

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6538645号
(P6538645)

(45) 発行日 令和1年7月3日(2019.7.3)

(24) 登録日 令和1年6月14日(2019.6.14)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 14/62	(2006.01)	C07K	14/62
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00
C07K 14/575	(2006.01)	C07K	14/575
C07K 14/605	(2006.01)	C07K	14/605
C07K 14/65	(2006.01)	C07K	14/65

請求項の数 11 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-500671 (P2016-500671)
(86) (22) 出願日	平成26年3月5日(2014.3.5)
(65) 公表番号	特表2016-512255 (P2016-512255A)
(43) 公表日	平成28年4月25日(2016.4.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/020801
(87) 國際公開番号	W02014/158900
(87) 國際公開日	平成26年10月2日(2014.10.2)
審査請求日	平成29年3月3日(2017.3.3)
(31) 優先権主張番号	61/783,491
(32) 優先日	平成25年3月14日(2013.3.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	507277642 インディアナ ユニバーシティ リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION アメリカ合衆国 46202 インディアナ州 インディアナポリス インディアナ アベニュー 518
(74) 代理人	100086771 弁理士 西島 孝喜
(74) 代理人	10008694 弁理士 弟子丸 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インスリン-インクレチン複合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グルカゴン関連ペプチド及びインスリンペプチドを含むインスリニアゴニスト/インクレチン複合物であって、

該グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端が、ペプチド結合を介して、該インスリンペプチドへ、該インスリンペプチドのN-末端アルファアミンを経て連結されており、

該グルカゴン関連ペプチドが、

HAEGTFTSDVSSYLEEQAAREFI AWLVRGRG (配列番号:700) 、

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI AWLVKGRG (配列番号:703) 、

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI CWLVKGR (配列番号:717) 、

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (配列番号:701) 又は

HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT (配列番号:699) の配列を含み、

該インスリンペプチドが、配列

GPEX₂₅LCGAX₃₀LVDALYLVCADX₄₂GFYFNX₄₈X₄₉GAGSSSSRRGIVDECCX₈RSCDLRRLENYCN - R₁₃ (配列番号:144) 、

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTGAGSSSSRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN - R₁₃ (配列番号:143) 又は

GPEHLCGAHLVDAVLVCGDRGFYFNDRGAGSSSSRRGIVDECCCHRSCDLRRLENYCN (配列番号:145)

(式中、

X₈は、フェニルアラニン又はヒスチジンであり、

10

20

X_{25} は、ヒスチジン又はスレオニンであり、
 X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸又はシステイン酸であり、

X_{42} は、アラニン、オルニチン又はアルギニンであり、

X_{48} は、リジン又はアスパラギン酸であり、

X_{49} は、プロリン、オルニチン又はアルギニンであり、さらに

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。)を含む単一鎖インスリンアナローグである、前記複合物。

【請求項2】

前記グルカゴン関連ペプチドが、

HAEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIawlVRGRG (配列番号:700) 又は

10

HSQGTFTSDYLSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (配列番号:701) の配列を含み、

前記単一鎖インスリンアナローグが、配列

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTGAGSSSSRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN - R₁₃ (配列番号:143)

又は

GPEHLCGAHLVDALYLVCGDRGFYFNDRGAGSSSSRRGIVDECCHRSCDLRRLENYCN (配列番号:145)

を含む、請求項1に記載のインスリンアゴニスト/インクレチン複合物。

【請求項3】

前記複合物が、配列番号:132又は配列番号:135の配列を含む、請求項1に記載のインスリンアゴニスト/インクレチン複合物。

【請求項4】

20

親水性部分が、前記複合物のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結されている、請求項1から3のいずれか1項に記載の複合物。

【請求項5】

親水性部分が、A14、A15、B0、B1、B10、B22、B28、B29又は天然のグルカゴン (配列番号:701) の16、17、20、21、24若しくは29位に対応する1つ以上の位置に、又は該グルカゴン関連ペプチドのC-末端領域に共有結合により連結されている、請求項4に記載の複合物。

【請求項6】

前記親水性部分がポリエチレングリコールである、請求項5に記載の複合物。

【請求項7】

30

あるアミノ酸側鎖に共有結合により連結されているアシル基又はアルキル基をさらに含む、請求項1から6のいずれか1項に記載の複合物。

【請求項8】

前記アシル基又はアルキル基が、天然のグルカゴン (配列番号:701) の10位に対応するグルカゴン関連ペプチドの位置に、又はインスリンペプチドのA14、A15、B0、B1、B10、B22、B28、B29から選択される1つ以上の位置に共有結合により連結されている、請求項7に記載の複合物。

【請求項9】

請求項1から8のいずれか1項に記載の複合物、又は医薬的に許容できるその塩、及び医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。

40

【請求項10】

インスリンアゴニスト/インクレチン複合物をその必要がある患者に投与するためのキットであって、前記キットが請求項9に記載の医薬組成物及び前記組成物を患者に投与するための装置を含む、前記キット。

【請求項11】

請求項9に記載の組成物の複合物又は医薬的に許容できるその塩の、糖尿病治療薬の製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

50

関連出願の相互引用

本出願は、米国仮特許出願No.61/783,491（2013年3月14日出願）（前記文献の内容は参考によりその全体が本明細書に組み入れられる）の優先権を主張する。

電子提出資料の参照による組み入れ

参考によりその全体が組み入れられるものは、本明細書とともに提出され以下のように特定されるコンピュータ読み出し可能配列表である：“27137_PCT_SL.txt”と命名された1箇の983KB ASCII（テキスト）ファイル（2014年3月5日作成）。

【0002】

背景技術

インスリンは、若年開始糖尿病及び後期成人開始糖尿病の治療に有効と立証された治療法である。当該ペプチドは、低い効能（天然のインスリンの約2%から9%）を有する、より大きな線状前駆体（プロインスリンと称される）として生合成される。プロインスリンは、35残基の接続ペプチド（Cペプチド）の選択的除去によってタンパク分解的にインスリンに変換される。その結果生じる、インスリン“A鎖”（配列番号:1）及び“B鎖”（配列番号:2）の間のジスルフィド結合によって形成される合計51アミノ酸のヘテロ二重体は、インスリン受容体に対して高い効能（nM範囲）を有する。天然のインスリンは、関連するインスリン様増殖因子1受容体と比較してインスリン受容体に対し約100倍選択性の高い親和性を有するが、2つの異なるインスリン受容体アイソフォーム（A及びBと称される）に対してはほとんど選択性を示さない。

インスリン様増殖因子1及び2は単一鎖線状ペプチドホルモンであり、前記は、それらのA及びB鎖配列に高度な相同性を有し、天然のインスリンと約50%の相同性を共有する。IGF-A及びB鎖は“C-ペプチド”によって連結され、ここで2つのIGFのC-ペプチドはサイズ及びアミノ酸配列が異なる（第一のものは長さが12アミノ酸で第二のものは8アミノ酸である）。ヒトIGF-1は、配列番号:3に示すタンパク質配列を有する70aaの塩基性ペプチドであり、プロインスリンと43%の相同性を有する（Rinderknecht et al. (1978) J.Biol.Chem. 253:2769-2776）。ヒトIGF-2は、配列番号:4に示すタンパク質配列を有する67aaの塩基性ペプチドである。IGFは、インスリンA受容体アイソフォームよりもインスリンB受容体アイソフォームで顕著に低い活性を示す。

【0003】

出願人らは、以前にインスリン受容体で高い活性を示すIGF-1系インスリンペプチドアナローグを同定した（前記では、B鎖の本来のGln-PheジペプチドはTyr-Leuに取り替えられている）（PCT/US2009/068713を参照されたい（前記文献の開示は本明細書に組み入れられる））。そのようなアナローグ（本明細書ではIGFYLアナローグと称される）は、インスリンよりも容易に合成され、インスリン及びIGF-1受容体のためのコアゴニスト及び選択的なインスリン受容体特異的アナローグの開発を可能にする。さらにまた、これらのインスリンアナローグはまた、本開示にしたがって単一鎖インスリンアゴニストとして処方することができる。

インスリンA及びB鎖を含む単一鎖インスリンアナローグは以前に調製された（EP1,193,272及びUS2007/0129284を参照されたい）。しかしながら、単一鎖の高い効能を有するインスリンアゴニストはまた、インスリンB及びAペプチドを連結する接続ペプチドとしてIGF-1 Cペプチド又はそのアナローグを挿入することによって調製できる。C-ペプチド配列の個々のアミノ酸の選択的変異導入は、IGF-1受容体に比較してインスリンに対して高度に選択的なペプチドを生じる。

インクレチニンは、極めて多様な生理学的機能（グルコース恒常性、インスリン分泌、胃内容排出及び腸増殖とともに食物摂取の調節を含む）に必要とされる一群の胃腸ホルモンである。プレ-プログルカゴンは158アミノ酸の前駆体ポリペプチドであり、前記は種々の組織でプロセッシングを受け多数の異なるペプチドを形成する。インクレチニンには以下を含む多数のブリグルカゴン誘導ペプチドが含まれる：グルカゴン（配列番号:701）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1：アミノ酸7-36が配列番号:703として提供され、アミノ酸7-35が配列番号:704として提供される）、グルカゴン様ペプチド-2（GLP-2；配列番号:70

10

20

30

40

50

8) 及びオキシントモデュリン (OXM ; 配列番号:706) 。

【 0 0 0 4 】

グルカゴンは、プレ-プログルカゴンのアミノ酸33から61に対応する29アミノ酸のペプチドであり、一方、GLP-1は、プレ-プログルカゴンのアミノ酸72から108に対応する37アミノ酸ペプチドとして生成される。GLP-1(7-36)アミド (配列番号:703 ; C末端はアルギニンアミド) 又はGLP-1(7-37)酸 (配列番号:704 ; C末端はグリシン) はGLP-1の生物学的に強力な形態であり、GLP-1受容体で本質的に等価の活性を示す。

グルカゴンは、重篤な低血糖症の急性期治療で用いられる救命医薬である。オキシントモデュリンは、食欲を抑制し体重を低下させる薬理学的能力を有することが報告された。GLP-1受容体アゴニスト又は安定化GLP-1アナローグを用いた臨床試験は、このペプチドファミリーはII型糖尿病の有効な治療であることを立証した。 10

さらにまた、消化管抑制ポリペプチド (GIP) はまた、グルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチドとしても知られ、セクレチンファミリーホルモンのメンバーである。GIPは、GIP遺伝子によってコードされる153アミノ酸の前タンパク質から誘導され、生物学的に活性な42アミノ酸ペプチド (配列番号:707) として循環する。GIP遺伝子は、小腸で唾液腺と同様に発現され、胃酸分泌の弱い阻害因子である。胃におけるその阻害性作用に加えて、グルコースの存在下で、GIPは、生理学的用量で投与されたとき膵のベータ小島細胞によるインスリン放出を強化する。GIPは、膵臓インスリンの放出を刺激し、グルコース恒常性の維持に生理学的役割を果たすことができる腸因子として機能すると考えられる。 20

【 0 0 0 5 】

本明細書に開示するように、複合物は、インスリンペプチドとインクレチン (例えばグルカゴン関連ペプチドを含む) との間で形成され、該複合物はインスリン受容体及び対応するインクレチン受容体の双方でアゴニスト活性を有する。より具体的には、グルカゴン関連ペプチド (例えばGIP、GLP-1又はグルカゴン) の複合物は、インスリンペプチド活性の有利な改変をもたらすと予想される。例えば、グルカゴン受容体でインスリンペプチドに対してアゴニスト活性を有するペプチドの連結は複合物の肝臓への標的到達を強化すると予想される。なぜならば、グルカゴン受容体は優先的に肝臓に存在するからである。複合物の肝臓への標的到達は、肝臓がグルコース利用ではなくグルコース生成に主として必要とされるので所望される。したがって、肝臓を標的に設定することは、インスリンが他の組織 (例えば筋肉又は脂肪) と接触するときにグルコース生成の停止が生じるよりもグルコース生成の停止へのより安全なアプローチであり得る (前記他の組織では、グルコース生成の停止に加えて、グルコース使用もまた刺激され低血糖症の危険が高まる) 。さらにもう、膵臓のアルファ細胞にグルカゴン受容体が存在する。当該複合体のアルファ細胞へのデリバリーは追加のグルカゴン生成を抑制するか、又は低血糖症に対してアルファ細胞をより鋭敏にことができる。出願人らはまた、グルカゴン-インスリン複合物におけるグルカゴンの存在は、結合インスリン活性に対する緩衝剤として機能してよりベースラインに近い活性を提供し、したがって血中グルコースレベルの急上昇を回避することができると予想する。 30

【 0 0 0 6 】

同様に、インスリンペプチドと他のグルカゴン関連ペプチド (インクレチン、GLP-1及びGIPを含む) 及びGLP-1及び / 又はGIP受容体で活性を有する他の関連ペプチドとの複合物は、有益な特性を有する複合物を生じるであろうと予想される。例えば、GLP-インスリン複合物は、視床下部を標的として誘導され、食欲を低下させるとともに血中グルコースを低下させることができる。また別に或いはさらに加えて、GLP-インスリン複合物はベータ細胞を標的として誘導され、同化作用応答を駆動する (小島ベータ細胞のインスリン生成を高める) ことができる。

グルカゴン関連ペプチド-インスリンペプチド複合物はまた、プロドラッグ化学の使用による治療インデックスの改善、血漿タンパク質 (例えばアルブミン) の連結又は他の改変 (PEG化及びアシル化を含む) による作用時間の延長、及びグリコシル化による物理的 50

安定性の強化をもたらすと想定される更なる構造的強化に適している。C-ペプチドリンカ-を用いる単一鎖インスリンアナローグの調製はまた新規な構造的配置を提供し、それアローグでは、これらの化学的改変は首尾よく配置され得る。本インスリン複合物は主としてインスリン依存性糖尿病の治療で使用されよう。

【発明の概要】

【0007】

インスリンアゴニスト/インクレチン複合物が提供され、前記複合物はインスリン受容体及び対応するインクレチンの受容体の両受容体でアゴニスト活性を有する。複合物のインスリンペプチド成分は、天然のインスリンであっても又はインスリン受容体で活性を有する任意の公知のインスリンであってもよく、例えば公開国際出願WO96/34882、WO 2010/080607、WO 2010/080609、WO 2011/159882、WO/2011/159895及び米国特許No.6,630,348(前記文献の開示は参照により本明細書に組み入れられる)に開示された任意のインスリンペプチドが含まれる。複合物のインクレチン成分は、本明細書に開示する任意のグルカゴン関連ペプチドであることができ、前記には、例えば天然のグルカゴン、GLP-1、GIP又は1つ以上のインクレチン受容体で活性を有する任意の公知のインクレチン若しくはグルカゴン関連ペプチドが含まれる。本開示にしたがって使用される適切なグルカゴン関連ペプチドには、例えば、公開国際出願WO 2009/155258、WO 2009/058734、WO 2011/094337、WO 2009/148089、WO 2011/163473及びWO 2010/071807(前記文献の開示はその全体が本明細書に組み入れられる)に開示された任意のグルカゴン関連ペプチドが含まれる。

10

【0008】

20

ある実施態様にしたがえば、グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端は、インスリンペプチドのN-末端にペプチド結合を介して直に(融合ペプチドを形成する)又はスペーサーを介して間接的に連結される。ある実施態様にしたがえば、グルカゴン又はGLP-1とインスリンとの融合によって形成される複合物が提供され、前記複合物は、高い效能、複合物の対応する受容体での均衡のとれた活性、及び正常マウスに注射したときグルコースを低下させる性能を示す。ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチドのC-末端は、A鎖のA9、A14及びA15、B鎖のB1、B2、B10、B22、B28又はB29位から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖、B鎖のN-末端アルファアミン、A若しくはB鎖のカルボキシ末端、及び単一鎖インスリンアナローグのA鎖及びB鎖を連結する連結部分の任意の位置のアミノ酸の側鎖から別個に選択される位置を介してインスリンペプチドと共有結合により連結される。

30

本明細書で用いられるように、グルカゴン関連ペプチドのC-末端領域というとき、それぞれ天然のグルカゴン配列と関連して、グルカゴンペプチドの天然のC-末端、又はグルカゴンアナローグの天然のC-末端若しくはC-末端アミノ酸の欠失によって短縮されたグルカゴンアナローグのC-末端アミノ酸に付加された任意のアミノ酸を包含することを意図する。例えば、天然のグルカゴン関連ペプチドのC-末端を1から3アミノ酸によって延長させることができ、続いてこれらアミノ酸がC-末端領域のアミノ酸の側鎖又はC-末端カルボキシ基を介してインスリンペプチドに連結される。ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端は、インスリンペプチドのB鎖のアミノ末端領域と共有結合により連結される。ある実施態様では、インスリンペプチドは単一鎖インスリンアナローグであり、当該グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端領域は、インスリンペプチドのB鎖のアミノ末端と共有結合により連結される。

40

【0009】

ある実施態様では、複合物のインスリンペプチドは二鎖インスリンアナローグであり、分子内ジスルフィド結合を介して互いに連結されるA鎖及びB鎖を含む。さらに別の実施態様では、複合物は二鎖インスリンアナローグを含み、第一及び第二のグルカゴン関連ペプチドが、インスリンペプチドとB鎖のアミノ末端、A鎖のカルボキシ末端領域及びB鎖のカルボキシ末端領域から成る群から選択される位置で共有結合により連結される。ある実施態様では、第一及び第二のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン、GLP-1及びGIP受容体に対して異なる親和性/選択性を有する。

