切な樹脂上での固相合成である。固相ペプチド合成は、十分に確立された方法論である（例えば、Ｓｔｅｗａｒｔ ａｎｄ Ｙｏｕｎｇ、Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ.、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、Ｉｌｌ.、１９８４年；Ｅ.ＡｔｈｅｒｔｏｎおよびＲ.Ｃ.Ｓｈｅｐｐａｒｄ、Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ.Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、Ｏｘｆｏｒｄ－ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９８９年を参照されたい）。固相合成は、Ｎ－末端保護したアミノ酸のカルボキシ末端を、切断可能なリンカーを保有する不活性な固体支持体に付着させることにより開始する。この固体支持体は、カルボキシ基（またはＲｉｎｋ樹脂ではカルボキサミド）の樹脂に対する連結が酸に対して感受性である（Ｆｍｏｃ戦略を用いた場合）、トリチル樹脂、クロロトリチル樹脂、Ｗａｎｇ樹脂、またはＲｉｎｋ樹脂など、最初のアミノ酸のカップリングを可能にする任意のポリマーであってよい。ポリマー支持体は、ペプチド合成の間α－アミノ基を脱保護するのに用いる条件下で安定でなければならない。

【００８０】

Ｎ－末端保護した第１のアミノ酸を固体支持体にカップリングさせた後、このアミノ酸のα－アミノ保護基を除去する。残りの保護されているアミノ酸を、次いで、ＢＯＰ、ＨＢＴＵ、ＨＡＴＵ、またはＤＩＣ（Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド）／ＨＯＢｔ（１－ヒドロキシベンゾトリアゾール）などの適切なアミドカップリング試薬を用いて、ペプチド配列によって表される順序で次々に、または前もって形成されたジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドとカップリングさせるが、この場合、ＢＯＰ、ＨＢＴＵ、およびＨＡＴＵは三級アミン塩基と用いる。あるいは、遊離したＮ－末端を、カルボン酸などのアミノ酸以外の基で官能化してもよい。

【００８１】

通常、アミノ酸の反応性側鎖基を、適切なブロッキング基で保護する。これらの保護基は、所望のペプチドを構築した後に除去する。これらは、同じ条件下で樹脂から所望の生成物を切断するのに相伴って除去される。保護基、および保護基を導入するための手順は、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、第３版、Ｇｒｅｅｎｅ，Ｔ.Ｗ.およびＷｕｔｓ，Ｐ.Ｇ.Ｍ.、Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：１９９９年）に見出すことができる。

【００８２】

いくつかの場合において、他の側鎖の保護基が依然としてインタクトである間に、選択

的に除去することができる側鎖の保護基があるのが望ましいことがある。この場合、遊離した官能性を選択的に官能化することができる。例えば、リジンを、非常に求核性の塩基（例えば、ＤＭＦ（ジメチルホルムアミド）中４％ヒドラジン）に対して不安定である、ｉｖＤｄｅ（［１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキサ－１－イリデン）－３－メチルブチル）保護基で保護してもよい（Ｓ．Ｒ．Ｃｈｈａｂｒａら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．、３９巻、（１９９８年）、１６０３頁）。このように、Ｎ－末端のアミノ基および全ての側鎖の官能性を酸に不安定な保護基で保護する場合、ｉｖＤｄｅ基は、ＤＭＦ中４％ヒドラジンを用いて選択的に除去することができ、対応する遊離のアミノ基を、次いで、アシル化などによってさらに修飾することができる。リジンを代替的に、保護されたアミノ酸にカップリングしてもよく、このアミノ酸のアミノ基を、次いで、脱保護し、別の遊離のアミノ基を得ることができ、この遊離のアミノ基をアシル化し、またはさらなるアミノ酸に付着させてもよい。代替的に、予め官能化された構成単位、例えば、（２Ｓ）－６－［［（４Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－［［（４Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－（ヘキサデカノイルアミノ）－５－オキソ－ペンタノイル］アミノ］－５－オキソ－ペンタノイル］アミノ］－２－（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシカルボニルアミノ）ヘキサン酸をカップリングパートナーとして使用して、ペプチド合成中に（表２に記載のような）側鎖をリジンと一緒に導入することができる。

【００８３】

最後に、ペプチドを樹脂から切断する。これは、Ｋｉｎｇのカクテルを用いることにより実現することができる（Ｄ．Ｓ．Ｋｉｎｇ、Ｃ．Ｇ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｇ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｒｅｓ．、３６巻、１９９０年、２５５～２６６頁）。原材料を、次いで、必要に応じて、分取ＲＰ－ＨＰＬＣなどのクロマトグラフィーによって精製してもよい。

【００８４】

作用強度

本明細書で用いる「作用強度」または「ｉｎ　ｖｉｔｒｏの作用強度」の語は、細胞ベースのアッセイで、化合物がＧＬＰ－１、グルカゴン、またはＧＩＰに対する受容体を活性化する能力に対する尺度である。数値的に、これは「ＥＣ５０値」と表現され、投与量反応実験において反応（例えば、細胞内ｃＡＭＰの形成）の最大の増大の半分を誘発する化合物の効果的な濃度である。

【００８５】

治療的使用

メタボリックシンドロームは、一緒に生じた場合に、２型糖尿病、ならびにアテローム硬化性の血管疾患（例えば、心疾患および脳卒中）を発症するリスクを増大する医学的障害の組合せである。メタボリックシンドロームに対する医学的パラメーターの定義には、真性糖尿病、耐糖能障害、空腹時グルコースの上昇、インスリン抵抗性、尿中アルブミン分泌、中心性肥満、高血圧、トリグリセリドの上昇、ＬＤＬコレステロールの上昇、およびＨＤＬコレステロールの低下が含まれる。

【００８６】

肥満は、過剰の体脂肪が、健康および平均余命に対して有害作用があり得る程度に蓄積し、成人および小児における有病率の増大により、現代の世界における予防できる主要な死因の一つとなっている医学的状態である。肥満は、心疾患、２型糖尿病、閉塞性睡眠時無呼吸、あるタイプの癌、および骨関節炎を含めた多様な他の疾患の可能性を増大し、最も一般的に、過剰な食物摂取、エネルギー支出の低下、および遺伝的感受性の組合せによって引き起こされる。

【００８７】

真性糖尿病はしばしば単に糖尿病と呼ばれ、身体が十分なインスリンを生成しないため、または生成されるインスリンに細胞が反応しないためにヒトが高血糖レベルを有する一群のメタボリック疾患である。最も一般的なタイプの糖尿病は：（１）身体がインスリンを生成することができない、１型糖尿病；（２）経時的なインスリン欠乏の増大と組み合

わされて、身体がインスリンを適切に用いることができない、２型糖尿病（Ｔ２ＤＭ）、および（３）女性が妊娠により糖尿病を発症する、妊娠糖尿病である。全ての形態の糖尿病が長期の合併症のリスクを増大し、合併症は長年の後に発症するのが典型的である。これらの長期の合併症の殆どが血管に対する損傷に基づくものであり、大血管のアテローム性動脈硬化に起因する「大血管性」疾患、および小血管の損傷に起因する「微小血管」疾患の２つのカテゴリーに分けることができる。大血管性疾患状態の例には、虚血性心疾患、心筋梗塞、脳卒中、および末梢血管疾患がある。微小血管疾患の例には、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、および糖尿病性神経障害がある。

【００８８】

ＧＬＰ－１およびＧＩＰ、ならびにグルカゴンに対する受容体は、７回膜貫通型ヘテロ三量体Ｇタンパク質連結型受容体のファミリーのメンバーである。これらは構造的に相互に関連しており、著しいレベルの配列同一性を共有するだけでなく、リガンド認識および細胞内シグナル伝達経路の同様の機序も有する。

【００８９】

同様に、ペプチドであるＧＬＰ－１、ＧＩＰ、およびグルカゴンは、配列同一性／類似性の高い領域を共有する。ＧＬＰ－１およびグルカゴンは、共通の前駆物質であるプレプログルカゴンから生成され、これが差次的に組織特異的な形でプロセシングを受けて、例えば、腸の内分泌細胞でＧＬＰ－１が、膵島のアルファ細胞でグルカゴンが産生される。ＧＩＰはより大型のｐｒｏＧＩＰプロホルモン前駆物質に由来し、小腸にあるＫ細胞から合成され、放出される。

【００９０】

ペプチドのインクレチンホルモンであるＧＬＰ－１およびＧＩＰは、食物に反応して腸の内分泌細胞によって分泌され、食事刺激性インスリン分泌の最大７０％を占める。ＧＬＰ－１分泌は、耐糖能障害または２型糖尿病を有する対象で低下するが、これらの患者ではＧＬＰ－１に対する反応性は依然として保存されていることが、証拠により示唆される。したがって、ＧＬＰ－１受容体を適切なアゴニストで標的化することにより、糖尿病を含めたメタボリック障害の処置に対する魅力的な手法がもたらされる。ＧＬＰ－１に対する受容体は広く分布しており、主に膵島、脳、心臓、腎臓、および消化管に見出される。膵臓では、ＧＬＰ－１は、ベータ細胞からのインスリン分泌の増大により、厳密にグルコース依存的に作用する。このグルコース依存性により、ＧＬＰ－１受容体の活性化は低血糖を引き起こす可能性がないことが示される。また、ＧＩＰに対する受容体は、膵島、脂肪組織、胃、小腸、心臓、骨、肺、腎臓、精巣、副腎皮質、下垂体、内皮細胞、気管、脾臓、胸腺、甲状腺、および脳を含めた末梢組織において広範に発現される。インクレチンホルモンとしての生物学的機能に一致して、膵臓のβ細胞は、ヒトにおけるＧＩＰに対する最高レベルの受容体を発現する。

【００９１】

ＧＩＰ受容体媒介性のシグナリングは、Ｔ２ＤＭを有する患者において損なわれている可能性があるが、ＧＩＰ作用の損失は、可逆的であることが示されており、糖尿病状態の改善で回復させることができるという臨床上の証拠がいくつか存在する。重要なことに、インクレチンホルモン、ＧＩＰおよびＧＬＰ－１のいずれによるインスリン分泌の刺激も厳密にグルコース依存性であり、低血糖の低いリスクに関連した絶対に安全な機序を確実にしている。

【００９２】

ベータ細胞レベルで、ＧＬＰ－１およびＧＩＰは、グルコース感受性、新生、増殖、プロインスリンの転写および肥大、ならびに抗アポトーシスを促進することが示された。ＧＬＰ－１およびＧＩＰ受容体に対する両方のアゴニスト活性を有するペプチドは、相加または相乗的な抗糖尿病有用性を有すると予測することができる。膵臓以外にＧＬＰ－１の他の関連した効果には、遅延した胃内容排出、満腹感の増加、食物摂取の減少、体重の低下、ならびに神経保護および心保護的効果が含まれる。２型糖尿病を有する患者において、肥満および心血管疾患のような高い率の併存症を考慮すると、こうした膵外の効果は特

に重要となる。骨粗鬆症、およびアルツハイマー病のような認知性欠陥の治療に有益であり得る、膵臓以外の末梢組織におけるさらなるＧＩＰ作用は、増加した骨形成および低下した骨再吸収ならびに神経保護効果を含む。

【００９３】

グルカゴンは、膵臓のアルファ細胞によって生成され、循環グルコースが低い場合に血流中に放出される、アミノ酸２９個のペプチドホルモンである。グルカゴンの重要な生理学的役割は、肝臓におけるグルコース出力を刺激することであり、これはｉｎ　ｖｉｖｏでグルコース恒常性を維持する上でインスリンに対して主要な対抗制御的な機序をもたらすプロセスである。

【００９４】

しかし、グルカゴン受容体は、腎臓、心臓、脂肪細胞、リンパ芽球、脳、網膜、副腎、および消化管などの肝臓外の組織においても発現され、グルコース恒常性を超えたより広範囲の生理学的役割が示唆される。したがって、最近の研究は、グルカゴンには、食物摂取の減少および体重減少を伴う、エネルギー支出の刺激および熱発生を含めたエネルギー管理に対して、治療的にポジティブな効果があることを報告している。まとめると、グルカゴン受容体の刺激は、肥満およびメタボリックシンドロームの処置において有用であり得る。

【００９５】

オキシントモジュリンは、Ｃ－末端の延長を包含するアミノ酸８個とグルカゴンからなるペプチドホルモンである。ＧＬＰ－１およびグルカゴン同様、オキシントモジュリンはプレプログルカゴンにおいて前もって形成され、切断され、小腸の内分泌細胞によって組織特異的に分泌される。オキシントモジュリンは、ＧＬＰ－１およびグルカゴンに対する受容体の両方を刺激し、したがって二重アゴニストの原型であることが知られている（Ｐｏｃａｉ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ、２０１３年、３巻、２４１～５１頁を参照されたい）。

【００９６】

ＧＬＰ－１およびＧＩＰは抗糖尿病効果で知られており、ＧＬＰ－１およびグルカゴンは共に食物摂取抑制効果で知られており、グルカゴンはさらなるエネルギー支出のメディエータでもあるので、１分子に３つのホルモンの活性を組み合わせることで、メタボリックシンドローム、特にその構成成分である糖尿病および肥満を処置するのに強力な薬物療法をもたらすことができると考えられる。

【００９７】

したがって、本発明の化合物は、グルコース不耐性、インスリン抵抗性、糖尿病前症、空腹時グルコースの上昇（高血糖）、２型糖尿病、高血圧、異脂肪血症、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、末梢動脈疾患、脳卒中、またはこれら個々の疾患の構成成分の任意の組合せの処置に用いることができる。

【００９８】

さらに、本発明の化合物は、食欲、摂食、およびカロリー摂取のコントロール、エネルギー支出の増大、体重増加の予防、体重減少の促進、体重過剰の減少、および病的肥満を含めた肥満の全体的な処置に用いることができる。

【００９９】

本発明の化合物は、ＧＬＰ－１、ＧＩＰに対する、およびグルカゴンに対する受容体に対するアゴニスト（例えば、「三重アゴニスト」）であり、糖尿病および肥満を同時に処置できるようにすることにより、メタボリックシンドロームを標的化する臨床的必要性に取り組む治療上の利点を提供することができる。

【０１００】

本発明の化合物で処置し得るさらなる疾患状態および健康状態は、肥満関連の炎症、肥満関連の胆嚢疾患、および肥満誘発性の睡眠時無呼吸である。

【０１０１】

これらの状態は全て肥満に直接的または間接的に関連し得るが、本発明の化合物の効果

は、全体的または部分的に体重に対する効果によって、またはこの効果とは独立に媒介され得る。

【０１０２】

さらに、処置しようとする疾患は、アルツハイマー病もしくはパーキンソン病などの神経変性疾患、または上記に記載した他の変性疾患であることもある。

【０１０３】

一実施形態において、化合物は、高血糖、２型糖尿病および／または肥満の処置または予防において有用である。

【０１０４】

本発明の化合物は、患者の腸通過を低減する能力、胃内容物を増大する能力および／または食物摂取を減少させる能力を有し得る。本発明の化合物のこれらの活性は、当業者に知られており本明細書において方法にも記載されている動物モデルにおいて評価することができる。

【０１０５】

本発明の化合物は、患者の血中グルコースレベルを低下させる能力、および／またはＨｂＡ１ｃレベルを低下させる能力を有する。本発明の化合物のこれらの活性は、当業者に知られており本明細書において方法および実施例にも記載されている動物モデルにおいて評価することができる。

【０１０６】

本発明の化合物は、患者の体重を減少させる能力を有し得る。本発明の化合物のこれらの活性は、当業者に知られており本明細書において方法および実施例にも記載されている動物モデルにおいて評価することができる。

【０１０７】

本発明の化合物は、肝脂肪症、好ましくは、非アルコール性肝疾患（ＮＡＦＬＤ）および非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）の処置または予防において有用であり得る。

【０１０８】

医薬組成物

「医薬組成物」の語は、混合した場合に適合性であり、投与することができる成分を含む混合物を指し示すものである。医薬組成物は、１つまたはそれ以上の医薬品を含むことができる。さらに、医薬組成物は、活性の、または不活性の成分と考えられても、考えられなくても、担体、バッファー、酸性化剤、アルカリ化剤、溶媒、補助剤、等張化剤、緩和薬、増量剤、保存剤、物理的および化学的安定化剤、例えば、界面活性剤、抗酸化剤、ならびに他の構成成分を含むことができる。医薬組成物の調製における技術者に対する指南は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ、（第２０版）Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ Ａ．Ｒ．編集、２０００年、Ｌｉｐｐｅｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ、およびＲ．Ｃ．Ｒｏｗｅら（編集）、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ、ＰｈＰ、２０１３年５月最新版に見出すことができる。

【０１０９】

本発明のエキセンジン－４ペプチド誘導体、またはその塩は、医薬組成物の一部として、許容される製薬上の担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて投与される。

【０１１０】

「薬学的に許容される担体」は、生理学的に許容され（例えば、生理学的に許容されるｐＨ）、一緒に投与される物質の治療上の性質を保持する担体である。標準的な許容される製薬上の担体およびその製剤は当業者には知られており、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ、（第２０版）Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ Ａ．Ｒ．編集、２０００年、Ｌｉｐｐｅｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ、およびＲ．Ｃ．Ｒｏｗｅら（編集）、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ、ＰｈＰ、２０１３年５月最新版に記載されている。一例の薬学的に許容される担体は、生理学的食塩水

