(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6018129号
(P6018129)

(45)発行日　平成28年11月2日(2016.11.2)　(24)登録日　平成28年10月7日(2016.10.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/605	(2006.01)	C07K	14/605	ZNA
A61K 38/26	(2006.01)	A61K	37/28	
A61P 3/04	(2006.01)	A61P	3/04	
A61P 11/00	(2006.01)	A61P	11/00	
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10	

請求項の数 11　外国語出願　(全 29 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-139114(P2014-139114)
(22)出願日　平成26年7月4日(2014.7.4)
(62)分割の表示　特願2011-540190(P2011-540190)の分割
原出願日　平成20年12月15日(2008.12.15)
(65)公開番号　特開2014-210799(P2014-210799A)
(43)公開日　平成26年11月13日(2014.11.13)
審査請求日　平成26年8月4日(2014.8.4)

(73)特許権者　502453045
ジーランド　ファーマ　アクティーゼルスカブ
デンマーク国，デーコー－２６００　グロストルップ，スメデランド　３６
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺　陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】グルカゴン類似体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式R^1－Ｘ－Ｚ－R^2
{式中、
R^1が、Ｈ、C_{1-4}アルキル、アセチル、ホルミル、ベンゾイル又はトリフルオロアセチルであり；
R^2が、ＯＨ又はNH_2であり；
Ｘが、以下の式（Ｉ）：
Ｈｉｓ－Ｓｅｒ－Ｇｌｎ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ－Ｐｈｅ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｔｙｒ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｔｙｒ－Ｌｅｕ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ａｓｐ－Ｐｈｅ－Ｉｌｅ－Ｇｌｕ－Ｔｒｐ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ－Ａｌａ（配列番号４）
を有するペプチドであるか；又は式（Ｉ）と異なる場合には、以下の：
１６位の残基が：Ｓｅｒであり；
２０位の残基が：Ｇｌｎであり；
２４位の残基が：Ｇｌｎ、Ａｒｇから選択され；及び
２８位の残基が：Ａｒｇであり；
のうちの最大４ヶ所によって式（Ｉ）と異なっているペプチドであり；そして
Ｚが、存在しないか、又は４、５、６又は７個の連続したリジン残基である。}を有する化合物、又は医薬的に許容し得るその塩（但し、該化合物は、

Ｈ－ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＳＡ－ＮＨ$_2$；
Ｈ－ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＳＡ－ＮＨ$_2$；
Ｈ－ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＱＤＦＩＥＷＬＬＳＡ－ＮＨ$_2$；
Ｈ－ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＱＷＬＬＳＡ－ＮＨ$_2$；
Ｈ－ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＱＤＦＩＥＷＬＬＳＡ－ＮＨ$_2$；
Ｈ－ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＲＷＬＬＳＡ－ＮＨ$_2$；
Ｈ－ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＲＡ－ＮＨ$_2$；又は
Ｈ－ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＳＡ－ＯＨ
ではない）。

【請求項２】
前記式（Ｉ）と異なる場合に、前記Ｘが、以下の：
１６位の残基がＳｅｒであり；及び
２０位の残基がＧｌｎであり；
のうちの１又は２ヶ所によって式（Ｉ）と異なっている、請求項１に記載の化合物。

【請求項３】
前記の１６位と２０位、及び／又は２０位と２４位の残基が、塩橋を形成することができる、請求項１～２のいずれか１項に記載の化合物。

【請求項４】
前記Ｘが、以下の残基のセット：
２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ｇｌｕ；
２０‐Ｌｙｓ、２３‐Ｉｌｅ、２４‐Ｇｌｕ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ｇｌｕ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２９‐Ａｌａ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２３‐Ｉｌｅ、２４‐Ｇｌｕ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２３‐Ｉｌｅ、２４‐Ｇｌｕ、２９‐Ａｌａ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ｇｌｕ、２９‐Ａｌａ；
２０‐Ｌｙｓ、２３‐Ｉｌｅ、２４‐Ｇｌｕ、２９‐Ａｌａ；
２７‐Ｌｅｕ、２８‐Ｓｅｒ、２９‐Ａｌａ；
２９‐Ａｌａ；
１６‐Ｓｅｒ；
２０‐Ｇｌｎ；
２４‐Ｇｌｎ；
１６‐Ｓｅｒ、２０‐Ｇｌｎ；
２４‐Ａｒｇ；又は
２８‐Ａｒｇ、
のうちの１つ又は複数を含んでなる、請求項１～３のいずれか１項に記載の化合物。

【請求項５】
前記Ｘが、以下の配列：
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号１３）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＱＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号５）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＱＷＬＬＳＡ（配列番号７）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＱＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号８）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＲＷＬＬＳＡ（配列番号１１）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＲＡ（配列番号１２）；
又は
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号１７）
を有する、請求項１に記載の化合物。

【請求項６】
前記Ｒ^{1}がＨである、請求項１～５のいずれか１項に記載の化合物。

【請求項７】
前記R^2がNH_2である、請求項１～６のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項８】
前記Ｚが存在しない、請求項１～７のいずれか１項に記載の化合物。
【請求項９】
請求項１～８のいずれか１項に記載の化合物を、医薬的に許容し得る担体との混合物の状態で含んでなる医薬組成物。
【請求項１０】
体重増加を予防するためか、体重減少を促進するためか、あるいは病的な肥満、肥満に関係する炎症、肥満に関係する胆嚢疾患及び肥満誘発性睡眠時無呼吸症を含めた過剰体重若しくは肥満により引き起こされた又はそれらに関連する身体状態の処置のため、あるいはインスリン抵抗性、耐糖能異常、２型糖尿病、高血圧症、アテローム形成性脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患又は脳卒中の処置のための医薬の調製における、請求項１～８のいずれか１項に記載の化合物の使用。
【請求項１１】
体重増加を予防するか、体重減少を促進するか、あるいは病的な肥満、肥満に関係する炎症、肥満に関係する胆嚢疾患及び肥満誘発性睡眠時無呼吸症を含めた過剰体重若しくは肥満により引き起こされたか又はそれらに関連する身体状態の処置のためか、あるいはインスリン抵抗性、耐糖能異常、２型糖尿病、高血圧症、アテローム形成性脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患又は脳卒中の処置のための方法における、請求項１～８のいずれか１項に記載の化合物を含む、医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、グルカゴン類似体、並びに例えば、過剰食物摂取、肥満、及び過剰体重の処置におけるそれらの医学的な使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
プレプログルカゴンは、グルカゴン（Ｇｌｕ）、グルカゴン様ペプチド‐１（ＧＬＰ‐１）、グルカゴン様ペプチド‐２（ＧＬＰ‐２）、及びオキシントモジュリン（ＯＸＭ）を含めた多くの構造的に関連したプログルカゴン由来ペプチドを形成するように組織内で別々に処理された１５８個のアミノ酸の前駆体ポリペプチドである。これらの分子は、グルコースの恒常性、インシュリン分泌、胃内容排出及び腸の成長、並びに摂食の調整を含めたさまざまな生理機能にかかわっている。
【０００３】
グルカゴンは、プレプログルカゴンの第５３～８１アミノ酸に相当する、配列Ｈｉｓ‐Ｓｅｒ‐Ｇｌｎ‐Ｇｌｙ‐Ｔｈｒ‐Ｐｈｅ‐Ｔｈｒ‐Ｓｅｒ‐Ａｓｐ‐Ｔｙｒ‐Ｓｅｒ‐Ｌｙｓ‐Ｔｙｒ‐Ｌｅｕ‐Ａｓｐ‐Ｓｅｒ‐Ａｒｇ‐Ａｒｇ‐Ａｌａ‐Ｇｌｎ‐Ａｓｐ‐Ｐｈｅ‐Ｖａｌ‐Ｇｌｎ‐Ｔｒｐ‐Ｌｅｕ‐Ｍｅｔ‐Ａｓｎ‐Ｔｈｒ（配列番号１）を持つ２９個のアミノ酸のペプチドである。オキシントモジュリン（ＯＸＭ）は、配列Ｌｙｓ‐Ａｒｇ‐Ａｓｎ‐Ａｒｇ‐Ａｓｎ‐Ａｓｎ‐Ｉｌｅ‐Ａｌａ（配列番号２）を持つ「介在ペプチド１」若しくはＩＰ‐１と呼ばれるオクタペプチド・カルボキシ末端伸長（プレプログルカゴンの第８２～８９アミノ酸）を伴ったグルカゴンの完全な２９個のアミノ酸配列を含んでいる３７個のアミノ酸のペプチドである；よって、ヒト・オキシントモジュリンの完全な配列は、Ｈｉｓ‐Ｓｅｒ‐Ｇｌｎ‐Ｇｌｙ‐Ｔｈｒ‐Ｐｈｅ‐Ｔｈｒ‐Ｓｅｒ‐Ａｓｐ‐Ｔｙｒ‐Ｓｅｒ‐Ｌｙｓ‐Ｔｙｒ‐Ｌｅｕ‐Ａｓｐ‐Ｓｅｒ‐Ａｒｇ‐Ａｒｇ‐Ａｌａ‐Ｇｌｎ‐Ａｓｐ‐Ｐｈｅ‐Ｖａｌ‐Ｇｌｎ‐Ｔｒｐ‐Ｌｅｕ‐Ｍｅｔ‐Ａｓｎ‐Ｔｈｒ‐Ｌｙｓ‐Ａｒｇ‐Ａｓｎ‐Ａｒｇ‐Ａｓｎ‐Ａｓｎ‐Ｉｌｅ‐Ａｌａ（配列番号３）である。ＧＬＰ‐１の主要な生物学的に活性な断片は、３０個のアミノ酸であって、プレプログルカゴンの第９８～１２７アミノ酸に相当するＣ末端がアミド化されたペ

プチドとして産生される。

【０００４】

グルカゴンは、肝細胞上のグルカゴン受容体に結合し、肝臓がグリコーゲン分解によって‐グリコーゲンの形で保存された‐グルコースの放出を引き起こすことによって血中のグルコースレベルを維持するのに役立っている。これらの蓄えが使い果たされたとき、グルカゴンは、糖新生によって追加のグルコースを合成するように肝臓を刺激する。このグルコースが血流内に放出され、低血糖の発生を予防する。

【０００５】

ＯＸＭは、食物摂取に対応し、且つ、食事のカロリー量に比例して血液中に放出される。ＯＸＭが、ヒトの食欲を抑制し、そして食物摂取を阻害することが明らかにされた（Cohenら、Journal of Endocrinology and Metabolism、第８８号、４６９６～４７０１頁、２００３年；WO 2003/022304）。オキシントモジュリンで処理したラットがペアフィード・ラットに比べてわずかな体重増加しか示さなかったので、（ＧＬＰ‐１のそれと同様である）オキシントモジュリンの食欲抑制作用に加えて（Bloom, Endocrinology 2004, 145, 2687）、ＯＸＭはさらに別の機構によって体重に作用しているはずである。ＯＸＭによる肥満齧歯動物の処置はさらに、それらの耐糖能を改善し（Parlevlietら、Am J Physiol Endocrinol Metab、第２９４号、Ｅ１４２～７頁、２００８年）、且つ、体重増加を抑制する（WO 2003/022304）。

【０００６】

ＯＸＭは、グルカゴン受容体とＧＬＰ‐１受容体の両方を、ＧＬＰ‐１受容体よりもグルカゴン受容体を二倍強力に活性化するが、それは、天然のグルカゴン及びＧＬＰ‐１がそれらのそれぞれの受容体に対するほど強力でない。ＧＬＰ‐１受容体よりもグルカゴン受容体に関して強い優先傾向があるとはいえ、ヒト・グルカゴンもまた両方の受容体を活性化することができる。その一方、ＧＬＰ‐１はグルカゴン受容体を活性化することができない。オキシントモジュリンの作用機序は十分に理解されていない。特に、ホルモンの効果が伝達されるのが、ＧＬＰ‐１受容体やグルカゴン受容体を通じてなのか、１若しくは複数の同定されていない受容体を通じてなのか知られていない。

【０００７】

他のペプチドが、グルカゴン受容体とＧＬＰ‐１の両方に結合し、そして活性化すること（Hjortら、Journal of Biological Chemistry、第２６９号、３０１２１～３０１２４頁、１９９４年）、及び体重増加を抑制し、且つ、食物摂取を低減すること（WO 2006/134340；WO 2007/100535；WO 2008/101017）が知られている。