【0010】

50

ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴン、天然のGLP-1及び天然のGIPから成る群から選択される。ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは天然のグルカゴン又はグルカゴンアナローグであり、後者はグルカゴン受容体、GLP-1受容体又はGIP受容体から選択される1つ以上のインクレチン受容体で活性を有する。ある実施態様では、複合物のグルカゴン関連ペプチド成分は以下を含む：

(i) 1つから3つのアミノ酸改変を有するX1-X2-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-Z (配列番号:839) のアミノ酸配列、式中、

X1及び/又はX2は、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による切断に対するグルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然 (配列番号:701に対して) アミノ酸であり、Zは、-COOH、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH及びY-COOHから成る群から選択され (式中Yは1つから2つのアミノ酸)、さらにここで、

(1) ラクタム架橋がi位のアミノ酸及びi+4位のアミノ酸の側鎖を接続するか (式中iは12、16、20又は24)、又は

(2) グルカゴン関連ペプチドの16、20、21及び24位のアミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが、-二置換アミノ酸で置換されており、

かつ前記グルカゴン関連ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する、前記アミノ酸配列；

(ii) 配列番号:701のアミノ酸配列であって、

28位のAsnの荷電アミノ酸による置換、

28位のAsnのLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換、

28位におけるAsn、Asp又はGluによる置換、

28位におけるAspによる置換、

28位におけるGluによる置換、

29位のThrの荷電アミノ酸による置換、

29位のThrのLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換、

29位におけるAsp、Glu又はLysによる置換、

29位におけるGluによる置換、

29位の後に1つから3つの荷電アミノ酸の挿入、

29位の後にGlu又はLysの挿入、

29位の後にGly-Lys若しくはLys-Lys又は前記の組み合わせの挿入、

及びグループA若しくはグループB又は前記の組み合わせから選択される少なくとも1つのアミノ酸改変、

から成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸改変を含むように改変され、

ここで、グループAは、15位のAspのGluによる置換及び16位のSerのThr又はAIBによる置換から成る群から選択されるアミノ酸改変であり、さらに

グループBは、1位のHisのジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による切断に対する当該グルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、

2位のSerのジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による切断に対する当該グルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、

10位のTyrのPhe又はValによる置換、

12位のLysのArgによる置換、

20位のGlnのAla又はAIBによる置換、

21位のAspのGluによる置換、

24位のGlnのAla又はAIBによる置換、

27位のMetのLeu又はNleによる置換、

27 - 29位のアミノ酸の欠失、

28 - 29位のアミノ酸の欠失、

10

20

30

40

50

29位のアミノ酸の欠失、

又は前記の組み合わせから成る群から選択されるアミノ酸改変であり、かつここで前記グルカゴン関連ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する、前記アミノ酸配列；

(iii) 配列番号:701のグルカゴン関連ペプチドであって、

(a) GIPアゴニスト活性を付与する、1位のアミノ酸改変

(b) (1) i位及びi+4位のアミノ酸の側鎖間又はj位及びj+3位のアミノ酸の側鎖間のラクタム架橋(式中iは12、13、16、17、20又は24で、jは17である)、又は(2)当該アナローグの16、20、21及び24位のアミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全ての-, -二置換アミノ酸による置換、

10

(c) 27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変、及び

(d) 1つから6つの更なるアミノ酸改変、

を含むように改変され、ここで当該アナローグのGIP受容体の活性化のためのEC50が約10nM以下である、前記ペプチド；

(iv) $X_1X_2X_3GTFTSDX_{10}SX_{12}YX_{15}X_{16}X_{17}X_{18}AX_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}WLX_{27}X_{28}X_{29}$ の配列(配列番号:72)、

式中、

X_1 は、His、D-His、(Des-アミノ)His、ヒドロキシ-His、アセチル-His、ホモ-His又は-, -ジメチルイミダゾール酢酸(DMIA)、N-メチルHis、アルファ-メチルHis及びイミダゾール酢酸から成る群から選択され、

20

X_2 は、Ser、D-Ser、Ala、D-Ala、Val、Gly、N-メチルSer、アミノイソ酪酸(Aib)及びN-メチルAlaから成る群から選択され、

X_3 は、Gln、Glu、Orn及びNleから成る群から選択され、

X_{10} は、Tyr、Val及びTrpから成る群から選択され、

X_{12} は、Ser、Lys、シトルリン、Orn及びArgから成る群から選択され、

X_{15} は、Asp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択され、

X_{16} は、Ser、Gly、Glu、Gln、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択され、

X_{17} は、Arg、Gln、Lys、Cys、Orn、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニンから成る群から選択され、

30

X_{18} は、Arg、Ala、Lys、Cys、Orn、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニンから成る群から選択され、

X_{20} は、Gln、Lys、Arg、Orn及びシトルリンから成る群から選択され、

X_{21} は、Gln、Glu、Asp、Lys、Cys、Orn、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニンから成る群から選択され、

X_{23} は、Val及びIleから成る群から選択され、

X_{24} は、Ala、Gln、Glu、Lys、Cys、Orn、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニンから成る群から選択され、

X_{27} は、Met、Val、Leu及びNleから成る群から選択され、

40

X_{28} は、Asn、Arg、シトルリン、Orn、Lys及びAspから成る群から選択され、さらに

X_{29} は、Thr、Gly、Lys、Cys、Orn、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニンから成る群から選択される前記配列、又は配列番号:72のアナローグであって、ここで前記アナローグは1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28及び29位から選択される1つから3つのアミノ酸改変によって配列番号:72とは異なり、

前記グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体で天然のGLP-1の活性の少なくとも20%を示す；

(v) 10を超えないアミノ酸改変によって配列番号:701と異なるアミノ酸であって、16、20、21及び/又は24位にAIBによる1つ以上のアミノ酸置換並びにジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対して感受性の減少を提供する1位及び/又は2位におけるアミノ酸改変

50

を含み、前記グルカゴン関連ペプチドが、GLP-1受容体で天然のGLP-1の活性の少なくとも20%を示す、前記アミノ酸。

【0011】

ある実施態様では、複合物のインスリンペプチドはA鎖及びB鎖を含み、前記A鎖は配列GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈YCX₂₁-R₁₃（配列番号:19）を含み、前記B鎖は配列R₂X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号:20）を含み、式中、

X₄は、グルタミン酸又はアスパラギン酸であり、

X₅は、グルタミン又はグルタミン酸であり、

X₈は、ヒスチジン、スレオニン又はフェニルアラニンであり、

X₉は、セリン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₀は、イソロイシン又はセリンであり、

X₁₂は、セリン又はアスパラギン酸であり、

X₁₄は、チロシン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₅は、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、アラニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり、

X₁₇は、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、リジン、オルニチン又はグルタミンであり、

X₁₈は、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はスレオニンであり、

X₂₁は、アラニン、グリシン、セリン、バリン、スレオニン、イソロイシン、ロイシン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジン、トリプトファン、チロシン及びメチオニンから成る群から選択され、

X₂₅は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X₂₉は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X₃₀は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X₃₃は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X₃₄は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X₄₁は、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、

X₄₂は、アラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され、

X₄₅は、チロシン又はフェニルアラニンであり、

R₂₂は、AYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、PGPE（配列番号:11）、グリシン-プロリン-グルタミン酸トリペプチド、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、プロリン-グルタミン酸ジペプチド、アスパラギン-グルタミンジペプチド、グルタミン、グルタミン酸及びN-末端アミンから成る群から選択され、さらに

R₁₃はCOOH又はCONH₂である。ある実施態様では、複合物は、配列番号:132、配列番号:135、配列番号:139及び配列番号:140、又は1、2、3、4又は5アミノ酸改変によって配列番号:132、配列番号:135、配列番号:139又は配列番号:140と異なる前記のアナローグから成る群から選択される配列を含む。ある実施態様では、複合物は、1、2又は3アミノ酸置換によって配列番号:132、配列番号:135、配列番号:139又は配列番号:140と異なる配列を含む。

【0012】

ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は、B鎖のN-末端アルファアミンに、又はA鎖のA9、A14及びA15若しくはB鎖のB1、B2、B10、B22、B28若しくはB29位から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖に、又は単一鎖インスリンアナローグの連結部分のアミノ酸の側鎖に連結された親水性部分を含む。また別に或いはさらに加えて、親水性部分は、19、20、23、24、27、32、43位アミノ酸のいずれか又はC-末端領域でグルカゴン関連ペプチドに連結できる。

ある実施態様では、親水性部分はポリエチレン鎖であり、さらに別の実施態様では、ポリエチレン鎖は、インスリンペプチドが単一鎖インスリンアナローグであるときはインス

10

20

30

40

50

リンペプチド成分の連結部分のアミノ酸の側鎖に共有結合により結合される。ある実施態様では、インスリンペプチドは単一鎖インスリンであり、B及びA鎖を継ぎ合わせる連結部分は長さが17アミノ酸を超えないアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列は、配列GYGSSS_{X₅₇X₅₈}（配列番号:21）、GAGSSSRR（配列番号:22）又はGYGSSSX₅₇X₅₈APQT（配列番号:69）を含む（式中X₅₇及びX₅₈は別個にアルギニン、リジン又はオルニチンであり、さらにX₅₇及びX₅₈によって示されるアミノ酸は場合によって、当該位置のアミノ酸の側鎖に連結される親水性部分をさらに含む）。ある実施態様では、親水性部分はポリエチレングリコール鎖である。

アシル化又はアルキル化は、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物ペプチドの循環中の半減期を増すことができる。アシル化又はアルキル化は、インスリン受容体で作用開始を有利に先送りし及び/又は作用時間を延長することができる。グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物ペプチドは、同じアミノ酸の位置で（ここで（例えば連結部分の8位を含む）親水性部分が連結される）又は異なるアミノ酸の位置でアシル化又はアルキル化され得る。

【0013】

本開示に包含されるものはまた、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物及び医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物である。ある実施態様にしたがえば、医薬組成物が提供され、前記は、好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度レベルの本明細書に開示のグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のいずれか及び医薬的に許容できる希釈剤、担体又は賦形剤を含む。そのような組成物は、本明細書に開示の単一鎖インスリンアゴニストペプチドを少なくとも0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL、9mg/mL、10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL、15mg/mL、16mg/mL、17mg/mL、18mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、21mg/mL、22mg/mL、23mg/mL、24mg/mL、25mg/mL又は前記より高い濃度で含むことができる。ある実施態様では、医薬組成物は、滅菌され場合によって多様な包装容器に保存された水溶液を含む。他の実施態様では、医薬組成物は凍結乾燥散剤を含む。医薬組成物はさらにキットの部分として包装することができ、前記キットは、当該組成物を患者に投与するための使い捨て装置を含む。前記容器又はキットは、周囲室温又は冷蔵温度での保存のために付箋を付すことができる。

ある実施態様では、インスリン依存患者の血中グルコースレベルを調節する改善方法が提供される。前記方法は、単一鎖インスリンアゴニストペプチド又はその誘導体を、糖尿病の管理に治療的に有効な量で患者に投与する工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ヒトイインスリン調製のための二工程合成法の模式的大要を示す。本手順の詳細は実施例1に提供される。

【図2】精製した天然インスリンに対して合成ヒトイインスリンのインスリン受容体特異的結合を比較するグラフである。合成インスリンは図1に詳述するアプローチにより生成され、前記アプローチではA⁷-B⁷結合が第一に形成されるジスルフィドである。グラフに提示したデータによって示されるように、2つの分子は同様な結合活性を有する。

【図3】天然インスリン及びA19インスリンアナローグ（インスリン(p-NH₂-F)¹⁹）の相対的インスリン受容体結合を比較するグラフである。グラフに提示したデータによって示されるように、2つの分子は同様な結合活性を有する。

【図4】天然インスリン及びIGF(Y^{B16}L^{B17})アナローグの相対的インスリン受容体結合を比較するグラフである。グラフに提示したデータによって示されるように、2つの分子は同様な結合活性を有する。

【図5】ヒトイインスリン（A鎖、配列番号:1；B鎖、配列番号:2；及びC鎖、配列番号:141）並びにインスリン様増殖因子I及びII（IGF I、配列番号:3；及びIGF II、配列番号:4）のアミノ酸配列のアラインメントである。本アラインメントは、これら3つのペプチドが高レベルの配列同一性を共有することを示している（*は対応するアミノ酸が存在しない

10

20

30

40

50

空隙を示し、ダッシュ（-）はインスリンに存在するアミノ酸と同一のアミノ酸を示す）。

【図6】単一鎖インスリンアナローグを用いて形成されたGLP-1及びグルカゴン融合ペプチドセットの配列を示す。より具体的には、これら配列は、GLP1-インスリン複合物（GLP1-DP8；配列番号:132）及びグルカゴン-インスリン複合物（Glu-DP8；配列番号:135）を示す。これら2つの配列の以下のような更なる改変が提供される：1) A19位のチロシンがアラニンで置換され効果的にインスリン活性が除去される：GLP-インスリンA鎖Ala19（GLP1-DP8A19；配列番号:133）及びグルカゴン-インスリンA鎖Ala19（Glu-DP8A19；配列番号:136）；2) 22位のフェニルアラニンがアラニンで置換され、効果的にGLP-1活性が除去される：GLP1 Ala22（配列番号:134）；3) 3位のグルタミンのグルタミン酸による置換はグルカゴン活性を除去する（グルカゴンE3；配列番号:137）；及び4) 16位のセリンのグルタミン酸による置換はGLP-1及びグルカゴン活性を付加する（グルカゴンE16（配列番号:138））。

【図7】天然のインスリン、IGF-1及び天然のグルカゴンと比較した、合成GLP1-DP8複合物のクロマトグラフィー単離プール分画のインスリン及びGLP1受容体におけるEC₅₀値を示す。GLP1-DP8複合物の構造は図6に示されている。プール1はインスリン受容体で天然インスリンとほぼ同一の活性を示す。3つのプールは全てGLP1受容体で高い活性を示した。したがって、プール1の複合物は、天然のインスリン及び天然のGLP1とそれら2つの対応する受容体で同じように高い効能を示す。

【図8】天然のインスリン、IGF-1及び天然のグルカゴンと比較した、合成Glu-DP8複合物のクロマトグラフィー単離プール分画のインスリン及びGLP1受容体におけるEC₅₀値を示す。Glu-DP8複合物の構造は図6に示されている。プール1はインスリン受容体で天然インスリンと同様な活性を示し、グルカゴン配列の存在は当該複合物のインスリン受容体における活性を緩和する。プール1及び3はグルカゴン受容体で高い活性を示す。3つのプールは全てGLP1受容体で貧弱な活性を示す。したがって、プール1の複合物は、インスリン及びグルカゴンで高い効能を示すが、GLP1受容体に関しては選択性を維持する。

【図9A - 9C】血中グルコースレベルにおける天然インスリン並びにGlu-DP8及びGLP1-DP8複合物のin vivo作用を示す。マウスの皮下に、天然インスリン（図9A）を2通りの用量で（12nmol/kg又は60nmol/kg）、又は複合物の1つ（GLP1-DP8（図9B）又はGlu-DP8（図9C））を3通りの異なる濃度（12nmol/kg、60nmol/kg及び300nmol/kg）で注射した。複合物は、天然のインスリンよりも急激でない血中グルコースの下降及びより長期の半減期を示した（はるかに長い作用持続時間）。さらにまた、GLP1-DP8（図9B）は、Glu-DP8（図9C）よりもグルコース低下でより強い活性を有し、これは、インスリン活性に対するグルカゴンの緩衝から生じたと考えられる。

【図10】GLP1-DP8及びGLP1-DP8A19（インスリンA鎖の19位がアラニンに改変されてあるGLP1-DP8）のインスリン受容体におけるin vitro活性を提供する。A19位のアラニンによる置換はインスリン受容体におけるインスリンの活性を効果的に除去する。EC₅₀値は、インスリン及びGLP1-DP8の両方が強力なインスリン受容体アゴニストであるが、GLP-1及びGLP1-DP8A19はインスリン受容体で貧弱な活性を有することを示している。

【図11】Glu-DP8及びGlu-DP8A19、グルカゴン活性を除去するように改変されたグルカゴン-インスリン複合物（GluE3-DP8；グルカゴンペプチドの3位がグルタミン酸に改変されてある）及びグルカゴン受容体での活性を維持する改変物（GluE16-DP8；16位がグルタミン酸に改変されてある）のin vitroインスリン受容体活性（EC₅₀値）を示す。グルカゴン3位のグルタミン酸への置換はグルカゴン活性を効果的に除去することが知られている。インスリンのA19位のアラニンへの置換はインスリン受容体でのインスリン活性を効果的に除去することが知られている。EC₅₀値は、インスリン及びGlu-DP8はともに強力なインスリン受容体アゴニストであるが、グルカゴン及びGlu-DP8A19はインスリン受容体で貧弱な活性を有することを示している。GluE3-DP8及びGluE16-DP8はまたインスリン受容体で高い効能を示した。