溶液である。
【０１１１】
一実施形態において、担体は、バッファー（例えば、シトレート／クエン酸、アセテート／酢酸）、酸性化剤（例えば、塩酸）、アルカリ化剤（例えば、水酸化ナトリウム）、保存剤（例えば、フェノール、ｍ－クレゾール）、共溶媒（例えば、ポリエチレングリコール４００）、等張化剤（例えば、マンニトール、グリセロール）、安定化剤（例えば、界面活性剤、抗酸化剤、アミノ酸）の群から選択される。
【０１１２】
用いる濃度は、生理学的に許容される範囲におけるものである。
【０１１３】
許容される製薬上の担体または希釈剤には、経口、直腸、経鼻、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内、皮内、および経皮を含む）の投与に適する製剤において用いられるものが含まれる。本発明の化合物は、非経口投与するのが典型的である。
【０１１４】
「薬学的に許容される塩」の語は、哺乳動物において用いるのに安全および効果的である本発明の化合物の塩を意味する。
【０１１５】
「溶媒和物」の語は、本発明の化合物またはその塩の、有機溶媒分子および／または水などの溶媒分子との複合体を意味する。
【０１１６】
医薬組成物において、エキセンジン－４誘導体は、モノマーまたはオリゴマーの形態であってよい。
【０１１７】
化合物の「治療有効量」の語は、所望の効果を提供するのに、非毒性であるが十分な量の化合物を意味する。所望の生物学的効果を実現するのに必要な式Ｉの化合物の量は、選択する特定の化合物、使用目的、投与様式、および患者の臨床上の状態などの数々の因子に依存する。任意の個々の症例における適切な「有効」量は、当業者によってルーチンの実験を用いて決定され得る。例えば、式Ｉの化合物の「治療有効量」は、約０．０１から５０ｍｇ／投与量、好ましくは０．０２から１ｍｇ／投与量である。
【０１１８】
本発明の医薬組成物は、非経口（例えば、皮下、筋肉内、皮内、または静脈内）、直腸、局所、および経口的（例えば、舌下）の投与に適するものであるが、最も適切な投与様式は、個々の症例の各々において処置しようとする状態の性質および重症度、ならびに各症例において用いられる式Ｉの化合物の性質に依存する。一実施形態において、適用は、非経口、例えば、皮下である。
【０１１９】
非経口適用の場合、相当する製剤が、投与の間に微生物および細菌の増殖を阻害するために少なくとも１つの抗微生物性保存剤を含むことが好ましいであろう。好ましい保存剤は、ベンジル型アルコール、またはフェノールもしくはｍ－クレゾールのようなフェノール化合物である。これらの成分は、製剤中でより低い溶解性および安定性をもたらすペプチドおよびタンパク質の凝集を誘導し得ることが記載されている（Ｒ．Ｌ．Ｂｉｓら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．４７２巻、３５６～３６１頁、２０１４年；Ｔ．Ｊ．Ｋａｍｅｒｚｅｌｌ、Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．、６３巻、１１１８～１１５９頁、２０１１年を参照されたい）。
【０１２０】
適切な医薬組成物は、別々の単位の形態、例えば、バイアルまたはアンプル中の、カプセル剤、錠剤、および散剤であってよく、これらは各々、規定された量の化合物を；粉末もしくは顆粒として；水性もしくは非水性の液体中の溶液もしくは懸濁液として；または水中油型もしくは油中水型エマルジョンとして含んでいる。組成物は、単一または複数の投与量の注射可能な形態において、例えば、ペンの形態において提供することができる。

組成物は、すでに言及した通り、活性成分および担体（１つまたはそれ以上のさらなる成分からなっていてよい）を接触させるステップを含む、任意の適切な製薬方法によって調製することができる。

【０１２１】

ある実施形態において、医薬組成物は、適用のための装置と一緒に、例えば、シリンジ、注射用ペン、またはオートインジェクターと一緒に提供することができる。このような装置は、医薬組成物と別々に提供しても、または医薬組成物が予め充填してあってもよい。

【０１２２】

投与単位、パッケージ、ペン装置および投与

本発明の化合物は、好適な医薬組成物における使用のために調製することができる。好適な医薬組成物は、１つまたは複数の投与単位の形態であってもよい。

【０１２３】

組成物は、本発明の化合物および担体（１つまたは複数のさらなる成分からなっていてよい）を接触させるステップを含む、任意の適切な製薬方法によって調製することができる。投与単位は、例えば、カプセル剤、錠剤、糖衣剤、顆粒分包剤、滴剤、液剤、懸濁液、凍結乾燥物および散剤であり、そのそれぞれが、規定された量の本発明の化合物を含む。

【０１２４】

本発明の化合物または本発明の医薬組成物（投与単位）の上記の投与単位のそれぞれは、容易な輸送および保存のためにパッケージに入れて提供されてもよい。投与単位は、標準的な単回投与または多回投与のパッケージング中にパッケージ化され、それらの形態、材料および形状は、調製される単位のタイプに依存する。

【０１２５】

例えば、錠剤および他の形態の固体投与単位は、単回単位中にパッケージ化することができ、単回パッケージ化単位は、マルチパック容器中にパッケージ化することができる。液体の製剤は、単回単位、例えば、バイアル、カートリッジ、シリンジ／予備充填シリンジ、注入袋、折り畳み式プラスチック袋、注入ボトル、ブロー充填封止ボトルもしくは注入チュービングまたは単回もしくは多回の用量注射用の形態、例えば、ペン装置、ポンプまたはシリンジの形態でパッケージ化することができ、単回パッケージ化単位は、マルチパック容器中にパッケージ化することができる。単回パッケージは、１つだけまたは複数の投与単位を含んでいてもよい。パッケージは、例えば、紙、厚紙、板紙、プラスチック、金属など、紙、プラスチックおよび金属、またはガラスのうちの１つまたは複数の組合せまたはラミネートでできていてもよい。例示的実施形態は、例えば錠剤またはカプセル剤を含むブリスターパッケージであり、これは、次いで、例えば散剤を含む厚紙ボックス、アルミニウムバリアラミネート分包剤、例えば錠剤もしくは溶液を含むガラスもしくはプラスチックボトル、または溶液もしくは懸濁液を含むバイアル、カートリッジ、シリンジ、注入袋、注入ボトル、注入チュービングまたはアンプル中で提供することができる。

【０１２６】

ある実施形態では、投与単位は、適用のための装置と一緒に、例えば、シリンジ、注射用ペン、またはオートインジェクターと一緒に提供することができる。このような装置は、医薬組成物と別々に提供することもでき、または医薬組成物を予め充填することもできる。

【０１２７】

「ペン型注射装置」は、簡単に「注入ペン」と呼ばれることが多く、典型的には、筆記のための万年筆に似た細長い形状を有する注入装置である。こうしたペンは、通常、管状断面を有するが、それらは、異なる断面、例えば、三角形、四角形または正方形またはこれらの幾何学的形状の周りのいずれのバリエーションをも簡単に有することができる。一般に、ペン型注射装置は、以下の３つの主要エレメントを含む：カートリッジを含むカートリッジ断面は、ハウジングまたはホルダーの中に含まれることが多く；カートリッジ断

面の１つの端に連結されたニードルアセンブリ；およびカートリッジ断面の他の端に連結された投与断面。カートリッジは、「アンプル」と呼ばれることも多く、典型的には、医薬品で充填されたリザーバー、カートリッジリザーバーの１つの端に位置する移動可能なゴム型栓またはストッパー、およびネックダウン端であることが多い他に位置する穿刺可能なゴム封止を有する上部を含む。圧着された環状金属バンドは、典型的には、ゴム封止を所定位置に保持するのに使用される。カートリッジハウジングが典型的にはプラスチックでできているのに対して、カートリッジリザーバーは、歴史的にガラスでできていた。

【０１２８】

併用治療

本発明の化合物である、ＧＬＰ－１に対する三重アゴニスト、ＧＩＰおよびグルカゴン受容体は、他の薬理学的な有効化合物と、例えば、Ｒｏｔｅ　Ｌｉｓｔｅ　２０１６に言及されている全ての薬物、例えば、Ｒｏｔｅ　Ｌｉｓｔｅ　２０１６、第１章に言及されている全ての体重減少薬または食欲抑制薬と、Ｒｏｔｅ　Ｌｉｓｔｅ　２０１６、第５８章に言及されている全ての脂質低下薬と、Ｒｏｔｅ　Ｌｉｓｔｅ　２０１６に言及されている全ての降圧薬および腎臓保護薬（ｎｅｐｈｒｏｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅｓ）と、またはＲｏｔｅ　Ｌｉｓｔｅ　２０１５、第３６章に言及されている全ての利尿薬と、広範に組み合わせることができる。

【０１２９】

活性成分の併用を、特に作用における相乗作用的改善に用いることができる。これは、活性成分を患者に別々に投与することにより、または複数の活性成分が１つの医薬調製物に存在する併用生成物の形態において適用することができる。活性成分の別々の投与によって活性成分を投与する場合、これは同時に、または連続的に行うことができる。

【０１３０】

このような併用に適する他の活性物質には、特に、例えば、言及する徴候の１つに関して１つもしくはそれ以上の活性物質の治療効果を増強するもの、および／または１つもしくはそれ以上の活性物質の投与量の減少を可能にするものが含まれる。

【０１３１】

併用に適切である治療剤は、例えば、以下のような抗糖尿病剤を含む：
インスリンおよびインスリン誘導体、例えば：Ｇｌａｒｇｉｎｅ／Ｌａｎｔｕｓ（登録商標）、インスリングラルギン２７０～３３０Ｕ／ｍＬ（ＥＰ２３８７９８９Ａ）、インスリングラルギン３００Ｕ／ｍＬ（ＥＰ２３８７９８９Ａ）、Ｇｌｕｌｉｓｉｎ／Ａｐｉｄｒａ（登録商標）、Ｄｅｔｅｍｉｒ／Ｌｅｖｅｍｉｒ（登録商標）、Ｌｉｓｐｒｏ／Ｈｕｍａｌｏｇ（登録商標）／Ｌｉｐｒｏｌｏｇ（登録商標）、Ｄｅｇｌｕｄｅｃ／ＤｅｇｌｕｄｅｃＰｌｕｓ、Ａｓｐａｒｔ、基本のインスリンおよび類似体（例えば、ＬＹ－２６０５５４１、ＬＹ２９６３０１６、ＮＮ１４３６）、ＰＥＧ化インスリンＬｉｓｐｒｏ、Ｈｕｍｕｌｉｎ（登録商標）、Ｌｉｎｊｅｔａ、ＳｕｌｉＸｅｎ（登録商標）、ＮＮ１０４５、インスリンプラスＳｙｍｌｉｎ、ＰＥ０１３９、即効性および短時間作用型のインスリン（例えば、Ｌｉｎｊｅｔａ、ＰＨ２０、ＮＮ１２１８、ＨｉｎｓＢｅｔ）、（ＡＰＣ－００２）ヒドロゲル、経口、吸入可能、経皮、および舌下のインスリン（例えば、Ｅｘｕｂｅｒａ（登録商標）、Ｎａｓｕｌｉｎ（登録商標）、Ａｆｒｅｚｚａ、Ｔｒｅｇｏｐｉｌ、ＴＰＭ　０２、Ｃａｐｓｕｌｉｎ、Ｏｒａｌ－ｌｙｎ（登録商標）、Ｃｏｂａｌａｍｉｎ（登録商標）経口インスリン、ＯＲＭＤ－０８０１、ＮＮ１９５３、ＮＮ１９５４、ＮＮ１９５６、ＶＩＡｔａｂ、Ｏｓｈａｄｉ経口インスリン）。さらに、二官能性のリンカーによってアルブミンまたは別のタンパク質に結合しているインスリン誘導体もさらに含まれる。

【０１３２】

ＧＬＰ－１、ＧＬＰ－１類似体およびＧＬＰ－１受容体アゴニスト、例えば：リキシセナチド／ＡＶＥ００１０／ＺＰ１０／リキスミア、エキセナチド／エキセンジン－４／Ｂｙｅｔｔａ／Ｂｙｄｕｒｅｏｎ／ＩＴＣＡ　６５０／ＡＣ－２９９３、リラグルチド／Ｖｉｃｔｏｚａ、セマグルチド、タスポグルチド、シンクリア（Ｓｙｎｃｒｉａ）／アルビ

グルチド、デュラグルチド、ｒエキセンジン－４、ＣＪＣ－１１３４－ＰＣ、ＰＢ－１０２３、ＴＴＰ－０５４、エフェグレナチド（Ｅｆｐｅｇｌｅｎａｔｉｄｅ）／ＨＭ－１１２６０Ｃ、ＣＭ－３、ＧＬＰ－１エリゲン（Ｅｌｉｇｅｎ）、ＯＲＭＤ－０９０１、ＮＮ－９９２４、ＮＮ－９９２６、ＮＮ－９９２７、ノデキセン（Ｎｏｄｅｘｅｎ）、Ｖｉａｄｏｒ－ＧＬＰ－１、ＣＶＸ－０９６、ＺＹＯＧ－１、ＺＹＤ－１、ＧＳＫ－２３７４６９７、ＤＡ－３０９１、ＭＡＲ－７０１、ＭＡＲ７０９、ＺＰ－２９２９、ＺＰ－３０２２、ＺＰ－ＤＩ－７０、ＴＴ－４０１、ＭＫ－８５２１、ＭＥＤＩ０３８２、ＢＨＭ－０３４、ＨＭ１２５２５Ａ、ＭＯＤ－６０３０、ＣＡＭ－２０３６、ＤＡ－１５８６４、ＡＲＩ－２６５１、ＡＲＩ－２２５５、ＬＹ３２９８１７６、ＮＮ１１７７、エキセナチド－ＸＴＥＮおよびグルカゴン－ＸＴＥＮ、ＮＮ９０３０。

【０１３３】

ＤＰＰ－４インヒビター、例えば：アログリプチン／Ｎｅｓｉｎａ、Ｔｒａｊｅｎｔａ／リナグリプチン／ＢＩ－１３５６／Ｏｎｄｅｒｏ／Ｔｒａｊｅｎｔａ／Ｔｒａｄｊｅｎｔａ／Ｔｒａｙｅｎｔａ／Ｔｒａｄｚｅｎｔａ、サキサグリプチン／Ｏｎｇｌｙｚａ、シタグリプチン／Ｊａｎｕｖｉａ／Ｘｅｌｅｖｉａ／Ｔｅｓａｖｅ／Ｊａｎｕｍｅｔ／Ｖｅｌｍｅｔｉａ、Ｇａｌｖｕｓ／ビルダグリプチン、アナグリプチン、ゲミグリプチン、テネリグリプチン、メログリプチン、トレラグリプチン、ＤＡ－１２２９、オマリグリプチン／ＭＫ－３１０２、ＫＭ－２２３、エボグリプチン、ＡＲＩ－２２４３、ＰＢＬ－１４２７、ピノキサシン（Ｐｉｎｏｘａｃｉｎ）。

【０１３４】

ＳＧＬＴ２インヒビター、例えば：Ｉｎｖｏｋａｎａ／カナグリフロジン、Ｆｏｒｘｉｇａ／ダパグリフロジン、レモグリフロジン、セリグロフロジン、エンパグリフロジン、イプラグリフロジン、トホグリフロジン、ルセオグリフロジン、ソタグリフロジン（ＬＸ－４２１１）、エルツグリフロジン／ＰＦ－０４９７１７２９、ＲＯ－４９９８４５２、ベキサグリフロジン（ＥＧＴ－０００１４４２）、ＫＧＡ－３２３５／ＤＳＰ－３２３５、ＬＩＫ０６６、ＳＢＭ－ＴＦＣ－０３９、ヘナグリフロジン（ＳＨＲ３８２４）、ジャナグリフロジン、ティアナグリフロジン、ＡＳＴ１９３５、ＪＲＰ４９３、ＨＥＣ－４４６１６

ビグアナイド（例えば、メトホルミン、ブホルミン、フェンホルミン）、チアゾリジンジオン（例えば、ピオグリタゾン、リボグリタゾン、ロシグリタゾン、トログリタゾン）、二重ＰＰＡＲアゴニスト（例えば、アレグリタザール、ムラグリタザール、テサグリタザール）、スルホニル尿素（例えば、トルブタミド、グリベンクラミド、グリメピリド／アマリール、グリピジド）、メグリチニド（例えば、ナテグリニド、レパグリニド、ミチグリニド）、アルファグルコシダーゼインヒビター（例えば、アカルボース、ミグリトール、ボグリボース）、アミリンおよびアミリン類似体（例えば、プラムリンチド、シムリン）。

【０１３５】

ＧＰＲ１１９アゴニスト（例えば、ＧＳＫ－２６３Ａ、ＰＳＮ－８２１、ＭＢＸ－２９８２、ＡＰＤ－５９７、ＺＹＧ－１９、ＤＳ－８５００）、ＧＰＲ４０アゴニスト（例えば、ファシグリファム／ＴＡＫ－８７５、ＴＵＧ－４２４、Ｐ－１７３６、ＪＴＴ－８５１、ＧＷ９５０８）。

【０１３６】

他の適切な併用パートナーには：Ｃｙｃｌｏｓｅｔ、１１－ベーターＨＳＤのインヒビター（例えば、ＬＹ２５２３１９９、ＢＭＳ７７０７６７、ＲＧ－４９２９、ＢＭＳ８１６３３６、ＡＺＤ－８３２９、ＨＳＤ－０１６、ＢＩ－１３５５８５）、グルコキナーゼのアクチベーター（例えば、ＴＴＰ－３９９、ＡＭＧ－１５１、ＴＡＫ－３２９、ＧＫＭ－００１）、ＤＧＡＴのインヒビター（例えば、ＬＣＱ－９０８）、プロテインチロシンホスファターゼ１のインヒビター（例えば、トロズスクエミン）、グルコース－６－ホスファターゼのインヒビター、フルクトース－１，６－ビスホスファターゼのインヒビター、グリコーゲンホスホリラーゼのインヒビター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキ

ナーゼのインヒビター、グリコーゲンシンターゼキナーゼのインヒビター、ピルビン酸デヒドロキナーゼのインヒビター、アルファ２－アンタゴニスト、ＣＣＲ－２アンタゴニスト、ＳＧＬＴ－１インヒビター（例えば、ＬＸ－２７６１）がある。

【０１３７】

例えば：ＨＭＧ－ＣｏＡ－レダクターゼインヒビター（例えば、シンバスタチン、アトルバスタチン）、フィブラート（例えば、ベザフィブラート、フェノフィブラート）、ニコチン酸およびその誘導体（例えば、ナイアシン）、ＰＰＡＲ－（アルファ、ガンマまたはアルファ／ガンマ）アゴニストまたはモジュレーター（例えば、アレグリタザール）、ＰＰＡＲ－デルタアゴニスト、ＡＣＡＴインヒビター（例えば、アバシミブ）、コレステロール吸収インヒビター（例えば、エゼチミブ）、胆汁酸結合物質（例えば、コレスチラミン）、回腸胆汁酸輸送インヒビター、ＭＴＰインヒビター、またはＰＣＳＫ９のモジュレーターのような１つまたはそれ以上の脂質低下薬も併用パートナーとして適切である。

【０１３８】

ＣＥＴＰインヒビター（例えば、トルセトラピブ、アナセトラピブ、ダルセトラピブ、エバセトラピブ、ＪＴＴ－３０２、ＤＲＬ－１７８２２、ＴＡ－８９９５）またはＡＢＣ１レギュレーターのようなＨＤＬ上昇化合物。

【０１３９】

他の適切な併用パートナーは、例えば：シブトラミン、テソフェンシン、オルリスタット、カンナビノイド－１受容体のアンタゴニスト、ＭＣＨ－１受容体アンタゴニスト、ＭＣ４受容体アゴニスト、ＮＰＹ５もしくはＮＰＹ２アンタゴニスト（例えば、ベルネペリット）、ベーター３－アゴニスト、レプチンもしくはレプチンミメティック、５ＨＴ２ｃ受容体のアゴニスト（例えば、ロルカセリン）、またはブプロピオン／ナルトレキソン、ブプロピオン／ゾニサミド、ブプロピオン／フェンテルミン、またはプラムリンチド／メトレレプチンの併用のような、肥満を処置するための１つまたはそれ以上の活性物質である。