【０００８】

肥満は、世界的に高まっている健康問題に分類され、そして様々な疾患、特に心血管疾患（ＣＶＤ）、２型糖尿病、閉塞型睡眠時無呼吸症、特定のタイプの癌、及び骨関節炎と関連している。その結果、肥満は平均余命を短くすることがわかった。世界保健機構による２００５年の予測によれば、世界中で４億人の成人（年齢＞１５歳）が肥満体に分類される。米国では、現在、肥満は、喫煙に次いで２番目に多い予防可能な死因であると考えられている。

【０００９】

肥満の増加は、糖尿病の増加を促進するので、２型糖尿病を患っている人の約９０％が肥満に分類され得る。世界中には２億４６００万人が糖尿病を患っていて、２０２５年までには、３億８０００万人が糖尿病を患うであろうと推定されている。多くの人が、高い／異常なＬＤＬ及びトリグリセリド、そして低いＨＤＬを含めた付加的な心血管疾患の危険因子を有する。

【００１０】

糖尿病を患っている人は、糖尿病を患っていない人に比べて心血管疾患を発症する可能性が２～４倍高いので、心血管疾患が糖尿病の最も一般的な合併症になっている。心血管疾患は、糖尿病を患っている人の死亡率の約５０％の割合を占める。肥満や２型糖尿病の高い発生率及び有病率と共に、糖尿病を患っている若年成人は、糖尿病を患っていない若

年成人に比べて冠動脈性心疾患（ＣＨＤ）の割合が１２～４０倍高く、これらの代謝異常に関連する罹患率と死亡率が、効果的な処置の選択肢の医学的な必要性を浮き彫りにしている。

【００１１】

従って、肥満を処置すること、及び耐糖能を改善することの医学的な必要性が大いにある。

【発明の概要】

【００１２】

第１の態様では、本発明は、式R^1‐Ｘ‐Ｚ‐R^2

｛式中、

R^1が、Ｈ、C_{1-4}アルキル、アセチル、ホルミル、ベンゾイル又はトリフルオロアセチルであり；

R^2が、ＯＨ又はNH_2であり；

Ｘが、以下の式（Ｉ）：

Ｈｉｓ‐Ｓｅｒ‐Ｇｌｎ‐Ｇｌｙ‐Ｔｈｒ‐Ｐｈｅ‐Ｔｈｒ‐Ｓｅｒ‐Ａｓｐ‐Ｔｙｒ‐Ｓｅｒ‐Ｌｙｓ‐Ｔｙｒ‐Ｌｅｕ‐Ａｓｐ‐Ｇｌｕ‐Ａｒｇ‐Ａｒｇ‐Ａｌａ‐Ｌｙｓ‐Ａｓｐ‐Ｐｈｅ‐Ｉｌｅ‐Ｇｌｕ‐Ｔｒｐ‐Ｌｅｕ‐Ｌｅｕ‐Ｓｅｒ‐Ａｌａ（配列番号４）

を有するペプチドであるか；又は式（Ｉ）と異なる場合には、以下の：

２位の残基が：Ｄ‐Ｓｅｒ、Ａｉｂから選択され；

１６位の残基が：Ｓｅｒ、Ａｓｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇから選択され；

１８位の残基が：Ａｌａであり；

２０位の残基が：Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｇｌｕ、Ａｓｐから選択され；

２１位の残基が：Ｇｌｕであり；

２３位の残基が：Ｖａｌであり；

２４位の残基が：Ｇｌｎ、Ａｓｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ａｌａから選択され；

２７位の残基が：Ｍｅｔ、Ｃｙｓ、Ｌｙｓから選択され；

２８位の残基が：Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ａｓｐから選択され；及び

２９位の残基が：Ｔｈｒ、Ａｒｇから選択される；

のうちの最大４ヶ所によって式（Ｉ）と異なっているペプチドであり；そして

Ｚが、存在しないか、又はＡｌａ、Ｌｅｕ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ｃｙｓ、Ｇｌｕ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｄｂｕ、Ｄｐｒ及びＯｒｎから成る群から選択される１～２０個のアミノ酸単位から成る配列である。｝を有する化合物、又は医薬的に許容し得るその塩を提供する。

【００１３】

いくつかの実施形態では、式（Ｉ）と異なる場合には、Ｘが、以下の：

２位の残基が：Ｄ‐Ｓｅｒ、Ａｉｂから選択され；

１６位の残基が：Ｓｅｒ、Ａｓｐ、Ｌｙｓから選択され；

２０位の残基が：Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｇｌｕから選択され；

２７位の残基が：Ｍｅｔ、Ｃｙｓ、Ｌｙｓから選択され；及び

２８位の残基が：Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ａｌａから選択される；

のうちの最大４ヶ所によって式（Ｉ）と異なる。

【００１４】

それらの実施形態のうちのいくつかでは、式（Ｉ）と異なる場合には、Ｘが、以下の：

２位の残基が：Ｄ‐Ｓｅｒ、Ａｉｂから選択され；

１６位の残基が：Ｓｅｒ、Ａｓｐ、Ｌｙｓから選択され；及び

２０位の残基が：Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｇｌｕから選択される；

のうちの最大３ヶ所によって式（Ｉ）と異なっていてもよい。

【００１５】

代替実施形態では、式（Ｉ）と異なる場合には、Ｘが、以下の：
２位の残基が：Ｄ‐Ｓｅｒ、Ａｉｂから選択され；
１６位の残基が：Ｓｅｒ、Ａｓｐ、Ｌｙｓから選択され；
１８位の残基が：Ａｌａであり；及び
２０位の残基が：Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｇｌｕから選択される；
のうちの最大４ヶ所によって式（Ｉ）と異なっていてもよい。

【００１６】

より一層さらなる代替実施形態では、式（Ｉ）と異なる場合には、Ｘが、以下の：
２３位の残基が：Ｖａｌであり；
２４位の残基が：Ｇｌｎ、Ａｓｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ａｌａから選択され；
２７位の残基が：Ｍｅｔ、Ｃｙｓ、Ｌｙｓから選択され；及び
２８位の残基が：Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ａｌａから選択される；
のうちの最大４ヶ所によって式（Ｉ）と異なっていてもよい。

【００１７】

先に記載の実施形態のいずれかで、１６位と２０位の残基が、塩橋を形成できることもある。好適な残基対の例には：
１６‐Ａｓｐ、２０‐Ｌｙｓ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ；
１６‐Ａｓｐ、２０‐Ａｒｇ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ａｒｇ；
１６‐Ｌｙｓ、２０‐Ａｓｐ；
１６‐Ａｒｇ、２０‐Ａｓｐ；
１６‐Ｌｙｓ、２０‐Ｇｌｕ；
１６‐Ａｒｇ、２０‐Ｇｌｕ、
が挙げられる。

【００１８】

さらに又はあるいは、２０位と２４位の残基が、塩橋を形成できることもある。好適な残基対の例には：
２０‐Ａｓｐ、２４‐Ｌｙｓ；
２０‐Ｇｌｕ、２４‐Ｌｙｓ；
２０‐Ａｓｐ、２４‐Ａｒｇ；
２０‐Ｇｌｕ、２４‐Ａｒｇ；
２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ａｓｐ；
２０‐Ａｒｇ、２４‐Ａｓｐ；
２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ｇｌｕ；
２０‐Ａｒｇ、２４‐Ｇｌｕ、
が挙げられる。

【００１９】

先の定義との整合性を維持しながら、Ｘが、以下の残基のセット：
２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ｇｌｕ；
２０‐Ｌｙｓ、２３‐Ｉｌｅ、２４‐Ｇｌｕ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ｇｌｕ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２９‐Ａｌａ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２３‐Ｉｌｅ、２４‐Ｇｌｕ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２３‐Ｉｌｅ、２４‐Ｇｌｕ、２９‐Ａｌａ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ｇｌｕ、２９‐Ａｌａ；
２０‐Ｌｙｓ、２３‐Ｉｌｅ、２４‐Ｇｌｕ、２９‐Ａｌａ；
２７‐Ｌｅｕ、２８‐Ｓｅｒ、２９‐Ａｌａ；
２９‐Ａｌａ；

１６‐Ｓｅｒ；
２０‐Ｇｌｎ；
２３‐Ｖａｌ；
２４‐Ｇｌｎ；
１６‐Ｓｅｒ、２０‐Ｇｌｎ；
１６‐Ａｓｐ、２０‐Ａｒｇ、２４‐Ａｓｐ；
１６‐Ｌｙｓ、２０‐Ｇｌｕ；
２４‐Ａｒｇ；又は
２８‐Ａｒｇ、
のうちの１つ又は複数を含んでなることが望まれることもある。

【００２０】

例えば、Ｘは、以下の配列：
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号１３）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＱＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号５）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＶＥＷＬＬＳＡ（配列番号６）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＱＷＬＬＳＡ（配列番号７）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＱＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号８）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＤＲＲＡＲＤＦＩＤＷＬＬＳＡ（配列番号９）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＫＲＲＡＥＤＦＩＫＷＬＬＳＡ（配列番号１０）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＲＷＬＬＳＡ（配列番号１１）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＲＡ（配列番号１２）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＡＡＫＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号１４）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＤＷＬＬＳＡ（配列番号１５）；
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＡＡ（配列番号１６）；
又は
ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＥＲＲＡＫＤＦＩＥＷＬＬＳＡ（配列番号１７）、
を有していてもよい。

【００２１】

本発明は、本発明の化合物をコードする核酸（ＤＮＡ若しくはＲＮＡであってもよい）、そのような核酸を含んでなる発現ベクター、及びそのような核酸又は発現ベクターを含んでいる宿主細胞をさらに提供する。

【００２２】

更なる態様では、本発明は、本明細書中に規定されるグルカゴン類似体ペプチド、又はその塩若しくは誘導体を含んでなる組成物、そのようなグルカゴン類似体ペプチドをコードする核酸、そのような核酸を含んでなる発現ベクター、又は担体との混合物の状態でそのような核酸若しくは発現ベクターを含んでいる宿主細胞を提供する。好ましい実施形態では、前記組成物は医薬的に許容し得る組成物であり、且つ、前記担体は医薬的に許容し得る担体である。前記グルカゴン・ペプチド類似体は、グルカゴン類似体の医薬的に許容し得る酸付加塩であってもよい。

【００２３】

記載した化合物には、体重増加を予防するか又は体重減少を促進する際の使用が見出された。「予防すること」は、処置の不存在と比較した場合に、体重増加を阻害するか又は低減することを意味するが、必ずしも体重増加の完全な停止を含意するわけではない。前記ペプチドは、食物摂取の減少及び／又はエネルギー消費の増加を引き起こし、その結果として体重に対して観察された効果をもたらし得る。体重に対するそれらの効果とは無関係に、本発明の化合物は、循環ＬＤＬレベルを下げることや、ＨＤＬ／ＬＤＬ比を高めることができる、耐糖能及び循環コレステロールレベルに有益な効果を有し得る。よって、本発明の化合物は、過剰体重によって引き起こされる又は特徴づけられるあらゆる身体状態の直接的又は間接的な治療法、例えば肥満、病的な肥満、肥満に関連した炎症、肥満に関連した胆嚢疾患、肥満誘発型睡眠時無呼吸症の処置及び／又は予防などに使用できる。

それらはさらに、メタボリック症候群、インスリン抵抗性、耐糖能異常、２型糖尿病、高血圧症、アテローム形成性脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、又は脳卒中の処置に使用できる。これらの身体状態におけるそれらの効果は、体重に対するそれらの効果の結果としてであっても、それらの効果に関連していてもよく、又はそれとは無関係であってもよい。

【００２４】

よって、本発明は、それを必要としている人における、先に記載の身体状態の処置の際の本発明の化合物の使用を提供する。

【００２５】

本発明はさらに、医療処置方法での使用のための、特に先に記載したような身体状態の処置方法での使用のための本発明の化合物も提供する。

【００２６】

本発明はさらに、先に記載したような身体状態の処置のための薬剤の調製における本発明の化合物の使用も提供する。

【００２７】

既に記載したように、本発明は、先に記載した核酸配列を、その発現を指示する配列と任意に組み合わせて含んでなる発現ベクター、及びその発現ベクターを含んでいる宿主細胞まで広がる。好ましくは、宿主細胞は、本発明の化合物を発現し、そして分泌できる。より一層更なる態様では、本発明は、前記化合物の製造方法であって、その化合物を発現するのに好適な条件下で宿主細胞を培養し、そしてこうして産生された化合物を精製することを含んでなる方法を提供する。