【図12】Glu-DP8、GluE3-DP8及びGluE16-DP8、Glu-DP8A19及びGLP1-DP8のin vitroグル

10

20

30

40

50

カゴン受容体活性 (EC₅₀値) を示す。グルカゴンの3位のグルタミン酸への置換はグルカゴン活性を効果的に除去することが知られ、さらにインスリンのA19位のアラニンへの置換はインスリン受容体でのインスリン活性を効果的に除去することが知られている。グルカゴン16位のグルタミン酸への置換はグルカゴン及びGLP-1のコアゴニストを生じる。EC₅₀値は、グルカゴン、Glu-DP8及びGluE16-DP8は強力なグルカゴン受容体アゴニストであるが、GLP-1及びGLP1-DP8及びGluE3-DP8はグルカゴン受容体で貧弱な活性を有することを示している。したがって、該複合物は予想される活性を示した。

【図13】GLP-1、GLP-1-DP8、GLP-1A22-DP8、GLP-1-DP8A19、Glu-DP8及びGluE16-DP8のin vitro GLP-1受容体活性 (EC₅₀値) を示す。GLP-1A22-DP8は、22位がアラニンで置換されてある (GLP-1活性を効果的に除去することが知られている変更) インスリンとGLP-1の複合物である。EC₅₀値は、GLP-1、GLP-1-DP8及びGLP1-DP8A19は強力なGLP-1受容体アゴニストであるが、GLP-1A22-DP8、Glu-DP8及びGluE16-DP8はGLP-1受容体で貧弱な活性を有することを示している。したがって、該複合物は予想される活性を示した。

【図14A - 14B】DP8 (図14A) 又はGLP1-DP8A19 (図14B) を投与したC57BL/6マウスの血中グルコースレベルにおける当該列挙複合物の天然インスリンと比較したin vitro効果を示す。DP8又はGLP1-DP8A19を2通りの濃度 (60nmol/kg又は300nmol/kg) で投与した。DP8は血中グルコースを首尾よく低下させたが、GLP1-DP8A19は血中グルコースの有意な低下を示さなかった。

【図15A - 15C】Glu-DP8A19 (図15A) 又はGLP1A22-DP8 (図15B) 又はGluE3/DP8 (図15C) を投与したC57BL/6マウスの血中グルコースレベルにおける当該列挙複合物の天然インスリンと比較したin vivo効果を示す。Glu-DP8A19複合物はインスリン活性を欠くが、それでもなおグルカゴン刺激インスリン分泌からもたらされる血中グルコース低下をin vivoで誘発する。GLP1A22-DP8は22位での置換の結果としてグルカゴン活性を減少させたが、しかしながら複合物のインスリン成分は血中グルコースの活性減少を提供し、該複合物はインスリンの活性の約1/5を有する。GluE3/DP8はE3置換のためにグルカゴン活性を減少させたが、しかしながら当該複合物は天然のインスリンと比較してわずかに弱められたグルコース低下活性を有する。

【発明を実施するための形態】

【0015】

定義

本発明の開示及び特許請求の範囲では、以下の用語体系が下記に示す定義にしたがって用いられるであろう。

本明細書で用いられる“約”という用語は、記述されている値又は値の範囲より10パーセント高いか又は低いことを意味するが、ただし一切の値又は値の範囲をこのより広範囲の定義にのみ指定しようとするものではない。“約”という用語が先行する値又は値の範囲の各々はまた、当該記述されている絶対的値又は値の範囲が表すものを包含することが意図される。

本明細書で用いられるように“アミノ酸”という用語は、アミノ及びカルボキシル官能基の両方を含む任意の分子を包含し、ここでアミノ及びカルボキシル基は同じ炭素 (アルファ炭素) に付加される。アルファ炭素は場合によって1つ又は2つのさらに別の有機置換基を有し得る。本開示の目的のためには、その立体化学構造を指定することなくあるアミノ酸を指示する場合は、当該アミノ酸のL若しくはD型のどちらか又はラセミ混合物を包含することが意図される。しかしながら、アミノ酸がその3文字コードで指示されかつ上付き数字を含む場合には、該アミノ酸のD型は3文字コード及び上付き数字の前に小文字dを含むことによって指定され (例えばdLys⁻¹)、ここで小文字dを欠く指示 (例えばLys⁻¹) は該アミノ酸の天然のL型を指定することが意図される。この命名体系では、上付き数字の組み入れは当該インスリンアナローグ配列中の当該アミノ酸の位置を示し、ここで該インスリンアナローグ内に配置されるアミノ酸は、N-末端から連続的に付与される正の上付き数字によって指示される。N-末端に又は側鎖を介してインスリンアナローグペプチドに連結される追加のアミノ酸は、0から始まり該インスリンアナローグ配列からさらに離

10

20

30

40

50

れるにつれ増大する負の整数値が付与される。

本明細書で用いられるように“ヒドロキシリ酸”という用語は、改変されてアルファ炭素のアミノ基がヒドロキシリ基に取り替えられてあるアミノ酸を指す。

本明細書で用いられる“非コードアミノ酸”という用語は、以下の20のアミノ酸のいずれかのL-異性体ではない任意のアミノ酸を包含する：Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr。

【0016】

“生物活性ポリペプチド”は、生物学的作用を *in vitro* 及び / 又は *in vivo* で示すことができるポリペプチドを指す。

本明細書で用いられるように、一般的にペプチドというとき、改変されたアミノ及びカルボキシ末端を有するペプチドを包含することが意図される。例えば、標準的なアミノ酸を指示するアミノ酸配列は、N-及びC-末端に標準的なアミノ酸とともに、N-末端に対応するヒドロキシリ酸、及び / 又は末端カルボン酸の代わりにアミド基を含むように改変された対応するC-末端アミノ酸を含むことが意図される。

本明細書で用いられる“アシル化”アミノ酸は、自然に出現するアミノ酸にとって天然ではないアシル基を含むアミノ酸であり、それが生成される手段とは無関係である。アシル化アミノ酸及びアシル化ペプチドを生成する例示的方法は当業界で公知であり、ペプチドに組み入れる前にアミノ酸をアシル化するか、又はペプチド合成の後で該ペプチドを化学的にアシル化することを含む。いくつかの実施態様では、アシル基はペプチドに以下の1つ以上の現象を引き起こす：(i) 循環中の半減期の延長、(ii) 作用開始の先送り、(iii) 作用持続時間の延長、(iv) プロテアーゼ（例えばDPP-IV）に対する耐性の改善、及び(v) IGF及び / 又はインスリンペプチド受容体での効能の増加。

【0017】

本明細書で用いられるように“アルキル化”アミノ酸は、自然に出現するアミノ酸にとって天然ではないアルキル基を含むアミノ酸であり、それが生成される手段とは無関係である。アルキル化アミノ酸及びアルキル化ペプチドを生成する例示的方法は当業界で公知であり、ペプチドに組み入れる前にアミノ酸をアルキル化するか、又はペプチド合成の後で該ペプチドを化学的にアルキル化することを含む。いずれの特定の理論にも拘束されないが、ペプチドのアルキル化は、ペプチドのアシル化と類似する（同じではないとしても）作用（例えば、循環中の半減期の延長、作用開始の先送り、作用持続時間の延長、プロテアーゼ（例えばDPP-IV）に対する耐性の改善、及びIGF及び / 又はインスリン受容体での効能の増加）を達成するであろう。

本明細書で用いられるように“医薬的に許容できる担体”という用語は、任意の標準的な医薬担体、例えば、リン酸緩衝食塩水溶液、水、エマルジョン（例えば油/水又は水/油エマルジョン）及び多様なタイプの湿潤剤を含む。前記用語はまた、米連邦政府の規制庁に承認された又は動物（ヒトを含む）で使用される米薬局方に列挙された任意の薬剤を包含する。

本明細書で用いられるように“医薬的に許容できる塩”という用語は、親化合物の生物学的活性を維持し、さらに生物学的又は他の意味で望ましくないものではない化合物の塩を包含する。本明細書に開示する化合物の多くが、アミノ及び / 又はカルボキシリ基又はそれらに類似する基の存在により酸及び / 又は塩基塩を形成することができる。

医薬的に許容できる塩基付加塩は無機及び有機塩基から調製できる。無機塩基から誘導される塩は、例示すればナトリウム塩、カリウム炎、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩及びマグネシウム塩を含む。有機塩基から誘導される塩は、第一、第二及び第三アミンの塩を含むが、ただしこれらに限定されない。

【0018】

医薬的に許容できる酸付加塩は無機及び有機酸から調製できる。無機酸から誘導される塩は塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などを含む。有機酸から誘導される塩は、酢酸、プロピオン酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマール酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、

10

20

30

40

50

エタンスルホン酸、p-トルエン-スルホン酸、サリチル酸などを含む。

本明細書で用いられるように“親水性部分”という用語は、容易に水に溶解又は容易に水を吸収でき、かつ有害作用がなく哺乳動物種がin vivoで耐性を示す（すなわち生物適合性である）任意の化合物を指す。親水性部分の例には、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸-ポリグリコール酸コポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリメトキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、及び誘導セルロース（例えばヒドロキシメチルセルロース又はヒドロキシエチルセルロース及びそれらのコポリマー）とともに天然のポリマー（例えばアルブミン、ヘパリン及びデキストラン）が含まれる。

10

【0019】

本明細書で用いられるように“治療する”という用語は、特定の異常若しくは症状の予防、又は特定の異常若しくは症状に付随する諸症候の緩和、及び/又は前記諸症候の予防又は排除を含む。例えば、本明細書で用いられるように“糖尿病を治療する”という用語は一般的にはグルコースの血中レベルを正常レベル近くに維持することを指し、与えられた状況に応じて血中グルコースレベルを増加又は減少させることを含むことができる。

本明細書で用いられるように、インスリンアナローグの“有効な”量又は“治療的に有効な量”は、所望の作用を提供するために有害ではないが十分な量のインスリンアナローグを指す。例えば、所望されるある作用は高血糖の予防又は治療であろう。“有効”な量は、個体の年齢及び一般的な状態、投与態様などに応じて対象動物ごとに変動するであろう。したがって、厳密な“有効量”を特定することが常に可能であるとは限らない。しかしながら、任意の個々の事例において適切な“有効”量を日常的な試験を用いて当業者は決定できる。

20

“非経口的”という用語は、栄養管を通過しないが何らかの他のルート（例えば鼻内、吸入、皮下、筋肉内、脊髄内又は静脈内）によることを意味する。

【0020】

本出願を通して、文字及び数字による具体的なアミノ酸の位置（例えばA5位）の指示はいずれも、それぞれ天然のヒトインスリンA鎖（配列番号：1）若しくはB鎖（配列番号：2）におけるA鎖（例えばA5位）若しくはB鎖（例えばB5位）の当該位置におけるアミノ酸、又はその任意のアナローグにおける対応するアミノ酸の位置を指す。例えば本明細書で“B28位”（更なる修飾を一切含まない）というとき、配列番号：2の第一のアミノ酸が欠失されてあるインスリンアナローグのB鎖の対応する位置B27を意味するであろう。同様に、天然のB鎖のN-末端に付加されるアミノ酸にはB0で始まる番号が付与され、N-末端にアミノ酸が付加されるにつれ増加する負の値の番号が続く（例えばB-1、B-2...）。また別に、単一鎖アナローグの連結部分のアミノ酸の位置のいずれの指示も、IGF1の天然のC鎖（配列番号：17）に対応して為される。例えば、天然のC鎖の9位（又は“C9位”）はアラニン残基を有する。

30

【0021】

本明細書で用いられるように“天然のインスリンペプチド”という用語は、配列番号：1のA鎖及び配列番号：2のB鎖を含む51アミノ酸のヘテロ二重体とともに配列番号：1及び2を含む単一鎖インスリンアナローグを指すことが意図される。本明細書で用いられる“インスリンペプチド”（更なる説明的言葉を含まない）という用語は、配列番号：1のA鎖及び配列番号：2のB鎖を含む51アミノ酸のヘテロ二重体とともに、その単一鎖インスリンアナローグ（例えば、公開国際出願WO96/34882及び米国特許6,630,348号に開示されたもの（前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる））を包含することが意図され、前記には、天然のA鎖及び/又はB鎖の改変アナローグ及びその誘導体を含むヘテロ二重体並びに単一鎖アナローグが含まれる。そのような改変アナローグは、A19、B16又はB25位アミノ酸から4-アミノフェニルアラニンまでの改変、又はA5、A8、A9、A10、A12、A14、A15、A17、A18、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B17、B20、B21、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置の1つ以上のアミノ酸置換、又は

40

50

B1 - 4及びB26 - 30位のいずれか若しくは全ての欠失を含む。本明細書で定義されるインスリンペプチドはまた、非ペプチド部分（例えばレトロインベルソフラグメント）の挿入若しくは置換によって、又は非ペプチド結合（例えばアザペプチド結合（NHによるCOの置換）若しくは偽ペプチド結合（例えばNHのCH₂による置換）若しくはエステル結合（例えばデプシペプチド（1つ以上のアミド（-CONHR-）結合がエステル（COOR）結合によって取り替えられる））の取り込みによって、自然に出現するインスリンから誘導されるアナローグであり得る。

【 0 0 2 2 】

“A19インスリンアナローグ”は、天然インスリンA鎖19位の天然のチロシン残基を4-アミノフェニルアラニン又は4-メトキシフェニルアラニンで置換したインスリンペプチドである。

本明細書で用いられるように“IGF^{B16B17}アナローグペプチド”は、A鎖及びB鎖へテロ二重体或いはその単一鎖インスリンアナローグを含む包括的用語で、ここで当該A鎖は配列番号:19のペプチド配列を含み、B鎖は配列番号:20を含み、或いはそれら配列のアナローグを含み、ここでA鎖及び/又はB鎖は1 - 3つのさらに別のアミノ酸置換を含むが、ただしB鎖が配列番号:2の配列を含まず、かつB16位にチロシン及びB17位にロイシンを含むことを条件とする。

“IGF YLアナローグ”は、配列番号：19のIGF A鎖及び配列番号：36のIGF B鎖を含むペプチドである。

本明細書で用いられるように“単一鎖インスリンアナローグ”という用語は構造的に関連するタンパク質群を包含し、ここで、インスリン又はIGF A及びB鎖、又は前記のアナローグ若しくは誘導体は、共有結合により互いに連結されて線状ポリペプチド鎖を形成する。本明細書で開示するように、単一鎖インスリンアナローグは、連結部分を介するB鎖のカルボキシ末端とA鎖のアミノ末端との共有結合を含む。

【 0 0 2 3 】

本明細書で用いられるように“インスリンA鎖”という用語（更なる説明的言葉を含まない）は、配列番号：1の21アミノ酸配列、或いはその機能的アナローグ及び誘導体を包含することが意図され、前記には、A19インスリンアナローグのA鎖及び当業者に公知の他のアナローグが含まれ、前記はA4、A5、A8、A9、A10、A12、A14、A15、A17、A18、A21から選択される位置に1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失又は置換を含む。

本明細書で用いられる“インスリンB鎖”という用語（更なる説明的言葉を含まない）は、配列番号：2の30アミノ酸配列、或いは天然のB鎖の改変された機能的アナローグを包含することが意図され、前記アナローグは、B16又はB25位のアミノ酸の4-アミノフェニルアラニンへの改変、又はB1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B17、B20、B21、B22、B23、B25、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置における1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失若しくは置換、又はB1 - 4及びB26 - 30位のいずれか若しくは全ての欠失を含む。

本明細書で用いられる“同一性”という用語は2つ以上の配列間の類似性に関する。同一性は、同一残基数を残基総数で割り、結果に100を乗じてパーセンテージを得ることによって測定される。したがって、正確に同じ配列の2つのコピーは100%の同一性を有し、一方、互いに比較してアミノ酸の欠失、付加又は置換を有する2つの配列はより低い同一性の程度を有する。いくつかのコンピュータープログラム（例えばBLST（Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al. (1993) J.Mol.Biol.215:403-410）のようなアルゴリズムを利用するもの）が配列同一性の決定に利用できることを当業者は認識しているであろう。

【 0 0 2 4 】

“グルカゴン関連ペプチド”という用語は、グルカゴン、GLP-1、GLP-2及びGIP受容体のいずれか1つ以上で生物学的活性（アゴニストとして又はアンタゴニストとして）を有し、かつ天然のグルカゴン、天然のオキシントモデュリン、天然のエクセンジン-4、天然のGLP-1、天然のGLP-2、又は天然のGIPの少なくとも1つと少なくとも40%の配列同一性（

10

20

30

40

50

例えば45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%）を共有するアミノ酸配列を含むペプチドを指す。特段の記載がなければ、（例えばプロドラッグ部分の結合物、複合物部分、親水性ポリマー、アシル化又はアルキル化ために）グルカゴン関連ペプチドでアミノ酸の位置をいうときはいずれも、天然のグルカゴンのアミノ酸配列（配列番号:701）に対応する位置を指す。

本明細書で用いられるように、グルカゴン関連ペプチドのC-末端領域というとき、グルカゴンペプチドの天然のC-末端、又は、それぞれ天然のグルカゴン配列に対比して、C-末端の1つ以上のアミノ酸の付加によって延長されたグルカゴンアナローグのC-末端延長部の任意のアミノ酸、若しくは1つ以上のアミノ酸の欠失によって短縮されたグルカゴンアナローグの末端アミノ酸を包含することが意図される。グルカゴン関連ペプチドのC-末端領域で複合化されるインスリンペプチドは、当該C-末端領域のアミノ酸の側鎖との結合又はC-末端のカルボン酸部分を介する結合を含むことが意図される。10