【０１４０】

他の適切な併用パートナーは：
ペプチドＹＹ３－３６（ＰＹＹ３－３６）またはその類似体、膵臓ポリペプチド（ＰＰ）またはその類似体のようなさらなる消化管ペプチド、
グルカゴン受容体アゴニストまたはアンタゴニスト、ＧＩＰ受容体アゴニストまたはアンタゴニスト、グレリンアンタゴニストまたはインバースアゴニスト、キセニンおよびその類似体である。

【０１４１】

さらに、例えば：アンジオテンシンＩＩ受容体アンタゴニスト（例えば、テルミサルタン、カンデサルタン、バルサルタン、ロサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、オルメサルタン、タソサルタン、アジルサルタン）、ＡＣＥインヒビター、ＥＣＥインヒビター、利尿薬、ベータブロッカー、カルシウムアンタゴニスト、中枢作用性昇圧薬、アルファ－２－アドレナリン作用性受容体のアンタゴニスト、中性エンドペプチダーゼのインヒビター、血小板凝集インヒビターおよびその他、またはこれらの組合せのような、高血圧、慢性心不全またはアテローム性動脈硬化に影響を及ぼすための薬物との併用が適切である。

【０１４２】

別の一態様において、本発明は、ＧＬＰ－１およびグルカゴンに対する受容体に結合することにより、およびこれらの活性を変調することにより、影響を及ぼすことができる疾患または状態を処置または予防するのに適する薬物を調製するための、併用パートナーとして上記に記載した活性物質の少なくとも１つと組み合わせた、本発明による化合物または生理学的に許容されるその塩の使用に関する。これは、メタボリックシンドローム、特に上記に列挙した疾患または状態の１つ、最も詳しくは糖尿病もしくは肥満またはこれらの合併症の状況における疾患であるのが好ましい。

【０１４３】

本発明による化合物、または生理学的に許容されるその塩の、１つまたはそれ以上の活性物質との併用における使用は、同時に、別々に、または連続的に起こり得る。

【０１４４】

本発明による化合物、または生理学的に許容されるその塩の、別の活性物質との併用における使用は、同時に、または互い違いの時間であるが、特に短期の時間間隔内に起こり得る。これらを同時に投与する場合、２つの活性物質は患者に一緒に投与され；これらを互い違いの時間に用いる場合、２つの活性物質は患者に、１２時間以下、特に６時間以下の期間内に投与される。

【０１４５】

したがって、別の一態様において、本発明は、本発明による化合物、またはそのような化合物の生理学的に許容される塩、および併用パートナーとして上記に記載した少なくとも１つの活性物質を、場合により１つまたはそれ以上の不活性な担体および／または希釈剤と一緒に含む薬物に関する。

【０１４６】

本発明による化合物、または生理学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物、およびこれらと併用されるさらなる活性物質は、共に、錠剤もしくはカプセル剤中などの１製剤中に一緒に、またはいわゆるキットオブパーツなど、２つの同一の、もしくは異なる製剤中に別々に存在することができる。

【図面の簡単な説明】

【０１４７】

【図１】可逆的自己会合（吸引相互作用）および反発的ビリアル相互作用を示しているペプチド製剤についての動的デバイプロットの比較を示す図である。

【図２】配列番号６、配列番号７－食餌を与えたＤＩＯマウスにおける、第１の処置後の血中グルコースプロファイルを示す図である。

【図３】配列番号６、配列番号７－ＤＩＯマウスにおける体重を示す図である。

【図４】配列番号６、配列番号７－ＤＩＯマウスにおける体重変化を示す図である。

【図５】配列番号配列番号６、配列番号７－ＤＩＯマウス（ｎ＝８／群、ｎ＝７　ＤＩＯ－ビヒクル）における総体脂肪量変化を示す図である。

【図６】配列番号６、配列番号７－ＤＩＯマウスにおける最終肝臓重量を示す図である。

【図７】配列番号６、配列番号７－ＤＩＯマウス（ｎ＝８／群、ｎ＝７　ＤＩＯ－ビヒクル）における最終血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＡＴ）濃度を示す図である。

【図８】配列番号６、配列番号７－ＤＩＯマウスにおける最終総血漿中コレステロール濃度を示す図である。

【図９】配列番号６、配列番号７－ＤＩＯマウスにおける最終血漿中インスリン濃度を示す図である。

【図１０】配列番号６、配列番号７－食餌を与えたｄｂ／ｄｂマウスにおける、単回処置後の血中グルコースプロファイルを示す図である。

【図１１】配列番号６、配列番号７－食餌を与えたｄｂ／ｄｂマウスにおける血中グルコース曲線下面積（ＡＵＣ）を示す図である。

【図１２】配列番号８、配列番号９、または配列番号１０－食餌を与えたＤＩＯマウスにおける、第１の処置後の血中グルコースプロファイルを示す図である。

【図１３】配列番号８、配列番号９、または配列番号１０－ＤＩＯマウスにおける体重を示す図である。

【図１４】配列番号８、配列番号９、または配列番号１０－ＤＩＯマウスにおける体重変化を示す図である。

【図１５】配列番号８、配列番号９、または配列番号１０－ＤＩＯマウスにおける総体脂肪量変化を示す図である。

【図１６】配列番号８、配列番号９、または配列番号１０－ＤＩＯマウスにおける最終肝臓重量を示す図である。

【図１７】配列番号８、配列番号９、または配列番号１０－ＤＩＯマウスにおける最終血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度を示す図である。
【図１８】配列番号８、配列番号９、または配列番号１０－ＤＩＯマウスにおける最終総血漿中コレステロール濃度を示す図である。
【図１９】配列番号８、配列番号９、または配列番号１０－ＤＩＯマウスにおける最終血漿中インスリン濃度を示す図である。
【図２０】配列番号１３－食餌を与えたｄｂ／ｄｂマウスにおける、単回処置後の血中グルコースプロファイルを示す図である。
【図２１】配列番号１３－食餌を与えたｄｂ／ｄｂマウスにおける血中グルコース曲線下面積（ＡＵＣ）を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【０１４８】
方法
用いる略語は以下の通りである：
ＡＡ　アミノ酸
ＡＥＥＡｃ　（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）アセチル
Ａｉｂ　アルファ－アミノ－イソ酪酸
ｃＡＭＰ　環状アデノシン一リン酸
Ｂｏｃ　ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル
ＢＯＰ　（ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）ｔｒｉｓ（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート
ＢＳＡ　ウシ血清アルブミン
ｔＢｕ　三級ブチル
ｄＡｌａ　Ｄ－アラニン
ＤＣＭ　ジクロロメタン
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
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
ＤＩＣ　Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド
ＤＩＰＥＡ　Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン
ＤＭＥＭ　ダルベッコ変法イーグル培地
ＤＭＦ　ジメチルホルムアミド
ＤＭＳ　ジメチルスルフィド
ＥＤＴ　エタンジチオール
ＦＡ　ギ酸
ＦＢＳ　ウシ胎児血清
Ｆｍｏｃ　フルオレニルメチルオキシカルボニル
ｇＡＡＡ　ガンマ－アミノアジピン酸
ｇＧｌｕ　ガンマ－グルタメート（γＥ）
ＨＡＴＵ　Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート
ＨＢＳＳ　ハンクス平衡塩類溶液
ＨＢＴＵ　２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチル－ウロニウムヘキサフルオロホスフェート
ＨＥＰＥＳ　２－［４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル］エタンスルホン酸
ＨＯＢｔ　１－ヒドロキシベンゾトリアゾール
ＨＯＳｕ　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド
ＨＰＬＣ　高速液体クロマトグラフィー
ＨＴＲＦ　ホモジニアス時間分解蛍光（Ｈｏｍｏｇｅｎｏｕｓ　Ｔｉｍｅ　Ｒｅｓｏｌｖ

ｅｄ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ）
ＩＢＭＸ　３－イソブチル－１－メチルキサンチン
ＬＣ／ＭＳ　液体クロマトグラフィー／質量分析法
Ｍｍｔ　モノメトキシ－トリチル
Ｐａｌｍ　パルミトイル
ＰＢＳ　リン酸緩衝食塩水
ＰＥＧ　ポリエチレングリコール
ＰＫ　薬物動態
ＲＰ－ＨＰＬＣ　逆相高速液体クロマトグラフィー
Ｓｔｅａ　ステアリル
ＴＦＡ　トリフルオロ酢酸
Ｔｒｔ　トリチル
ＵＶ　紫外線

【０１４９】

ペプチド化合物の一般的合成

材料

様々なＲｉｎｋ－アミド樹脂（４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノメチル）－フェノキシアセトアミド－ノルロイシルアミノメチル樹脂、Ｍｅｒｃｋ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；４－［（２，４－ジメトキシフェニル）（Ｆｍｏｃ－アミノ）メチル］フェノキシアセトアミドメチル樹脂、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を、０．２～０．７ｍｍｏｌ／ｇの範囲のローディング（ｌｏａｄｉｎｇ）で、ペプチドアミドの合成に用いた。

【０１５０】

Ｆｍｏｃ保護した天然のアミノ酸は、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．、Ｓｅｎｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｍｅｒｃｋ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ、Ｉｒｉｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｂａｃｈｅｍ、Ｃｈｅｍ－Ｉｍｐｅｘ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、またはＭＡＴＲＩＸ　Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎから購入した。合成を通して以下の標準のアミノ酸を用いた：Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｒｇ（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｉｌｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｅｕ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｍｅｔ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｐｒｏ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｔｙｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｖａｌ－ＯＨ。

【０１５１】

さらに、以下の特殊なアミノ酸を上記と同じ供給業者から購入した：Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（ｉｖＤｄｅ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ａｉｂ－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ｓｅｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－ＯＨ、Ｂｏｃ－Ｌ－Ｈｉｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ（トルエン溶媒和物として入手可能）、およびＢｏｃ－Ｌ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ。

【０１５２】

さらに、構成単位（２Ｓ）－６－［［（４Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－［［（４Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－（ヘキサデカノイルアミノ）－５－オキソ－ペンタノイル］アミノ］－５－オキソ－ペンタノイル］アミノ］－２－（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシカルボニルアミノ）ヘキサン酸およびＢｏｃ－Ｌ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－Ａｉｂ－ＯＨを適用することができる。両方の構成単位を別々に合成する。

【０１５３】

固相ペプチド合成を、例えば、Ｐｒｅｌｕｄｅペプチドシンセサイザー（Ｐｒｏｔｅｉ

ｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ）または同様の自動合成機上で、標準のＦｍｏｃ化学反応およびＨＢＴＵ／ＤＩＰＥＡ活性化を用いて行った。溶媒としてＤＭＦを用いた。脱保護：２０％ピペリジン／ＤＭＦで２×２．５分間。洗浄：７×ＤＭＦ。カップリングＤＭＦ２×中、２：５：１０　２００ｍＭＡＡ／５００ｍＭ　ＨＢＴＵ／２Ｍ　ＤＩＰＥＡ２０分間。洗浄：５×ＤＭＦ。

【０１５４】

Ｌｙｓ－側鎖を修飾する場合は、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（ｉｖＤｄｅ）－ＯＨまたはＦｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨを、相当する位置で用いた。合成の完了後、文献の手順（Ｓ．Ｒ．Ｃｈｈａｂｒａら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．、１９９８、３９、１６０３）を部分修正したものに従って、ＤＭＦ中４％のヒドラジン水和物を使用して、ｉｖＤｄｅ基を除去した。ＡｃＯＨ／ＴＦＥ／ＤＣＭ（１／２／７）で室温で１５分間繰返し処理することによってＭｍｔ基を除去し、次いで、樹脂をＤＣＭ、ＤＣＭ中５％のＤＩＰＥＡ、およびＤＣＭ／ＤＭＦ中５％のＤＩＰＥＡで繰返し洗浄した。

【０１５５】

樹脂を所望の酸のＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルで処理し、またはＨＢＴＵ／ＤＩＰＥＡもしくはＨＯＢｔ／ＤＩＣなどのカップリング試薬を用いて、以下のアシル化を行った。

【０１５６】

合成したペプチドを全て、８２．５％ＴＦＡ、５％フェノール、５％水、５％チオアニソール、２．５％ＥＤＴからなるＫｉｎｇの切断カクテルで、樹脂から切断した。次いで、粗製ペプチドをジエチルエーテルまたはジイソプロピルエーテル中で沈殿させ、遠心分離し、凍結乾燥した。ペプチドを分析用ＨＰＬＣによって分析し、ＥＳＩ質量分析法によってチェックした。粗製のペプチドを、慣例的な分取用ＲＰ－ＨＰＬＣ精製手順によって精製した。

【０１５７】

あるいは、ペプチドを、手操作の合成手順により合成した：乾燥させたＲｉｎｋアミドＭＢＨＡ樹脂（０．６６ｍｍｏｌ／ｇ）０．３ｇを、ポリプロピレンフィルタを装着したポリエチレン製容器中に配置した。樹脂を、ＤＣＭ（１５ｍｌ）中１時間、およびＤＭＦ（１５ｍｌ）中１時間膨潤させた。樹脂上のＦｍｏｃ基を２０％（ｖ／ｖ）ピペリジン／ＤＭＦ溶液で５分間および１５分間の２回、処理することにより脱保護した。樹脂を、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６：６：６回）で洗浄した。Ｋａｉｓｅｒ試験（定量方法）を、固体支持体からＦｍｏｃを除去されたことの確認に用いた。乾燥ＤＭＦ中のＣ末端Ｆｍｏｃ－アミノ酸（樹脂ローディングに対応して５等量過剰）を、脱保護した樹脂に加え、ＤＭＦ中の５等量過剰のＤＩＣおよびＨＯＢＴを用いて次のＦｍｏｃ－アミノ酸のカップリングを開始させた。反応混合物中の各反応物の濃度はおよそ０．４Ｍであった。混合物を室温で２時間、ローター上で回転させた。樹脂をろ過し、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６：６：６回）で洗浄した。カップリング完了時、ペプチド樹脂アリコートに対するＫａｉｓｅｒ試験は陰性であった（樹脂上に着色なし）。第１のアミノ酸を付着させた後、樹脂中に非反応のアミノ基があれば、無水酢酸／ピリジン／ＤＣＭ（１：８：８）を用いて２０分間キャッピングして、配列のあらゆる欠失を回避した。キャッピング後、樹脂をＤＣＭ／ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６／６／６／６回）で洗浄した。ペプチジル樹脂に付着しているＣ末端アミノ酸上のＦｍｏｃ基を、２０％（ｖ／ｖ）ピペリジン／ＤＭＦ溶液で５分間および１５分間の２回処理することにより、脱保護した。樹脂をＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６：６：６回）で洗浄した。Ｆｍｏｃ脱保護完了時、ペプチド樹脂アリコートに対するＫａｉｓｅｒ試験は陽性であった。

【０１５８】

ＲｉｎｋアミドＭＢＨＡ樹脂上の標的配列における残りのアミノ酸を、Ｆｍｏｃ　ＡＡ／ＤＩＣ／ＨＯＢｔ方法を用い、ＤＭＦ中樹脂充填に相当する５等量過剰を用いて、逐次的にカップリングさせた。反応混合物中の各反応物の濃度は、およそ０．４Ｍであった。混合物を室温で２時間、ローター上で回転させた。樹脂をろ過し、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭ

Ｆ（各６：６：６回）で洗浄した。各カップリング工程およびＦｍｏｃ脱保護工程後、Ｋａｉｓｅｒ試験を行って反応の完全性を確認した。

【０１５９】

直鎖状配列が完成した後、分枝点または修飾点として用いたリジンのε－アミノ基を、ＤＭＦ中２．５％ヒドラジン水和物を用いて１５分間×２、脱保護し、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６：６：６回）洗浄した。グルタミン酸のγ－カルボキシル終端をＬｙｓのε－アミノ基に、ＤＭＦ中、ＤＩＣ／ＨＯＢｔ法でＦｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯＨ）－ＯｔＢｕを用いて付着させた（樹脂充填に関して５等量過剰）。混合物を室温で２時間、ローター上で回転させた。樹脂をろ過し、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６×３０ｍｌ）で洗浄した。グルタミン酸上のＦｍｏｃ基を、２０％（ｖ／ｖ）ピペリジン／ＤＭＦ溶液で５分間および１５分間（各２５ｍｌ）の２回処理することにより脱保護した。樹脂を、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６：６：６回）で洗浄した。Ｆｍｏｃ脱保護完了時、ペプチド樹脂アリコートに対するＫａｉｓｅｒ試験は陽性であった。

【０１６０】

側鎖の分枝がまた、γグルタミン酸をもう１つ含んでいる場合、第２のＦｍｏｃ－Ｇｌｕ（ＯＨ）－ＯｔＢｕを、ＤＭＦ中、ＤＩＣ／ＨＯＢｔ法（樹脂充填に関して５等量過剰）でのγグルタミン酸の遊離のアミノ基に対する付着に用いた。混合物を室温で２時間、ローター上で回転させた。樹脂をろ過し、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６×３０ｍｌ）で洗浄した。γ－グルタミン酸上のＦｍｏｃ基を、２０％（ｖ／ｖ）ピペリジン／ＤＭＦ溶液で５分間および１５分間（２５ｍｌ）の２回処理することにより脱保護した。樹脂を、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６：６：６回）で洗浄した。Ｆｍｏｃ脱保護完了時、ペプチド樹脂アリコートに対するＫａｉｓｅｒ試験は陽性であった。

【０１６１】

グルタミン酸の側鎖に対するパルミチン酸およびステアリン酸の付着：

γグルタミン酸の遊離のアミノ基に、ＤＭＦ中に溶解したパルミチン酸またはステアリン酸（５等量）を加え、ＤＭＦ中ＤＩＣ（５等量）およびＨＯＢｔ（５等量）を加えることにより、カップリングを開始させた。樹脂を、ＤＭＦ／ＤＣＭ／ＤＭＦ（各６：６：６回）で洗浄した。

【０１６２】

樹脂からのペプチドの最終的な切断：

手操作の合成により合成したペプチジル樹脂を、ＤＣＭ（６×１０ｍｌ）、ＭｅＯＨ（６×１０ｍｌ）、およびエーテル（６×１０ｍｌ）で洗浄し、真空乾燥機で一夜乾燥させた。固体支持体からのペプチドの切断を、ペプチド樹脂を室温で３時間、試薬カクテル（８０．０％ＴＦＡ／５％チオアニソール／５％フェノール／２．５％ＥＤＴ、２．５％ＤＭＳ、および５％ＤＣＭ）で処理することによって実現した。切断混合物をろ過により収集し、樹脂をＴＦＡ（２ｍｌ）およびＤＣＭ（２×５ｍｌ）で洗浄した。過剰のＴＦＡおよびＤＣＭを、窒素下で小体積に濃縮し、少量のＤＣＭ（５～１０ｍｌ）を樹脂に加え、窒素下で蒸発させた。プロセスを３～４回繰り返して、揮発性不純物の殆どを除去した。残渣を０℃に冷却し、無水エーテルを加えてペプチドを沈殿させた。沈殿したペプチドを遠心分離し、上清のエーテルを除去し、新たなエーテルをペプチドに加え、再び遠心分離した。粗製試料を、分取ＨＰＬＣで精製し、凍結乾燥した。ペプチドの同一性をＬＣＭＳによって確認した。