【００２８】

本発明は、医療処置での使用のための、本発明の核酸、本発明の発現ベクター、又は本発明の化合物を発現し、そして分泌できる宿主細胞をさらに提供する。前記の核酸、発現ベクター、及び宿主細胞が、その化合物自体を用いて処置し得る本明細書中に記載の障害のいずれかの処置のために使用され得ることは理解される。そのため、本発明の化合物を含んでなる治療用組成物、本発明の化合物の投与、又はいずれかの治療のためのその使用は、文脈が他のものを求めている場合を除いて、本発明の核酸、発現ベクター又は宿主細胞の同等な使用を包含すると解釈されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【００２９】

【図１】ｄｂ／ｄｂマウスにおける経口耐糖能に対するＺＰ２６６３の効果。ｄｂ／ｄｂマウスを一晩断食させ、そしてビヒクル又はＺＰ２６６３（４５ｎｍｏｌ／ｋｇ）の投与（腹腔内）直前に最初の血液サンプル（空腹時血糖値）を採血した。１５分後に、経口用量のグルコース（５ｍｌ／ｋｇ中に１ｇ／ｋｇ）を与え、そしてＢＧレベルをｔ＝３０分、ｔ＝６０分、ｔ＝１２０分及びｔ＝２４０分の時点で計測した。ベースライン（ｔ＝０）からの差をそれぞれの時点について計算し、そしてAUC_{0-240}値を決定した。ＺＰ２６６３は、糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスの耐糖能を有意に改善した。

【図２】マウスの食物摂取に対するＺＰ２６６３の効果。（体重を量った後に階層化した）階層化マウスの群を一晩断食させ、そしてPYY_{3-36}（３０ｎｍｏｌ／ｋｇ）（内部陽性対照）、グルカゴン（５００ｎｍｏｌ／ｋｇ）、ＺＰ２６６３（５００ｎｍｏｌ／ｋｇ）又はビヒクルで処置した。一時間後に、あらかじめ重量を量っておいた食餌を与え、一時間後に残っている食餌の重量を量ることによって食餌摂取量を計測し、そしてマウス体重に対して相対的に表した（ｍｇ食餌／ｇ ＢＷ）。ＰＹＹ（３－３６）は、以前の知見から予想されるとおり、食欲抑制効果を示した。ＺＰ２６６３（５００ｎｍｏｌ／ｋｇ）は、ペプチドの注射後一時間の間、食餌摂取を有意に減少させた。グルカゴンは食餌摂取に対して効果がなかった。

【図３】食餌誘発性肥満（ＤＩＧ）マウスの体重増加に対するＺＰ２６６３を用いた２８日間の処置の効果。Ｃ５７Ｂｌ／６雄マウスに、高脂肪食（ＨＦＤ）を与え、そしてＺＰ２６６３（５００ｎｍｏｌ／ｋｇ）（ＺＰ２６６３）又はビヒクルで処置した（１日２回

；皮下）。普通食で維持された非肥満性対照群を、ＤＩＧ群と同じ処置計画においてビヒクルで処置した（ＣＨＯＷ）。体重を毎日記録し、そして研究を通じてペプチドの体重補正用量の投与に使用した。ＺＰ２６６３は、普通食（chow）摂取で観察されたのと同様のレベルまで体重増加を低減した。

【図４】ＬＤＬコレステロールの濃度に対する４週間のＤＩＯマウスの二重Ｇｌｕ‐ＧＬＰ‐１作動薬処置（１日２回）の効果。ＯＸＭ（ｐ＝０．００２）とＺＰ２６６３（ｐ＝０．０００１）の効果は、ビヒクル群とは統計的に有意に異なっていた。

【図５】ＨＤＬ／ＬＤＬ比に対する４週間のＤＩＧマウスの二重Ｇｌｕ‐ＧＬＰ‐１作動薬処置（１日２回）の効果。ＰＢＳ（ｐＨ７．４）が、ＯＸＭ及びエキセンジン‐４に使用されるビヒクルであったのに対して、酢酸（acetate）（ｐＨ５．０）は、ＺＰ２６６３に使用されるビヒクルであった。ＯＸＭ（Ｐ＝０．００２）及びＺＰ２６６３（Ｐ＝０．０００３）の効果は、ビヒクル群とは統計的に有意に異なっていた。

【００３０】

発明の詳細な説明

この明細書を通して、天然アミノ酸についての慣習的な一文字表記及び三文字表記、並びにその他のアミノについての一般に認められている三文字表記、例えばＡｉｂ（α‐アミノイソ酪酸）、Ｏｒｎ（オルニチン）、Ｄｂｕ（２，４‐ジアミノ酪酸）及びＤｐｒ（２，３‐ジアミノプロパン酸）などが使用される。

【００３１】

「天然グルカゴン」という用語は、配列Ｈ‐Ｈｉｓ‐Ｓｅｒ‐Ｇｌｎ‐Ｇｌｙ‐Ｔｈｒ‐Ｐｈｅ‐Ｔｈｒ‐Ｓｅｒ‐Ａｓｐ‐Ｔｙｒ‐Ｓｅｒ‐Ｌｙｓ‐Ｔｙｒ‐Ｌｅｕ‐Ａｓｐ‐Ｓｅｒ‐Ａｒｇ‐Ａｒｇ‐Ａｌａ‐Ｇｌｎ‐Ａｓｐ‐Ｐｈｅ‐Ｖａｌ‐Ｇｌｎ‐Ｔｒｐ‐Ｌｅｕ‐Ｍｅｔ‐Ａｓｎ‐Ｔｈｒ‐ＯＨ（配列番号１）を有する天然ヒト・グルカゴンを指す。

【００３２】

「オキシントモジュリン」及び「ＯＸＭ」という用語は、配列Ｈ‐Ｈｉｓ‐Ｓｅｒ‐Ｇｌｎ‐Ｇｌｙ‐Ｔｈｒ‐Ｐｈｅ‐Ｔｈｒ‐Ｓｅｒ‐Ａｓｐ‐Ｔｙｒ‐Ｓｅｒ‐Ｌｙｓ‐Ｔｙｒ‐Ｌｅｕ‐Ａｓｐ‐Ｓｅｒ‐Ａｒｇ‐Ａｒｇ‐Ａｌａ‐Ｇｌｎ‐Ａｓｐ‐Ｐｈｅ‐Ｖａｌ‐Ｇｌｎ‐Ｔｒｐ‐Ｌｅｕ‐Ｍｅｔ‐Ａｓｎ‐Ｔｈｒ‐Ｌｙｓ‐Ａｒｇ‐Ａｓｎ‐Ａｒｇ‐Ａｓｎ‐Ａｓｎ‐Ｉｌｅ‐Ａｌａ‐ＯＨ（配列番号３）を有する天然ヒト・オキシントモジュリンを指す。

【００３３】

本発明は、先に規定した化合物を提供する。誤解を避けるために、本明細書中に示した定義において、配列Ｘは、変動を認めると記述された位置において式（Ｉ）と異なっているだけであることが一般に意図される。配列Ｘ内のアミノ酸は、従来のＮ末端からＣ末端の向きに１から２９まで連続して付番されると考えられる。従って、Ｘ内の「位置」についての言及は、天然ヒト・グルカゴン及びその他の分子内の位置に対して言及しなくてはならないと解釈されるべきである。

【００３４】

本発明の化合物は、ペプチド配列Ｘ内に１若しくは複数の分子内架橋を持っていてもよい。そのような架橋のそれぞれは、Ｘの線形配列内で通常３アミノ酸離れているＸの２つのアミノ酸残基の側鎖間（すなわち、アミノ酸Ａとアミノ酸Ａ＋４の間）で形成される。

【００３５】

より特に、架橋は、残基対１２と１６、１６と２０、１７と２１、２０と２４、又は２４と２８の側鎖間で形成され得る。２つの側鎖は、イオン性相互作用を通して又は共有結合によって互いに連結されることができる。よって、これらの残基対は、イオン性相互作用によって塩橋を形成するために逆帯電した側鎖を備えていてもよい。例えば、前記残基の一方がＧｌｕ又はＡｓｐであり得、それと同時にもう一方がＬｙｓ又はＡｒｇであり得る。

【００３６】

ＬｙｓとＧｌｕ及びＬｙｓとＡｓｐの対合はまた、反応して、ラクタム環を形成することもできる。同様に、ＴｙｒとＧｌｕ又はＴｙｒとＡｓｐは、ラクトン環を形成することができる。

【００３７】

特に、１６位と２０位の残基、及び／又は２０位と２４位の残基は、分子内架橋を形成できることもある。これらの位置の好適な残基対の例には：

１６‐Ａｓｐ、２０‐Ｌｙｓ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ｌｙｓ；
１６‐Ａｓｐ、２０‐Ａｒｇ；
１６‐Ｇｌｕ、２０‐Ａｒｇ；
１６‐Ｌｙｓ、２０‐Ａｓｐ；
１６‐Ａｒｇ、２０‐Ａｓｐ；
１６‐Ｌｙｓ、２０‐Ｇｌｕ；
１６‐Ａｒｇ、２０‐Ｇｌｕ；及び／又は
２０‐Ａｓｐ、２４‐Ｌｙｓ；
２０‐Ｇｌｕ、２４‐Ｌｙｓ；
２０‐Ａｓｐ、２４‐Ａｒｇ；
２０‐Ｇｌｕ、２４‐Ａｒｇ；
２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ａｓｐ；
２０‐Ａｒｇ、２４‐Ａｓｐ；
２０‐Ｌｙｓ、２４‐Ｇｌｕ；
２０‐Ａｒｇ、２４‐Ｇｌｕ、

が挙げられる。

【００３８】

いずれかの特定の理論に縛られることを望むものではないが、そのような分子内架橋が、分子のαヘリックス構造を安定させるので、ＧＬＰ‐１受容体における、そしてもしかするとグルカゴン受容体においても同様に、効力及び／又は選択性を増強すると信じられている。

【００３９】

いずれかの特定の理論に縛られることを望むものではないが、天然グルカゴンの１７位及び１８位のアルギニン残基は、顕著な選択性をグルカゴン受容体に与えるように思われる。１８位の疎水性残基（例えばＡｌａ）は、ＧＬＰ‐１受容体及びグルカゴン受容体の両方における効力を増強し得る。

【００４０】

（例えばＩｌｅによる）２３位における置換は、ＧＬＰ‐１受容体における効力及び／又は選択性を増強し得る。

【００４１】

（例えばＧｌｕによる）２４位における置換もまた、ＧＬＰ‐１受容体における効力及び／又は選択性を増強し得る。

【００４２】

いずれかの特定の理論に縛られることを望むものではないが、天然グルカゴンの２７、２８及び２９位の残基は、グルカゴン受容体における顕著な選択性を与えるように思われる。天然グルカゴン配列に関するこれらの位置のうちの１つ、２つ又は３つすべての置換は、グルカゴン受容体における効力の顕著な低減の可能性なしに、ＧＬＰ‐１受容体における効力及び／又は選択性を増強し得る。特定の例には、２７位のＬｅｕ、２８位のＳｅｒ及び２９位のＡｌａが含まれる。

【００４３】

（例えばＬｅｕ又はＬｙｓ、特にＬｅｕによる）２７位の天然のＭｅｔ残基の置換はさらに、酸化の可能性を低下させ、それで化合物の化学的安定性を増強する。

（例えばＳｅｒ、Ａｒｇ又はＡｌａによる）２８位の天然のＡｓｎ残基の置換はさらに

、酸性溶液中での脱アミド化の可能性を低下させ、それで化合物の化学的安定性を増強する。

【００４４】

ＧＬＰ‐１受容体における効力及び／又は選択性はまた、両親媒性螺旋構造を形成する可能性がある残基を導入することによっても、グルカゴン受容体における効力の顕著な損失の可能性なしに増強され得る。これは、１６、２０、２４、及び２８位のうちの１つ又は複数に荷電残基を導入することによって達成され得る。よって、１６及び２０位の残基はすべてが荷電残基であり得、１６、２０、及び２４位の残基はすべてが荷電残基であり得、又は１６、２０、２４、及び２８位の残基はすべてが荷電残基であり得る。例えば、１６位の残基は、Ｇｌｕ、Ｌｙｓ又はＡｓｐであり得る。２０位の残基は、Ｌｙｓ、Ａｒｇ又はＧｌｕであり得る。２４位の残基は、Ｇｌｕ、Ａｓｐ、Ｌｙｓ又はＡｒｇであり得る。２８位の残基はＡｒｇであり得る。

【００４５】

２０及び２４位の天然のＧｌｎ残基の一方又は両方の置換はさらに、酸性溶液中の脱アミド化の可能性を低減し、それで化合物の化学的安定性を増強する。２４位の残基は、Ｇｌｕ、Ａｓｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ又はＡｌａであり得る。