“GLP-1アゴニスト”という用語は、有効性が証明されたin vitroモデルアッセイ（例えば公開国際出願WO2007/056362の実施例13に記載されたもの（2007年5月18日公開、前記文献の開示内容は参照により本出願に明瞭に組み入れられる））によって測定したとき、GLP-1受容体活性を刺激する化合物を指す。

【0025】

本明細書で用いられるように、“天然のグルカゴン”という用語は配列番号:701の配列から成るペプチドを指し、“天然のGIP”という用語は配列番号:707の配列から成るペプチドを指し、さらに“天然のGLP-1”という用語は、GLP-1(7-36)アミド（配列番号:703の配列から成る）、GLP-1(7-37)酸（配列番号:704の配列から成る）又は当該2つの成分の混合物を指す包括的用語である。本明細書で用いられるように、更なる指示を一切含まずに一般的に“グルカゴン”又は“GIP”又は“GLP-1”というとき、それぞれ天然のグルカゴン又は天然のGIP又は天然のGLP-1を意味することが意図される。20

本明細書で用いられるように、“グルカゴンペプチド”という用語は、配列番号:701の自然のグルカゴンペプチド、或いは天然のグルカゴン配列に対して1つ以上のアミノ酸改変を有する改変誘導体を示す包括的用語である。前記改変誘導体は、場合によってアミノ酸1、2、5、7、8、10、12、13、14、16、17、18、24、28及び29位での置換を含むが、ただし前記に限定されない。一般的には、数により具体的にアミノ酸の位置をいうときはいずれも（例えば28位）、天然のグルカゴン（配列番号:701）の当該位置のアミノ酸又はその任意のアナローグの対応するアミノ酸の位置を指す。例えば、“28位”というときは、配列番号:701の最初のアミノ酸が欠失してあるグルカゴンアナローグに対しては対応する27位を意味するであろう。同様に、“28位”というときは、配列番号:701のN-末端の前に1つのアミノ酸が付加されてあるグルカゴンアナローグに対しては対応する29位を意味するであろう。30

【0026】

本明細書で用いられるように“誘導体”という用語は、化合物（例えばアミノ酸）に対する化学的改変を包含することが意図され、前記改変には、例えばポリペプチドの1つ以上の位置の側鎖に基を導入することによって（例えばチロシン残基のニトロ基又はチロシン残基のヨウ素）、又は遊離カルボキシル基のエステル基若しくはアミド基への変換によって、又はアミノ基のアシル化によるアミドへの変換によって、又はヒドロキシ基をアシル化してエステルにすることによって、又は第一アミンをアルキル化して第二アミンにすることによって、又はアミノ酸側鎖への親水性部分の結合によってin vitroで化学的に改変することが含まれる。他の誘導体は、ポリペプチド内のアミノ酸残基の側鎖の酸化又は還元によって入手される。40

本明細書で用いられるようにIGF A鎖という用語（更なる説明的言葉を含まない）は、天然のIGF 1又はIGF 2の21アミノ酸配列（それぞれ配列番号:5及び7）、或いは当業者に公知のその機能的アナローグを包含することが意図され、前記アナローグは、A5、A8、A9、A10、A12、A14、A15、A17、A18、A21から選択される位置における1つ以上のアミノ酸の置換による配列番号:5及び7の配列の改変を含む。50

本明細書で用いられるように“IGF YL B鎖”という用語（更なる説明的言葉を含まない）は、配列番号:20を含むアミノ酸配列、或いはIGF YL B鎖のアナローグ及びその誘導体を包含することが意図され、前記誘導体は、B16又はB25位のアミノ酸の4-アミノフェニルアラニンへの改変、又はB1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B17、B20、B21、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置における1つ以上のアミノ酸の置換、又はB1-4及びB26-30位のいずれか若しくは全ての欠失を含む。

【0027】

本明細書で用いられるように、第二の受容体と対比して第一の受容体に対するある分子の“選択性”という用語は以下の比率を指す：第一の受容体における分子のEC₅₀で割った第二の受容体における分子のEC₅₀。例えば、第一の受容体で1nMのEC₅₀及び第二の受容体で100nMのEC₅₀を有する分子は、第二の受容体と対比して第一の受容体に対して100倍の選択性を有する。

本明細書で用いられるように、アミノ酸“改変”は、アミノ酸の置換、又はアミノ酸への／からの化学基の付加及び／又は除去によるアミノ酸の誘導を指し、ヒトタンパク質で一般的に見出される20アミノ酸或いは非定型的又は自然には存在しないアミノ酸のいずれかによる置換を含む。非定型的アミノ酸の市場の供給源にはシグマ-アルドリッヂ (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI)、ケムペップ社 (ChemPep Inc., Miami, FL) 及びゲンザイムファーマシューティカルズ (Genzyme Pharmaceuticals, Cambridge, MA) が含まれる。非定型的アミノ酸は、市場の供給業者から購入するか、新規に合成するか、又は自然に出現するアミノ酸から化学的に改変するか若しくは誘導することができる。

本明細書で用いられるように、アミノ酸の“置換”は、あるアミノ酸残基の異なるアミノ酸残基による取り替えを指す。

本明細書で用いられるように、“保存的アミノ酸置換”という用語は、以下の5つのグループの1つの中での交換と定義される：

- I. 小さな脂肪族で、非極性又はわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；
- II. 極性で負に荷電した残基及びそれらのアミド：Asp、Asn、Glu、Gln、システイン酸及びホモシステイン酸；
- III. 極性で正に荷電した残基；His、Arg、Lys、オルニチン (Orn)；
- IV. 大きな脂肪族の非極性残基：Met、Leu、Ile、Val、Cys、ノルロイシン (Nle)、ホモシステイン；
- V. 大きな芳香族残基：Phe、Tyr、Trp、アセチルフェニルアラニン。

【0028】

本明細書で用いられるように一般的用語“ポリエチレングリコール鎖”又は“PEG鎖”は、エチレンオキシド及び水の縮合ポリマーの混合物を包含し、前記ポリマーは一般式H(OCH₂CH₂)_nOH (式中nは少なくとも2)で表される分枝又は直鎖状である。“ポリエチレングリコール鎖”又は“PEG鎖”は、そのほぼ平均の分子量を示すために数字の接尾辞と一緒に用いられる。例えばPEG-5,000は、約5,000ダルトンの全分子量平均を有するポリエチレングリコール鎖を指す。

本明細書で用いられるように“PEG化”などの用語は、ポリエチレングリコール鎖のある化合物に連結することによってその自然の状態から改変されてある当該化合物を指す。“PEG化ポリペプチド”は、当該ポリペプチドと共有結合されたPEG鎖を有するポリペプチドである。

本明細書で用いられるように“リンカー”は、2つの別々の実体を互いに結合させる結合、分子又は分子の基である。リンカーは2つの実体の最適な間隙を提供するか、さらにまた2つの物体を互いに分離させ得る不安定な結合を提供することができる。不安定な結合には、光切断可能基、易酸性部分、易塩基性部分及び酵素切断可能基が含まれる。

本明細書で用いられるように“ダイマー”は、リンカーにより互いに共有結合された2つのサブユニットを含む複合体である。ダイマーという用語は、何らかの修飾の言葉を含まずに用いられるときホモダイマー及びヘテロダイマーの双方を包含する。ホモダイマーは2つの同一のサブユニットを含み、一方、ヘテロダイマーは、異なるが互いに実質的に

10

20

30

40

50

類似する2つのサブユニットを含む。

【0029】

本明細書で用いられるように、“C₁ - C_nアルキル”（式中nは1から6であり得る）という用語は、1から指定された数の炭素原子を有する分枝又は直鎖アルキル基を表す。典型的なC₁ - C₆アルキル基には、メチル、エチル、n-プロピル、iso-プロピル、ブチル、iso-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

本明細書で用いられるように、“C₂ - C_nアルケニル”（式中nは2から6であり得る）という用語は、2から指定された数の炭素原子及び少なくとも1つの二重結合有する、オレフィン系不飽和分枝又は直鎖基を表す。そのような基の例には、1-プロペニル、2-プロペニル（-CH₂-CH=CH₂）、1,3-ブタジエニル（-CH=CHCH=CH₂）、1-ブテニル（-CH=CHCH₂CH₃）¹⁰、ヘキセニル、ペンテニルなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

“C₂ - C_nアルキニル”（式中nは2から6であり得る）という用語は、2からn個の炭素原子及び少なくとも1つの三重結合有する不飽和分枝又は直鎖基を表す。そのような基の例には、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニルなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0030】

本明細書で用いられるように“アリール”という用語は、1つ又は2つの芳香環を含む単環又は二環炭素環式環系を指し、前記にはフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、インデニルなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。アリール環のサイズ及び置換基又は連結基の存在は、存在する炭素数を指示することによって示される。例えば、“(C₁-C₃アルキル)(C₆-C₁₀アリール)”という用語は、1から3員のアルキル鎖を介して親部分に添付される5から10員のアリールを指す。²⁰

本明細書で用いられる“ヘテロアリール”という用語は、1つ又は2つの芳香環を含み、かつ1つの芳香環内に少なくとも1つの窒素、酸素又は硫黄原子を含む、単環式又は二環式環系を指す。ヘテロアリール環のサイズ及び置換基又は連結基の存在は、存在する炭素数を指示することによって示される。例えば、“(C₁-C_nアルキル)(C₅-C₆ヘテロアリール)”という用語は、1から“n”員のアルキル鎖を介して親部分に添付される5から6員のヘテロアリールを指す。

本明細書で用いられるように、“ハロ”という用語は、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から成る群の1つ以上のメンバーを指す。³⁰

【0031】

本明細書で用いられるように“患者”（更なる指示を含まない）という用語は、任意の温血脊椎家畜化動物（例えば家畜、ウマ、ネコ、イヌ及び他のペットを含むが、ただしこれらに限定されない）及びヒトを包含することが意図される。

本明細書で用いられる“単離された”という用語は、その自然の環境から移動されてあることを意味する。いくつかの実施態様では、アナローグは組換え方法を介して作製され、該アナローグは宿主細胞から単離される。

本明細書で用いられる“精製される”という用語は、天然の又は自然の環境においてある分子又は化合物に通常付随する夾雜物を実質的に含まない形態で該分子又は化合物を単離することに關し、本来の組成物の他の成分から分離された結果として純度が高められてあることを意味する。“精製されたポリペプチド”という用語は、他の化合物（核酸分子、脂質及び炭水化物を含むが、ただしこれらに限定されない）から分離されてあるポリペプチドを指すために本明細書では用いられる。⁴⁰

【0032】

“ペプチド模倣体”は、既存のペプチドの一般構造と相違する構造を有するが、該既存のペプチドの生物学的活性を模倣することによって当該ペプチドと同様な態様で機能する化合物を指す。ペプチド模倣体は、典型的には自然に存在するアミノ酸及び/又は非自然のアミノ酸を含むが、ペプチド骨格の改変物もまた含むことができる。例えば、ペプチド模倣体は、非ペプチド部分（例えばレトロインベルソフラグメント）の挿入若しくは置換

、又は非ペプチド結合（例えばアザペプチド結合（NHによるCOの置換）若しくは偽ペプチド結合（例えばNHのCH₂による置換）若しくはエステル結合（例えばデブシペプチド（1つ以上のアミド（-CONHR-）結合がエステル（COOR）結合によって取り換えられる））の取り入れを示す自然に存在するアミノ酸を含む。また別にペプチド模倣体は自然に存在するアミノ酸を全く欠くことができる。

【0033】

本明細書で用いられるように“荷電アミノ酸”又は“荷電残基”という用語は、生理学的pHの水溶液中で陰性に荷電する（すなわち脱プロトン化）又は陽性に荷電する（すなわちプロトン化）側鎖を含むアミノ酸を指す。例えば、陰性荷電アミノ酸には、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、及びホモグルタミン酸が含まれ、一方、陽性荷電アミノ酸には、アルギニン、リジン、及びヒスチジンが含まれる。荷電アミノ酸には、ヒトタンパク質で一般的に見出される20アミノ酸中の荷電アミノ酸、或いは非定型的又は自然には存在しないアミノ酸が含まれる。

本明細書で用いられるように“酸性アミノ酸”は、第二の酸性部分（アミノ酸のアルファカルボン酸以外、例えば側鎖のカルボン酸又はスルホン酸）を含むアミノ酸を指す。

本明細書で用いられるように“患者”（更なる指示を含まない）という用語は、任意の温血脊椎家畜化動物（例えば家畜、ウマ、ネコ、イヌ及び他のペットを含むが、ただしこれらに限定されない）、哺乳動物及びヒトを包含することが意図される。

【0034】

略称

インスリンアナローグは以下のように略称される：

インスリンA及びB鎖は、A鎖については大文字AでB鎖については大文字Bで示され、ここで、上付き数字0（例えばA⁰又はB⁰）は基本配列がインスリン配列であること（A鎖は配列番号：1、B鎖は配列番号：2）、上付き数字1（例えばA¹又はB¹）は基本配列がIGF-1配列であること（A鎖は配列番号：5、B鎖は配列番号：6）を示す。天然のインスリン配列及びIGF配列から逸脱する改変は、A又はB鎖の指定に続くカッコ内に示され（例えば[B¹(H5,H10,Y16,L17) : A¹(H8,N18,N21)]）、置換を示す一文字アミノ酸略称及び対応するA又はB鎖内の置換の位置（天然のインスリン番号付けを用いる）が付随する。A鎖とB鎖の間のコロンは二鎖インスリンを示し、一方、ダッシュは共有結合（したがって単一鎖アナローグ）を示す。単一鎖アナローグでは、連結部分はA鎖とB鎖の間に含まれ、C¹の表示は天然のIGF1ペプチド（配列番号：17）を指す。連結部分に関して“C8位”的表示は、配列番号：17の8番目のアミノ酸に対応する位置に存在するアミノ酸を指す。

【0035】

実施態様

本明細書で開示されるものは、インスリンペプチド及びグルカゴン関連ペプチドの複合物である。ある実施態様では、複合物は、インスリンペプチドとグルカゴン関連ペプチドとの直接的又はリンカーを介する共有結合を含む。ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、インスリンA鎖又はB鎖のアミノ若しくはカルボキシ末端に共有結合により連結される。別の実施態様では、1つ又は2つのグルカゴン関連ペプチドのC-末端領域は、A鎖のA9、A14及びA15、B鎖のB1、B2、B10、B22、B28又はB29位から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖、A又はB鎖のN-末端アルファアミン、B鎖のカルボキシ末端、又は単一鎖インスリンアナローグのA鎖及びB鎖を連結する連結部分の任意の位置のアミノ酸側鎖（例えばC8位を含む）から別個に選択される位置を介してインスリンペプチドに共有結合により連結される。別の実施態様では、インスリンペプチドのN-末端又はC-末端は、10、20、24、28及び29から選択される位置でグルカゴン関連ペプチドのアミノ酸の側鎖に共有結合により連結される。

【0036】

別の実施態様では、1つ又は2つのグルカゴン関連ペプチドは、B鎖のN-末端アルファアミン、B鎖のカルボキシ末端、又は単一鎖インスリンアナローグのA鎖及びB鎖を連結する連結部分の任意の位置（例えばC8位を含む）から別個に選択される位置を介してインスリ

10

20

30

40

50

ンペプチドに共有結合により連結される。ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端領域は、単一鎖インスリンペプチドアナローグのB鎖のN-末端アルファアミンに共有結合により連結される。ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端は、二鎖又は単一鎖インスリンペプチドアナローグのB鎖のN-末端アルファアミンに共有結合により連結される。

ある実施態様にしたがえば、インスリンペプチドは二鎖インスリンであり、A鎖及びB鎖は互いに鎖間ジスルフィド結合を介して連結される。ある実施態様では、複合物は二鎖インスリンペプチドを含み、グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端領域はインスリンペプチドのA鎖のアミノ末端に共有結合により連結される。ある実施態様では、複合物は二鎖インスリンペプチドを含み、インスリンペプチドのA鎖又はB鎖のカルボキシ末端は、グルカゴン関連ペプチドのアミノ末端領域に共有結合により連結される。ある実施態様では、複合物は二鎖インスリンペプチドを含み、グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端は、インスリンペプチドのB鎖のアミノ末端に共有結合により連結される。ある実施態様では、複合物は二鎖インスリンペプチドを含み、インスリンペプチドのB鎖のカルボキシ末端は、グルカゴン関連ペプチドのアミノ末端に共有結合により連結される。

【 0 0 3 7 】

別の実施態様では、複合物は二鎖インスリンアナローグ並びに第一及び第二のグルカゴン関連ペプチドを含み、各グルカゴン関連ペプチドは、B鎖のアミノ末端、A鎖のカルボキシ末端、及びB鎖のカルボキシ末端から成る群から選択される位置で別個にインスリンペプチドと共有結合により連結される。ある実施態様では、複合物は二鎖インスリンペプチドを含み、第一のグルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端領域はインスリンペプチドのB鎖のアミノ末端に共有結合により連結され、さらにインスリンペプチドのB鎖のカルボキシ末端領域は第二のグルカゴン関連ペプチドのアミノ末端に共有結合により連結される。ある実施態様では、第一及び第二のグルカゴン関連ペプチドは異なり、グルカゴン、GLP-1及びGIP受容体から成る群から選択される2つの異なる受容体で活性を有する。ある実施態様では、第一のグルカゴン関連ペプチドはグルカゴン受容体で活性を有し、第二のグルカゴン関連ペプチドはGLP-1受容体で活性を有する。ある実施態様では、第一及び / 又は第二のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン、GLP-1及びGIP受容体から成る群から選択される2つの受容体で活性を有するコアゴニストである。