【０１６３】

さらに、リジン側鎖の導入のための異なる経路を使用し、側鎖がすでにリジンに付加されている予め官能化された構成単位（例えば、（２Ｓ）－６－［［（４Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－［［（４Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－（ヘキサデカノイルアミノ）－５－オキソ－ペンタノイル］アミノ］－５－オキソ－ペンタノイル］アミノ］－２－（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシカルボニルアミノ）ヘキサン酸）をペプチド合成におけるカップリングパートナーとして適用する。アミノ基を有する０．６７ｍｍｏｌのペプチド樹脂を２０ｍｌのジメチルホルムアミドで洗浄する。２．９３ｇの（２Ｓ）

－６－［［（４Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－［［（４Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－（ヘキサデカノイルアミノ）－５－オキソ－ペンタノイル］アミノ］－５－オキソ－ペンタノイル］アミノ］－２－（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシカルボニルアミノ）ヘキサン酸を３１０ｍｇのヒドロキシベンゾトリアゾール水和物および０．３２ｍｌのジイソプロピルカルボジイミドと一緒に２０ｍｌのジメチルホルムアミド中に溶解する。５分間の撹拌後、溶液を樹脂に添加した。樹脂を２０時間撹拌し、次いで、それぞれ２０ｍｌのジメチルホルムアミドで３回洗浄した。小さな樹脂試料を採取して、Ｋａｉｓｅｒ試験およびＣｈｌｏｒａｎｉｌ試験（Ｅ．Ｋａｉｓｅｒ、Ｒ．Ｌ．Ｃｏｌｅｓｃｏｔｔ、Ｃ．Ｄ．Ｂｏｓｓｉｎｇｅｒ、Ｐ．Ｉ．Ｃｏｏｋ、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９７０年、３４巻、５９５～５９８頁；Ｃｈｌｏｒａｎｉｌ－Ｔｅｓｔ：Ｔ．Ｖｏｊｋｏｖｓｋｙ、Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１９９５年、８巻、２３６～２３７頁）を行った。この手順は、選択的脱保護工程の必要性ならびにきわめて進行した合成中間体上での側鎖構成単位の選択的付加を回避するものである。

【０１６４】

分析用ＨＰＬＣ／ＵＰＬＣ

方法Ａ：検出２１０～２２５ｎｍ

カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ（登録商標）ＣＳＨ（商標）Ｃ１８　１．７μｍ（１５０×２．１ｍｍ）、５０℃

溶媒：H_2O＋０．０５％ＴＦＡ：ＡＣＮ＋０．０３５％ＴＦＡ（流速０．５ｍｌ／分）

勾配：８０：２０（０分）から８０：２０（３分）から２５：７５（２３分）から２：９８（２３．５分）から２：９８（３０．５分）から８０：２０（３１分）から８０：２０（３７分）

場合により、エレクトロスプレーポジティブイオンモードの、質量分析計：ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒで

【０１６５】

方法Ｂ：２１４で検出

カラム：　Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ（登録商標）ＣＳＨ（商標）Ｃ１８　１．７μｍ（１５０×２．１ｍｍ）、５０℃

溶媒：　H_2O＋０．０５％ＴＦＡ：ＡＣＮ＋０．０３５％ＴＦＡ（流速０．５ｍｌ／分）

勾配：　８０：２０（０分）から８０：２０（３分）から２５：７５（２３分）から２：９８（２３．５分）から２：９８（３０．５分）から８０：２０（３１分）から８０：２０（３７分）

場合により、質量分析計：Ａｇｉｌｅｎｔ　６２３０　Ａｃｃｕｒａｔｅ－Ｍａｓｓ　ＴＯＦ、Ｄｕａｌ　Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｊｅｔ　Ｓｔｒｅａｍ　ＥＳＩで

【０１６６】

方法Ｃ：２１４ｎｍで検出

カラム：　Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ（登録商標）ＣＳＨ（商標）Ｃ１８　１．７μｍ（１５０×２．１ｍｍ）、５０℃

溶媒：　H_2O＋０．１％ＴＦＡ：ＡＣＮ＋０．１％ＴＦＡ（流速０．５ｍｌ／分）

勾配：　８０：２０（０分）から８０：２０（３分）から２５：７５（２３分）から２：９８（２３．５分）から２：９８（３０．５分）から８０：２０（３１分）から８０：２０（３８分）

場合により、質量分析計：Ａｇｉｌｅｎｔ　６２３０　Ａｃｃｕｒａｔｅ－Ｍａｓｓ　ＴＯＦ、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｊｅｔ　Ｓｔｒｅａｍ　ＥＳＩで

【０１６７】

方法Ｄ：２２０ｎｍで検出

カラム：　Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＢＥＨ　Ｃ１８（２．１×１００ｍｍ×１．７μｍ）、温度：４０℃

ＡｒｉｅｓペプチドＸＢ　Ｃ１８（４．６×２５０ｍｍ×３．６μｍ）、温度

：４０℃
溶媒：　H_2O＋０．１％ギ酸（バッファーＡ）：ＡＣＮ＋０．１％ギ酸（流速１ｍｌ／分）（バッファーＢ）
勾配：　２％バッファーＢでカラムを平衡にし、バッファーＢ２％から７０％の勾配によって１５分間溶出
【０１６８】
方法Ｅ：２１５ｎｍで検出
カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ（登録商標）ＣＳＨ^{TM}Ｃ１８　１．７μｍ（１５０×２．１ｍｍ）、温度：５０℃
溶媒：H_2O＋０．０５％ＴＦＡ：ＡＣＮ＋０．０３５％ＴＦＡ（流速０．５ｍｌ／分）
勾配：８０：２０（０分）から８０：２０（３分）から２５：７５（２３分）から５：９５（２３．５分）から５：９５（２５．５分）から８０：２０（２６分）から８０：２０（３０分）
【０１６９】
一般的な分取ＨＰＬＣ精製手順
　粗製ペプチドを、Ａｋｔａ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒシステム上、Ｊａｓｃｏ　ｓｅｍｉｐｒｅｐ　ＨＰＬＣシステム上、またはＡｇｉｌｅｎｔ　１１００　ＨＰＬＣシステム上のいずれかで精製した。精製しようとする粗製ペプチドの量に応じて、様々なサイズおよび様々な流速の分取用ＲＰ－Ｃ１８－ＨＰＬＣカラムを用いた。アセトニトリル＋０．１％ＴＦＡ（Ｂ）および水＋０．１％ＴＦＡ（Ａ）を、溶離液として使用した。生成物を含む分画を収集し、凍結乾燥させて、典型的にＴＦＡ塩である、精製生成物を得た。
【０１７０】
エキセンジン－４誘導体の溶解性の評価
　ペプチドバッチの溶解性の測定前に、その純度をＵＰＬＣ／ＭＳによって決定した。溶解性試験では、目的濃度は、純粋化合物１０ｍｇ／ｍｌであった。したがって、固体試料からの溶液を、緩衝系において、予め決定した％純度に基づいて１０ｍｇ／ｍＬの化合物の濃度で調製した：
溶解性緩衝系Ａ）酢酸バッファー　ｐＨ４．５、酢酸ナトリウム三水和物１００ｍＭ、ｍ－クレゾール２．７ｍｇ／ｍｌ
溶解性緩衝系Ｂ）リン酸バッファー　ｐＨ７．４、リン酸水素ナトリウム１００ｍＭ、ｍ－クレゾール２．７ｍｇ／ｍｌ
溶解性緩衝系Ｃ）クエン酸バッファー　ｐＨ６．０、クエン酸１００ｍＭ、ｍ－クレゾール２．７ｍｇ／ｍＬ
【０１７１】
　１時間の穏やかな撹拌後に、２５００ＲＣＦ（相対遠心加速度）で１５分間の遠心分離後に得た、上清から、ＨＰＬＣ－ＵＶを行った。
【０１７２】
　既知の濃度の参照ペプチドの標準曲線を用いて、１：１０希釈した緩衝処理した試料の２μＬの注射のＵＶピーク面積を比較することによって溶解性を決定した。異なるアミノ酸配列に基づいて試料および参照ペプチドの異なるＵＶ吸光係数を算出し、濃度計算の考慮に入れた。
【０１７３】
エキセンジン－４誘導体の化学的安定性評価
　ペプチドバッチの化学的安定性の測定前に、その純度をＵＰＬＣ／ＭＳによって決定した。安定性試験では、目的濃度は、純粋化合物１ｍｇ／ｍｌであった。したがって、固体試料からの溶液を、緩衝系において、予め決定した％純度に基づいて１ｍｇ／ｍＬの化合物の濃度で調整した：
【０１７４】
　化学的安定性緩衝系Ａ）２５ｍＭ酢酸バッファー　ｐＨ４．５、Ｌ－メチオニン３ｍｇ／ｍＬ、ｍ－クレゾール２．７ｍｇ／ｍＬ、８５％グリセリン１８ｍｇ／ｍＬ

化学的安定性緩衝系Ｂ）２５ｍＭリン酸バッファー　ｐＨ６．０、Ｌ－メチオニン３ｍｇ／ｍＬ、ｍ－クレゾール２．７ｍｇ／ｍＬ、８５％グリセリン１８ｍｇ／ｍＬ

【０１７５】

ペプチド溶液を０．２２μＭの細孔径に通してろ過し、無菌条件下で分注してアリコートにした。出発点において、無希釈の試料２μｌの注入によってＵＰＬＣ－ＵＶを行った。

【０１７６】

化学的安定性試験では、アリコートを５℃および４０℃で２８日間保存した。この時間経過後、試料を２５００ＲＣＦで１５分間遠心分離した。次いで、無希釈の上清２μｌをＵＰＬＣ－ＵＶで分析した。

【０１７７】

化学的安定性については、以下の等式によって算出した純度の相対的な低下を通して評価した：

［（出発点の純度）－（Ｘ℃で２８日後の純度）］／（出発点の純度）］＊１００％

Ｘ＝５℃または４０℃

【０１７８】

純度については、

［（ペプチドのピーク面積）／（合計ピーク面積）］＊１００％

として算出する。

【０１７９】

物理的安定性の評価のための動的光散乱（ＤＬＳ）

単色性かつ可干渉性の光ビーム（レーザー）を使用して液体試料を照らした。動的光散乱（ＤＬＳ）は、ブラウン運動を行う粒子（１ｎｍ≦半径≦１μｍ）から散乱した光を測定する。この運動は、粒子と、それ自体がそれらの熱エネルギーによって動いている溶媒分子との間の衝突によって誘導される。粒子の拡散運動は、散乱光の一時性の揺らぎをもたらす［Ｐｅｃｏｒａ，Ｒ．Ｄｙｎａｍｉｃ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｃａｔｔｅｒｉｎｇ：Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｏｆ　Ｐｈｏｔｏｎ　Ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ　Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ、Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｒｅｓｓ、１９８５］。

【０１８０】

散乱光強度の揺らぎを記録して自己相関関数に変換する。自己相関曲線を指数関数に適合させることにより、溶液中での粒子の拡散係数Ｄを導くことができる。次いで、拡散係数を使用して、球状粒子を仮定するＳｔｏｋｅｓ－Ｅｉｎｓｔｅｉｎ式を通して流体力学的半径R_h（または見かけのストークス半径）を算出する。この計算は、ＩＳＯ１３３２１およびＩＳＯ２２４１２において定義されている［国際標準ＩＳＯ１３３２１　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｓｉｚｅ　Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ　第８部：Ｐｈｏｔｏｎ　Ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ　Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ、国際標準化機構（ＩＳＯ）　１９９６；国際標準ＩＳＯ２２４１２　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｓｉｚｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　－　Ｄｙｎａｍｉｃ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｃａｔｔｅｒｉｎｇ、国際標準化機構（ＩＳＯ）　２００８］。

【０１８１】

多分散試料の場合には、自己相関関数は、種のそれぞれに該当する指数関数的減衰の和である。次いで、散乱光の一時性の揺らぎを使用して、粒子の画分またはファミリーの粒径分布プロファイルを決定することができる。一次結果は、粒径の関数としての散乱光の強度分布である。強度分布は、それぞれの粒子の画分またはファミリーの散乱強度によって自然に加重される。生物学的材料またはポリマーでは、粒子散乱強度は、分子量の二乗に比例する。したがって、少量の凝結体／凝集体またはより大きな粒子種の存在は、強度分布を支配し得る。しかし、この分布を使用して、試料中の大きな物質の存在を高感度で検出することができる。ある仮定の下でＭｉｅ理論を使用して、強度分布を粒径の体積または質量の分布に転換することができる。強度分布とは対照的に、質量分布は、比較目的で使用するのが最善であり、（基礎となっている仮定により）決して絶対的なものである

と考慮されるべきではない。

【０１８２】

ＤＬＳ技術により、固有のピーク広がりを有する分布が作成される。多分散指数％Ｐｄは、粒径分布の幅の尺度であり、ＩＳＯ１３３２１およびＩＳＯ２２４１２に記載されている標準的な方法によって算出される［国際標準ＩＳＯ１３３２１　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｓｉｚｅ　Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ　第８部：Ｐｈｏｔｏｎ　Ｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ　Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ、国際標準化機構（ＩＳＯ）　１９９６；国際標準ＩＳＯ２２４１２　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｓｉｚｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　－　Ｄｙｎａｍｉｃ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｃａｔｔｅｒｉｎｇ、国際標準化機構（ＩＳＯ）　２００８］。

【０１８３】

ＤＬＳ相互作用パラメーター（k_D）

ＤＬＳ相互作用パラメーター（k_D）は、粒子間相互作用を記述する尺度であり、ここで、粒子は、折り畳まれたタンパク質またはペプチドである［Ｓａｎｄｅｅｐ　Ｙａｄａｖら（２００９）Ｊ　Ｐｈａｒｍ　Ｓｃ、９９巻（３）、１１５２～１１６８頁；Ｂｒｉａｎ　Ｄ．Ｃｏｎｎｏｌｌｙら（２０１２）Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ　１０３巻、６９～７８頁］。

【０１８４】

パラメーターk_Dは、拡散係数Ｄの濃度依存性から導かれ、これは、濃度ｃの冪で展開することによって得られる：

$$D(c) = D_0 (1 + k_D c + k_{iD} c^2 + k_{jD} c^3 + \cdots)$$

【０１８５】

より高次の項を無視して、すなわち、$k_{iD} = k_{jD} = \cdots = 0$で、データを直線的にあてはめることができ、$k_D$は、曲線$D = D_0 (1 + k_D c)$と$D_0$との勾配から得られる。$D_0$は、ゼロ濃度における拡散係数である。パラメーター$k_D$を使用して、タンパク質またはペプチド分子もしくはオリゴマーの、それら自身および溶液中のそれらの環境との相互作用を記述することができ、パラメーターk_Dを、例えば、ＨａｒｄｉｎｇおよびＪｏｈｎｓｏｎによって記載されるような、ビリアル係数B_{22}と理論的に関連する［式中、Ｍはモル質量であり、k_sは沈降速度の一次濃度係数であり、υは偏比容である］［Ｈａｒｄｉｎｇ　ＳＥ、Ｊｏｈｎｓｏｎ　Ｐ．（１９８５）Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ、２３１、５４３～５４７頁］。

$$k_D = 2B_{22}M - k_s - \upsilon$$

【０１８６】

正のB_{22}値は、自己会合よりも溶媒和（ｓａｌｖａｔｉｏｎ）を好む試料を示すのに対して、負のB_{22}値は、自己会合を好む試料を示す。実用的な観点から、k_Dは、その意味においてB_{22}に類似しており、分子間の正味の力における情報が得られる。高い値は、強い正味の反発相互作用を示すのに対して、低い値は、正味の吸引力を示す。したがって、k_Dを相対的な定性的比較に使用することができる（図１を参照されたい）。

【０１８７】

全てのペプチド溶液について、（Ｓｔｏｋｅｓ－Ｅｉｎｓｔｅｉｎ式によって関連付けされる）流体力学的半径R_hおよび拡散定数Ｄを、同じもの３つずつの平均値として決定した。両方のパラメーターを、同じ緩衝系中の異なる濃度（例えば、R_{h1}およびD_1：１ｍｇ／ｍｌならびにR_{h5}およびD_5：５ｍｇ／ｍｌ）で決定した。低いペプチド濃度と高いペプチド濃度との間のこれらのパラメーターの差異は、ＤＬＳ相互作用パラメーターk_Dの代替である。$R_{h5} < R_{h1}$または$D_5 > D_1$は、$k_D > 0$に相当し、したがって、物理的（またはコロイドの）安定性の改良をもたらす反発的粒子間相互作用に相当する。

【０１８８】

ＤＬＳ緩衝系Ａ）２５ｍＭ酢酸バッファー　ｐＨ４．５、Ｌ－メチオニン３ｍｇ／ｍＬ、ｍ－クレゾール２．７ｍｇ／ｍＬ、８５％グリセリン１８ｍｇ／ｍＬ

ＤＬＳ緩衝系Ｂ）２５ｍＭリン酸バッファー　ｐＨ６．０、Ｌ－メチオニン３ｍｇ／ｍＬ、ｍ－クレゾール２．７ｍｇ／ｍＬ、８５％グリセリン１８ｍｇ／ｍＬ

【０１８９】

ＤＬＳ方法Ａ：ＤＬＳ測定を、Ｗ１３０ｉ装置（Ａｖｉｄ　Ｎａｎｏ　Ｌｔｄ、Ｈｉｇｈ　Ｗｙｃｏｍｂｅ、ＵＫ）上で、体積の小さい使い捨て可能なキュベット（ＵＶｅｔｔｅ、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ　ＡＧ、Ｈａｍｂｕｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して行った。データを、Ａｖｉｄ　Ｎａｎｏによって提供されたｉ－Ｓｉｚｅ３．０で処理した。粒径分布のパラメーターを、ＤｙｎａＬＳアルゴリズムを使用して非負拘束付き最小二乗（ＮＮＬＳ）法で決定した。測定は、２５℃で、６６０ｎｍのレーザー光源を用いて９０°の角度で行った。

【０１９０】

ＤＬＳ方法Ｂ：ＤＬＳ測定を、Ｎａｎｏｓｉｚｅｒ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｍａｌｖｅｒｎ、ＵＫ）上で、使い捨て可能なＵＶキュベット（Ｂｒａｎｄマクロ、２．５ｍＬおよびＢｒａｎｄセミミクロ１．５ｍＬ、Ｂｒａｎｄ　ＧｍｂＨ＋Ｃｏ　ＫＧ、Ｗｅｒｔｈｅｉｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して行った。データを、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒソフトウェアバージョン７．１０または７．０１で処理した。粒径分布のパラメーターを、非負拘束付き最小二乗（ＮＮＬＳ）法で決定した。測定は、２５℃で、６３３ｎｍのレーザー光源を用いてＮＩＢＳ（非侵襲性後方散乱）モードで１７３°の角度で行った。