【００４６】

化合物は、例えばＷＯ９９／４６２８３に記載のとおり、例えばグルカゴン類似体ペプチドの立体構造及び／又は二次構造を安定させるために、そして／あるいはグルカゴン類似体ペプチドに酵素分解に対してより抵抗性をもたせるために、１～２０個のアミノ酸から成るＣ末端ペプチド配列Ｚを含んでなることもできる。

【００４７】

存在する場合、Ｚは、１～２０個のアミノ酸残基、例えば１～１５個の範囲内、より好ましくは１～１０個の範囲内、特に１～７個の範囲内のアミノ酸残基、例えば１、２、３、４、５、６又は７個のアミノ酸残基、例えば６個のアミノ酸残基など、から成るペプチド配列を表す。ペプチド配列Ｚ内のそれぞれアミノ酸残基は、独立に、Ａｌａ、Ｌｅｕ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ｃｙｓ、Ｇｌｕ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｄｂｕ（２，４‐ジアミノ酪酸）、Ｄｐｒ（２，３‐ジアミノプロパン酸）及びＯｒｎ（オルニチン）から選択され得る。好ましくは、前記アミノ酸残基は、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ｇｌｕ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｄｂｕ、Ｄｐｒ及びＯｒｎから選択され、より好ましくはＧｌｕ、Ｌｙｓ、及びＣｙｓだけから選択され得る。先に触れたアミノ酸はＤ型又はＬ型の立体配置のいずれかをとることができるが、好ましくはＬ型の立体配置をとっている。特に好ましい配列Ｚは、４、５、６又は７個の連続したリジン残基（すなわち$Ｌｙｓ_3$、$Ｌｙｓ_4$、$Ｌｙｓ_5$、$Ｌｙｓ_6$又は$Ｌｙｓ_7$）であり、そして特に５又は６個の連続したリジン残基から成る配列である。Ｚのその他の代表的な配列は、ＷＯ０１／０４１５６に示されている。あるいは、配列ＺのＣ末端残基は、Ｃｙｓ残基であってもよい。これは、化合物の修飾（例えばペグ化）を助けることができる。そのような実施形態では、配列Ｚは、例えば長さが1アミノ酸（すなわち、Ｚ＝Ｃｙｓ）だけでも、長さが２、３、４、５、６アミノ酸又はさらに多くのアミノ酸であってもよい。そのため、他のアミノ酸がペプチドＸと端末のＣｙｓ残基の間のスペーサーとして機能する。

【００４８】

ペプチド配列Ｚは、（配列Ｌｙｓ‐Ａｒｇ‐Ａｓｎ‐Ａｒｇ‐Ａｓｎ‐Ａｓｎ‐Ｉｌｅ‐Ａｌａを持っている）ヒトＯＸＭのＩＰ‐１部分の対応する配列と２５％以下の配列同一性しかない。

【００４９】

別のポリペプチド配列（例えばＩＰ‐１）に関する所定のペプチド又はポリペプチド配列の「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」は、２つが互いに整列された場合にもう一方のポリペプチドの対応する配列内の対応するアミノ酸残基と同一である所定のペプチド配列内のアミノ酸残基のパーセンテージとして計算され、必要であれば、最適な整列のためにギャップが導入される。％同一性の値は、ＷＵ‐ＢＬＡＳＴ‐２（Altschulら、Meth

ods in Enzymology、第２６６号：４６０～４８０頁（１９９６年））によって測定されてもよい。ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２はいくつかの検索パラメーターを使用するが、その大部分は初期値に設定される。調整可能なパラメーターは、以下の値：重複スパン＝１、重複フラクション＝０．１２５、ワード閾値（Ｔ）＝１１に設定される。％アミノ酸配列同一性値は、参照配列の残基総数（整列スコアを最大にするためにＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２によって参照配列内に導入されたギャップは無視される）で割って、１００を掛けた、ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２によって測定された合致している同一残基数によって決定される。

【００５０】

よって、ＩＰ－１の８個のアミノ酸と最適に整列させたとき、Ｚは、ＩＰ－１の対応するアミノ酸と同一であるアミノ酸を２個以下しか持たない。

本発明の化合物内のアミノ酸側鎖のうちの１つ又は複数が、親油性置換基に結合することもできる。この親油性置換基は、アミノ酸側鎖の原子に共有結合されてもよく、あるいはスペーサーによってアミノ酸側鎖に結合されてもよい。前記アミノ酸はペプチドＸの一部であっても、ペプチドＺの一部であってもよい。

【００５１】

理論に縛られることを望むものではないが、親油性置換基が血流中でアルブミンに結合し、それよって酵素的分解からの本発明の化合物を保護することで化合物の半減期を延長できると考えられている。スペーサーは、存在する場合には、化合物と親油性置換基の間の間隔を提供するために使用される。

【００５２】

親油性置換基は、エステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド又はスルホンアミドを介してアミノ酸側鎖又はスペーサーに取り付けられ得る。従って、好ましくは、親油性置換基としては、エステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド又はスルホンアミドの一部を形成するアシル基、スルホニル基、Ｎ原子、Ｏ原子又はＳ原子が挙げられることは理解される。好ましくは、親油性置換基内のアシル基は、アミノ酸側鎖又はスペーサーとアミド又はエステルの一部を形成する。

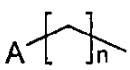
【００５３】

親油性置換基には、４～３０個のＣ原子を持つ炭化水素鎖が含まれ得る。好ましくは、それは８又は１２個のＣ原子を持ち、そして好ましくは、それは２４個以下のＣ原子、又は２０個以下のＣ原子を持つ。炭化水素鎖は、直鎖であっても分岐鎖であってもよく、且つ、飽和であっても不飽和であってもよい。当然のことながら、炭化水素鎖は、アミノ酸側鎖又はスペーサーへの結合部の一部を形成する部分、例えばアシル基、スルホニル基、Ｎ原子、Ｏ原子又はＳ原子により好ましくは置換される。最も好ましくは、炭化水素鎖はアシルによって置換され、従って、炭化水素鎖はアルカノイル基、例えばパルミトイル、カプロイル、ラウロイル、ミリストイル又はステアロイルの一部となり得る。

【００５４】

従って、親油性置換基は、以下に示した式を持つこともできる。

【化１】



【００５５】

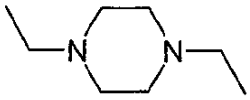
Ａは、例えばアシル基、スルホニル基、ＮＨ、Ｎ－アルキル、Ｏ原子又はＳ原子であり得るが、好ましくはアシルであり得、ｎは、３～２９の整数であるが、好ましくは少なくとも７であるか又は少なくとも１１であり、そして好ましくは２３未満であり、より好ましくは１９未満である。

【００５６】

炭化水素鎖はさらに置換されることもできる。例えば、それは、NH_2、ＯＨ及びＣＯＯＨから選択される最大３つの置換基によりさらに置換されることもできる。炭化水素鎖がさらに置換されるのであれば、好ましくは、それは１つの置換基だけでさらに置換される。あるいは又は加えて、炭化水素鎖は、例えば以下に示したような、シクロアルカン又はヘテロシクロアルカンを含むこともできる：

【００５７】

【化２】



【００５８】

好ましくは、シクロアルカン又はヘテロシクロアルカンは、六員環である。最も好ましくは、それはピペリジンである。

【００５９】

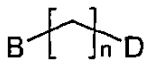
あるいは、親油性置換基は、シクロペンタノフェナントレン骨格に基づいていてもよく、それは部分的に又は完全に不飽和であっても、飽和されていてもよい。それぞれの骨格の炭素原子は、Ｍｅ又はＯＨにより置換されていてもよい。例えば、親油性置換基は、コリル（ｃｈｏｌｙｌ）、デオキシコリル又はリトコリルであってもよい。

【００６０】

以上のように、親油性置換基は、スペーサーによってアミノ酸側鎖に結合されることもできる。存在している場合には、スペーサーは、親油性置換基とアミノ酸側鎖に取り付けられる。スペーサーは、エステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド又はスルホンアミドによって独立に親油性置換基とアミノ酸側鎖に取り付けられることもできる。従って、それは、アシル、スルフォニル、Ｎ原子、Ｏ原子又はＳ原子から独立に選択される２つの部分を含むこともできる。スペーサーは、以下の式：

【００６１】

【化３】



【００６２】

｛式中、Ｂ及びＤは、それぞれ独立に、アシル、スルフォニル、ＮＨ、Ｎ‐アルキル、Ｏ原子又はＳ原子から選択され、好ましくはアシル及びＮＨから選択される。｝を持つこともできる。好ましくは、ｎは、１～１０の整数であり、好ましくは１～５の整数である。スペーサーは、C_{1-6}アルキル、C_{0-6}アルキル・アミン、C_{0-6}アルキル・ヒドロキシ及びC_{0-6}アルキル・カルボキシから選択される１若しくは複数の置換基によりさらに置換されることもできる。

【００６３】

あるいは、スペーサーは、先の式の２以上の反復単位を持つこともできる。Ｂ、Ｄ、及びｎは、各反復単位に関してそれぞれ独立に選択される。隣接している反復単位は、それらのそれぞれのＢ及びＤ部分を介して互いに共有結合され得る。例えば、隣接している反復単位のＢ及びＤ部分は、一緒にエステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド又はスルホンアミドを形成し得る。スペーサーの各末端の遊離Ｂ及びＤユニットは、先に

記載のように、アミノ酸側鎖や親油性置換基に取り付けられる。

【００６４】

好ましくは、スペーサーには、５つ以下、４つ以下、又は３つ以下の反復単位しかない。最も好ましくはスペーサーには、２つの反復単位しかないか、又は単一ユニットである。

【００６５】

スペーサー（又は反復単位があるのであれば、スペーサーの１つ又は複数の反復単位）は、例えば、天然のアミノ酸であっても、非天然のアミノ酸であってもよい。当然のことながら、官能性側鎖を持つアミノ酸に関して、Ｂ及び／又はＤは、アミノ酸の側鎖内の部分であってもよい。スペーサーは、どの天然のアミノ酸であっても、どの非天然のアミノ酸であってもよい。例えば、スペーサー（又は反復単位があるのであれば、スペーサーの１つ又は複数の反復単位）は、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｍｅｔ、Ｃｙｓ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ、α‐Ｇｌｕ、γ‐Ｇｌｕ、Ａｓｐ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇａｂａ、Ａｉｂ、β‐Ａｌａ、５‐アミノペンタノイル、６‐アミノヘキサノイル、７‐アミノヘプタノイル、８‐アミノオクタノイル、９‐アミノノナノイル又は１０‐アミノデカノイルであり得る。

【００６６】

例えば、スペーサーは、γ‐Ｇｌｕ、Ｇａｂａ、β‐Ａｌａ及びα‐Ｇｌｙから選択される単一アミノ酸であり得る。

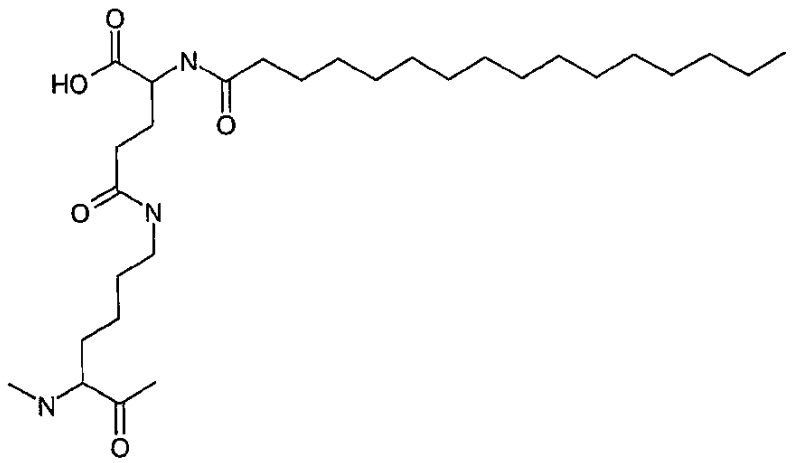
【００６７】

親油性置換基は、本発明の化合物のあらゆるアミノ酸側鎖に結合され得る。好ましくは、アミノ酸側鎖としては、スペーサー又は親油性置換基とエステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド若しくはスルホンアミドを形成するためのカルボキシ、ヒドロキシル、チオール、アミド又はアミン基が挙げられる。例えば、親油性置換基は、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｃｙｓ又はＤｂｕ、Ｄｐｒ若しくはＯｒｎに結合させ得る。好ましくは、親油性置換基はＬｙｓに結合させる。しかしながら、親油性置換基が加えられる場合、本明細書中に提供した式中にＬｙｓと示したあらゆるアミノ酸が、Ｄｂｕ、Ｄｐｒ又はＯｒｎによって置き換えられてもよい。