【 0 0 3 8 】

ある実施態様では、複合物は融合タンパク質であり、グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端領域は、インスリンペプチドB鎖のアミノ末端に直に又はペプチドリンクを介して連結される。ある実施態様では、複合物は単一鎖インスリンアナローグを含み、グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端領域は単一鎖インスリンアナローグのアミノ末端に共有結合により連結される。ある実施態様では、複合物は単一鎖インスリンアナローグを含み、単一鎖インスリンペプチドのカルボキシ末端はグルカゴン関連ペプチドのアミノ末端に共有結合により連結される。

いくつかの又はいずれかの実施態様では、本開示の複合物のインスリンペプチドは、配列番号:1のA鎖及び配列番号:2のB鎖を含む天然のインスリンであるか、又は天然のインスリンのアナローグであり、例えば配列番号:1及び配列番号:2を含む単一鎖インスリンアナローグを含む。ある実施態様では、インスリンペプチドはIGF^{B16B17}アナローグペプチドである。本開示にしたがえば、インスリンアナローグはA鎖及びB鎖を含むポリペプチドを包含し、ここで、該インスリンアナローグは、A5、A8、A9、A10、A12、A14、A15、A17、A18、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B17、B20、B21、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される位置における1つ以上のアミノ酸置換、又はB1 - 4及びB26 - 30位のいずれか若しくは全ての欠失によって天然のインスリンと異なる。

【 0 0 3 9 】

ある実施態様では、複合物のグルカゴン関連ペプチド成分は、天然のグルカゴン（配列番号:71）、天然のGLP-1（配列番号:703）及び天然のGIP（配列番号:707）から成る群から選択されるペプチドである。ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチドはグルカゴン

10

20

30

40

50

ペプチド又はGLP-1ペプチドである。いくつかの実施態様では、本開示の複合物のグルカゴン関連ペプチドは天然のヒトグルカゴン（配列番号:701）のアナローグであり、前記は配列番号:701のアミノ酸配列を土台とするアミノ酸配列を含むが、1つ以上の（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15）及びいくつかの事例では16以上の（例えば17、18、19、20、21、22、23、24、25など）特定の又は任意のアミノ酸改変を含むために配列番号:701と異なる。いくつかの又はいずれかの実施態様では、本開示のペプチドは、天然のヒトグルカゴン配列（配列番号:701）と対比して、合計して1つ、2つまで、3つまで、4つまで、5つまで、6つまで、7つまで、8つまで、9つまで又は10までの追加のアミノ酸改変（例えば特定のアミノ酸改変に加えて）を含む。例えば、ある実施態様では、グルカゴン（配列番号:701）のアナローグは、（a）1位にイミダゾール側鎖を含むアミノ酸、（b）2位にDPP-IV防御アミノ酸、（c）9、10、12、16、20又は37-43位のいずれかにアシル化アミノ酸又はアルキル化アミノ酸、（d）16、17、18、19、20及び21位の1つ以上のアルファヘリックス安定化アミノ酸、並びに（e）配列番号:701と対比して10までの追加のアミノ酸改変を含む。ある実施態様では、本開示は、（a）-（d）で特定されるアミノ酸改変に加えて、10までの追加のアミノ酸改変を有する（a）-（d）を含むグルカゴンアナローグを提供する。いくつかの又はいずれかの実施態様では、改変は本明細書に記載する改変のいずれか、例えばアシル化、アルキル化、PEG化、C-末端の短縮、1、2、3、7、10、12、15、16、17、18、19、20、21、23、24、27、28及び29位の1つ以上におけるアミノ酸の置換である。

【0040】

10

インスリンペプチド

本開示の複合物のインスリンペプチド成分は、ヒトイインスリンの天然のB及びA鎖配列（それぞれ配列番号:1及び2）又はその公知のアナローグ若しくは誘導体であってヘテロ二重体として互いに連結されたときインスリンアゴニスト活性を有するものを含むことができる。そのようなアナローグには、例えばヒトイインスリンのA鎖及びB鎖とは異なるA鎖及びB鎖を有するタンパク質が含まれ、前記タンパク質は、インスリンアナローグのインスリン活性が破壊されない1つ以上のアミノ酸の欠失、1つ以上のアミノ酸の置換及び/又は1つ以上のアミノ酸の挿入によってヒトイインスリンと異なる。

ある実施態様では、インスリンペプチドは以下のようなインスリンアナローグである：（a）28位のアミノ酸残基がAsp、Lys、Leu、Val又はAlaで置換され、B29位のアミノアシル残基がLys又はProである；

20

（b）B27、B28、B29及びB30位のいずれかのアミノ酸が欠失するか、又は非天然のアミノ酸で置換される。ある実施態様では、B28位のAspによる置換又は28位のLysによる置換及びB29位のプロリンによる置換を含むインスリンアナローグが提供される。さらに別のインスリンアナローグは以下で開示される：Chance, et al., 米国特許No.5,514,646；Chance, et al., 米国特許出願No.08/255,297；Brems, et al., Protein Engineering, 5:527-533, 1992；Brange, et al., EPO公開公報No.214,826（1987年3月18日公開）；及びBrange, et al., Current Opinion in Structural Biology, 1:934-940, 1991（前記文献の開示内容は参照により明瞭に本明細書に組み入れられる）。

【0041】

40

インスリンアナローグはまたアミド化アミノ酸の酸性形で取り替えることができる。AsnはAsp又はGluで取り替えることができる。同様に、GlnはAsp又はGluで取り替えることができる。特に、Asn（A18）、Asn（A21）若しくはAsp（B3）又はそれら残基の任意の組み合わせをAsp又はGluで取り替えてよい。さらに、Gln（A15）若しくはGln（B4）又は双方をAsp又はGluで取り替えてよい。

本明細書で開示するように、ヒトイインスリンのB鎖及びA鎖又はそのアナローグ若しくは誘導体を含む単一鎖インスリンアゴニストが提供され、ここでB鎖のカルボキシ末端はA鎖のアミノ末端に連結部分を介して連結される。ある実施態様では、A鎖は、GIVEQCCTS1CSLYQLENYCN（配列番号:1）、GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA（配列番号:5）又はGIVEECCFRSCDLALLETYCA（配列番号:7）から成る群から選択されるアミノ酸配列であり、さらにB鎖は以下を

50

含む：配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号：2）、GPETLCGAEELVDALYLVCGDRGFYFNKPT（配列番号：6）若しくはAYRPSETLCGGELVDTLYLVCGRGFYFSRPA（配列番号：8）、又は前記のカルボキシ短縮配列であってB26、B27、B28、B29及びB30に対応する1つから5つのアミノ酸が欠失されてあるもの、及びこれら配列のアナローグであって、各配列が、A5、A8、A9、A10、A14、A15、A17、A18、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B20、B22、B23、B26、B27、B28、B29及びB30から選択される天然のインスリンの位置に対応する位置（図5に示すペプチドアラインメントを参照されたい）で1つから5つのアミノ酸置換を含むように改変されるもの。ある実施態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。インスリンの所望される活性に有害な影響を与えないこれらの位置における適切なアミノ酸置換は、例えば以下の文献に示されているように当業者には公知である：Mayer, et al., *Insulin Structure and Function, Biopolymers*.2007;88(5):687-713（前記文献の開示内容は参照により本明細書に組み入れられる）。

【0042】

追加のアミノ酸配列を、本発明の単一鎖インスリンアゴニストのB鎖のアミノ末端又はA鎖のカルボキシ末端に付加することができる。例えば、一連の陰性荷電アミノ酸をB鎖のアミノ末端に付加することができ、前記は、例えば長さが1から12、1から10、1から8又は1から6アミノ酸のペプチドを含み、さらに1つ以上の陰性荷電アミノ酸（例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸）を含む。ある実施態様では、B鎖のアミノ末端延長部は、配列G_{X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄X₆₅K}（配列番号：26）又はX₆₁X₆₂X₆₃X₆₄X₆₅RK（配列番号：27）を含み、式中X₆₁、X₆₂、X₆₃、X₆₄及びX₆₅は別個にグルタミン酸又はアスパラギン酸である。ある実施態様では、B鎖は配列GEEEEKGPEHLCGAHLVDALYLVCGDX₄₂GFY（配列番号：28）を含み、式中X₄₂は、アラニン、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択される。ある実施態様にしたがえば、本明細書に開示するグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は、A鎖のC-末端カルボキシレートの代わりにC-末端アミド又はエステルを含む。

【0043】

高い効能をもつグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物もまた、公開国際出願WO 2010/080607に記載された改変IGF I及びIGF IIを、インスリンペプチド成分として土台に用いて調製され得る（前記文献の開示内容は参照により本明細書に組み入れられる）。より具体的には、天然のインスリンのB16及びB17に対応する位置で天然IGFアミノ酸のチロシンロイシンジペプチドによる置換を含むIGF I及びIGF IIアナローグは、インスリン受容体で10倍の効能増加を示す。

ある実施態様にしたがえば、本開示で使用されるインスリンペプチドは、R₂₂-X₂₅LCGX₂X₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号：20）のB鎖配列及びGIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁4X₁₅LX₁₇X₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号：29）のA鎖配列を含み、式中、

X₄は、グルタミン酸又はアスパラギン酸であり、

X₅は、グルタミン又はグルタミン酸であり、

X₈は、ヒスチジン、スレオニン又はフェニルアラニンであり、

X₉は、セリン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₀は、イソロイシン又はセリンであり、

X₁₂は、セリン又はアスパラギン酸であり、

X₁₄は、チロシン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₅は、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、アラニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり、

X₁₇は、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、アスパラギン酸又はリジン、オルニチンであり、

X₁₈は、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はスレオニンであり、

X₁₉は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X₂₁は、アラニン、グリシン、セリン、バリン、スレオニン、イソロイシン、ロイシン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジン、トリプトファ

10

20

30

40

50

ン、チロシン及びメチオニンから成る群から選択され、
 X_{25} は、ヒスチジン又はスレオニンであり、
 X_{29} は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、
 X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、
 X_{33} は、アスパラギン酸、グルタミン及びグルタミン酸から成る群から選択され、
 X_{34} は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、
 X_{41} は、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、
 X_{42} は、アラニン、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され、
 X_{45} は、チロシン、ヒスチジン、アスパラギン又はフェニルアラニンであり、
 R_{22} は、AYRPSE (配列番号:14)、FVNQ (配列番号:12)、PGPE (配列番号:11)、グリシン-プロリン-グルタミン酸トリペプチド、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、プロリン-グルタミン酸ジペプチド、アスパラギン-グルタミンジペプチド、グルタミン、グルタミン酸及び結合であり、 R_{13} はCOOH又はCONH₂である。ある実施態様では、A鎖及びB鎖は鎖間ジスルフィド結合 (天然のインスリンのA及びB鎖間で形成されるものを含む) によって互いに連結される。また別の実施態様では、A及びB鎖は直線状の単一鎖インスリンペプチドとして一緒に連結される。
10

【0044】

ある実施態様では、複合物は、A鎖がGIVEQCCX₁SICSLYQLENX₂CX₃ (配列番号:30) の配列を含み、B鎖がX₄LCGX₅X₆LVEALYLVCGERGFF (配列番号:31) の配列を含む、インスリンペプチドを含み、式中、
 X_1 は、スレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され、
 X_2 は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルフェニルアラニンであり、
 X_3 は、アスパラギン及びグリシンから成る群から選択され、
 X_4 は、ヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、
 X_5 は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、
 X_6 は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択される。
20

ある実施態様にしたがえば、インスリンペプチドのA鎖が配列GIVEQCCX₈X₉ICSLYQLENYCX₂₁-R₁₃ (配列番号:73) 又はGIVEQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₁ (配列番号:32) を含み、さらにB鎖が配列R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅YT-Z₁-B₁ (配列番号:142) を含む、インスリンアナローグが提供され、式中、
 X_8 は、スレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され、
 X_9 は、バリン又はチロシンであり、
 X_{17} は、グルタミン又はグルタミン酸であり、
 X_{19} は、チロシン、4-メトキシフェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、
 X_{21} は、アスパラギン又はグリシンであり、
 X_{25} は、ヒスチジン又はスレオニンであり、
 X_{29} は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、
 X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、
 X_{33} は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、
 X_{34} は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、
 X_{41} は、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、
 X_{42} は、アラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され、
 X_{45} はチロシン又はフェニルアラニンであり、
 R_{22} は、FVNQ (配列番号:12)、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、アスパラギン-グルタミンジペプチド、グルタミン及びN-末端アミンであり、
 Z_1 は、アスパルテート-リジン、リジン-プロリン、及びプロリン-リジンから成る群から
30
40
50

選択されるジペプチドであり、さらに

B_1 は、スレオニン、アラニン又はスレオニン-アルギニン-アルギニントリペプチドから成る群から選択される。

【0045】

ある実施態様にしたがえば、インスリンペプチドのA鎖が配列GIVEQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₁（配列番号:32）を含み、さらにB鎖がX₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFF（配列番号:33）を含む、インスリンアナローグが提供され、式中、

X_8 は、スレオニン及びヒスチジンから成る群から選択され、

X_{17} は、グルタミン酸又はグルタミンであり、

X_{19} は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{21} は、アスパラギン又はグリシンであり、

X_{25} は、ヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{29} は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択される。さらに別の実施態様では、B鎖は配列X₂₂VNQX₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFFYT-Z₁-B₁（配列番号:34）を含み、式中、

X_{22} は、フェニルアラニン及びdesアミノ-フェニルアラニンから成る群から選択され、

X_{25} は、ヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{29} は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

Z_1 は、アスパルテート-リジン、リジン-プロリン、及びプロリン-リジンから成る群から選択されるジペプチドであり、さらに

B_1 は、スレオニン、アラニン又はスレオニン-アルギニン-アルギニントリペプチドから成る群から選択される。

【0046】

いくつかの実施態様にしたがえば、A鎖は、配列GIVEQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃（配列番号:32）又はGIVDECCX₈X₉SCDLX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号:35）を含み、さらにB鎖は配列X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGDX₄₂GFX₄₅（配列番号:36）を含み、式中、

X_8 は、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、

X_9 及び X_{14} は、別個にアルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンから選択され、

X_{15} は、アルギニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり、

X_{17} は、グルタミン酸又はグルタミンであり、

X_{18} は、メチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、

X_{19} は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X_{23} は、アスパラギン又はグリシンであり、

X_{25} は、ヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{29} は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X_{33} は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X_{34} は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{42} は、アラニン、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され、

X_{45} はチロシンであり、さらに

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

【0047】

さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVDECCX₈X₉SCDLX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号:35）を含み、さらにB鎖は配列X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGDX₄₂GFX₄₅（配列番号:36）を含み、式中、

10

20

30

40

50

X_8 はヒスチジンであり、

X_9 及び X_{14} は、別個にアルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンから選択され、

X_{15} は、アルギニン、リジンオルニチン又はロイシンであり、

X_{17} は、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、リジン、オルニチン又はグルタミンであり、

X_{18} は、メチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、

X_{19} は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X_{23} は、アスパラギン又はグリシンであり、

X_{25} は、ヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、

10

X_{29} は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され

X_{33} は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X_{34} は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{42} は、アラニン、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され、

X_{45} は、チロシン又はフェニルアラニンであり、さらに

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

【0048】

さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVDECCH₉SCDLX₁₄X₁₅LX₁₇MX₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号:37）を含み、さらにB鎖は配列X₂₅LCGAX₃₀LVDALYLVCGDX₄₂GFX₄₅（配列番号:38）を含み、式中、

20

X_9 、 X_{14} 及び X_{15} は、別個にオルニチン、リジン又はアルギニンであり、

X_{17} は、グルタミン酸又はグルタミンであり、

X_{19} は、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X_{25} は、ヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X_{42} は、アラニン、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され、

X_{45} は、チロシン又はフェニルアラニンであり、さらに

30

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。ある実施態様では、B鎖は、HLCGAELVDALYLVCGDX₄₂GFY（配列番号:39）、GPEHLCGAELVDALYLVCGDX₄₂GFY（配列番号:40）、GPEHLCGAELVDALYLVCGDX₄₂GFYFNPKT（配列番号:41）及びGPEHLCGAELVDALYLVCGDX₄₂GFYFNKPT（配列番号:42）から成る群から選択され、式中、 X_{42} はオルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択される。さらに別の実施態様では、A鎖は配列GIVDECCH₉SCDLX₁₄X₁₅LQMYCN-R₁₃（配列番号:43）を含み、式中、 X_9 、 X_{14} 及び X_{15} は別個にオルニチン、リジン又はアルギニンである。

【0049】

別の実施態様では、A鎖は配列GIVDECCX₈RSCDLYQLENX₁₉CN-R₁₃（配列番号:44）を含み、さらにB鎖は配列R₂₂-X₂₅LCGSHLDALYLVCGDX₄₂GFX₄₅（配列番号:45）を含み、式中、