【０１９１】

ＤＬＳ方法Ｃ：ＤＬＳ測定を、ＤｙｎａＰｒｏ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ　ＩＩ（Ｗｙａｔｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｓａｎｔａ　Ｂａｒｂａｒａ、ＣＡ、ＵＳ）上で、以下の黒色で体積の小さい、無処理のプレートのうちの１種を使用して行った：透明な底を有するポリスチレン３８４アッセイプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、ＮＹ、ＵＳ）、透明な底を有するポリスチレン９６アッセイプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、ＮＹ、ＵＳ）、透明な底を有するシクロオレフィンポリマー（ＣＯＰ）３８４アッセイプレート（Ａｕｒｏｒａ、ＭＴ、ＵＳ）、または透明な底を有するポリスチレン３８４アッセイプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－Ｏｎｅ、Ｇｅｒｍａｎｙ）。データを、Ｗｙａｔｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙによって提供されるＤｙｎａｍｉｃｓソフトウェアで処理した。粒径分布のパラメーターを、ＤｙｎａＬＳアルゴリズムを使用して非負拘束付き最小二乗（ＮＮＬＳ）法で決定した。測定は、２５℃で、８３０ｎｍのレーザー光源を用いて１５８°の角度で行った。

【０１９２】

物理的安定性の評価のためのＴｈＴアッセイ

ペプチド溶液の低い物理的安定性は、アミロイド線維形成を導く場合もあり、それは、試料中で、秩序立ったねじ山のような巨大分子構造として観察され、最終的にゲル形成を導く場合もある。チオフラビンＴ（ＴｈＴ）は、誤って折り畳まれたタンパク質凝集体の存在を可視化して定量化するために広く使用される。［Ｂｉａｎｃａｌａｎａら（２０１０）Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ．１８０４（７）：１４０５～１４１２．］。それが、アミロイド凝集体中のもののような、線維に結合するとき、色素は、異なる蛍光サインを示す［Ｎａｉｋｉら（１９８９）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１７７、２４４～２４９；ＬｅＶｉｎｅ（１９９９）Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．３０９、２７４～２８４］。線維形成の経時変化は、シグモイド曲線の特徴的な形状をたどることが多く、以下の３つの領域に分離することができる：遅滞期、急速発達期、および定常期。

【０１９３】

典型的な線維形成過程は、遅滞期で始まり、ここで、線維に変化した、部分的に折り畳まれたペプチドの量は、検出するのに十分なほどは多くない。遅滞時間は、臨界量の核が形成される時間に該当する。その後、急激な伸長期がそれに続き、線維濃度は急速に上昇する。

【０１９４】
Ｆｌｕｏｒｏｓｋａｎ Ａｓｃｅｎｔ ＦＬにおいて３７℃での振盪によるストレス条件下での線維化の傾向を決定するために研究を行った。
【０１９５】
Ｆｌｕｏｒｏｓｋａｎ Ａｓｃｅｎｔ ＦＬにおける試験では、試料２００μＬを９６ウエルマイクロタイタープレートＰＳ、平底、Ｇｒｅｉｎｅｒ Ｆｌｕｏｔｒａｃ ６５０７６番に入れた。プレートをＳｃｏｔｃｈ Ｔａｐｅ（Ｑｕｉａｇｅｎ）で封じた。９６０ｒｐｍで１０秒振盪および３７℃で５０秒の休止期間の連続サイクルによって試料にストレスをかけた。その動態を、２０分間毎に蛍光強度を測定することによってモニターした。
【０１９６】
ペプチドを緩衝系中に希釈して３ｍｇ／ｍｌの最終濃度にした。H_2O中に１０．１ｍＭのＴｈＴ溶液２０μＬを、ペプチド溶液２ｍＬに添加してＴｈＴ １００μＭの最終濃度にした。各試料について８つずつの重複試料を試験した。
【０１９７】
Ｔｈｔ緩衝系Ａ）ｍ－クレゾールを含む１００ｍＭ酢酸 ｐＨ４．５（１００ｍＭ酢酸ナトリウム三水和物、２Ｎ ＣＨ３ＣＯＯＨ、ｍ－クレゾール２．７ｍｇ／ｍＬを使用してｐＨ調整）
Ｔｈｔ緩衝系Ｂ）１００ｍＭクエン酸バッファー ｐＨ６．０
【０１９８】
ＧＬＰ－１、グルカゴン、およびＧＩＰ受容体の効能に対するｉｎ ｖｉｔｒｏ細胞アッセイ
受容体に対する化合物のアゴニズムを、ヒトＧＬＰ－１、ＧＩＰまたはグルカゴン受容体を安定して発現するＨＥＫ－２９３細胞株のｃＡＭＰ反応を測定する機能的アッセイによって決定した。
【０１９９】
細胞のｃＡＭＰ含量を、ＨＴＲＦ（ホモジニアス時間分解蛍光）をベースとしたＣｉｓｂｉｏ Ｃｏｒｐ．（カタログ番号６２ＡＭ４ＰＥＪ）からのキットを用いて決定した。調製のため、細胞をＴ１７５培養フラスコ中に分割し、培地（ＤＭＥＭ／１０％ＦＢＳ）中で一夜増殖させてほぼコンフルエントにした。次いで、培地を除去し、カルシウムおよびマグネシウムを欠くＰＢＳで細胞を洗浄し、引き続きアキュターゼ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ カタログ番号Ａ６９６４）でプロテイナーゼ処理した。剥離した細胞を洗浄し、アッセイバッファー（１×ＨＢＳＳ；２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、０．１％ ＢＳＡ、２ｍＭ ＩＢＭＸ）中に再懸濁し、細胞密度を決定した。次いで、これらを４００００細胞／ｍｌに希釈し、２５μｌアリコートを、９６ウエルプレートのウエル中に懸濁した。測定のため、アッセイバッファー中の試験化合物２５μｌをウエルに加え、引き続き室温で３０分間インキュベートした。溶解バッファー（キットの構成成分）中に希釈したＨＴＲＦ試薬を加えた後、プレートを１時間インキュベートし、引き続き６６５／６１６ｎｍで蛍光比を測定した。最大反応の５０％活性化を引き起こした濃度（ＥＣ５０）を決定することによって、アゴニストのｉｎ ｖｉｔｒｏの作用強度を定量した。
【０２００】
マウスおよびミニブタにおけるエキセンジン－４誘導体を定量するための生物学的分析スクリーニング方法
マウスに１ｍｇ／ｋｇを皮下投与（ｓ．ｃ．）する。マウスを屠殺し、適用後０．２５、０．５、１、２、４、８、１６、および２４時間後に血液試料を採取した。タンパク質を沈殿させた後、液体クロマトグラフィー質量分析法（ＬＣ／ＭＳ）により血漿試料を分析した。ＰＫパラメーターおよび半減期を、ＷｉｎｏｎＬｉｎバージョン５．２．１（非コンパートメントモデル）を用いて算出した。
【０２０１】
Ｇｏｔｔｉｎｇｅｒ雌ミニブタに、０．０５ｍｇ／ｋｇ、０．０７５ｍｇ／ｋｇ、また

は０．１ｍｇ／ｋｇを皮下投与した（ｓ．ｃ．）。適用後０．２５、０．５、１、２、４、８、２４、３２、４８、５６、および７２時間後に血液試料を採取した。血漿試料を、タンパク質を沈殿させた後、液体クロマトグラフィー質量分析法（ＬＣ／ＭＳ）によって分析した。ＰＫパラメーターおよび半減期を、ＷｉｎｏｎＬｉｎ　Ｖｅｒｓｉｏｎ５．２．１（ノンコンパートメントモデル）を用いて計算した。

【０２０２】

食餌誘発性肥満（ＤＩＯ）Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスにおける、血中グルコース、体重、総体脂肪含量および摂食量に対する、皮下処置後の急性および慢性効果

Ｃ５７ＢＬ／６ＮＨｓｄ雌マウスを、Ｅｎｖｉｇｏ　ＲＭＳ　Ｉｎｃ．から群収容で注文して、群収容で輸送し、投与前フェーズの３８日目まで、木材チップの床敷を備えた靴箱型ケージング中に、輸送したケージ仲間と共に群収容したままにした。試験開始時、マウスは、２５～２６週齢の間であった。

【０２０３】

１２時間の明／暗サイクル（明期　午前０４：００～午後４：００）、２３～２６℃の間の室温および３０～７０％の間の相対湿度を含んだ動物施設条件下でマウスを収容した。全ての動物に、薬理学的介入（投与フェーズ）前の１６週間、水および高脂肪食（ＴＤ９７３６６）を自由に摂取させた。投与前フェーズの３８日目の最後まで毎週およびその最後に、餌を新しい餌と交換した。次の投与フェーズの間、１週間毎に１回、残っている餌のうちの約５０％を除去して新しい餌と交換し、ペレットを均一に混合した。

【０２０４】

投与前３８日目に、平均体重が全てのＤＩＯ群の間で一致するように肥満型ＤＩＯマウスを処置群（ｎ＝８）に割り当てた。げっ歯動物の維持食（Ｔｅｋｌａｄ　Ｇｌｏｂａｌ　Ｄｉｅｔｓ　Ｒｏｄｅｎｔ　２０１４、ペレット状）を自由に摂取させた同齢の群を、痩せ型対照群として試験に含めた。投与前フェーズにおいて３２日目から３８日目にわたり、全ての試験動物をビヒクル（$CaCl_2$および$MgCl_2$を含まない、リン酸緩衝食塩水、ＰＢＳ、Ｇｉｂｃｏ）で１日１回処置した（ｓ．ｃ．約０．２ｍＬ／マウス）。

【０２０５】

投与前フェーズの３７日目に、試験物をＰＢＳで１００μｇ／ｍＬの濃度に希釈し、このストック溶液のアリコートを約≦－６０℃で保存した。ストックアリコートを、一週間の使用のために解凍し、その後、冷蔵庫中で約４℃で保存した。それぞれの投与日に、ストック溶液をＰＢＳで希釈することにより、注射する試験物の溶液を一度新しく調製して所望の濃度にした。

【０２０６】

マウスをＰＢＳ－ビヒクルまたは試験物のｓ．ｃ．注射で１日２回、２８日間処置した。朝の投与は午前０６：００から０７：３０の間に、午後の投与は午後２：００から３：３０の間に開始および完了した。投与フェーズの２８日目には、朝の用量のみを投与した。適用した量は５ｍｌ／ｋｇであって、各個体の最新の体重記録に合うように用量を調整した。

【０２０７】

１）食餌を与えたＤＩＯ雌マウスにおける、血中グルコースプロファイルに対する急性効果：

実験の間、動物に水および餌を自由に摂取させた。投与フェーズの１日目に、ＰＢＳ－ビヒクルまたは試験物の１回目のｓ．ｃ．投与前の０時間、ならびに投与後の１、２、３、４、６、および２４時間に、尾の切断を介して血液約５μＬを採取した。１回目の投与の８時間後、動物にＰＢＳ－ビヒクルまたは試験物の２回目のｓ．ｃ．投与を行った。血中グルコースプロファイルの２４時間の血液採取は、２日目の投与前に行った。Ａｖｉｖａグルコメーターを使用して、グルコース測定を全血において同じもの２つずつまたは３つずつで行った。

【０２０８】

２）食餌を与えたＤＩＯ雌マウスにおける、体重に対する慢性効果：

投与前フェーズの３２日目から３８日目および投与フェーズの２８日間にわたり体重をほぼ午前０６：００～０７：３０の間に毎日測定した。投与フェーズの間、マウスをＰＢＳ－ビヒクルまたは試験物のいずれかのｓ．ｃ．注射で１日２回処置した。

【０２０９】

３）食餌を与えたＤＩＯ雌マウスにおける、総体脂肪量に対する慢性効果：

総体脂肪量を決定するために、投与前の３７日目および投与フェーズの２６日目に定量核磁気共鳴（ＱＮＭＲ）測定を行った。投与フェーズの間、マウスをＰＢＳ－ビヒクルまたは試験物のいずれかのｓ．ｃ．注射で１日２回処置した。

【０２１０】

４）ＤＩＯ雌マウスにおける、摂食量に対する効果：

摂食量は、午前０６：００～０７：３０の間の各ケージの給餌器重量の毎日の評価に基づいていた。それぞれのケージに４匹のマウスを収容し、投与フェーズの２８日にわたって摂食量を算出した。投与フェーズの間、マウスをＰＢＳ－ビヒクルまたは試験物のいずれかのｓ．ｃ．注射で１日２回処置した。

【０２１１】

５）非空腹時のＤＩＯ雌マウスにおける最終血漿パラメーター：

２８日目に、他の全ての生存中の活動（ｉｎｌｉｆｅ　ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ）の前に血漿中インスリン濃度の決定のために血液を採取した。次いで、朝の用量を投与し、投与４時間後に剖検を行った。この目的のために、動物をイソフルランで麻酔し、眼窩採血によって血液を採取した。

【０２１２】

５）非空腹時のＤＩＯ雌マウスにおける最終肝臓重量：

２８日目、朝の投与の４時間後に、上記のように、イソフルラン麻酔下でマウスから血液を採取した。次いで、マウスを殺し、肝臓を採取して計量した。

【０２１３】

６）肝臓脂質の定量化

肝臓アリコートをジクロロメタン：メタノール（２：１）と共にインキュベートした。dH_2Oの添加およびその後の遠心分離によって親油相および疎油相を分離した。底部の親油相を収集し、残りの疎油層および肝臓組織でこの手順を繰り返した。次に、それらの親油相を合わせ、溶媒を蒸発させた。次いで、６０℃で継続的に振盪しながら、試料を２－プロパノールと共にインキュベートした。総コレステロール、トリアシルグリセリンおよびリン脂質の濃度を、市販のキットを用いて製造業者の説明書に従って酵素的に定量化した。

【０２１４】

７）統計分析：

データを平均±ＳＥＭとして示している。Ｓｉｇｍａｐｌｏｔ１２．５を用いて統計分析を行った。一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定を、全ての群（ｎ＝８／群、群サイズからの偏差を示す）のペアワイズ多重比較に用いた。２つの群の平均値における差異が０．０５よりも大きいときには、それらが統計学的に有意に異なると考えた。痩せ型－ビヒクル群データは、非肥満状態についての参照データセットとしての役割を果たす。

【０２１５】

非空腹時の糖尿病ｄｂ／ｄｂ雌マウスにおける、血中グルコース濃度に対する、皮下処置後の急性効果

雌の健常な痩せ型ＢＫＳ．Ｃｇ－（痩せ型）／ＯｌａＨｓｄおよび糖尿病になりやすい肥満型ＢＫＳ．Ｃｇ－＋Ｌｅｐｒ^{db}／＋Ｌｅｐｒ^{db}／ＯｌａＨｓｄマウスを、Ｅｎｖｉｇｏ　ＲＭＳ　Ｉｎｃ．から群収容で注文して、群収容で輸送し、投与前フェーズの１５日目まで、木材チップの床敷を備えた靴箱型ケージング中に群収容したままにした。試験開始時、マウスは、約１２週齢であった。

【０２１６】

１２時間の明／暗サイクル（明期　午前０４：００～午後４：００）、２３～２６℃の

間の室温および３０～７０％の間の相対湿度を含む動物施設条件下でマウスを収容した。全ての動物に水およびＰｕｒｉｎａ　Ｆｏｍｕｌａｂ　Ｄｉｅｔ　５００８を自由に摂取させた。

【０２１７】

投与前９日目に、（ほぼ午前０８：００～１０：００の間の）血中グルコースおよび体重ならびにＨｂＡ１ｃの測定を行った。投与前フェーズの１５日目に、平均ＨｂＡ１ｃおよび平均体重が全てのｄｂ／ｄｂ群の間で一致するように動物を処置群（ｎ＝８）に割り当て、新しいケージに振り分けた。同齢の痩せ型群を、健常な痩せ型参照として試験に含めた。

【０２１８】

投与フェーズの１日目の前に、試験物を（$CaCl_2$および$MgCl_2$を含まない）リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ、Ｇｉｂｃｏ）で１ｍｇ／ｍＬの濃度に希釈し、このストック溶液のアリコートを約≦－６０℃で保存した。投与フェーズの１日目に、ストックアリコートを解凍し、それをＰＢＳで希釈することにより、注射する試験物の溶液を新しく調製して所望の濃度にした。

【０２１９】

投与フェーズの１日目に、ｄｂ／ｄｂマウスをＰＢＳ－ビヒクルまたは試験物３０μｇ／ｋｇのいずれかのｓ．ｃ．注射で１回処置した。痩せ型参照群については、ＰＢＳ－ビヒクルのｓ．ｃ．注射で１回処置した。投与は、午前０８：００から１０：００の間に開始および完了した。適用した量は５ｍｌ／ｋｇであって、各個体の最新の体重記録に合うように用量を調整した。

【０２２０】

１）非空腹時の動物における、血中グルコースプロファイルに対する急性効果：

実験の間、動物に水および餌を自由に摂取させた。投与フェーズの１日目に、他の全ての生存中の活動の前の－３０分および０分に尾の切断を介して血液約５μＬを採取した。０分にマウスにＰＢＳ－ビヒクルまたは試験物３０μｇ／ｋｇのいずれかのｓ．ｃ．投与を行った。投与後の０．２５、０．５、１、１．５、２、３、４、６、８、および２４時間に、さらなる血液試料を採取した。ＡｌｐｈａＴＲＡＫグルコメーターを使用して、グルコース測定を全血で行った。２つの測定値のグルコース濃度が２０ｍｇ／ｄＬを超えて異なる場合、３つ目の値を記録した。血中グルコースについての曲線下面積（ＡＵＣ）を、台形法によって、投与後２４時間の期間について算出した。

【０２２１】

２）統計分析：

３）データを平均±ＳＥＭとして示している。Ｓｉｇｍａｐｌｏｔ１２．５を用いて統計分析を行った。一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定を、全ての群（ｎ＝８／群、群サイズからの偏差を示す）のペアワイズ多重比較に用いた。２つの群の平均値における差異が０．０５よりも大きいときには、それらが統計学的に有意に異なると考えた。非糖尿病－ビヒクル群のデータは、正常血糖の痩せ状態についての参照データセットとしての役割を果たす。

【実施例】

【０２２２】

本発明を以下の実施例によってさらに説明する。

【実施例１】

【０２２３】

配列番号６の合成

方法に記載しているような固相合成を、Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ　Ｒｉｎｋ－Ａｍｉｄｅ樹脂（４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノメチル）－フェノキシアセトアミド－ノルロイシルアミノメチル樹脂）、１００～２００メッシュ上で０．４３ｍｍｏｌ／ｇをロードして行った。Ｆｍｏｃ合成の戦略をＨＢＴＵ／ＤＩＰＥＡ活性化とともに適用した。１４位にＦｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨおよび１位にＢｏｃ－Ｈ

ｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨを固相合成プロトコールにおいて使用した。Ｍｍｔ基を、方法に記載する通りに樹脂上のペプチドから切断した。この後、ＤＩＰＥＡを塩基として用いて、Ｐａｌｍ－ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＯＳｕを、遊離したアミノ基にカップリングさせた。ペプチドを、Ｋｉｎｇのカクテル（Ｄ．Ｓ．Ｋｉｎｇ、Ｃ．Ｇ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｇ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．１９９０年、３６巻、２５５～２６６頁）で樹脂から切断した。粗製生成物を、アセトニトリル／水勾配（両方とも０．１％ＴＦＡを含むバッファー）を用いてＷａｔｅｒｓカラム（Ｓｕｎｆｉｒｅ Ｐｒｅｐ Ｃ１８ ＯＤＢ ５μｍ ５０×１５０ｍｍ）上の分取ＨＰＬＣによって精製した。精製したペプチドをＬＣＭＳによって分析した（方法Ｂ）。

保持時間９．８２４分のピークのもとに見出された質量シグナルの逆重畳積分により、ペプチドの質量は４８３９．６７であることが明らかになり、これは予想値である４８３９．６７と一致する。

【実施例２】

【０２２４】

配列番号７の合成

方法に記載しているような固相合成を、Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ Ｒｉｎｋ－Ａｍｉｄｅ樹脂（４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノメチル）－フェノキシアセトアミド－ノルロイシルアミノメチル樹脂）、１００～２００メッシュ上で０．４３ｍｍｏｌ／ｇをロードして行った。Ｆｍｏｃ合成の戦略をＨＢＴＵ／ＤＩＰＥＡ活性化とともに適用した。１４位にＦｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨおよび１位にＢｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨを固相合成プロトコールにおいて使用した。方法に記載しているように、Ｍｍｔ基を樹脂上のペプチドから切断した。この後、ＤＩＰＥＡを塩基として用いて、Ｐａｌｍ－ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＯＳｕを、遊離したアミノ基にカップリングさせた。ペプチドを、Ｋｉｎｇのカクテル（Ｄ．Ｓ．Ｋｉｎｇ、Ｃ．Ｇ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｇ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．１９９０、３６、２５５～２６６）で樹脂から切断した。粗製生成物を、アセトニトリル／水勾配（両方とも０．１％ＴＦＡを含むバッファー）を用いてＷａｔｅｒｓカラム（Ｓｕｎｆｉｒｅ Ｐｒｅｐ Ｃ１８ ＯＢＤ ５μｍ ５０×１５０ｍｍ）上の分取ＨＰＬＣによって精製した。精製したペプチドをＬＣＭＳによって分析した（方法Ｂ）。

保持時間９．９３５分のピークのもとに見出された質量シグナルの逆重畳積分により、ペプチドの質量は４８５３．７３であることが明らかになり、これは予想値である４８５３．６７と一致する。

【実施例３】

【０２２５】

配列番号１１の合成

方法に記載しているような固相合成を、Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ Ｒｉｎｋ－Ａｍｉｄｅ樹脂（４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノメチル）－フェノキシアセトアミド－ノルロイシルアミノメチル樹脂）、１００～２００メッシュ上で０．４３ｍｍｏｌ／ｇをロードして行った。Ｆｍｏｃ合成の戦略をＨＢＴＵ／ＤＩＰＥＡ活性化とともに適用した。１４位にＦｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨおよび１位にＢｏｃ－Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨを固相合成プロトコールにおいて使用した。Ｍｍｔ基を、方法に記載する通りに樹脂上のペプチドから切断した。この後、ＤＩＰＥＡを塩基として用いて、Ｐａｌｍ－ｇＧｌｕ－ｇＧｌｕ－ＯＳｕを、遊離したアミノ基にカップリングさせた。ペプチドを、Ｋｉｎｇのカクテル（Ｄ．Ｓ．Ｋｉｎｇ、Ｃ．Ｇ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｇ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．１９９０年、３６巻、２５５～２６６頁）で樹脂から切断した。粗製生成物を、アセトニトリル／水勾配（両方とも０．１％ＴＦＡを含むバッファー）を用いてＷａｔｅｒｓカラム（Ｓｕｎｆｉｒｅ Ｐｒｅｐ Ｃ１８ ＯＢＤ ５μｍ ５０×１５０ｍｍ）上の分取ＨＰＬＣによって精製した。精製したペプチドをＬＣＭＳによって分析した（方法Ｂ）。

保持時間９．８２８分のピークのもとに見出された質量シグナルの逆重畳積分により、

ペプチドの質量は４８９４．６３であることが明らかになり、これは予想値である４８９４．６４と一致する。

【０２２６】

類似の方法で、表３にリストする他のペプチドを合成し、特性を決定した。

【０２２７】

【表４】

表3: 合成したペプチドのリストおよび算出分子量対実測分子量の比較

配列番号	算出質量	実測質量	モノアイソトピック質量または平均質量	保持時間(分)
6	**4839.7**	4839.7	モノアイソトピック	9.824
7	**4853.7**	4853.7	モノアイソトピック	9.935
8	**4880.6**	4880.6	モノアイソトピック	9.585
9	**4840.6**	4840.6	モノアイソトピック	10.471
10	**4854.6**	4854.7	モノアイソトピック	10.64
11	**4894.6**	4849.6	モノアイソトピック	9.828
12	**4879.7**	4879.7	モノアイソトピック	9.490
13	**4893.7**	4893.7	モノアイソトピック	9.690
14	**4710.6**	4710.7	モノアイソトピック	9.435
15	**4738.7**	4783.7	モノアイソトピック	10.528
16	**5024.7**	5024.7	モノアイソトピック	9.137
17	**5038.8**	5038.8	モノアイソトピック	9.286
18	**5025.7**	5025.7	モノアイソトピック	9.573
19	**5039.7**	5039.7	モノアイソトピック	9.715
20	**5041.8**	5040.8	平均	8.996
21	**5055.8**	5055.0	平均	9.102
22	**5042.8**	5041.6	平均	9.254
23	**5056.8**	5055.6	平均	9.340

【実施例４】

【０２２８】

安定性

ペプチド試料を化学的安定性緩衝系Ａ中で調整し、方法に記載しているように化学的安定性を評価した。結果を表４に示す。

【０２２９】

【表５】

表4: 安定性

配列番号	PH4.5における化学的安定性 [28日間40℃での相対的純度低下] (%)
6	6.9
7	6.8
8	7.6
9	8.7
10	7.4
11	7.2
12	5.4
13	4.5
14	5.5
15	5.6
17	6.4
19	6.0
23	9.6

【実施例５】

【０２３０】

溶解性

ペプチド試料を溶解性緩衝系Ａ中で調整し、方法に記載しているように溶解性を評価した。結果を表５に示す。

【０２３１】

【表６】

表5: 溶解性

配列番号	PH4.5における溶解性[mg/ml]
6	>9.6
7	>9.9
8	>10
10	>10.1
11	>9.9
12	>9.3
13	>9.3
14	>9.3
15	>8.9
17	>9.2
19	>9.2
23	>10.4

【実施例６】

【０２３２】

ＤＬＳ相互作用パラメーターによって評価される安定性

ＤＬＳ相互作用パラメーターk_Dの代替として、ペプチド試料の流体力学的半径R_hを、方法に記載しているようなＤＬＳ方法Ｃを使用して、ＤＬＳ緩衝系Ａ中の異なるペプチド濃度（１ｍｇ／ｍｌおよび５ｍｇ／ｍｌ）で決定した。結果を表６に示す。

【０２３３】

【表７】

表 6: 1mg/ml および 5mg/ml のペプチド濃度における流体力学的半径 R_h。
より高いペプチド濃度における R_h の減少は、反発的粒子間相互作用による
より高い物理的安定性を表す

配列番号	R_{h1} [nm] c = 1mg/ml	R_{h5} [nm] c = 5mg/ml	デルタ R_h [nm] = R_{h5} - R_{h1}
6	2.3	1.8	-0.5
7	2.8	2.4	-0.3
13	2.8	2.5	-0.3
14	2.7	2.4	-0.2
15	2.7	2.6	-0.2
17	2.9	2.4	-0.5
19	3.1	3.0	-0.1
23	2.8	2.7	-0.1

【実施例７】

【０２３４】

安定性をＴｈＴアッセイにおいて評価した。

ペプチド試料のチオフラビンＴ（ＴｈＴ）アッセイにおける時間単位での遅滞時間を、方法に記載しているように、Ｔｈｔ緩衝系Ａ中で決定した。結果を表７に示す。

【０２３５】

【表８】

表 7: チオフラビン T(ThT)アッセイにおける時間単位での遅滞時間

配列番号	PH4.5でのFIにおける上昇	上昇までの遅滞時間[時間]
6	なし	>45
7	なし	>45
8	なし	>45
9	なし	>45
10	なし	>45
11	なし	>45
12	なし	>45
13	なし	>45
16	なし	>45
17	なし	>45
18	なし	>45
19	なし	>45
20	なし	>45
21	なし	>45
22	なし	>45
23	なし	>45

【実施例８】

【０２３６】

ヒトＧＬＰ－１、ＧＩＰ、グルカゴンおよびＧＩＰ受容体に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏのデータ

ＧＬＰ－１、グルカゴン、およびＧＩＰ受容体でのペプチド化合物の作用強度を、ヒトグルカゴン受容体（ｈグルカゴン　Ｒ）、ヒトＧＩＰ受容体（ｈＧＩＰ－Ｒ）、またはヒトＧＬＰ－１受容体（ｈＧＬＰ－１　Ｒ）を発現する細胞を、「方法」に記載した通りに、濃度を増大させながら列挙する化合物に曝露し、形成したｃＡＭＰを測定することによって測定した。

【０２３７】

結果を以下の表８に示す：

【０２３８】

【表９】

表 8. ヒト GLP-1、グルカゴンおよび GIP 受容体におけるエキセンジン-4 誘導体の(pM で示す)EC50 値

配列番号	EC50 hGLP-1R	EC50 hグルカゴン R	EC50 hGIP R
6	2.8	16.4	7.9
7	4.0	21.8	14.2
8	2.2	32.6	5.6
9	2.6	24.7	5.6
10	2.4	26.1	5.4
11	2.3	22.4	3.5
12	2.7	22.0	15.8
13	3.8	25.8	20.4
14	5.7	31.6	18.2
15	5.7	15.6	26.1
16	1.3	18.6	7.5
17	1.8	22.0	11.4
18	1.7	46.6	5.6
19	1.9	52.2	7.9
20	2.4	44.0	12.7
21	4.2	69.9	24.6
22	2.1	108.0	6.0
23	1.0	64.3	2.0

【実施例９】

【０２３９】

食餌誘発性肥満（ＤＩＯ）Ｃ５７ＢＬ／６ＮＨｓｄ雌マウスにおける、血中グルコースおよび体重に対する、皮下処置後の配列番号６および配列番号７の急性および慢性効果

痩せ型および食餌誘発性肥満の、２５～２６週齢Ｃ５７ＢＬ／６ＮＨｓｄ雌マウスを、ＰＢＳ、配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇのｓ．ｃ．注射で１日２回、２８日間処置した。朝の投与は午前０６：００から０７：３０の間に、午後の投与は午後２：００から３：３０の間に開始および完了した。適用した量は５ｍｌ／ｋｇであって、各個体の最新の体重記録に合うように用量を調整した。

【０２４０】

１）グルコースプロファイル

実験の間、動物に水および餌を自由に摂取させた。投与フェーズの１日目に、ＰＢＳ－ビヒクル、配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇの１回目のｓ．ｃ．投与前の０時間、ならびに投与後の１、２、３、４、６、および２４時間に、尾の切断を介して血液約５μＬを採取した。１回目の投与の８時間後、動物にＰＢＳ－ビヒクル、配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇの２回目のｓ．ｃ．投与を行った。血中グルコースプロファイルの２４時間の血液採取は、２日目の投与前に行った。Ａｖｉｖａグルコメーターを使用して、グルコース測定を全血において同じもの２つずつまたは３つずつで行った。

【０２４１】

配列番号６　３０μｇ／ｋｇおよび配列番号７　３０μｇ／ｋｇはともに、２４時間の血中グルコースプロファイルの間、ＤＩＯ対照マウスにおいて観察された濃度を下回る、血中グルコース濃度における同程度の低下を媒介した（図２）。

【０２４２】

２）体重

体重を毎日決定した。投与フェーズにおいて、ＰＢＳ－ビヒクル、配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇのいずれかのｓ．ｃ．注射でマウスを１日

２回処置した。
【０２４３】
配列番号６、または配列番号７での慢性的な１日２回の処置は、投与フェーズの２８日以内に、ＤＩＯ－ビヒクル群の動物とは対照的に体重減少をもたらした（図３）。配列番号６または配列番号７　３０μｇ／ｋｇでのＤＩＯ動物の慢性的な処置は、ＤＩＯ－ビヒクル群と比べて、体重における統計学的に有意な減少を誘導した（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図４、表９）。
【０２４４】
３）総体脂肪量
核磁気共鳴（ＱＮＭＲ）により、投与前フェーズで１回、および投与フェーズの２６日目に１回、毎日総体脂肪量を決定した。投与フェーズにおいて、ＰＢＳ－ビヒクル、配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇのいずれかのｓ．ｃ．注射でマウスを１日２回処置した。
【０２４５】
配列番号６および配列番号７での慢性的な１日２回の処置は、２８日以内に、ＤＩＯ－ビヒクル群と比べて、総体脂肪量における統計学的に有意な減少をもたらした（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図５、表９）。
【０２４６】
４）最終肝臓重量
２８日目に、朝の投与の４時間後にマウスを安楽死させて肝臓を採取した。
【０２４７】
配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇでの１日２回の慢性的なＤＩＯ動物の処置は、ビヒクルで処置したＤＩＯ動物と比べて、投与フェーズの２８日目の肝臓重量の統計学的に有意な減少をもたらした（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図６、表９）。
【０２４８】
５）最終血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＡＴ）濃度
２８日目、朝の投与の４時間後に、麻酔した非空腹時のマウスから眼窩採血によって血液を採取した。
【０２４９】
配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇでの１日２回の慢性的なＤＩＯ動物の処置は、ビヒクルで処置したＤＩＯ動物と比べて、投与フェーズの２８日目の血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度の統計学的に有意な低下をもたらし、肝機能の改善が示唆された（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図７、表９）。
【０２５０】
６）最終血漿中総コレステロール
２８日目、朝の投与の４時間後に、麻酔した非空腹時のマウスから眼窩採血によって血液を採取した。
【０２５１】
配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇでの１日２回の慢性的なＤＩＯ動物の処置は、ビヒクルで処置したＤＩＯ動物と比べて、血漿中総コレステロール濃度における統計学的に有意な低下をもたらした（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図８、表９）。
【０２５２】
７）最終血漿中インスリン
２８日目、朝の投与の４時間後に、麻酔した非空腹時のマウスから眼窩採血によって血液を採取した。
【０２５３】
配列番号６　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号７　３０μｇ／ｋｇでの１日２回の慢性

的なＤＩＯ動物の処置は、ビヒクルで処置したＤＩＯ動物と比べて、血漿中インスリン濃度における統計学的に有意な低下をもたらし、高脂肪食誘発性のインスリン抵抗性の改善が示唆された（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図９、表９）。

【０２５４】

８）統計分析

データを平均±ＳＥＭとして示している。Ｓｉｇｍａｐｌｏｔ１２．５を用いて統計分析を行った。一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定を、全ての群（示したようにｎ＝７～８／群）のペアワイズ多重比較に用いた。２つの群の平均値における差異が０．０５よりも大きいときには、それらが統計学的に有意に異なると考えた。痩せ型－ビヒクル群データを図面において示しており、これは、非肥満状態についての参照データセットとしての役割を果たす。

【０２５５】

【表１０】

表 9. 食餌を与えた食餌誘発性肥満(DIO)C57BL/6 雌マウスにおける、配列番号 6 および配列番号 7 での 28 日間の qd 投与試験によって生じる効果。データは、平均±SEM である。一元配置 ANOVA および Tukey 検定、DIO-ビヒクルの n=7 を除いて n=8/群。

例 投与	DIO-ビヒクル 1日2回 PBS	配列番号6 1日2回 30μg/kg	配列番号7 1日2回 30μg/kg
体重変化(g)	4.65 ± 0.33	- 5.36 ± 0.36 P<0.001対DIO-ビヒクル	- 5.58 ± 0.60 P<0.001 対DIO-ビヒクル
総体脂肪量変化(g)	3.37 ± 0.36	-4.33 ± 0.42 P<0.001 対DIO-ビヒクル	-4.46 ± 0.50 P<0.001 対DIO-ビヒクル
最終肝臓重量(g)	+1.94 ± 0.11	+1.16 ± 0.04 P<0.001対DIO-ビヒクル	+1.14 ± 0.04 P<0.001対DIO-ビヒクル
最終血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ(U/L)	+155.25 ± 13.46	+62.25 ± 9.79 P<0.001対DIO-ビヒクル	+47.63 ± 6.76 P<0.001対DIO-ビヒクル
最終血漿中総コレステロール(mmol/L)	+2.27 ± 0.09	+5.11 ± 0.12 P<0.001対DIO-ビヒクル	+4.19 ± 0.15 P<0.001対DIO-ビヒクル
最終血漿中インスリン(U/L)	+217.94 ± 51.48	+31.07 ± 5.26 P<0.001対DIO-ビヒクル	+58.04 ± 6.33 P<0.001対DIO-ビヒクル

【実施例１０】

【０２５６】

非空腹時の糖尿病ｄｂ／ｄｂ雌マウスにおける、血中グルコース濃度に対する、皮下処置後の配列番号６および配列番号７の急性効果

雌の１２週齢の健常な痩せ型ＢＫＳ．Ｃｇ－（痩せ型）／ＯｌａＨｓｄまたは糖尿病になりやすい肥満型ＢＫＳ．Ｃｇ－＋Ｌｅｐｒｄｂ／＋Ｌｅｐｒｄｂ／ＯｌａＨｓｄマウスを、ＰＢＳ、配列番号６　３０μｇ／ｋｇまたは配列番号７　３０μｇ／ｋｇのｓ．ｃ．注射で１回処置した。投与は、午前０８：００から１０：００の間に開始および完了した。適用した量は５ｍｌ／ｋｇであって、各個体の最新の体重記録に合うように用量を調整した。糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスはＨｂＡ１ｃおよび体重を一致させた。痩せ型参照群については、ＰＢＳ－ビヒクルのｓ．ｃ．注射で１回処置した。