【００６８】

親脂質置換基とスペーサーの例は、以下の式に示されている：

【化４】



【００６９】

ここで、本発明の化合物からのＬｙｓは、アミド部分を介することによってγ‐Ｇｌｕ（スペーサー）に共有結合で取り付けられる。パルミトイルは、アミド部分を介してγ‐

Ｇｌｕスペーサーに共有結合で取り付けられる。

【００７０】

あるいは又は加えて、本発明の化合物内の１つ又は複数のアミノ酸側鎖は、例えば溶解性、及び／又は生体内（例えば血漿中での）半減期、及び／又は生物学的利用能を増強するために、重合体部分に結合させることもできる。そのような修飾はさらに、治療用タンパク質やペプチドのクリアランス（例えば腎クリアランス）を低減することが知られている。

【００７１】

重合体部分は、水溶性（両親媒性（amphiphillc）又は親水性）であり、無毒性であり、且つ、医薬的に不活性であることが好ましい。好適な重合体部分には、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ＰＥＧのホモポリマー若しくはコポリマー、ＰＥＧのモノメチル置換重合体（ｍＰＥＧ）、又はポリオキシエチレン・グリセロール（ＰＯＧ）が含まれる。例えば、Int. J. Hematology、第６８号：１頁（１９９８年）；Bioconjugate Chem.、第６号：１５０頁（１９９５年）；及びCrit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.、第９号：２４９頁（１９９２年）を参照のこと。

【００７２】

他の好適な重合体残基には、ポリ‐アミノ酸、例えばポリ‐リシン、ポリ‐アスパラギン酸及びポリ‐グルタミン酸などが含まれる（例えば、Gombotzら（１９９５年）、Bioconjugate Chem.、第６号：３３２～３５１頁；Hudeczら（１９９２年）、Bioconjugate Chem.、第３号、４９～５７頁；Tsukadaら（１９８４年）、J. Natl. Cancer Inst.、第７３号：７２１～７２９頁；及びPratesiら（１９８５年）、Br. J. Cancer、第５２号：８４１～８４８頁を参照のこと）。

【００７３】

重合体部分は、直鎖であっても分岐鎖であってもよい。それは、５００～４００００Ｄａ、例えば５００～１００００Ｄａ、１０００～５０００Ｄａ、１００００～２００００Ｄａ、又は２００００～４００００Ｄａの分子量を持ち得る。

【００７４】

化合物は２つ以上のそのような部分を含んでなることもできるが、その場合、そのような部分全部の総分子量は一般に、先に与えられた範囲内に収まる。

【００７５】

重合体部分は、アミノ酸側鎖のアミノ、カルボキシル又はチオール基に（共有結合によって）連結され得る。好ましい例は、Ｃｙｓ残基のチオール基やＬｙｓ残基のイプシロン・アミノ基であり、そしてＡｓｐ及びＧｌｕ残基のカルボキシル基もまた使用され得る。

【００７６】

当業者（The skilled reader）は、連結反応を実施するのに使用できる好適な技術をよく知っている。例えば、メトキシ基を保有するＰＥＧ部分は、Nektar Therapeutics ALからの市販されている試薬を使用したマレイミド結合によってＣｙｓチオール基と連結できる。また、ＷＯ２００８／１０１０１７及び好適な化学の詳細について先に引用した引用文献も参照のこと。

【００７７】

ペプチド合成

本願発明の化合物は、標準的な合成方法、遺伝子組み換え発現系、又はその他の最先端の方法のいずれかによって製造され得る。よって、グルカゴン類似体は、例えば以下の：

（ａ）固相法又は液相法を用いて段階的に若しくは断片組立によってペプチドを合成し、そして最終的なペプチド生成物を単離及び精製する段階；

（ｂ）宿主細胞内でペプチドをコードする核酸構築物を発現させ、そして発現産物を宿主細胞培養物から回収する段階；又は

（ｃ）ペプチドをコードする核酸構築物の無細胞試験管内発現をおこない、そして発現産物を回収する段階；

を含んでなる方法、あるいは、ペプチドの断片を得るための（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）

の方法のいずれかの組み合わせと、それに続いて断片をつなぎ合わせてペプチドを得、そしてそのペプチドを回収すること、を含めた多くのやり方で合成され得る。

【００７８】

固相又は液相ペプチド合成を用いて本発明の類似体を合成することが好ましい。これに関連して、参考文献は、ＷＯ９８／１１１２５、そして中でもFields, GBら、２００２年、「Principles and practice of solid-phase peptide synthesis」：Synthetic Peptides（第２版）中、及び本明細書中の実施例に与えられている。

【００７９】

組み換え発現のために、通常、本発明の核酸断片は、好適なベクター内に挿入されて、本発明の核酸断片を保有するクローニングベクター又は発現ベクターを形成する；そのような新規ベクターもまた本発明の不可欠な要素である。適用の目的及びタイプにより、ベクターは、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体、又はウイルスの形態であり得るが、特定の細胞において一時的に発現されるだけである裸のＤＮＡもまた重要なベクターである。本発明の好ましいクローニングベクター及び発現ベクター（プラスミドベクター）は、自動複製が可能であり；それにより、その後のクローニングのための高レベルの発現又は高レベルの複製のための高いコピー数を可能にする。

【００８０】

一般的な概要では、発現ベクターは、５’→３’の方向で、且つ、作動できるように連結された状態で以下の要素を含んでなる：本発明の核酸断片の発現を駆動するためのプロモーター、任意には（細胞外相又は該当する場合にはペリプラズマ内への）分泌を可能にするリーダーペプチドをコードする核酸配列、本発明のペプチドをコードする核酸断片、及び任意にはターミネータをコードする核酸配列。それらは、追加の要素、例えば選択マーカーや複製開始点などを含んでもよい。生産株又は細胞株の中で発現ベクターを操作する場合、ベクターが宿主細胞ゲノム内に組み込まれることができるのは好ましいことであり得る。当業者は、好適なベクターに非常に詳しいので、それらの具体的な必要性に従ってベクターを設計できる。

【００８１】

本発明のベクターは、本発明の化合物を産生するように宿主細胞を形質転換するために使用される。（本発明の不可欠な要素でもある）そのような形質転換細胞は、本発明の核酸断片及びベクターの伝播のために使用される、又は本発明のペプチドの遺伝子組み換え産生のために使用される培養細胞又は細胞株であることができる。

【００８２】

本発明の好ましい形質転換細胞は、微生物、例えば細菌（例えばエシェリキア（Escherichia）属（例えばＥ．コリ（E. coli））、バチルス（Bacillus）属（例えばバチルス・ズブチリス（Bacillus subtilis））、サルモネラ（Salmonella）属、若しくはマイコバクテリウム（Mycobacterlum）属（好ましくは非病原性のもの、例えばＭ．ボビス（M. bovis）ＢＣＧ）、酵母（例えばサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae））など）、及び原虫などである。あるいは、形質転換細胞は、多細胞生物に由来することもある、すなわち、それは、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、又は哺乳動物細胞であってもよい。クローニング及び／又は最適化された発現を目的として、形質転換細胞が本発明の核酸断片を複製することができるのが好ましい。核酸断片を発現する細胞は、本発明の有用な実施形態である；それらは本発明のペプチドの小規模又は大規模な調製のために使用できる。

【００８３】

形質転換細胞によって本発明のペプチドを製造するとき、必須ではないが、発現産物が培地中に分泌されると都合がよい。

【００８４】

有効性

ＧＬＰ－１又はグルカゴン（Ｇｌｕ）受容体への関連化合物の結合を、アゴニスト活性の指標として使用できるが、一般に、関連受容体へのかかる化合物の結合によって引き起

こされる細胞内シグナル伝達を計測する生物学的アッセイを使用することが好ましい。例えば、グルカゴン作動薬によるグルカゴン受容体の活性化は、細胞サイクリックＡＭＰ（ｃＡＭＰ）形成を刺激する。同様に、ＧＬＰ‐１作動薬によるＧＬＰ‐１受容体の活性化は、細胞ｃＡＭＰ形成を刺激する。よって、これらの２つの受容体のうちの一方を発現している好適な細胞におけるｃＡＭＰの産生は、関連する受容体活性を観察するのに使用できる。従って、それぞれ一方の受容体を発現しているが、もう一方を発現していない細胞型の好適な対の使用は、両タイプの受容体に対するアゴニスト活性を測定するのに使用できる。

【００８５】

当業者は好適なアッセイ形式を認識し、そして実施例が以下に提供されている。ＧＬＰ‐１受容体及び／又はグルカゴン受容体は、実施例に記載のとおり受容体の配列を持つことができる。例えば、アッセイには、一次受入番号ＧＩ：４５０３９４７のヒト・グルカゴン受容体（グルカゴンＲ）及び／又は一次受入番号ＧＩ：１６６７９５２８３のヒト・グルカゴン様ペプチド１受容体（ＧＬＰ‐１Ｒ）を使用することもできる（前駆タンパク質の配列に関する場合には、シグナル配列を欠いた成熟タンパク質をアッセイに利用することはもちろん理解されるべきである）。

【００８６】

所定の受容体における作動薬の効力の数的評価基準としてEC_{50}値が使用されることもある。EC_{50}値は、特定のアッセイにおいてその化合物の最大活性の半分を達成するのに必要とされる化合物の濃度の評価基準である。よって、例えば、特定のアッセイにおいてグルカゴンのEC_{50}［ＧＬＰ‐１］より低いEC_{50}［ＧＬＰ‐１］を有する化合物は、グルカゴンよりもさらに高いＧＬＰ‐１効力を有すると考えることができる。

【００８７】

この明細書に記載の化合物は、通常、Ｇｌｕ‐ＧＬＰ‐１二重作動薬である、すなわち、それらはグルカゴン受容体とＧＬＰ‐１受容体の両方においてｃＡＭＰ形成を刺激することができる。それぞれの受容体の刺激は独立したアッセイにより計測され、その後互いに比較できる。

【００８８】

所定の化合物に関するＧＬＰ‐１受容体についてのEC_{50}値（EC_{50}［ＧＬＰ‐１Ｒ］）とグルカゴン受容体についてのEC_{50}値（EC_{50}［グルカゴンＲ］）を比較することによって、その化合物の相対グルカゴン選択性（％）が求められる：

相対グルカゴンＲ選択性［化合物］＝（１／EC_{50}［グルカゴンＲ］）ｘ１００／（１／EC_{50}［グルカゴンＲ］＋１／EC_{50}［ＧＬＰ‐１Ｒ］）

【００８９】

相対ＧＬＰ‐１Ｒ選択性も同様に求められる：

相対ＧＬＰ‐１Ｒ選択性［化合物］＝（１／EC_{50}［ＧＬＰ‐１Ｒ］）ｘ１００／（１／EC_{50}［グルカゴンＲ］＋１／EC_{50}［ＧＬＰ‐１Ｒ］）

【００９０】

化合物の相対的選択性は、ＧＬＰ‐１又はグルカゴン受容体に対するその効果をもう片方の受容体に対するその効果と直接比較することを可能にする。例えば、より高い化合物の相対ＧＬＰ‐１選択性は、グルカゴン受容体と比較したときにＧＬＰ‐１受容体に対してその化合物がより効果的であるということである。

【００９１】

以下で記載したアッセイを使用して、我々は、ヒト・グルカゴンに関する相対ＧＬＰ‐１選択性が約５％であることを求めた。

【００９２】

本発明の化合物は、ヒト・グルカゴンに比べてより高い相対ＧＬＰ‐１Ｒ選択性を有する。よって、特定のレベルのグルカゴンＲアゴニスト活性に関して、化合物は、グルカゴンに比べてより高いレベルのＧＬＰ‐１Ｒアゴニスト活性（すなわち、ＧＬＰ‐１受容体においてより優れた効力）を示す。当然のことながら、グルカゴン受容体及びＧＬＰ‐１

受容体における特定の化合物の絶対効力は、適当な相対ＧＬＰ‐１Ｒ選択性が達成されている限り、天然ヒト・グルカゴンより高くても、より低くても、又はほぼ同等であってもよい。

【００９３】

それにもかかわらず、本願発明の化合物は、ヒト・グルカゴンより低いEC_{50}［ＧＬＰ‐１Ｒ］を有することもある。化合物は、グルカゴンより低いEC_{50}［ＧＬＰ‐１Ｒ］を有することもある一方で、ヒト・グルカゴンのものより１０倍弱高い、ヒト・グルカゴンのものより５倍弱高い、又はヒト・グルカゴンのものより２倍弱高いEC_{50}［グルカゴンＲ］を維持している。