40

X_8 は、スレオニン、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、

X_{19} は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{25} は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X_{42} は、アラニン、オルニチン又はアルギニンであり、

X_{45} は、チロシン、ヒスチジン、アスパラギン又はフェニルアラニンであり、

R_{22} は、AYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、PGPE（配列番号:11）、グリシン-プロリン-グルタミン酸トリペプチド、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、プロリン-グルタミン酸ジペプチド、アスパラギン-グルタミンジペプチド、グルタミン、グルタミン酸及び結合であり、 R_{13} はCOOH又はCONH₂であり、さらに

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

別の実施態様では、A鎖は配列GIVEQCCHS1CSLYQLENX₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号:46）又はGIV

50

DECCHRSCDLRRLEMX₁₉CX₂₁-R₁₃ (配列番号:47) を含み、さらにB鎖は配列FVNQHLCGSHLVEALY LVCGERGFFYTPKT (配列番号:2) 又はGPETLCGAEVDALYLVCGDRGFYFNPKT (配列番号:48) を含み、式中

X₁₉は、チロシン、4-メトキシフェニルアラニン又は4-アミノ-フェニルアラニンであり、

X₂₁は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X₂₆及びX₂₇は各々アラニンであり、さらに

X₄₂はアルギニンである。

【0050】

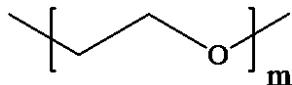
単一鎖インスリンペプチドアゴニスト

本明細書に開示するように、連結部分を用いて、ヒトイインスリンA及びB鎖又はそのアナローグ若しくは誘導体を連結することができ、ここで、B鎖のB25アミノ酸のカルボキシ末端は連結部分の第一の末端と直に連結され、連結部分の第二の末端は、介在する連結部分を介してA鎖のA1アミノ酸のアミノ末端と直に連結される。

ある実施態様にしたがえば、インスリンペプチドは、一般構造B-LM-Aを含む单一鎖インスリンアゴニストである (式中BはインスリンB鎖を表し、AはインスリンA鎖を表し、LMは、B鎖のカルボキシ末端をA鎖のアミノ末端に連結する連結部分を表す)。B鎖をA鎖に継ぎ合わせる適切な連結部分は、ヘッダー单一鎖インスリンアナローグのための連結部分並びに対応するサブヘッダー “ペプチドリンカー” 及び “非ペプチドリンカー” において本明細書で開示される。ある実施態様では、連結部分は連結ペプチドを含み、より具体的には、ある実施態様ではペプチドはIGF-1 Cペプチドのアナローグである。追加される例示的ペプチドリンカーには、X₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₅₈ (配列番号:49) 又はX₅₁X₅₂GSSSX₅₇X₅₈APQT (配列番号:50) が含まれ (ただし前記に限定されない)、式中、X₅₁はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、X₅₂はアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、さらにX₅₇又はX₅₈は別個にアルギニン、リジン、システイン、ホモシステイン、アセチル-フェニルアラニン又はオルニチンであり、場合によって連結部分の7又は8位 (すなわちX₅₇又はX₅₈) のアミノ酸の側鎖に連結される親水性部分を有する。連結部分のアミノ酸の位置は、IGF-1の天然のC鎖 (配列番号:17) の対応する位置を基準にして示される。別の実施態様では、ペプチド連結部分は連続する29アミノ酸配列を含み、前記配列は、SSSSX₅₀APPSLPPSPSRLPGPSDTPILPQX₅₁ (配列番号:68) と70%、80%、90%を超える配列同一性を有する (式中X₅₀及びX₅₁は別個にアルギニン及びリジンから選択される)。ある実施態様では、連結部分は非ペプチドリンカーであり、前記は、長さが約8-16アミノ酸配列の比較的短い二官能性非ペプチドポリマーを含む。ある実施態様では、非ペプチドリンカーは下記構造を有し、

【0051】

【化1】



【0052】

式中、mは10から14の範囲の整数であり、連結部分はB鎖のB25アミノ酸に直に連結される。ある実施態様にしたがえば、非ペプチド連結部分は、約4から20、8から18、8から16、8から14、8から12、10から14、10から12、又は11から13モノマーのポリエチレングリコールリンカーである。

【0053】

ある実施態様では、構造IB-LM-IAを有するインスリンペプチドを含む、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物が提供される。式中、IBは配列R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYL VCGX₄₁X₄₂GFX₄₅ (配列番号:20) を含み、LMはIBをIAに共有結合により連結する本明細書に開示する連結部分であり、さらにIAは配列GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃ (配列番号:29) を含み、式中、

X₄は、グルタミン酸又はアスパラギン酸であり、

10

20

30

40

50

X_5 は、グルタミン又はグルタミン酸であり、

X_8 は、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、

X_9 及び X_{14} は、別個にアルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンから成る群から選択され、

X_{10} は、イソロイシン又はセリンであり、

X_{12} は、セリン又はアスパラギン酸であり、

X_{14} は、チロシン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X_{15} は、アルギニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり、

X_{17} は、グルタミン酸又はグルタミンであり、

X_{18} は、メチオニン、アスパラギン又はスレオニンであり、

10

X_{19} は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X_{25} は、ヒスチジン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{29} は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X_{33} は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X_{34} は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{41} は、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、

X_{42} は、アラニン、リジン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され、

20

R_{22} は、AYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、PGPE（配列番号:11）、グリシン-プロリン-グルタミン酸トリペプチド、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、プロリン-グルタミン酸ジペプチド、アスパラギン-グルタミンジペプチド、グルタミン、グルタミン酸及びN-末端アミンから成る群から選択され、さらに

R_{13} はCOOH又はCONH₂であり、さらにここで、 X_{45} と指示されるアミノ酸は連結部分LMに直に結合される（すなわち、本明細書で用いられるIB-LM-IAの指示は、B鎖カルボキシ末端及びA鎖アミノ末端がさらに別のアミノ酸を全く介在させずに直に連結されることを表わすことを意図する）。

【0054】

ある実施態様では、連結部分（LM）は長さが17アミノ酸を超えないアミノ酸配列を含む。ある実施態様では、連結部分は、配列 $X_{51}X_{52}GSSSX_{57}X_{58}$ （配列番号:49）又は $X_{51}X_{52}GSSSX_{57}X_{58}APQT$ （配列番号:50）を含み、式中、 X_{51} はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンから成る群から選択され、 X_{52} はアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンであり、さらに、 X_{57} 又は X_{58} は別個にアルギニン、リジン、システイン、ホモシステイン、アセチル-フェニルアラニン又はオルニチンであり、前記は、場合によって連結部分の7又は8位（すなわち X_{57} 又は X_{58} ）のアミノ酸の側鎖に連結される親水性部分を有する。連結部分のアミノ酸の位置は、IGF-1の天然のC鎖（配列番号:17）の対応する位置を基準にして示される。

【0055】

別の実施態様では、連結部分は、B鎖のカルボキシ末端アミノ酸に直に連結される、連結する29アミノ酸の配列を含み、前記連結する29アミノ酸の配列は、SSSSX₅₀APPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQX₅₁（配列番号:68）と70%、80%、90%を超える配列同一性を有する（式中 X_{50} 及び X_{51} は別個にアルギニン及びリジンから選択される）。ある実施態様では、連結ペプチドは、合計29から158又は29から58アミノ酸を含み、さらに配列番号:68の配列を含む。別の実施態様では、連結部分は、B鎖のカルボキシ末端アミノ酸に直に連結される、連結する29アミノ酸の配列を含み、前記連結する29アミノ酸の配列は、SSSSX₅₀APPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQX₅₁（配列番号:68）と90%を超える配列同一性を有する（式中 X_{50} 及び X_{51} は別個にアルギニン及びリジンから選択される）。ある実施態様では、連結部分は、配列SS SSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQK（配列番号:51）又はSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQR（配列番号:52）を含み、前記は場合によって1つ又は2つのアミノ酸置換を有する。

40

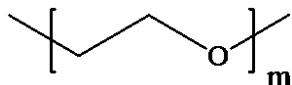
50

【0056】

ある実施態様にしたがえば、ヒトインスリンのB鎖及びA鎖、又はそのアナローグ若しくは誘導体を含む、単一鎖インスリンアゴニストポリペプチドが提供され、ここで、天然のB鎖の最後の5つのカルボキシアミノ酸は欠失し（すなわち、B26 - B30）、アミノ酸B25は介在する連結部分を介してA鎖のアミノ酸A1に連結される。ある実施態様では、連結部分は以下の構造を含み：

【0057】

【化2】



10

【0058】

式中、mは10から14の範囲の整数であり、連結部分はB鎖のB25アミノ酸に直に連結される。

【0059】

ある実施態様では、一般式IB-LM-IAを有するインスリンペプチドを含む、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物が提供され、ここで、IBは配列GPEHLCGAX₃₀LVDALYLVCGX₄₂GFYFNX₄₈X₄₉（配列番号:40）を含み、LMは配列SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQK（配列番号:51）、SSSKAPPPLPSPSRLPGPSDTPILPQR（配列番号:52）、GYGSSSR（配列番号:18）又はGAGSSSR（配列番号:22）を含み、IAは配列GIVDECCX₈X₉SCDLX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈X₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号:35）を含み、式中、

20

X₈は、ヒスチジン又はフェニルアラニンであり、

X₉は、アルギニン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₄及びX₁₅はともにアルギニンであり、

X₁₇はグルタミン酸であり、

X₁₉は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノフェニルアラニンであり、

X₂₁は、アラニン又はアスパラギンであり、

X₂₅は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X₃₀は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

30

X₄₂は、アラニン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され、

R₁₃はCOOHである。

【0060】

単一鎖インスリンアナローグのための連結部分ペプチドリンカー

ある実施態様にしたがえば、連結部分は、6-18、8-18、8-17、8-12、8-10、13-17又は13-15アミノ酸（又はアミノ酸アナローグ若しくはその誘導体）のペプチド又はペプチド模倣体である。ある実施態様では、連結部分は、該ペプチド連結部分が2つ以上の隣接する塩基性アミノ酸残基を含む、6-18、8-18、8-17、8-12、8-10、13-17又は13-15アミノ酸のペプチド又はペプチド模倣体である。ある実施態様にしたがえば、連結部分は、配列X₅₁X₅₂X₅₃X₅₄X₅₅X₅₆X₅₇X₅₈（配列番号:9）を含む、8から17の非天然アミノ酸配列であり、式中、X₅₁、X₅₂、X₅₃、X₅₄、X₅₅及びX₅₆は、別個に任意のアミノ酸又はアミノ酸アナローグ若しくはその誘導体であり、X₅₇及びX₅₈は塩基性アミノ酸である。ある実施態様では、連結部分は、配列X₅₁X₅₂X₅₃X₅₄X₅₅X₅₆RR（配列番号:10）を含む、長さが8から17アミノ酸の非天然ポリペプチドであり、式中、X₅₂は非芳香族アミノ酸である（例えばアラニンを含む）。ある実施態様では、連結部分は長さが8から17のアミノ酸であり、さらに配列X₅₁X₅₂GSSSR（配列番号:53）を含み、式中、X₅₁はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びメチオニンから成る群から選択され、X₅₂は非芳香族アミノ酸である（例えばアラニンを含む）。ある実施態様では、連結部分は長さが8から17のアミノ酸であり、ただ1つのアミノ酸置換によってX₅₁X₅₂GSSSR（配列番号

40

50

:53) と異なる配列を含み、ここで、該アミノ酸置換はその側鎖でPEG化されるアミノ酸であり、さらに式中、 X_{51} はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びメチオニンから成る群から選択され、 X_{52} は非芳香族アミノ酸である（例えばアラニンを含む）。

【0061】

ある実施態様にしたがえば、連結部分はIGF-1C鎖配列（GYGSSSRAPQT（配列番号:17））の誘導体である。ある実施態様では、該誘導体は、リジン、システイン、オルニチン、ホモシステイン又はアセチル-フェニルアラニン残基によるただ1つのアミノ酸置換によって配列番号:17と異なるペプチドであり、さらに別の実施態様では、リジン、システイン、オルニチン、ホモシステイン又はアセチル-フェニルアラニンアミノ酸がPEG化される。さらに別のある実施態様では、連結部分はリジンによるただ1つの置換によって配列番号:17と異なるペプチドである。ある具体的な実施態様では、置換は配列番号:17の8位で実施される。出願人らは、IGF-1C鎖配列及びそのアナローグの連結部分としての使用は、野生型に近いインスリン活性を有する単一鎖インスリンポリペプチドを生じることを見出した。さらにまた、IGF-1C鎖配列アナローグの連結部分としての使用は、インスリンに対して選択的である（すなわちIGF-1受容体と比較してインスリン受容体でより高い結合及び/又は活性を有する）単一鎖インスリンポリペプチドをもたらす（前記IGF-1C鎖配列アナローグは、IGF-1C鎖配列の2位が改変されるか、又はカルボキシ末端の4つのアミノ酸がIGF-1C鎖配列から欠失している）。ある実施態様では、単一鎖インスリンポリペプチドは、IGF-1受容体と比較して、5×、10×、20×、30×、40×若しくは50×高い親和性又は活性をインスリン受容体で有する。

【0062】

ある実施態様にしたがえば、連結部分はIGF-1C鎖配列（GYGSSSRAPQT（配列番号:17））の誘導体であり、1つから3つのアミノ酸置換又は1つから2つのアミノ酸置換によってGYGSSRR（配列番号:18）又はGAGSSSRAPQT（配列番号:23）と異なる非天然の配列を含む。ある実施態様では、該アミノ酸置換の少なくとも1つはリジン又はシステインによる置換であり、ある実施態様では、該アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。ある実施態様では、連結部分は8から17アミノ酸のペプチド（又はペプチド模倣体）であり、1アミノ酸置換（例えばリジン又はシステインによる置換を含む）によってGYGSSRR（配列番号:18）又はGAGSSSRAPQT（配列番号:23）と異なる非天然のアミノ酸配列を含む。ある実施態様では、連結部分は配列GYGSSRR（配列番号:18）又はGAGSSSRAPQT（配列番号:23）を含む。ある実施態様では、連結部分は、配列GAGSSRX₅APQT（配列番号:54）、GYGSSSX₅X₅APQT（配列番号:69）、又はただ1つのアミノ酸置換によって配列番号:54と異なるアミノ酸を含み（式中、 X_{57} はアルギニンであり、 X_{58} はアルギニン、オルニチン又はリジンである）、さらに別の実施態様では、ポリエチレングリコール鎖が前記連結部分の8位のアミノ酸の側鎖に連結される。別の実施態様では、連結部分は配列GX₅₂GSSSRX₅APQT（配列番号:55）を含み、式中、 X_{52} は任意の非芳香族アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン又はプロリンを含む）であり、 X_{58} はその側鎖にポリエチレン鎖が共有結合により連結されるアミノ酸を表す。ある実施態様では、 X_{58} はPEG化リジンである。

【0063】

別の実施態様では、連結部分は、配列GX₅₂GSSRR（配列番号:56）を含む8から17アミノ酸の配列であり、式中、 X_{52} は、任意のアミノ酸、配列番号:31のペプチド模倣体、又は配列番号:31の1、3、4、5、6、7又は8位のいずれかのただ1つのアミノ酸置換によって配列番号:31と異なる前記のアナローグである（ただし連結ペプチドが8アミノ酸より長いとき X_{52} はチロシン以外であることを条件とする）。ある実施態様にしたがえば、連結部分は、以下から成る群から選択される8-17アミノ酸の配列を含む：GYGSSRR（配列番号:18）、GAGSSRR（配列番号:22）、GAGSSRRA（配列番号:57）、GAGSSRRAP（配列番号:58）、GAGSSRRAPQ（配列番号:59）、GAGSSRRAPQT（配列番号:23）、PYGSSRR（配列番号:61）、PAGSSRR（配列番号:62）、PAGSSRRA（配列番号:63）、PAGSSRRAP（配列番号:64）、PAGSSRRAPQ（配列番号:65）PAGSSRRAPQT（配列番号:66）。ある実施態様にしたがえば

10

20

30

40

50

、連結部分は、ただ1つのPEG化アミノ酸による（例えばPEG化リジン又はPEG化システインアミノ酸による）置換によってGYGSSSRR（配列番号:18）、GAGSSSRR（配列番号:22）、GAGSSSRRA（配列番号:57）、GAGSSSRRAP（配列番号:58）、GAGSSSRRAPQ（配列番号:59）、GAGSSSRRAPQT（配列番号:23）、PYGSSSRR（配列番号:61）、PAGSSSRR（配列番号:62）、PAGSSSRRA（配列番号:63）、PAGSSSRRAP（配列番号:64）、PAGSSSRRAPQ（配列番号:65）PAGSSSRRAPQT（配列番号:66）と異なるアミノ酸配列を含む。ある実施態様では、PEG化アミノ酸は連結部分の8位に存在する。