【０２５７】

１）血中グルコースプロファイル

実験の間、動物に水および餌を自由に摂取させた。投与フェーズの１日目に、他の全ての生存中の活動の前の－３０分および０分に尾の切断を介して血液約５μＬを採取した。０分にマウスにＰＢＳ－ビヒクル、配列番号６または配列番号７　３０μｇ／ｋｇのいずれかのｓ．ｃ．投与を行った。投与後の１５、３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２４０、３６０、および４８０分に、さらなる血液試料を採取した。ＡｌｐｈａＴＲＡＫグルコメーターを使用して、グルコース測定を全血で行った。２つの測定値のグルコース濃度が２０ｍｇ／ｄＬを超えて異なる場合、３つ目の値を記録した。血中グルコースについての曲線下面積（ＡＵＣ）を、台形法によって、投与後２４時間の期間について算出した。

【０２５８】

配列番号６または配列番号７で処置した動物は、血中グルコース濃度における同程度の急性低下を示し、投与後約８時間で最低レベルに到達した（図１０）。投与２４時間後、全ての処置した動物の平均血中グルコース濃度は、ベースラインまたはその近くにあった（図１０）。配列番号６　３０μｇ／ｋｇまたは配列番号７　３０μｇ／ｋｇでの糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスの単回処置は、糖尿病－ビヒクル群と比べて、血中グルコースＡＵＣにおける統計学的に有意な減少をもたらした（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図１１、表１０）。

【０２５９】

２）統計分析

データを平均±ＳＥＭとして示している。Ｓｉｇｍａｐｌｏｔ１２．５を用いて統計分析を行った。一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定を、全ての群（ｎ＝８／群）のペアワイズ多重比較に用いた。２つの群の平均値における差異が０．０５よりも大きいときには、それらが統計学的に有意に異なると考えた。非肥満状態についての参照データセットとしての役割を果たす痩せ型－ビヒクル群のデータを図に示す。

【０２６０】

【表１１】

表 10. 食餌を与えた db/db 雌マウスにおける単回用量の配列番号 6 または配列番号 7 によって生じる効果。データは、平均±SEM である。一元配置 ANOVA および Tukey 検定。n=8/群。

例 投与	糖尿病-ビヒクル 1回 PBS	配列番号6 1回 30μg/kg	配列番号7 1回 30μg/kg
血漿中グルコース曲線下面積(24hでのmmol/L)	+705.52 ± 49.31	+430.70 ± 26.41 P<0.001対糖尿病-ビヒクル	+461.54 ± 39.43 P<0.001対糖尿病-ビヒクル

【実施例１１】

【０２６１】

食餌誘発性肥満（ＤＩＯ）Ｃ５７ＢＬ／６ＮＨｓｄ雌マウスにおける、血中グルコースおよび体重に対する、皮下処置後の配列番号８、配列番号９および配列番号１０の急性および慢性効果

痩せ型および食餌誘発性肥満の、２５～２６週齢Ｃ５７ＢＬ／６ＮＨｓｄ雌マウスを、ＰＢＳ、配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇのｓ．ｃ．注射で１日２回、２８日間処置した。朝の投与は午前０６：００から０７：３０の間に、午後の投与は午後１４：００から１５：３０の間に開始および完了した。適用した量は５ｍｌ／ｋｇであって、各個体の最新の体重記録に合うように用量を調整した。

【０２６２】

１）グルコースプロファイル

実験の間、動物に水および餌を自由に摂取させた。投与フェーズの１日目に、ＰＢＳ－ビヒクル、配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇの１回目のｓ．ｃ．投与前の０時間、ならびに投与後の１、２、３、４、６、および２４時間に、尾の切断を介して血液約５μＬを採取した。１回目の投与の８時間後、動物にＰＢＳ－ビヒクル、配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇの２回目のｓ．ｃ．投与を行った。血中グルコースプロファイルの２４時間の血液採取は、２日目の投与前に行った。Ａｖｉｖａグルコメーターを使用して、グルコース測定を全血において同じもの２つずつまたは３つずつで行った。

【０２６３】

配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇは、２４時間の血中グルコースプロファイルの間、ＤＩＯ対照マウスにおいて観察された濃度を下回る、血中グルコース濃度における同程度の低下を媒介した（図１２）。

【０２６４】

２）体重

体重を毎日決定した。投与フェーズにおいて、ＰＢＳ－ビヒクル、配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇのいずれかのｓ．ｃ．注射でマウスを１日２回処置した。

【０２６５】

配列番号８、配列番号９、または配列番号１０での慢性的な１日２回の処置は、投与フェーズの２８日以内に、ＤＩＯ－ビヒクル群の動物とは対照的に体重減少をもたらした（図１３）。配列番号８、配列番号９、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇでのＤＩＯ動物の慢性的な処置は、ＤＩＯ－ビヒクル群と比べて、体重における統計学的に有意な減少を誘導した（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図１４、表１１）。

【０２６６】

３）総体脂肪量

核磁気共鳴（ＱＮＭＲ）により、投与前フェーズで１回、および投与フェーズの２６日目に１回、毎日総体脂肪量を決定した。投与フェーズにおいて、ＰＢＳ－ビヒクル、配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇのいずれかのｓ．ｃ．注射でマウスを１日２回処置した。

【０２６７】

配列番号８、配列番号９、または配列番号での慢性的な１日２回の処置は、２８日以内に、ＤＩＯ－ビヒクル群と比べて、総体脂肪量における統計学的に有意な減少をもたらした（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図１５、表１１）。

【０２６８】

４）最終肝臓重量

２８日目に、朝の投与の４時間後にマウスを安楽死させて肝臓を採取した。

【０２６９】

配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇでの１日２回の慢性的なＤＩＯ動物の処置は、ビヒクルで処置したＤＩＯ動物と比べて、投与フェーズの２８日目の肝臓重量の統計学的に有意な減少をもたらした（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図１６、表１１）。

【０２７０】

５）最終血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度

２８日目、朝の投与の４時間後に、麻酔した非空腹時のマウスから眼窩採血によって血液を採取した。

【０２７１】

配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇでの１日２回の慢性的なＤＩＯ動物の処置は、ビヒクルで処置したＤＩＯ動物と比べて、投与フェーズの２８日目の血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度の統計学的に有意な低下をもたらし、肝機能の改善が示唆された（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図１７、表１１）。

【０２７２】

６）最終血漿中総コレステロール

２８日目、朝の投与の４時間後に、麻酔した非空腹時のマウスから眼窩採血によって血液を採取した。

【０２７３】

配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇでの１日２回の慢性的なＤＩＯ動物の処置は、ビヒクルで処置したＤＩＯ動物と比べて、血漿中総コレステロール濃度における統計学的に有意な低下をもたらした（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図１８、表１１）。

【０２７４】

７）最終血漿中インスリン

２８日目、朝の投与の４時間後に、麻酔した非空腹時のマウスから眼窩採血によって血液を採取した。

【０２７５】

配列番号８　３０μｇ／ｋｇ、配列番号９　３０μｇ／ｋｇ、または配列番号１０　３０μｇ／ｋｇでの１日２回の慢性的なＤＩＯ動物の処置は、ビヒクルで処置したＤＩＯ動物と比べて、血漿中インスリン濃度における統計学的に有意な低下をもたらし、高脂肪食誘発性のインスリン抵抗性の改善が示唆された（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図１９、表１１）。

【０２７６】

８）統計分析

データを平均±ＳＥＭとして示している。Ｓｉｇｍａｐｌｏｔ１２．５を用いて統計分析を行った。一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定を、全ての群（示したようにｎ＝７～８／群）のペアワイズ多重比較に用いた。２つの群の平均値における差異が０．０５よりも大きいときには、それらが統計学的に有意に異なると考えた。非肥満状態についての参照データセットとしての役割を果たす痩せ型－ビヒクル群のデータを図に示す。

【０２７７】

【表１２】

表 11. 食餌を与えた食餌誘発性肥満(DIO)C57BL/6 雌マウスにおける、配列番号 8、配列番号 9、または配列番号 10 での 28 日間の qd 投与試験によって生じる効果。データは、平均±SEM である。一元配置 ANOVA および Tukey 検定、n=8/群。

例 投与	DIO-ビヒクル 1日2回 PBS	配列番号8 1日2回 30μg/kg	配列番号9 1日2回 30μg/kg	配列番号10 1日2回 30μg/kg
体重変化(g)	5.10 ± 0.49	- 8.23 ± 0.62 P<0.001対DIO-ビヒクル	- 10.03 ± 2.33 P<0.001対DIO-ビヒクル	- 7.14 ± 0.64 P<0.001対DIO-ビヒクル
総体脂肪量変化(g)	2.51 ± 0.65	-6.65 ± 0.38 P<0.001対DIO-ビヒクル	-5.29 ± 2.32 P<0.001対DIO-ビヒクル	-6.48 ± 0.90 P<0.001対DIO-ビヒクル
最終肝臓重量(g)	+1.80 ± 0.07	+1.08 ± 0.03 P<0.001対DIO-ビヒクル	+1.11 ± 0.06 P<0.001対DIO-ビヒクル	+1.07 ± 0.04 P<0.001対DIO-ビヒクル
最終血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ(U/L)	207.50 ± 14.98	+68.88 ± 15.05 P<0.001対DIO-ビヒクル	+57.13 ± 7.33 P<0.001対DIO-ビヒクル	+56.75 ± 4.65 P<0.001対DIO-ビヒクル
最終血漿中総コレステロール(mmol/L)	+5.45 ± 0.15	+4.36 ± 0.08 P<0.001対DIO-ビヒクル	+3.97 ± 0.12 P<0.001対DIO-ビヒクル	+4.28 ± 0.15 P<0.001対DIO-ビヒクル
最終血漿中インスリン(U/L)	+145.08 ± 29.15	+39.70 ± 4.25 P<0.001対DIO-ビヒクル	+38.95 ± 7.30 P<0.001対DIO-ビヒクル	+35.81 ± 2.79 P<0.001対DIO-ビヒクル

【実施例１２】

【０２７８】

非空腹時の糖尿病ｄｂ／ｄｂ雌マウスにおける、血中グルコース濃度に対する、皮下処置後の配列番号１３の急性効果

雌の１２週齢の健常な痩せ型ＢＫＳ．Ｃｇ－（痩せ型）／ＯｌａＨｓｄまたは糖尿病になりやすい肥満型ＢＫＳ．Ｃｇ－＋Ｌｅｐｒ^{ｄｂ}／＋Ｌｅｐｒ^{ｄｂ}／ＯｌａＨｓｄマウスを、ＰＢＳまたは配列番号１３　３０μｇ／ｋｇのｓ．ｃ．注射で１回処置した。投与は、午前０８：００から１０：００の間に開始および完了した。適用した量は５ｍｌ／ｋｇであって、各個体の最新の体重記録に合うように用量を調整した。糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスはＨｂＡ１ｃおよび体重を一致させた。痩せ型参照群については、ＰＢＳ－ビヒクルのｓ．ｃ．注射で１回処置した。

【０２７９】

１）血中グルコースプロファイル

実験の間、動物に水および餌を自由に摂取させた。投与フェーズの１日目に、他の全ての生存中の活動の前の－３０分および０分に尾の切断を介して血液約５μＬを採取した。０分にマウスにＰＢＳ－ビヒクルまたは配列番号１３　３０μｇ／ｋｇのいずれかのｓ．ｃ．投与を行った。投与後の１５、３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０、２４０、３６０、および４８０分に、さらなる血液試料を採取した。ＡｌｐｈａＴＲＡＫグルコメーターを使用して、グルコース測定を全血で行った。２つの測定値のグルコース濃度が２０ｍｇ／ｄＬを超えて異なる場合、３つ目の値を記録した。血中グルコースについての

曲線下面積（ＡＵＣ）を、台形法によって、投与後２４時間の期間について算出した。

【０２８０】

配列番号１３で処置した動物は、血中グルコース濃度における急性低下を示し、投与後約８時間で最低レベルに到達した（図２０）。投与２４時間後、配列番号１３で処置した動物の平均血中グルコース濃度は、ベースラインの近くにあった（図２０）。配列番号１３　３０μｇ／ｋｇでの糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスの単回処置は、糖尿病－ビヒクル群と比べて、血中グルコースＡＵＣにおける統計学的に有意な減少をもたらした（一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定、図２１、表１２）。

【０２８１】

２）統計分析

データを平均±ＳＥＭとして示している。Ｓｉｇｍａｐｌｏｔ１２．５を用いて統計分析を行った。一元配置ＡＮＯＶＡおよびＴｕｋｅｙ検定を、全ての群（ｎ＝８／群）のペアワイズ多重比較に用いた。２つの群の平均値における差異が０．０５よりも大きいときには、それらが統計学的に有意に異なると考えた。非肥満状態についての参照データセットとしての役割を果たす痩せ型－ビヒクル群のデータを図に示す。

【０２８２】

【表１３】

表 12. 食餌を与えた db/db 雌マウスにおける単回用量の配列番号 13 によって生じる効果。データは、平均±SEM である。一元配置 ANOVA および Tukey 検定。n=8/群。

例 投与	糖尿病-ビヒクル 1回 PBS	配列番号13 1回 30 μg/kg
血漿中グルコース曲線下面積 (24hでのmmol/L)	+646.38 ± 45.04	+458.34 ± 27.11 P<0.001対糖尿病-ビヒクル

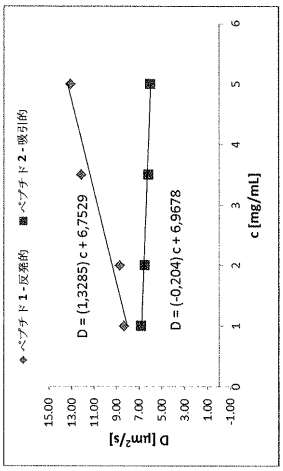
【０２８３】

【表１４】

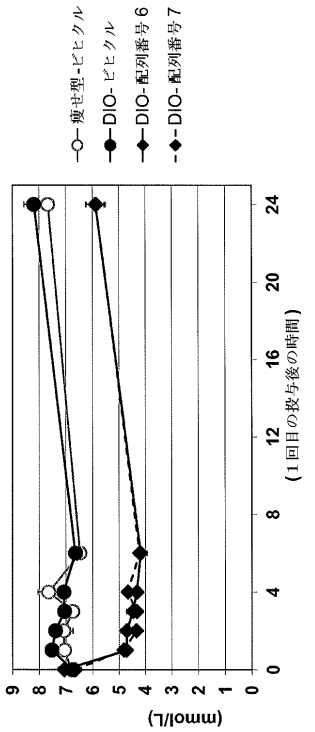
表13. 配列

配列番号	配列
1	H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-K-G-R-NH2
2	H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K(gGlu-Palm)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-OH
3	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-OH
4	H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH2
5	Y-A-E-G-T-F-I-S-D-Y-S-I-A-M-D-K-I-H-Q-Q-D-F-V-N-W-L-L-A-Q-K-G-K-K-N-D-W-K-H-N-I-T-Q-OH
6	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
7	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
8	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
9	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
10	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
11	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
12	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
13	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
14	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
15	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-Stea]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
16	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-AEEA-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
17	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-AEEA-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
18	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-AEEA-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
19	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-AEEA-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
20	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-AEEA-gAAA-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
21	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-AEEA-gAAA-Palm]-E-K-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
22	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-AEEA-gAAA-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2
23	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-AEEA-gAAA-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH2

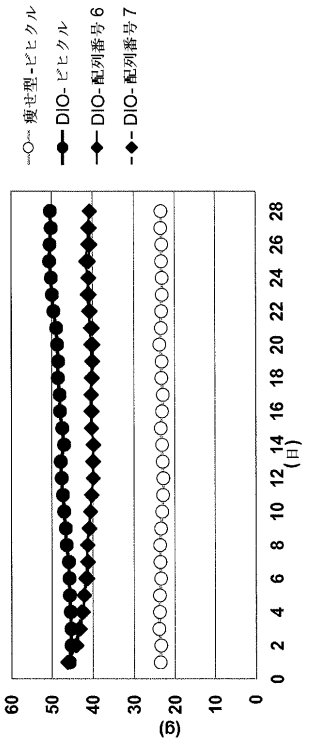
【図１】


◆ ベプチド１-反発的
■ ベプチド２-吸引的
D = (1,3285) c + 6,7529
D = (-0,204) c + 6,9678
D [µm²/s]
c [mg/mL]

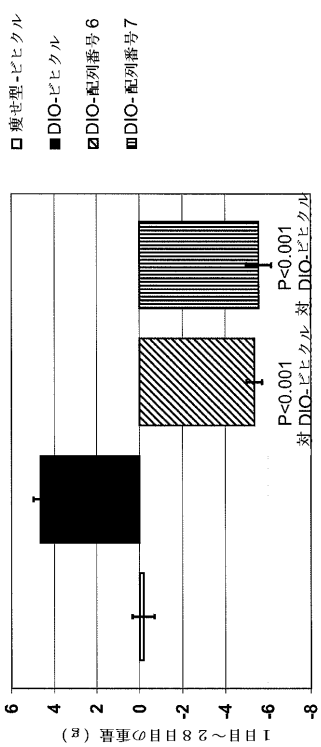
【図２】


痩せ型-ビヒクル
DIO-ビヒクル
DIO-配列番号６
DIO-配列番号７
(mmol/L)
(１回目の投与後の時間)

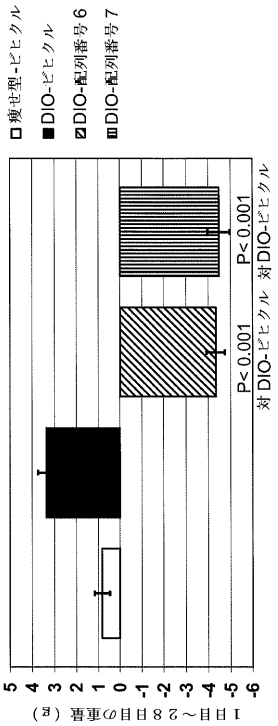
【図３】


痩せ型-ビヒクル
DIO-ビヒクル
DIO-配列番号６
DIO-配列番号７
(g)
(日)

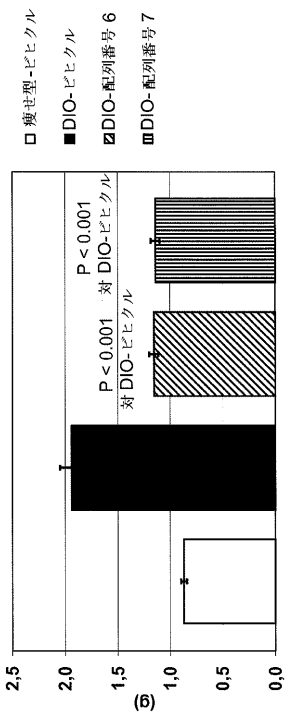
【図４】


痩せ型-ビヒクル
DIO-ビヒクル
DIO-配列番号６
DIO-配列番号７
１日目～２８日目の重量（ｇ）
P<0.001
対 DIO-ビヒクル
P<0.001
対 DIO-ビヒクル