【００９４】

本発明の化合物は、ヒトグルカゴンのものより２倍弱であるEC_{50}［グルカゴンＲ］を有することができる。化合物は、ヒト・グルカゴンのものの２倍弱であるEC_{50}［グルカゴンＲ］を有することができ、且つ、ヒト・グルカゴンのそれの半分未満、ヒト・グルカゴンのものの５分の１未満、又はヒト・グルカゴンのものの１０分の１未満であるEC_{50}［ＧＬＰ‐１Ｒ］を有する。

【００９５】

化合物の相対ＧＬＰ‐１選択性は、５％～９５％であり得る。例えば、化合物は、５～２０％、１０～３０％、２０～５０％、３０～７０％、又は５０～８０％；又は３０～５０％、４０～６０％、５０～７０％又は７５～９５％の相対選択性を有し得る。

【００９６】

治療上の使用

本発明の化合物は、２型糖尿病を含めた肥満及び代謝性疾患のための魅力的な処置選択肢を提供し得る。

【００９７】

単純に糖尿病と呼ばれることも多い真性糖尿病は、通常、遺伝的原因と環境的原因の組み合わせによる代謝障害の症候群であり、異常に高い血糖値（高血糖）をもたらす。

【００９８】

血糖値は、膵臓のベータ細胞内で作られるホルモンであるインスリンによって制御される。糖尿病は、（１型糖尿病における）インスリン産生膵臓ベータ細胞の破壊によって、そして（２型糖尿病における）ベータ細胞の喪失に続く（妊娠糖尿病における）インスリンの効果に対する耐性によって発症する。両タイプの糖尿病とも高血糖につながり、それが糖尿病の急性徴候：過剰な尿産生、結果として生じる補償性口渇感と水分摂取の増加、視力障害、体重減少、嗜眠、及びエネルギー代謝の変化、の大きな原因となる。

【００９９】

メタボリック症候群は、人の代謝的なリスク因子群を特徴とする。それらには、腹部肥満（腹筋内臓周りの過剰な脂肪組織）、アテローム形成性脂質異常症（高いトリグリセリド、低いＨＤＬコレステロール及び／又は高いＬＤＬコレステロールを含めた血液脂質異常であって、それが動脈壁におけるプラークの蓄積を助長する）、高血圧（高血圧症）、インスリン抵抗性及び耐糖能異常、血栓形成促進状態（例えば、高い血中フィブリノゲン又はプラスミノゲンアクチベータインヒビター‐１）、及び炎症促進状態（例えば、高い血中Ｃ反応性タンパク質）が含まれる。

【０１００】

メタボリック症候群を患っている人は、２型糖尿病、並びに冠動脈性心疾患及び動脈硬化症のその他の発現（例えば脳卒中や末梢血管疾患）に関連した他の疾患の高いリスクがある。この症候群の主要な潜在するリスク因子は、腹部肥満、インスリン抵抗性及び耐糖能異常、血栓形成促進状態（例えば、高い血中フィブリノゲン又はプラスミノゲンアクチベータインヒビター‐１）、及び炎症促進状態（例えば、高い血中Ｃ反応性タンパク質）であると思われる。

【０１０１】

いずれかの特定の理論に縛られることを望むものではないが、本発明の化合物はＧｌｕ

ＧＬＰ‐１二重作動薬として作用すると信じられている。二重作動薬は、血糖値と食餌摂取に対するＧＬＰ‐１の効果と、脂肪代謝に対するグルカゴンの効果を兼ね備えている。そのため、それらは、低血糖の危険なしに、過度の脂肪沈着の排除を加速し、持続可能な体重減少を引き起こし、そして病的なグルコースレベルを正常レベルへと直接的に減少させるように相乗的な様式で作用し、そしてそれらは、ＧＬＰ‐１作動薬とスルホニル尿素との併用に関連する。

【０１０２】

二重ＧｌｕＧＬＰ‐１作動薬の相乗効果はさらに、例えば高コレステロールやＬＤＬなどの心血管疾患の危険因子の低減、並びに耐糖能の改善をもたらすこともできるが、それは、体重に対するそれらの効果とは完全に独立したものであり得る。

【０１０３】

そのため、本発明の化合物は、病的な肥満、並びにこれだけに限定されるものではないが、肥満に関係する炎症、肥満に関係する胆嚢疾患及び肥満誘発性睡眠時無呼吸症を含めた関連疾患及び健康状態を含めて、（例えば食欲、給食、食物摂取、熱量摂取、及び／又はエネルギー消費の制御によって）体重増加を予防するか、体重減少を促進するか、過剰体重を低減するか、又は肥満を処置するための医薬品として使用できる。本発明の化合物はさらに、メタボリック症候群、インスリン抵抗性、耐糖能異常、２型糖尿病、高血圧症、アテローム形成性脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、及び脳卒中の処置に使用できる。これらは、肥満に関連し得るすべての身体状態である。しかしながら、これらの身体状態に対する本発明の化合物の効果は、体重に対する効果を介して全体又は一部が媒介されていても、それとは無関係であってもよい。

【０１０４】

医薬組成物

本発明の化合物又はその塩は、貯蔵又は投与向けに調製された医薬組成物として処方されてもよく、その医薬組成物は、医薬的に許容し得る担体中に治療上有効な量の本発明の化合物又はその塩を通常含んでなる。

【０１０５】

本発明の化合物の治療上有効な量は、投与経路、処置される哺乳動物のタイプ、及び考慮している特定の哺乳動物の物理的特性に依存する。これらの因子とこの量を決定するためのそれらの相関は、医学分野の熟練した開業医にとって周知である。この量と投与方法は、最適な有効性を達成するために調整されることができ、医学分野の当業者に周知である体重、食餌、併用投薬、及び他の要素といった要因に依存し得る。

【０１０６】

ヒトでの使用に最も適当である投薬量サイズ及び投薬計画は、本発明によって得られた結果を指針としてよく、適切に設計された臨床試験で確認されてもよい。

有効投薬量及び治療プロトコールは、実験動物における低用量から出発して、次に効果を観察しながら投薬量を増大させ、系統的に投薬計画を変えて、従来の手段によって決定され得る。所定の対象についての最適な用量を決定するとき、臨床医は多数の要因を考慮に入れることができる。そのような考慮事項は、当業者にとって公知である。

【０１０７】

「医薬的に許容し得る担体」という用語には、あらゆる標準的な医薬担体が含まれる。治療用途のための医薬的に許容し得る担体は、医薬的技術分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.（A. R. Gennaro編、1985年）中に記載されている。例えば、弱酸性の又は生理的ｐＨの無菌の生理的食塩水やリン酸緩衝生理的食塩水を使用してもよい。ｐＨ緩衝剤は、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（ＴＲＩＳ）、Ｎ‐トリス（ヒドロキシメチル）メチル‐３‐アミノプロパン・スルホン酸（ＴＡＰＳ）、重炭酸アンモニウム、ジエタノールアミン、好ましい緩衝液であるヒスチジン、アルギニン、リジン又は酢酸塩、あるいはそれらの混合物であってもよい。前記用語は、ヒトを含めた動物における使用のためにＵＳ薬局方に掲載されたあらゆる薬剤がさらに包含される。

【０１０８】
「医薬的に許容し得る塩」という用語は、化合物の塩を指す。塩には、酸付加塩や塩基性塩などの医薬的に許容し得る塩が含まれる。酸付加塩の例には、塩酸塩、クエン酸塩、及び酢酸塩が含まれる。塩基性塩の例には、陽イオンがアルカリ金属、例えばナトリウムやカリウム、アルカリ土類金属、例えばカルシウムやアンモニウムイオン$^{+}N(R^{3})_{3}(R^{4})$｛ここで、Ｒ３及びＲ４は、独立に、任意に置換されたC_{1-6}－アルキル、任意に置換されたC_{2-6}－アルケニル、任意に置換されたアリール、又は任意に置換されたヘテロアリールを表す。｝から選択される塩が含まれる。医薬的に許容し得る塩のその他の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第１７版、Ed. Alfonso R. Gennaro（編）、Mark Publishing Company、Easton、PA、U.S.A.、１９８５年、並びにさらに最新の版、及びEncyclopaedia of Pharmaceutical Technologyに記載されている。
【０１０９】
「処置」は、有益な又は所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本願発明の目的のために、有益な又は所望の臨床結果には、検出可能であるか検知不可能であるかにかかわらず、症状の緩和、疾患の範囲の縮小、安定化した（すなわち、悪化しない）病状、疾患進行の遅延又は減速、病状の改善又は緩和、及び（部分的であるか全体的であるかにかかわらず）寛解が含まれるが、これだけに限定されるものではない。「処置」はさらに、処置を受けなかった場合に予想された生存と比較して生存を長引かせることを意味することもできる。「処置」は、障害の発生を予防するか又は病理を変更することを企図して実施される干渉である。従って、「処置」は、治療処置と予防対策（prophylactic or preventative measures）の両方を指す。処置を必要とする人には、既に障害を患っている人、並びに障害を予防すべき状態にある人が含まれる。
【０１１０】
医薬組成物は単位剤形であることができる。そのような形態では、組成物は適当な数量の活性成分を含む単位用量に分割される。単位剤形は、パッケージ化された調製物であることができ、そのパッケージには、個別の分量の調製物、例えばパックされた錠剤、カプセル剤、及びバイアル又はアンプル中の散剤が含まれている。単位剤形はまた、カプセル剤、カシェ剤、それ自体の錠剤であることもできるが、又はそれは、これらのいずれかを適当な数パッケージ化した形態であることもできる。それは、例えばペン形で、単回投与注射剤型で提供することもできる。組成物は、あらゆる好適な投与経路及び手段のために処方され得る。医薬的に許容し得る担体又は希釈剤には、経口投与、直腸投与、経鼻投与、（頬側や舌下を含めた）局所投与、膣投与又は（皮下、筋肉内、静脈内、皮内、及び経皮を含めた）非経口投与に好適な製剤に使用されるものが含まれる。製剤は、都合よく、単位剤形で提供されることができ、そして薬学の技術分野で周知の方法のいずれかによって調製されることができる。
【０１１１】
皮下又は経皮様式の投与が、本明細書中に記載した化合物にとって特に好適であり得る。
【０１１２】
併用療法
本発明の化合物は、糖尿病、肥満又は高血圧症の処置のための作用物質と共に併用療法の一部として投与することもできる。
【０１１３】
そのような場合、２種類の活性物質は、同じ医薬製剤の一部として又は別々の製剤として、一緒に又は別々に与えられることができる。
【０１１４】
よって、本発明の化合物（又はその塩）は、これだけに限定されるものではないが、メトホルミン、スルホニル尿素、グリニド、ＤＰＰ－ＩＶ阻害剤、グリタゾン、又はインスリンを含めた他の抗糖尿病薬と組み合わせて使用できる。好ましい実施形態では、化合物又はその塩は、適当な血糖コントロールを達成するためにインスリン、ＤＰＰ－ＩＶ阻害

剤、スルホニル尿素又はメトホルミン、特にスルホニル尿素又はメトホルミンと組み合わせて使用される。よりいっそう好ましい実施形態では、化合物又はその塩は、適当な血糖コントロールを達成するために、インスリン又はインシュリン類似体と組み合わせて使用される。インシュリン類似体の例には、Ｌａｎｔｕｓ、Ｎｏｖｏｒａｐｉｄ、Ｈｕｍａｌｏｇ、Ｎｏｖｏｍｉｘ、及びＡｃｔｒａｐｈａｎｅ ＨＭが含まれるが、これだけに限定されるものではない。

【０１１５】

化合物又はその塩は、これだけに限定されるものではないが、グルカゴン様ペプチド受容体１作動薬、ペプチドＹＹ又はその類似体、カンナビノイド受容体１拮抗薬、リパーゼ阻害剤、メラノコルチン受容体４作動薬、又はメラニン濃縮ホルモン受容体１拮抗薬を含めた抗肥満薬と組み合わせてさらに使用されることができる。

【０１１６】

類似体化合物又はその塩は、これだけに限定されるものではないが、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシンII受容体遮断薬、利尿剤、ベータ遮断薬、又はカルシウムチャネル遮断薬を含めた抗高血圧剤と組み合わせて使用されることもできる。

【０１１７】

方法

グルカゴン類似体の一般的合成

固相ペプチド合成を、ポリスチレン樹脂（TentaGel S Ram）上のＮＭＰにおいて標準的なＦｍｏｃストラテジーを使用したマイクロ波支援合成装置によるＳＰＰＳとして実施した。塩基としてのＤＩＰＥＡと一緒に、ＨＡＴＵをカップリング試薬として使用した。Ｐｉｐｅｒｉｄｌｎｅ（ＮＭＰの２０％）は脱保護基に使用した。