【0064】

ある実施態様では、C-末端ペプチド（CTP：SSSKAPPSLPSRPLPGPSDTPILPQR（配列番号:52））と称されるペプチド配列（前記は、真核細胞発現系で発現されるときO-結合高グリコシル化を受け易い）をリンカーペプチドとして用いることができる。驚くべきことに、出願人らは、CTPペプチドを用いてインスリンのA及びB鎖を接続し、天然のプロインスリンC-ペプチドでは不可能な態様でin vitroにおける高い効能を維持しながら単一鎖インスリンアナローグを形成できることを見出した。ある実施態様では、B鎖のカルボキシ末端がA鎖のアミノ末端にCTPペプチドを介して連結されるインスリンペプチドを含む、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物が調製される。べつの実施態様では、インスリンアナローグは、B鎖のC-末端及び/又はB鎖のアミノ末端に共有結合により連結されたCTPを有する二鎖構築物として提供される。in vitro及びin vivoにおける特徴は、CTP改変インスリンアナローグはグリコシル化の非存在下で高い効能を有することを示し、したがってグリコシル化（より長時間持続タンパク質のための自然のアプローチ）に基づくインスリン作用の延長メカニズムを提供する。

【0065】

出願人らは、CTPペプチドの一次配列は決定的であるようには思われないことを見出した。したがって、ある実施態様では、連結部分は、同様なアミノ酸内容を共有する少なくとも18アミノ酸の長さを有するペプチドを含む。ある実施態様では、連結部分は配列番号:68のアナローグを含み、前記アナローグは、1、2、3、4、5又は6つのアミノ酸置換によって配列番号:68と異なる。ある実施態様では、連結ペプチドはCTPペプチドを含み、ここで、アミノ酸置換は、配列番号:68の1、2、3、4、10、13、15及び21位から選択される1つ以上の位置で実施される。ある実施態様では、連結部分は、B鎖のカルボキシ末端アミノ酸に直に連結される、連続する29アミノ酸の配列を含み、ここで、前記連続する29アミノ酸配列は、SSSX₅₀APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQX₅₁（配列番号:68）と60、80又は90%を超える配列同一性を有するが、ただし当該配列は配列番号:53に含まれる15アミノ酸の配列と同一の15アミノ酸の配列を含まないことを条件とする。別の実施態様では、B鎖のカルボキシ末端アミノ酸に直に連結される、連続する29アミノ酸の配列を含み、ここで、前記連続する29アミノ酸配列を含むアミノ酸の少なくとも58%はセリン及びプロリンから成る群から選択される。

【0066】

別の実施態様では、連結部分は、B鎖のカルボキシ末端アミノ酸に直に連結される、連続する29アミノ酸の配列を含み、ここで、前記連続する29アミノ酸配列は、SSSX₅₀APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQX₅₁（配列番号:68）と70、80又は90%を超える配列同一性を有し、X₅₀及びX₅₁は別個にアルギニン及びリジンから選択されるが、ただし当該配列は配列番号:53に含まれる15アミノ酸の配列と同一の15アミノ酸の配列を含まないことを条件とする。別の実施態様では、連結部分は、B鎖のカルボキシ末端アミノ酸に直に連結される、連続する29アミノ酸の配列を含み、ここで、前記連続する29アミノ酸配列は配列番号:52のアナローグであり、前記アナローグは、1、2、3、4、5又は6つのアミノ酸改変によってのみ配列番号:52と異なり、さらに別の実施態様では、該アミノ酸改変は保存的アミノ酸置換である。別の実施態様では、連結部分は、B鎖のカルボキシ末端アミノ酸に直に連結される、連続する29アミノ酸の配列を含み、ここで前記連続する29アミノ酸配列は配列番号:52のアナローグであり、前記アナローグは1、2又は3つのアミノ酸置換によってのみ配列番号:52と異なる。

10

20

30

40

50

【0067】

出願人らは、CTPペプチドのマルチコピーを、单一鎖アナローグで連結ペプチドとして及び／又は单一鎖のB鎖のアミノ末端に連結される連結ペプチドとして又は二鎖インスリンアナローグで連結ペプチドとして用いることができるを見出した。CTPペプチドのマルチコピーは配列が同一でも異なっていてもよく、頭対尾又は頭対頭の向きで編成することができる。ある実施態様にしたがえば、配列 $(SSSX_{50}APPSPSPSRLPGPSDTP1LPQX_{51})_n$ （配列番号:68）を有するCTPペプチドを含むインスリンアナローグが提供され、式中nは1、2、3及び4から成る群から選択される整数であり、 X_{50} 及び X_{51} は別個にアルギニン及びリジンから選択される。

ある実施態様では、CTPペプチドは配列 $SSSX_{50}APPSPSPSRLPGPSDTP1LPQX_{51}$ （配列番号:58）を含み、式中、 X_{50} 及び X_{51} は別個にアルギニン及びリジンから選択される。別の実施態様では、CTPペプチドは、 $SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTP1LPQK$ （配列番号:51）、 $SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTP1LPQR$ （配列番号:52）又は $SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTP1LPQ$ （配列番号:67）から成る群から選択される配列を含み、さらに別の実施態様では、CTPペプチドは配列 $SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTP1LPQK$ （配列番号:53）を含む。

【0068】

グリコシル化

*in vivo*での初期タンパク質生成時には、グリコシル化部位を含むインスリンアナローグは、翻訳後改変として公知の更なるプロセッシングに付され、ここで糖（グリコシル）残基がグリコシル化として公知のプロセスで付加され得る。生成されたタンパク質（共有結合により連結されたオリゴ糖側鎖を保持する）は、グリコシル化タンパク質又は糖タンパク質として知られている。したがって、グリコシル化部位を保持するタンパク質は必ずしもグリコシル化されるわけではない。ある実施態様にしたがえば、真核細胞発現系で発現されたとき高グリコシル化され易いペプチド配列を含むように改変されてあるインスリンアゴニストアナローグが提供される。

非天然及び天然のグリコシル化配列は当業者に公知であり、N-結合グリコシル化部位及びO-結合グリコシル化部位が含まれる。N-結合グリコシル化部位は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識部位として有用なペプチド配列である。O-結合グリコシル化のためのトリペプチド配列には、アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン（Xはプロリン以外の任意のアミノ酸）が含まれる。したがって、ポリペプチド中のこれらトリペプチド配列の存在は潜在的なグリコシル化部位を生じさせる。O-結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸（もっとも一般的にはセリン又はスレオニンであるが5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシルセリンもまた用いることができる）への炭水化物の酵素的結合のための認識部位として有用なペプチド配列である。ある実施態様では、O-結合グリコシル化糖はN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース又はキシロースである。多数のO-結合グリコシル化部位が当業界で公知であり、文献に報告されている（例えは以下を参照されたい：Ten Hagen et al. (11029) J.Biol.Chem.274(39):27867-74；Hanisch et al. (2001) Glycobiology 11:731-740；及びTen Hagen et al. (2003) Glycobiology 13:1R-16R。

【0069】

ある実施態様にしたがえば、高グリコシル化インスリンアナローグを生成する方法が提供される。前記方法は、非天然のグリコシル化部位（例えはCTPペプチド配列）を含むように改変されてあるインスリンアナローグをコードする遺伝子を含む真核細胞宿主を提供する工程、及び前記細胞を該インスリンアナローグ遺伝子の発現を可能にする条件下で培養する工程を含む。ある実施態様では、宿主細胞はヒトグリコシル化酵素を発現し、したがって当該宿主細胞で生成されるグリコシル化タンパク質（糖タンパク質）は、ヒト細胞のグリコシル化タンパク質と同一のタンパク質グリコシル化を示す（米国特許出願公開公報2004/0018590及び2002/0137134号、前記文献の開示内容は参照により本明細書に組み入れられる）。ある実施態様にしたがえば、真核宿主細胞は酵母（例えはピキア・パストリス（*Pichia pastoris*））又は哺乳動物細胞（CHO又はHEK293）から選択される。

10

20

30

40

50

【0070】

ある実施態様にしたがえば、インスリンアナローグが提供され、前記インスリンペプチドにはグリコシル化部位が導入されてある。ある実施態様では、インスリンアナローグ(二鎖又は単一鎖アナローグ)が提供され、前記アナローグではグリコシル化部位を含むペプチドがインスリンB鎖のカルボキシ末端に連結されてある。ある実施態様では、インスリンB鎖のカルボキシ末端をインスリンA鎖のアミノ末端に共有結合により継ぎ合わせる連結部分を含む、単一鎖インスリンアナローグが提供され、前記アナローグでは、該連結部分は18より大きい残基のアミノ酸配列を含み、かつ1つ以上のグリコシル化部位を含む。さらに別の実施態様では、2つのペプチド配列を含むインスリンアナローグが提供され、前記配列の各々は少なくとも1つのグリコシル化部位(同じか又は異なる)を含む。ある実施態様では、グリコシル化部位を含む第一のペプチド配列はB鎖のN-末端に連結され、グリコシル化部位を含む第二のペプチド配列はA又はB鎖のC-末端に連結される。ある実施態様では、インスリンアナローグは単一鎖アナローグであり、前記ではBとA鎖を継ぎ合わせる連結部分は第二のペプチド配列を含む。

【0071】

ある実施態様では、グリコシル化部位は、土台のインスリンアナローグにアミノ酸配列を付加することによって導入される。より具体的には、出願人らは、C-末端ペプチドと称されるペプチド配列(CTP:SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQR(配列番号:52))(前記C-末端ペプチドは、真核細胞発現系で当該タンパク質が発現されるときにはO-結合高グリコシル化を受け易い)は、インスリンアナローグの固有のin vitro活性を害することなくインスリンアナローグに共有結合により連結され得ることを見出した。

ある実施態様にしたがえば、A鎖及びB鎖並びにCTPペプチドを含むインスリンアナローグが提供され、ここで、CTPペプチドは配列番号:52と少なくとも60、70、80、85、90または95%の配列同一性を有するペプチドである。ある実施態様では、CTPペプチドは、配列番号:52の18から29アミノ酸の領域と少なくとも80、82、84、86、88、90、92、94、96又は98%の配列同一性を共有する18から29アミノ酸の配列を含むペプチドである。ある実施態様では、CTPペプチドは配列番号:52のアナローグを含み、ここで、前記アナローグは、1つ、1つから2つ、3つから4つ、4つから6つ又は8つまでのアミノ酸置換によって配列番号:52と異なる。ある実施態様では、該アミノ酸置換は、配列番号:52の1-4、7-15, 18, 20、21、24及び27から選択される1つ以上の位置に存在する。ある実施態様では、アミノ酸置換は配列番号:52の1、2、3、4、10、13、15及び21から選択される1つ以上の位置に存在する。ある実施態様では、アミノ酸置換は配列番号:52の7、8、9、12、14、18、20、24及び27から選択される1つ以上の位置に存在する。ある実施態様では、CTPペプチドは、1つから2つのアミノ酸置換によって配列番号:68と異なる29アミノ酸の配列を含む。さらに別の実施態様では、CTPペプチドは配列番号:52のフラグメントを含み、前記フラグメントは、配列番号:52に含まれるアミノ酸配列と同一の連続する18から28アミノ酸の配列を表す。ある実施態様では、CTPペプチドは、配列番号:68、配列番号:52又は配列番号:51から成る。

【0072】

ある実施態様にしたがえば、CTPペプチドは配列SSSSX₅₀APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQX₅₁(配列番号:68)のペプチドを含み、式中、X₅₀及びX₅₁は別個にアルギニン若しくはリジン、又は1つ若しくは2つのアミノ酸改変によってSSSSX₅₀APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQX₅₁(配列番号:68)と異なるペプチドである。ある実施態様では、CTPペプチドは29アミノ酸の配列であり、前記配列は、SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQK(配列番号:51)、SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQR(配列番号:52)及びSSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ(配列番号:67)から成る群から選択される配列を含む。ある実施態様では、CTPペプチドは、配列(SSSSX₅₀APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ₅₁)_n(配列番号:68)を含み、式中nは1、2、3及び4から成る群から選択される整数であり、さらに別の実施態様では、nは1又は2である。さらに別の実施態様では、第一のCTPペプチドはB鎖のN-末端に連結され第二のCTPペプチドはB鎖のカルボキシ末端に連結され、ここで、第一及び第二のCTPペプチドは、別個に、配列番号:51

10

20

30

40

50

、配列番号:52、配列番号:68及び配列番号:67から成る群から選択される配列を含む。

【0073】

非ペプチドリンカー

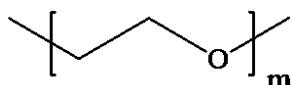
ある実施態様では、連結部分は比較的短い二官能性非ペプチドポリマーリンカーで、前記リンカーは長さがほぼ8-16アミノ酸の配列である。ある実施態様にしたがえば、非ペプチド連結部分は、約4から20、8から18、8から16、8から14、10から14、10から12、又は11から13モノマーのポリエチレングリコールリンカーである。ある実施態様では、天然のB鎖の最後の5つのカルボキシアミノ酸が欠失し、さらにアミノ酸B25が介在する結合によって連結部分に直に連結される、単一鎖インスリンアゴニストが提供される。連結部分の第二の末端はA鎖のアミノ酸A1に直に結合され、したがって該連結部分を介してB及びA鎖は連結される。ある実施態様では、連結部分は、少なくとも10のただし16を超えないモノマーユニットを含む線状ポリエチレングリコール連結部分であり、別の実施態様では、ポリエチレングリコール連結部分は、少なくとも12のただし16を超えないモノマーユニットを含み、さらに別の実施態様では、ポリエチレングリコール連結部分は少なくとも10のただし14を超えないモノマーユニットを含む。

【0074】

ある実施態様にしたがえば、ポリエチレングリコール連結部分は以下の構造を含み、

【0075】

【化3】



【0076】

式中、mは6から18、8から16、10から14又は11から13の範囲の整数である。ある実施態様では、mは10、11、12、13又は14から選択される整数である。ある実施態様では、mは12である。

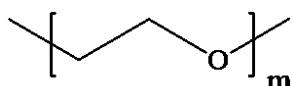
ある実施態様では、天然のB鎖の最後の5つのカルボキシアミノ酸が欠失し、さらにアミノ酸B25が、少なくとも8のただし16を超えないモノマーユニットのポリエチレングリコール及び1つから4つのアミノ酸のアミノ酸配列を含む連結部分を介してA鎖のアミノ酸A1に連結される、単一鎖インスリンアゴニストが提供される。ある実施態様にしたがえば、連結部分は、1-4アミノ酸の配列及び前記1-4アミノ酸配列に結合される長さが少なくとも8のただし14未満のモノマーユニットの線状ポリエチレングリコールを含むが、ただし該アミノ酸配列がYTPK (配列番号:70) 又はFNKP (配列番号:71) ではないことを条件とする。別の実施態様では、天然のB鎖の最後の5つのカルボキシアミノ酸が欠失し、さらにアミノ酸B25が、少なくとも8つのただし14未満のモノマーユニットのポリエチレングリコール及び2-5アミノ酸の配列を含む連結部分を介してA鎖のアミノ酸A1に連結される、単一鎖インスリンアゴニストが提供される。該2-5アミノ酸の配列は、B鎖とポリエチレングリコール鎖との間、又はA鎖とポリエチレングリコール鎖との間に位置し得る。しかしながら、2-5アミノ酸の配列がB鎖とポリエチレングリコール鎖との間に位置するとき、該アミノ酸配列はYTPKT (配列番号:16) 又はFNKPT (配列番号:76) ではない。

【0077】

ある実施態様では、連結部分は一般構造: $W_1 - Z_1 - Y_1$ を含み、式中、 W_1 及び Y_1 は別個に、結合、 $X_{46}X_{47}$ 、 $X_{46}X_{47}X_{48}$ 、 $X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}$ (配列番号:24) 又は $X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}X_{50}$ (配列番号:13) であるが、ただし W_1 はYTPK (配列番号:70) 又はFNKP (配列番号:71) ではなく、かつ Z_1 は下記一般構造のポリエチレングリコールを表すことを条件とし、

【0078】

【化4】



10

20

30

40

50

【0079】

式中、 m は6 - 14の範囲の整数であり、 X_{46} 、 X_{47} 、 X_{48} 、 X_{49} 及び X_{50} の各々は別個に任意のアミノ酸である。ある実施態様では、 X_{46} 、 X_{47} 、 X_{48} 、 X_{49} 及び X_{50} は、インスリン又はIGF-1のB26 - B30位に対応し任意の非天然アミノ酸である。ある実施態様では、 X_{46} 、 X_{47} 、 X_{48} 、 X_{49} 及び X_{50} は別個にグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン及びプロリンから成る群から選択され、さらに別の実施態様では、 X_{46} 、 X_{47} 、 X_{48} 、 X_{49} 及び X_{50} は別個にグリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンから成る群から選択される。ある実施態様では、 W_1 は結合であり、 Y_1 は X_{46} 、 $X_{46}X_{47}$ 又は $X_{46}X_{47}X_{48}$ （配列番号:15）（式中 X_{46} 、 X_{47} 及び X_{48} は各々アラニンである）であり、 Z は4 - 14モノマーユニットのポリエチレングリコールである。ある実施態様では、 Y_1 は結合であり、 W_1 は X_{46} 、 $X_{46}X_{47}$ 又は $X_{46}X_{47}X_{48}$ （配列番号:15）（式中 X_{46} 、 X_{47} 及び X_{48} は各々アラニンである）であり、 Z は4 - 14モノマーユニットのポリエチレングリコールである。10