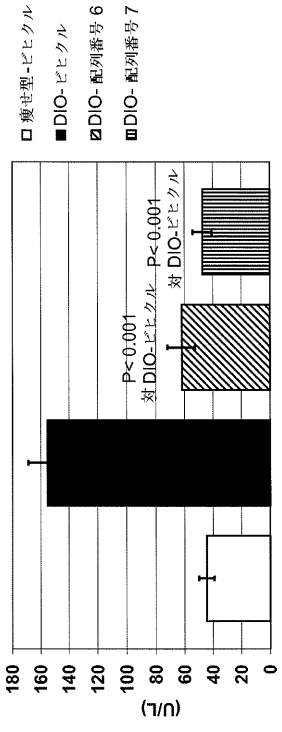
【図５】


□痩せ型-ピヒクル
■DIO-ピヒクル
▨DIO-配列番号６
▥DIO-配列番号７
１日目～２８日目の重量（ｇ）
P< 0.001
対 DIO-ピヒクル
P< 0.001
対 DIO-ピヒクル

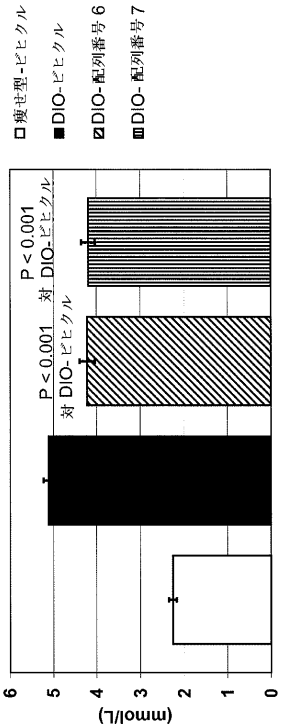
【図６】


□痩せ型-ピヒクル
■DIO-ピヒクル
▨DIO-配列番号６
▥DIO-配列番号７
P < 0.001
対 DIO-ピヒクル
P < 0.001
対 DIO-ピヒクル
(g)

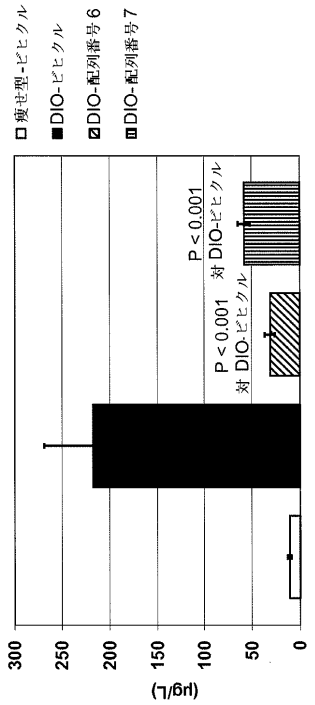
【図７】


□痩せ型-ピヒクル
■DIO-ピヒクル
▨DIO-配列番号６
▥DIO-配列番号７
P< 0.001
対 DIO-ピヒクル
P< 0.001
対 DIO-ピヒクル
(U/L)

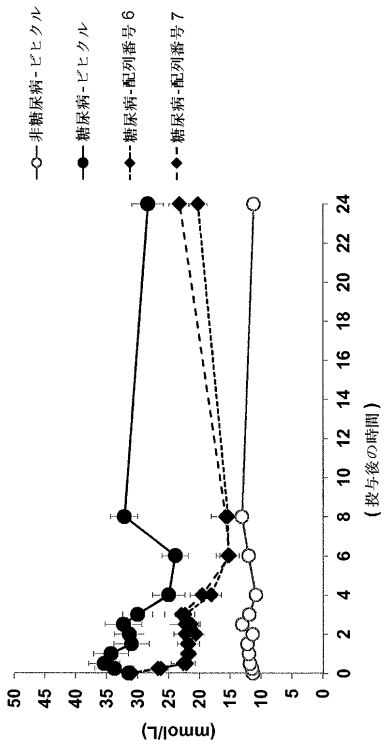
【図８】


□痩せ型-ピヒクル
■DIO-ピヒクル
▨DIO-配列番号６
▥DIO-配列番号７
P < 0.001
対 DIO-ピヒクル
P < 0.001
対 DIO-ピヒクル
(mmol/L)

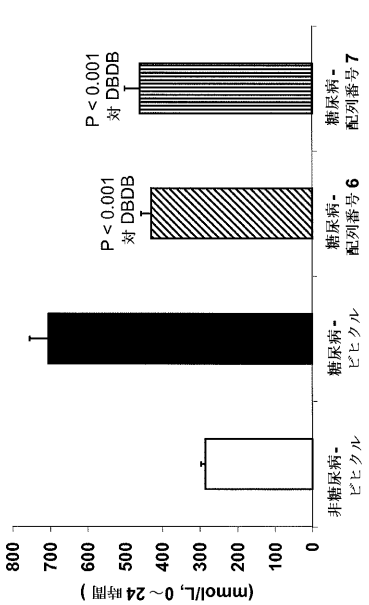
【図９】



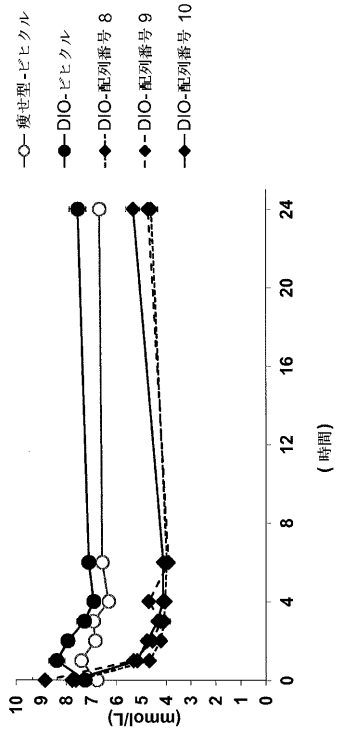
【図１０】



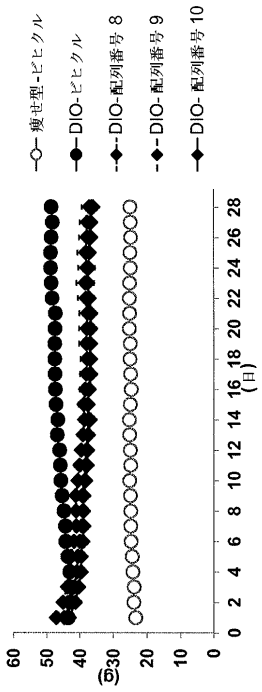
【図１１】



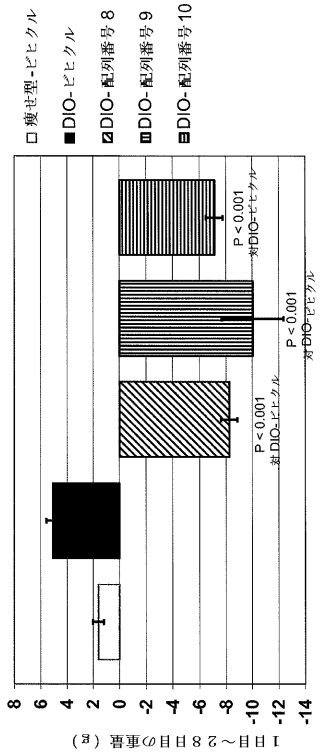
【図１２】



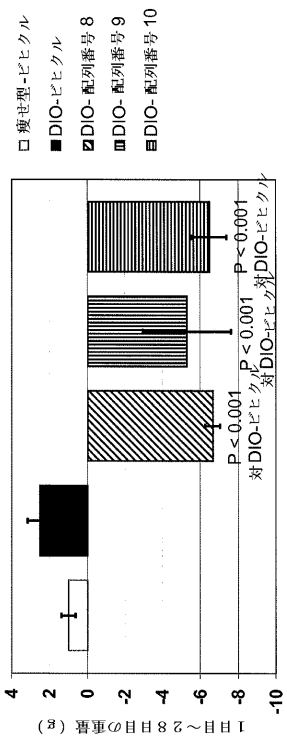
【図１３】



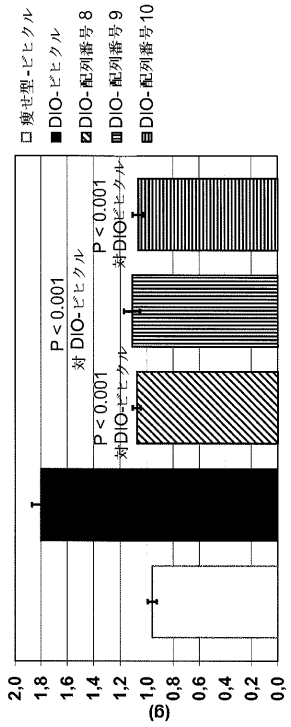
【図１４】



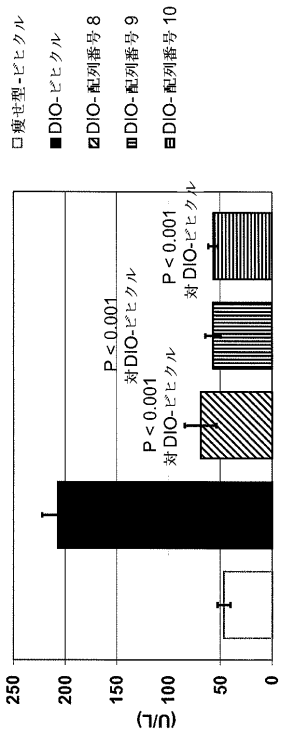
【図１５】



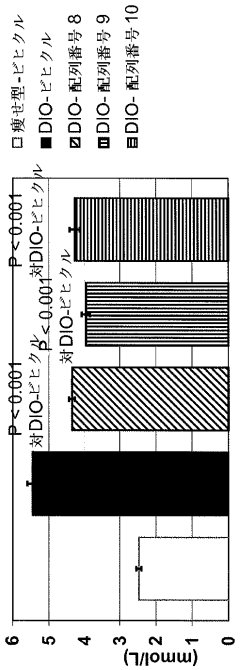
【図１６】



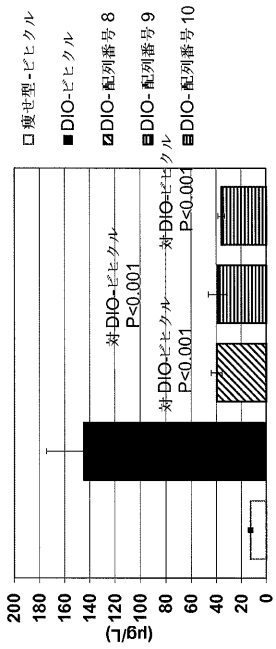
【図１７】



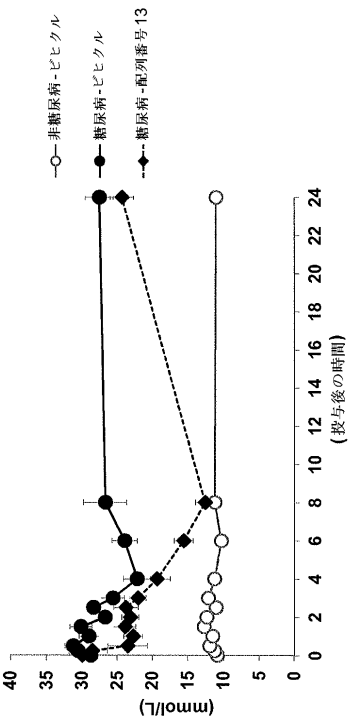
【図１８】



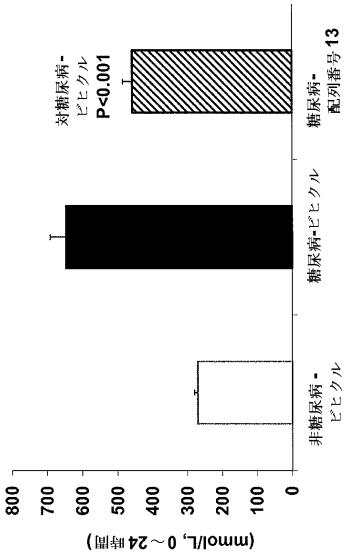
【図１９】



【図２０】



【図２１】



【配列表】
2019536795000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/081126

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/26 C07K14/575 C07K14/605
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/155141 A1 (SANOFI SA [FR]) 15 October 2015 (2015-10-15) cited in the application abstract; claims; tables 5,6	1-37
A	WO 2014/096145 A1 (SANOFI SA [FR]) 26 June 2014 (2014-06-26) cited in the application abstract; claims; tables 6,7	1-37
A	WO 2013/192129 A1 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]) 27 December 2013 (2013-12-27) cited in the application abstract; claims; examples 3-6; table 1	1-37

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 February 2018	02/03/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Pilat, Daniel

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/081126

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/067716 A1 (ZEALAND PHARMA AS [DK]; JUST RASMUS [DK]; RIBER DITTE [DK]; SHELTON AN) 14 May 2015 (2015-05-14) cited in the application abstract; claims	1-37
A,P	WO 2016/198624 A1 (SANOFI SA [FR]) 15 December 2016 (2016-12-15) abstract; claims	1-37

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/081126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015155141 A1	15-10-2015	AR 099977 A1	31-08-2016
		AU 2015243612 A1	13-10-2016
		CA 2944683 A1	15-10-2015
		CN 106414488 A	15-02-2017
		EP 3129397 A1	15-02-2017
		JP 2017512800 A	25-05-2017
		KR 20160143727 A	14-12-2016
		SG 11201607522Y A	28-10-2016
		TW 201625669 A	16-07-2016
		US 2015322129 A1	12-11-2015
		WO 2015155141 A1	15-10-2015
WO 2014096145 A1	26-06-2014	AR 094178 A1	15-07-2015
		AR 094180 A1	15-07-2015
		AR 094181 A1	15-07-2015
		AR 099912 A1	31-08-2016
		AR 105816 A2	15-11-2017
		AU 2013360721 A1	09-07-2015
		AU 2013366690 A1	09-07-2015
		AU 2013366691 A1	09-07-2015
		AU 2013366692 A1	09-07-2015
		CA 2894765 A1	26-06-2014
		CA 2895156 A1	26-06-2014
		CA 2895755 A1	26-06-2014
		CA 2895875 A1	26-06-2014
		CL 2015001751 A1	21-09-2015
		CN 104870009 A	26-08-2015
		CN 104902918 A	09-09-2015
		CN 104902919 A	09-09-2015
		CN 104902920 A	09-09-2015
		CR 20150358 A	16-09-2015
		DK 2934568 T3	22-01-2018
		DO P2015000156 A	31-08-2015
		EA 201591174 A1	31-03-2016
		EP 2934566 A1	28-10-2015
		EP 2934567 A1	28-10-2015
		EP 2934568 A1	28-10-2015
		EP 2934569 A1	28-10-2015
		HK 1211231 A1	20-05-2016
		HK 1211232 A1	20-05-2016
		HK 1211233 A1	20-05-2016
		HK 1213483 A1	08-07-2016
		JP 2016503770 A	08-02-2016
		JP 2016503771 A	08-02-2016
		JP 2016503772 A	08-02-2016
		JP 2016506401 A	03-03-2016
		KR 20150096398 A	24-08-2015
		KR 20150096433 A	24-08-2015
		KR 20150096684 A	25-08-2015
		KR 20150099548 A	31-08-2015
		MA 38276 A1	30-06-2017
		PE 12392015 A1	08-09-2015
		PH 12015501291 A1	24-08-2015
		RU 2015129696 A	27-01-2017
		RU 2015129788 A	30-01-2017
		RU 2015129815 A	27-01-2017
		SG 10201705097P A	28-07-2017
		SG 11201503524P A	29-06-2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/081126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SG 11201503526U A	29-06-2015
		SG 11201503576X A	29-06-2015
		SG 11201504215P A	29-06-2015
		TN 2015000283 A1	03-10-2016
		TW 201429985 A	01-08-2014
		TW 201441251 A	01-11-2014
		TW 201441252 A	01-11-2014
		TW 201443080 A	16-11-2014
		US 2014206608 A1	24-07-2014
		US 2014206609 A1	24-07-2014
		US 2014213513 A1	31-07-2014
		US 2014221281 A1	07-08-2014
		US 2017216406 A1	03-08-2017
		UY 35231 A	31-07-2014
		UY 35232 A	31-07-2014
		UY 35233 A	31-07-2014
		UY 35234 A	31-07-2014
		WO 2014096145 A1	26-06-2014
		WO 2014096148 A1	26-06-2014
		WO 2014096149 A1	26-06-2014
		WO 2014096150 A1	26-06-2014
		ZA 201503914 B	21-12-2016
WO 2013192129 A1	27-12-2013	AR 091477 A1	04-02-2015
		CA 2877358 A1	27-12-2013
		CN 104583232 A	29-04-2015
		EP 2864351 A1	29-04-2015
		ES 2602486 T3	21-02-2017
		HK 1209764 A1	08-04-2016
		JP 2015521622 A	30-07-2015
		KR 20150023013 A	04-03-2015
		RU 2015101697 A	10-08-2016
		TW 201402598 A	16-01-2014
		US 2014011738 A1	09-01-2014
		WO 2013192129 A1	27-12-2013
WO 2015067716 A1	14-05-2015	AU 2014345570 A1	12-05-2016
		CA 2929107 A1	14-05-2015
		CN 105829339 A	03-08-2016
		EA 201690629 A1	31-10-2016
		EP 3066117 A1	14-09-2016
		JP 2017503474 A	02-02-2017
		KR 20160074008 A	27-06-2016
		US 2016257729 A1	08-09-2016
		WO 2015067716 A1	14-05-2015
WO 2016198624 A1	15-12-2016	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P	*3/06*	*(2006.01)*	A61P	3/06		
A61P	*3/10*	*(2006.01)*	A61P	3/10		
A61P	*9/10*	*(2006.01)*	A61P	9/10	１０１	
A61P	*9/12*	*(2006.01)*	A61P	9/12		
A61P	*5/50*	*(2006.01)*	A61P	5/50		
A61P	*1/16*	*(2006.01)*	A61P	1/16		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	１１１	
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/12		
			C12N	15/12	ZNA	

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

(72)発明者　マルティン・ボッサルト
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　アンドレアス・エヴァース
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　トーシュテン・ハーク
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　カトリン・ローレンツ
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　ディーター・カーデライト
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　ミヒャエル・ワーグナー
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　シュテファーニア・プファイファー－マーレック
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー
(72)発明者　マルティン・ローレンツ
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト・アム・マイン．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー

Ｆターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA17 BA01 BA08 BA19 BA23 CA59 DB35 MA17
MA22 MA23 MA35 MA37 MA43 MA52 MA55 MA59 MA60 MA63
MA66 NA05 NA14 ZA361 ZA362 ZA421 ZA422 ZA451 ZA452 ZA661
ZA662 ZA701 ZA702 ZA751 ZA752 ZC031 ZC032 ZC331 ZC332 ZC351
ZC352

4H045 AA10 AA30 CA40 DA30 EA27 FA74