擬プロリン：Ｆｍｏｃ‐Ｐｈｅ‐Ｔｈｒ（．Ｐｓｉ．Ｍｅ、Ｍｅ ｐｒｏ）‐ＯＨ及びＦｍｏｃ‐Ａｓｐ‐Ｓｅｒ（．Ｐｓｉ．Ｍｅ、Ｍｅ ｐｒｏ）‐ＯＨ（NovaBiochemから購入）を適切な場所で使用した。

【０１１８】

切り出し：

未精製ペプチドを、９５／２．５／２．５％（ｖ／ｖ）のＴＦＡ／ＴＩＳ／水を用いて室温にて２時間処理することによって樹脂から切り出した。配列内にメチオニンがあるペプチドについては、９５／５％（ｖ／ｖ）のＴＦＡ／ＥＤＴの混合物を使用した。ＴＦＡの大部分を減圧下で取り除き、未精製ペプチドを、沈殿させ、ジエチルエーテルで洗浄し、そして周囲温度にて恒量まで乾燥させた。

【０１１９】

アシル化グルカゴン類似体の一般的合成

ペプチド骨格を、それがまだ樹脂に取り付けられているペプチドによってリジン残基の側鎖上でアシル化されること、及びアシル化されるべきリジン上のイプシロン・アミンを除いて、側鎖基上で完全に保護されていることを除いて、グルカゴン類似体の一般的合成について先に記載したとおり合成する。アシル化されるべきリジンを、Ｆｍｏｃ‐Ｌｙｓ（ｉｖＤｄｅ）‐ＯＨの使用によって組み込む。ペプチドのＮ末端を、ＮＭＰ中のBoc_2Oを使用してＢｏｃ基で保護する。ペプチドがまだ樹脂に取り付けられているうちに、ｉｖＤｄｅ保護基を、ＮＭＰ中の２％ ヒドラジン水和物を使用して選択的に切り出す。そして、保護されていないリジン側鎖を、最初にＦｍｏｃ‐Ｇｌｕ‐ＯｔＢｕのようなスペーサー・アミノ酸に結合させ、それを、ピペリジンで脱保護し、先に記載したとおり標準的なペプチドカップリング法を使用して脂肪酸でアシル化する。あるいは、Ｎ末端のヒスチジンを、Ｂｏｃ‐Ｈｉｓ（Ｂｏｃ）‐ＯＨとして始めから組み込むこともできる。樹脂からの切り出しと精製を、先に記載したとおり実施する。

【０１２０】

ペプチドの安定性の分析

グルカゴン類似体を、固形の化合物として４０℃にてインキュベートし、そして０．１ＭのＨＣｌ水溶液（２ｍｇ／ｍｌ）中の溶液として溶解した。溶液を４０℃にてインキュ

ベートした。残留している完全なグルカゴン類似体を、２２０ｎＭにおけるＵＶシグナルの積分によってＲＰ‐ＨＰＬＣにより計測した。残留率（％）は相対安定性の評価基準である。

【０１２１】

グルカゴン化合物の固体及び溶液を、分析前に０．２ｍｇ／ｍＬの濃度までＨＰＬＣ溶媒中に希釈し、そして適切な時点にて分析した。

【０１２２】

【表１】

表１．分析HPLCの設定

カラム	Gemini C18 150x3mm
グラジエント(時間;%B)	(0～3分;18%B) (3～22分;45%B) (22～23分;95%B) (23～24分;18%B) (24～30分;18%B)
溶媒A	1%のMeCN:MQW中に0.1%のTFA
溶媒B	MeCN中に0.085%のTFA
流量	0.300mL/分
注入量	35μL
カラム温度	30℃
UV検出	220nm

【０１２３】

ヒトグルカゴン受容体及びＧＬＰ‐１受容体を発現する細胞株の作出

ヒト・グルカゴン受容体（グルカゴンＲ）（一次受入番号Ｐ４７８７１）又はヒト・グルカゴン様ペプチド１受容体（ＧＬＰ‐１Ｒ）（一次受入番号Ｐ４３２２０）のどちらかをコードするｃＤＮＡを、それぞれｃＤＮＡクローンＢＣ１０４８５４（ＭＧＣ：１３２５１４／ＩＭＡＧＥ：８１４３８５７）又はＢＣ１１２１２６（ＭＧＣ：１３８３３１／ＩＭＡＧＥ：８３２７５９４）からクローン化した。グルカゴンＲ又はＧＬＰ‐１‐ＲをコードするｄｓＤＮＡを、サブクローニングのために端末の制限部位をコードするプライマーを使用してＰＣＲによって増幅した。５’末端プライマーは、効果的な翻訳を確実にするために近コザック・コンセンサス配列をさらにコードした。グルカゴンＲとＧＬＰ‐１‐ＲをコードするｄｓＤＮＡの忠実度を、ＤＮＡ配列決定法によって確認した。グルカゴンＲ又はＧＬＰ‐１‐ＲをコードするｄｓＰＣＲ産物を、ネオマイシン（Ｇ４１８）耐性マーカーを含んでいる哺乳動物発現ベクター内にサブクローニングした。

【０１２４】

グルカゴンＲ又はＧＬＰ‐１‐Ｒをコードする哺乳動物発現ベクターを、標準的なリン酸カルシウムトランスフェクション法によってＨＥＫ２９３細胞内にトランスフェクトした。トランスフェクションから４８時間後に、限界希釈クローニングのために細胞を播種し、培地中の１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を用いて選択した。３週間後に、グルカゴンＲ及びＧＬＰ‐１‐Ｒを発現する細胞の１２個の生き残ったコロニーを採取し、増殖させ、以下で記載するとおりグルカゴンＲ及びＧＬＰ‐１‐Ｒ有効性アッセイにおいて試験した。化合物プロファイリングのために、１つのグルカゴン‐Ｒ発現クローンと１つのＧＬＰ‐１‐Ｒ発現クローンを選択した。

【０１２５】

グルカゴン受容体及びＧＬＰ‐１‐受容体有効性アッセイ

０．０１％のポリ‐Ｌ‐リジンをコートした９６‐ウェルのマイクロタイタープレート内に１ウェルあたり４００００個の細胞の割合で、ヒト・グルカゴン‐Ｒ又はヒトＧＬＰ‐１‐Ｒを発現するＨＥＫ２９３細胞を播種し、１００μｌの成長培地中での培養において１日成長させる。分析の日に、成長培地を取り除き、細胞を２００μｌのＴｙｒｏｄｅ緩衝液で１回洗浄した。漸増濃度の試験ペプチド、１００μＭのＩＢＭＸ、及び６ｍＭの

グルコースを含有する１００μｌのＴｙｒｏｄｅ緩衝液中、３７℃にて最長１５分間、細胞をインキュベートした。２５μｌの０．５Ｍ ＨＣｌを添加することによって反応を停止させ、氷上にて６０分間インキュベートした。ｃＡＭＰ含有量を、Perkin‐Elmer製のFlashPlate（登録商標）ｃＡＭＰキットを使用して推定した。基準化合物（グルカゴン及びＧＬＰ‐１）と比較したEC_{50}と相対的有効性を、コンピューター支援曲線適合法によって推定した。

【０１２６】

初代ラット脂肪細胞における脂肪分解

脂肪分解に対するグルカゴン類似体の効果を、ラット脂肪細胞の初代培養において評価した。脂肪細胞を、健常な若年成人Sprague-Dawleyラットから摘出した副睾丸脂肪から単離した。脂肪塊を、細かく刻み、４％ＢＳＡ（KRB‐BSA）含有クレブス‐リンゲル緩衝液中のコラゲナーゼ（１ｍｇ／ｍｌ）と一緒に３７℃にて６０分間インキュベート及び振盪（２２０ｒｐｍ）した。懸濁液を、ナイロン・フイルター（１６０μｍのポアサイズ）を通して濾過し、そして濾液を２００ｘｇにて３分間遠心分離した。脂肪細胞の上部浮動層の下の下部媒質を、毛細管ピペットで取り除いた。脂肪細胞を、再懸濁と遠心分離によってＫＲＢ‐ＢＳＡ緩衝液中で３回洗浄した。脂肪細胞を、ＫＲＢ‐ＢＳＡ中に再懸濁し、混合し、インキュベートし、そして９６‐ウェルプレート（５００００細胞／ウェル）内で１ｍｌの全容積中、試験化合物と一緒に３７℃にて６０分間振盪した。プレートを、インキュベーション後少なくとも１０分間氷上に置き、続いて２００ｘｇにて３分間遠心分離した。脂肪細胞層下の緩衝液３００μｌを、９６‐ウェルプレート内に回収した。この過程をもう２回繰り返し、そして各培養物から３回分の抽出物を回収し、それを一緒に貯留した。脂肪細胞培養物における脂肪分解によって形成したグリセロールを、脂肪細胞抽出のアリコート（２５μｌ）に遊離グリセロール試薬（２００μｌ）を加え、室温にて１５分間インキュベートし、そして５４０ｎｍにて吸光度を計測するることによって計測した。

【０１２７】

ｄｂ／ｄｂマウスにおける経口グルコース負荷試験（ＯＧＴＴ）

ｄｂ／ｄｂマウスに、一晩断食させ、そしてビヒクル（酢酸緩衝液、２０ｍＭの酢酸、２５０ｍＭのマンニトール、ｐＨ５．０）又は試験化合物（５ｍｌ／ｋｇ、腹腔内）エキセンジン‐４（ＰＢＳ中に０．５６、１．６７及び５．０ｎｍｏｌ／ｋｇ）とＺＰ２６６３（配列番号４）（酢酸緩衝液中に５及び４５ｎｍｏｌ／ｋｇ）の投与（腹腔内）直前に最初の血液サンプル（空腹時血糖値）を採血した。実験中、動物は断食したままにして、混乱した食餌摂取を予防した。１５分後に、経口用量のグルコース（５ｍｌ／ｋｇ中に１ｇ／ｋｇ）を与え、そしてｔ＝３０分、ｔ＝６０分、ｔ＝１２０分、及びｔ＝２４０分にＢＧレベルを計測した。

【０１２８】

ベースライン（ｔ＝０）からの差を、それぞれの時点について計算し、そして$AUC_{0\text{-}240分}$の値を決定した。一元配置ＡＮＯＶＡ及びＤｕｎｎｅｔｔｓ事後検定によるＡＵＣ値の統計的分析を、GraphPad Prismバージョン４を用いて実施した。差はｐ＜０．０５の水準で有意であると見なした。

【０１２９】

正常なマウスにおける食餌摂取

研究の１週間前に、Ｃ５７Ｂｌ／６マウス（８週齢）（各群にＮ＝９～１２匹の動物）を、０．２ｍｌのビヒクルの連日注射（皮下）による処置に適合させ、週に２回のそれらの計量によって取り扱いに順化させた。実験開始前日に、マウスを、同じ位の体重（ＢＷ）を持つ群に階層化した。階層化マウス群に、一晩断食させ、そして$PYY_{3\text{-}36}$（３０ｎｍｏｌ／ｋｇ）（内部陽性対照）、グルカゴン（５００ｎｍｏｌ／ｋｇ）及びＺＰ２６６３（配列番号４）（５００ｎｍｏｌ／ｋｇ）又はビヒクル（ＰＢＳ）を用いて処置した（１０μｌの試験溶液／ｇ ＢＷ、皮下）。一時間後に、あらかじめ計量した食餌をマウスに与え、一時間後に残っている食餌の重量を計ることによって食餌摂取を計測し、そし

て体重に対して相対的に表した（ｍｇ食餌／ｇ ＢＷ）。一元配置ＡＮＯＶＡ及びＤｕｎｎｅｔｔｓ事後検定による食餌摂取データの統計的分析を、GraphPad Prismバージョン４を用いて実施した。差は、０．０５の水準で有意であると見なした。

【０１３０】

体重増加及び血漿コレステロールに対するＧＬＰ‐１と二重ＧｌｕＧＬＰ‐１作動薬を用いた食餌誘発性肥満（ＤＩＯ）マウスの２８日間の処置の効果

薬物処置の４週間前に、Ｃ５７Ｂｌ／６雄マウス（７週齢）（各群にＮ＝９～１２匹の動物）に高脂肪食（ＨＦＤ）を与え、そして２０００／０８００時にライトのオン／オフを用いてそれらの日夜サイクルを逆転した。薬物投与の開始１週間前に、実験動物を、０．１ｍｌのビヒクルの連日注射（皮下）によって処置に適合させ、週に２回のそれらの計量による取り扱いに順化させた。実験開始前日に、マウスを、同じ位の体重（ＢＷ）を持つ群に階層化し、そして翌日に、階層化マウス群を、ＺＰ２６６３（配列番号４）（５００ｎｍｏｌ／ｋｇ）又はビヒクル（酢酸緩衝液、２０ｍＭの酢酸、２５０ｍＭのマンニトール、ｐＨ５．０）で処置した（１日２回；皮下）。オキシントモジュリン及びエキセンジン‐４をＰＢＳ溶液中で与えた（ｐＨ７．４；２．５μｌ／ｇ ＢＷ）のに対して、ＺＰ２６６３（配列番号４）を等張酢酸緩衝液中で与えた（ｐＨ４．８；２．５μｌ／ｇ ＢＷ）。普通食を維持した非肥満対象群を、ＤＩＯ群と同じ処置計画でビヒクルを用いて処置した。体重を毎日記録し、そして研究を通じて、体重補正した用量のペプチドを投与するのに使用した。屠殺前、動物に一晩断食させた。次の朝の頸椎脱臼の直前に眼血液サンプル（０．６ｍｌのＥＤＴＡ）を得た。血液の血漿サンプルを、市販キットを使用したコレステロール、ＨＤＬ、及びＬＤＬの分析まで－８０℃にて保存した。処置期間を通じた体重増加を、処置開始時のその体重を引き算することによって各動物について計算した。

【０１３１】

体重増加とコレステロールに対する処置の効果を、GraphPad Prismバージョン４を使用して、反復測定のある二元ＡＮＯＶＡ及びＢｏｎｆｅｒｏｎｉ事後検定によって評価した。差は、０．０５の水準で有意であると見なした。

【実施例】

【０１３２】

結果

実施例１：ペプチドの安定性

ＨＣｌストレス溶液中でのインキュベーションの結果を、下記の表２に示す。固体の化合物すべてが、９０％超の純度の回収率で４０℃にて５週間にわたり安定していた。しかしながら、化合物の酸性分解の結果は、グルカゴン類似体が天然グルカゴンに比べて４倍安定していることを示している。

【０１３３】

【表２】

表２．ペプチドの安定性

ZP 化合物	回収率(%) 固体ペプチド	回収率(%) 0.1M HCl
グルカゴン	91	15
2663	95	71

【０１３４】

実施例２：グルカゴン受容体及びＧＬＰ‐１受容体に対する有効性

【表３】

表３．グルカゴン受容体及びGLP－1受容体についてのEC_{50}値

		GLP-1R EC_{50} (nmol)	GLUR EC_{50} (nmol)
グルカゴン		2.0	0.10
OXM		1.0	0.50
エキセンジン－4		0.02	>1,000
ZP2663 (配列番号4)	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA-NH2	0.06	0.06
L006-0082 (配列番号5)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFIEWLLSA-NH2	0.09	0.12
L006-0083 (配列番号6)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVEWLLSA-NH2	0.08	0.12
L006-0084 (配列番号7)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIQWLLSA-NH2	0.07	0.13
L006-0090 (配列番号8)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFIEWLLSA-NH2	0.15	0.22
L006-0093 (配列番号9)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDDRRARDFIDWLLSA-NH2	0.07	0.10
L006-0094 (配列番号10)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDKRRAEDFIKWLLSA-NH2	0.16	0.25
L006-0128 (配列番号11)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIRWLLSA-NH2	0.16	0.22
L006-0138 (配列番号12)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLRA-NH2	0.29	0.38
L006-0081 (配列番号13)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDSRRAKDFIEWLLSA-NH2	0.14	0.23
L006-0108 (配列番号14)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLLSA-NH2	0.53	0.81
L006-0129 (配列番号15)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIDWLLSA-NH2	0.20	0.24
L006-0136 (配列番号16)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLAA-NH2	0.22	0.33
L006-0295 (配列番号17)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA-OH	0.28	0.12

印「*」をつけた化合物は、90％未満の純度しかない未精製ペプチドである。EC_{50}は50％の純度に補正されている。

【０１３５】

実施例３：脂肪分解アッセイ

【表４】

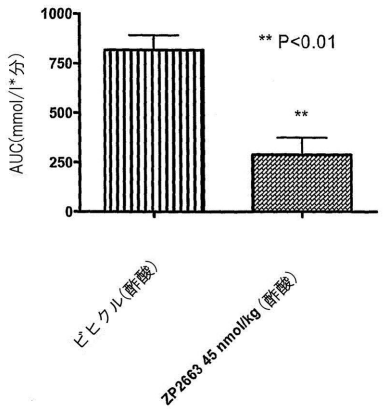
表４．初代ラット脂肪細胞培養における刺激
（詳細については方法を参照のこと）

化合物	EC50 (nM)
エキセンジン－４	効果なし
グルカゴン	6
OXM	180
ZP2663 (配列番号4)	4.4

【０１３６】
エキセンジン－４及びＯＸＭは、初代脂肪細胞培養物における脂肪分解に対して効果がないか又は効果はわずかであり、ＺＰ２６６３（配列番号４）は、グルカゴンと同等であり、且つ、ＯＸＭの４０倍強力であった。ＺＰ２６６３（配列番号４）を用いたＤＩＯマウスの４週間の処置が脂肪沈着を有意に減少させたという知見は、初代脂肪細胞培養物の脂肪代謝で観察された効果（表４）と一致する。
【０１３７】
実施例４：ｄｂ／ｄｂマウスにおける経口耐糖能に対する効果
ＺＰ２６６３（配列番号４）は、糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスにおいてＯＧＴＴ中に計測された耐糖能を有意に改善した（図１）。ＺＰ２６６３（配列番号４）は、４５ｎｍｏｌ／ｋｇにて耐糖能を６４．９％改善した。
【０１３８】
実施例５：マウスの食餌摂取に対する効果
ビヒクル処置動物は、最初の１時間で０．０３３±０．００１ｇ食餌／ｇ体重を食べた（図２）。ＰＹＹ（３－３６）は、これまでの知見から予想されるような食欲抑制作用を示した。ＺＰ２６６３（配列番号４）（５００ｎｍｏｌ／ｋｇ）は、ペプチド注射後の最初の１時間、食餌摂取を有意に減少させた（図２）。グルカゴンは食餌摂取に対して効果がなかった。
【０１３９】
実施例６：食餌誘発性肥満マウスにおける体重増加に対する皮下投与の効果
ＺＰ２６６３（配列番号４）は、普通食（chow）摂取で観察されたのと同じようなレベルまで体重増加を減少させた（図３）。体重増加は、ビヒクル群に比べて統計的に有意に少なかった。
【０１４０】
実施例７：ＬＤＬ及びＨＤＬに対する効果
エキセンジン－４は非常に強力なＧＬＰ－１Ｒ作動薬であるが、ＧｌｕＲに対して効果がなく、また先に記載したラット脂肪細胞の脂肪分解アッセイにおいても効果がなかった。さらに、エキセンジン－４は、総コレステロール、ＨＤＬ、ＬＤＬの血中濃度又はＨＤＬ／ＬＤＬ比に対して効果がなかった（図４、５）。
【０１４１】
対照的に、ＺＰ２６６３（配列番号４）を用いたＤＩＯマウスの処置は、ビヒクルと比較してＬＤＬコレステロールの血中濃度（Ｐ＝０．０００１）並びにＨＤＬ／ＬＤＬ比（Ｐ＝０．０００６）に対して有意な効果があった（図４、５）。

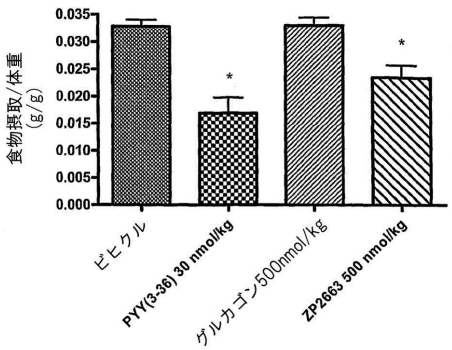
【図１】

図1



【図２】

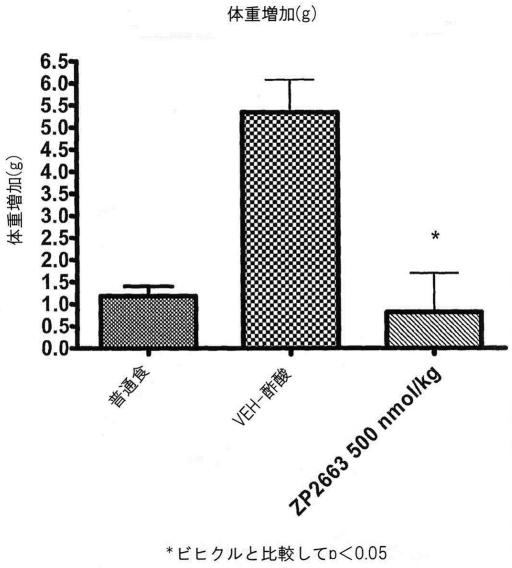
図2



*ビヒクルと比較してp＜0.05

【図３】

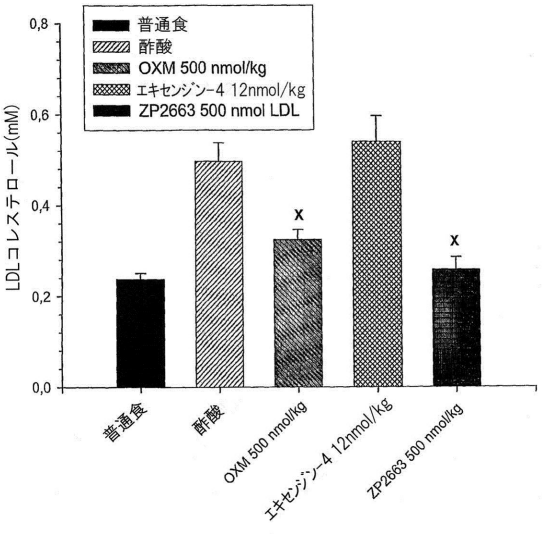
図3



*ビヒクルと比較してp＜0.05

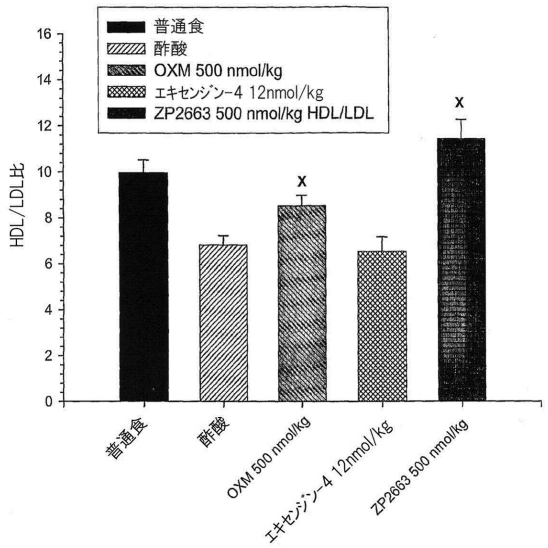
【図４】

図4



【図５】

図5



【配列表】

0006018129000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61P	***9/10***	***(2006.01)***	A61P	9/10	101
A61P	***9/12***	***(2006.01)***	A61P	9/12	
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	A61P	9/10	103
			A61P	9/10	
			C12N	15/00	A

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(74)代理人 100192201
弁理士 岡部 佐知子
(72)発明者 エッディ メイエール
デンマーク国, デーコー－３５００ ベルレーセ, ブリンゲバッケン ８８
(72)発明者 ディッテ リベル
デンマーク国, デーコー－２０００ フレデリクスベルウ, ノルドレ ファサンバイ ３７ベー, ２．テホ
(72)発明者 マリエ スコブガール
デンマーク国, デーコー－２１００ ケベンハウン オー, ストランドベーイェン ７５ アー, ３．テホ
(72)発明者 ビヤルネ ドゥエ ラールセン
デンマーク国, デーコー－４０００ ロスキルデ, ヒンメレブ, レーホルム １２
(72)発明者 イエンス ローゼングレン ダウガール
デンマーク国, デーコー－２８３０ ビルム, バッケバイ ６
(72)発明者 トリネ スコブルン リゲ ネールプ
デンマーク国, デーコー－３６００ フレデリクスン, ニガーデ ４８

審査官 星 浩臣

(56)参考文献 国際公開第２００８／１０１０１７（WO, A２）
特許第５６３５５３２（ＪＰ, Ｂ２）
国際公開第２００７／１００５３５（WO, A２）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