【0080】

ある実施態様では、A鎖及びB26 - B30（天然のインスリン配列に対比して）が除去され
てあるC-末端短縮B鎖を含む単一鎖インスリンアナローグが提供され、ここで、A鎖及びB
鎖はヒトインスリン配列又はそのアナローグ若しくは誘導体であり、さらにまたB鎖のB25
アミノ酸のカルボキシ末端は連結部分の第一の末端に直に連結され、該連結部分の第二の
末端はA鎖のA1アミノ酸のアミノ末端に直に連結される。ある実施態様では、切端B鎖は配
列番号:20の配列を含み、ここでB25アミノ酸は連結ペプチドのN-末端に直に連結される。
この実施態様では、連結部分は以下のいずれかを含む：20

- a) 6 - 16モノマーユニットのポリエチレングリコール；
- b) 長さが少なくとも8アミノ酸さらに17アミノ酸を超えない非天然アミノ酸配列；又は
- c) 前記ポリエチレングリコール及び1から4アミノ酸の非天然アミノ酸配列の組み合わせ
。

【0081】

インスリンペプチドのPEG化

出願人らは、親水性部分と本明細書に開示するインスリン単一鎖アナローグとの共有結合
は、より遅い開始、延長された持続時間有するアナローグを提供し、基礎的活性プロ
フィールを示すことを見出した。ある実施態様では、本明細書に開示するインスリンペプ
チドは、A鎖のA9、A14及びA15から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖、又はB鎖
のN-末端アルファアミン（例えばインスリン系B鎖のB1位又はIGF-1系B鎖のB2位）、又はB
鎖のB1、B2、B10、B22、B28又はB29位のアミノ酸の側鎖、又はA鎖及びB鎖を連結する連結
部分の任意の位置で共有結合により連結される親水性部分を含むようにさらに改変される
。例示的実施態様では、この親水性部分は、これらの位置のいずれかのLys、Cys、Orn、
ホモシステイン、又はアセチル-フェニルアラニンに共有結合により連結される。ある実
施態様では、親水性部分は連結部分のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結される。30

【0082】

例示的な親水性部分には、ポリエチレングリコール（PEG）、例えば分子量が約1,000ダ
ルトンから約40,000ダルトン、又は約20,000ダルトンから約40,000ダルトンのものが含
まれる。さらに別の適切な親水性部分には、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル
化ポリオール（例えばPOG）、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グル
コース、ポリオキシエチル化グリセロール（POG）、ポリオキシアルキレン、ポリエチ
レングリコールプロピオナルデヒド、エチレングリコール/プロピレングリコールコポ
リマー、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、モノ-(C1-C10)アルコキシ-又はアリ
ルオキシ-ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリアセタール、ポ
リビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3
,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリ(ベータ-アミノ酸)(ホモポ
リマー又はランダムコポリマー)、ポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、
プロプロピレングリコールホモポリマー（PEG）及び他のポリアルキレンオキシド、ポリ
プロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、コロン酸又は他の多糖類ポリマー、40

フィコール (Ficoll) 又はデキストラン並びに前記の混合物が含まれる。

【0083】

親水性部分、例えばいくつかの実施態様にしたがえばポリエチレンジリコール鎖は、約500から約40,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。ある実施態様では、親水性部分、例えばPEGは、約500から約5,000ダルトン、又は約1,000から約5,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。別の実施態様では、親水性部分、例えばPEGは、約10,000から約20,000ダルトンの分子量を有する。さらに他の例示的な実施態様では、親水性部分、例えばPEGは、約20,000から約40,000ダルトンの分子量を有する。ある実施態様では、親水性部分、例えばPEGは約20,000ダルトンの分子量を有する。ある実施態様では、アナローグの1つ以上のアミノ酸がPEG化され、共有結合により連結されるPEG鎖の合計分子量が約20,000ダルトンであるインスリンポリペプチドが提供される。

ある実施態様では、親水性部分としてデキストランが用いられる。デキストランは、もっぱら 1-6結合によって連結されたグルコースサブユニットの多糖類ポリマーである。デキストランは、多くの分子量範囲 (例えば約1kDから約100kD、又は約5、10、15若しくは20kDから約20、30、40、50、60、70、80若しくは90kD) で入手できる。

直鎖又は分枝ポリマーが意図される。結果として得られる複合物の調製物は本質的に単分散又は多分散であり、ペプチド当たり約0.5、0.7、1、1.2、1.5又は2ポリマーを有し得る。

【0084】

ある実施態様では、親水性部分はポリエチレンジリコール (PEG) 鎖であり、前記は場合によって、A鎖のA9、A14及びA15、B鎖のB1、B2、B10、B22、B28又はB29位から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖、B鎖のN-末端アルファアミン、又はA鎖及びB鎖を連結する単一鎖インスリンアナローグの連結部分の任意の位置 (例えばC8位を含む) に連結される。ある実施態様では、インスリン単一鎖アナローグは8から12アミノ酸のペプチド連結部分を含み、該連結部分のアミノ酸の1つはその側鎖に共有結合したポリエチレン鎖を有する。ある実施態様では、インスリン単一鎖アナローグは8から12アミノ酸のペプチド連結部分を含み、該連結部分のアミノ酸はPEG化され、A鎖のA9、A14及びA15、B鎖のB1、B2、B10、B22、B28又はB29位から成る群から選択される位置の1つ以上のアミノ酸もまたPEG化される。ある実施態様では、共有結合により連結されるPEG鎖の全分子量は約20,000ダルトンである。

【0085】

ある実施態様では、単一鎖インスリンアナローグは8から12アミノ酸の連結部分を含み、該連結部分のアミノ酸の1つは、その側鎖に共有結合により連結された20,000ダルトンのポリエチレン鎖を有する。別の実施態様では、インスリンアナローグは8から12アミノ酸の連結部分を含み、ここで、該連結部分のアミノ酸の1つはその側鎖に共有結合により連結されたポリエチレン鎖を有し、さらに第二のPEG鎖が、B鎖のN-末端アルファアミン (例えばインスリン系B鎖ではB1位又はIGF-1系B鎖ではB2位) に又はB鎖のB1、B2及びB29位のアミノ酸側鎖に連結される。ある実施態様で2つのPEG鎖がインスリンペプチドに連結されるとき、各PEG鎖は約10,000ダルトンの分子量を有する。ある実施態様でPEG鎖が8から12アミノ酸の連結部分に連結されるとき、PEG鎖は連結部分のC7又はC8位に連結され、ある実施態様では、PEG鎖は連結部分のC8位に連結される。ある実施態様で2つのPEG鎖が単一鎖インスリンアナローグに連結されるとき、1つのPEG鎖はC8位に連結され第二のPEG鎖はA9、A14、A15、B1、B2、B10、B22、B28又はB29に連結される。

【0086】

親水性部分 (例えばポリエチレンジリコール) は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために用いられる任意の適切な条件下でインスリンポリペプチドに付加することができる。当業界で公知の任意の手段を用いることができ、前記手段には、アシル化、還元アルキル化、ミカエル添加、チオールアルキル化又は他の化学選択的複合化/結合方法 (PEG部分の反応基 (例えばアルデヒド、アミノ、エステル、チオール、-ハロアセチル、マレイミド又はヒドロジノ基) から標的化合物の反応基 (例えばアルデヒド、アミノ

10

20

30

40

50

、エステル、チオール、-ハロアセチル、マレイミド又はヒドラジノ基)を介する)が含まれる。水溶性ポリマーを1つ以上のタンパク質に連結するために用いることができる活性基にはスルホン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート、アジジリン、オキシラン及び5-ピリジルが含まれるが、ただしこれらに限定されない。還元アルキル化によってペプチドに付加される場合は、選択されるポリマーは、ポリマー化度を制御できるように単反応性アルデヒドを有するべきである。例えば以下を参照されたい: Kinstler et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 477-485, 2002; Roberts et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476, 2002; 及びZalipsky et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182, 1995。

【0087】

10

アシル化

いくつかの実施態様では、インスリンアナローグはアシル基を含むように改変される。アシル基は、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸と直に、又はグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸とスペーサーを介して間接的に共有結合により連結され得る。ここで該スペーサーは、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸とアシル基との間に配置される。グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は、親水性部分が連結される同じアミノ酸の位置で、又は異なるアミノ酸の位置でアシル化することができる。例えば、アシル化は、A鎖又はB鎖のアミノ酸のいずれか或いは連結部分内の位置を含む任意の位置で生じ得るが、ただしアシル化されていないグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物によって示される活性がアシル化に際しても維持されることを条件とする。非限定的な例には、A鎖のA14及びA15位、インスリン系B鎖ではB1位若しくはIGF-1系B鎖ではB2位、又はB鎖のB10、B22、B28若しくはB29、又は連結部分の任意の位置が含まれる。

20

【0088】

本発明のある具体的な特徴では、インスリンアナローグは、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシル又はチオールの直接的アシル化によってアシル基を含むように改変される。いくつかの実施態様では、インスリンアナローグは、アミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して直接的にアシル化される。いくつかの実施態様では、アシル化はB28又はB29位に存在する(天然のインスリンA鎖及びB鎖配列のアミノ酸の番号付けによる)。これに関しては、A鎖又はB鎖配列で(例えばA14、A15、B1、B2、B10、B22、B28又はB29位(天然のインスリンA及びB鎖配列のアミノ酸の番号付けによる)を含む)又は連結部分の任意の位置で、1つ以上のアミノ酸を側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含むアミノ酸で置換することによって改変されてあるインスリンアナローグを提供することができる。本発明のいくつかの具体的な実施態様では、インスリンペプチドの直接的アシル化は、B28又はB29位(天然のインスリンA及びB鎖配列のアミノ酸の番号付けによる)のアミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して生じる。

30

【0089】

ある実施態様にしたがえば、アシル化インスリンアナローグは当該ペプチドとアシル基との間にスペーサーを含む。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物はスペーサーに共有結合され、スペーサーはアシル基に共有結合される。いくつかの例示的実施態様では、インスリンペプチドは改変されて、スペーサーのアミン、ヒドロキシル若しくはチオール(スペーサーは、B28又はB29位(天然のインスリンA及びB鎖配列のアミノ酸番号付けによる)のアミノ酸の側鎖に付加される)を、又はスペーサー部分の任意の位置でアシル化することによってアシル基を含む。スペーサーが付加されるグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸は、スペーサーとの結合を許容する部分を含む任意のアミノ酸であり得る。例えば、側鎖-NH₂、-OH又は-COOHを含むアミノ酸(例えばLys、Orn、Ser、Asp又はGlu)が適切である。

40

【0090】

いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物とアシル基との

50

間のスペーサーは、側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含むアミノ酸（又は側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを含むアミノ酸を含むジペプチド又はトリペプチド）である。いくつかの実施態様では、スペーサーは親水性二官能性スペーサーを含む。具体的な実施態様では、スペーサーはアミノポリ(アルキルオキシ)カルボキシレートを含む。これに関して、スペーサーは、例えば $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ を含むことができる。式中、 m は1から6の任意の整数で、 n は2から12の任意の整数であり、スペーサーは例えば8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸で、前記は、ペプチドインターナショナルズ社 (Peptides International, Inc., Louisville, KY) から市場で入手できる。ある実施態様では、親水性二官能性スペーサーは、2つ以上の反応基（例えばアミン、ヒドロキシル、チオール及びカルボキシル基又は前記の任意の組み合わせ）を含む。ある種の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはアミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはチオール基及びカルボキシレートを含む。

【0091】

いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物とアシル基との間のスペーサーは疎水性二官能性スペーサーである。疎水性二官能性スペーサーは当業界では公知である。例えば以下を参照されたい：Bioconjugate Techniques, G.T.Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)（前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。ある種の実施態様にしたがえば、該二官能性スペーサーは合成又は自然に生じるアミノ酸であり、長さが3から10原子のアミノ酸骨格を含む（例えば6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸及び8-アミノオクタン酸）。また別には、スペーサーは、長さが3から10原子（例えば6から10原子）のペプチド骨格を有するジペプチド又はトリペプチドスペーサーであり得る。グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物に付加されるジペプチド又はトリペプチドの各アミノ酸は、以下から成る群から別個に選択できる：自然に生じるアミノ酸及び/又は自然には生じないアミノ酸で、例えば以下を含む：自然に生じるアミノ酸 (Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr) のD若しくはL異性体、又は以下から成る群から選択される自然には生じないアミノ酸のD若しくはL異性体： -アラニン (-Ala)、N- -メチル-アラニン (Me-Ala)、アミノ酪酸 (Abu)、 -アミノ酪酸 (-Abu)、アミノヘキサン酸 (-Ahx)、アミノイソ酪酸 (Aib)、アミノメチルピロールカルボン酸、アミノピペリジンカルボン酸、アミノセリン (Ams)、アミノテトラヒドロピラン-4-カルボン酸、アルギニンN-メトキシ-N-メチルアミド、 -アスパラギン酸 (-Asp)、アゼチジンカルボン酸、3-(2-ベンゾチアゾリル)アラニン、 -tert-ブチルグリシン、2-アミノ-5-ウレイド-n-吉草酸 (シトルリン、Cit)、 -シクロヘキシルアラニン (Cha)、アセトアミドメチル-システィン、ジアミノブタン酸 (Dab)、ジアミノプロピオニ酸 (Dpr)、ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)、ジメチルチアゾリジン (DMTA)、 -グルタミン酸 (-Glu)、ホモセリン (Hse)、ヒドロキシプロリン (Hyp)、イソロイシンN-メトキシ-N-メチルアミド、メチル-イソロイシン (Melle)、イソニペコチン酸 (Isn)、メチル-ロイシン (MeLeu)、メチル-リジン、ジメチル-リジン、トリメチル-リジン、メタノプロリン、メチオニン-スルホキシド (Met(O))、メチオニン-スルホン (Met(O2))、ノルロイシン (Nle)、メチル-ノルロイシン (Me-Nle)、ノルバリン (Nva)、オルニチン (Orn)、パラ-アミノ安息香酸 (PABA)、ペニシラミン (Pen)、メチルフェニルアラニン (MePhe)、4-クロロフェニルアラニン (Phe(4-Cl))、4-フルオロフェニルアラニン (Phe(4-F))、4-ニトロフェニルアラニン (Phe(4-NO₂))、4-シアノフェニルアラニン (Phe(4-CN))、フェニルグリシン (Phg)、ピペリジニルアラニン、ピペリジニルグリシン、3,4-ジヒドロプロリン、ピロリジニルアラニン、サルコシン (Sar)、セレノシスティン (Sec)、U-ベンジル-ホスホセリン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸 (Sta)、4-アミノ-5-シクロヘキシル-3-ヒドロキシベンタン酸 (ACHPA)、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルベンタン酸 (AHPPA)、1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボン酸 (Tic)、テトラヒドロピラングリシン、チエニルアラニン (Thi)、U-

10

-アラニン (-Ala)、N- -メチル-アラニン (Me-Ala)、アミノ酪酸 (Abu)、 -アミノ酪酸 (-Abu)、アミノヘキサン酸 (-Ahx)、アミノイソ酪酸 (Aib)、アミノメチルピロールカルボン酸、アミノピペリジンカルボン酸、アミノセリン (Ams)、アミノテトラヒドロピラン-4-カルボン酸、アルギニンN-メトキシ-N-メチルアミド、 -アスパラギン酸 (-Asp)、アゼチジンカルボン酸、3-(2-ベンゾチアゾリル)アラニン、 -tert-ブチルグリシン、2-アミノ-5-ウレイド-n-吉草酸 (シトルリン、Cit)、 -シクロヘキシルアラニン (Cha)、アセトアミドメチル-システィン、ジアミノブタン酸 (Dab)、ジアミノプロピオニ酸 (Dpr)、ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)、ジメチルチアゾリジン (DMTA)、 -グルタミン酸 (-Glu)、ホモセリン (Hse)、ヒドロキシプロリン (Hyp)、イソロイシンN-メトキシ-N-メチルアミド、メチル-イソロイシン (Melle)、イソニペコチン酸 (Isn)、メチル-ロイシン (MeLeu)、メチル-リジン、ジメチル-リジン、トリメチル-リジン、メタノプロリン、メチオニン-スルホキシド (Met(O))、メチオニン-スルホン (Met(O2))、ノルロイシン (Nle)、メチル-ノルロイシン (Me-Nle)、ノルバリン (Nva)、オルニチン (Orn)、パラ-アミノ安息香酸 (PABA)、ペニシラミン (Pen)、メチルフェニルアラニン (MePhe)、4-クロロフェニルアラニン (Phe(4-Cl))、4-フルオロフェニルアラニン (Phe(4-F))、4-ニトロフェニルアラニン (Phe(4-NO₂))、4-シアノフェニルアラニン (Phe(4-CN))、フェニルグリシン (Phg)、ピペリジニルアラニン、ピペリジニルグリシン、3,4-ジヒドロプロリン、ピロリジニルアラニン、サルコシン (Sar)、セレノシスティン (Sec)、U-ベンジル-ホスホセリン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸 (Sta)、4-アミノ-5-シクロヘキシル-3-ヒドロキシベンタン酸 (ACHPA)、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルベンタン酸 (AHPPA)、1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボン酸 (Tic)、テトラヒドロピラングリシン、チエニルアラニン (Thi)、U-

20

30

40

50

ベンジル-ホスホチロシン、0-ホスホチロシン、メトキシチロシン、エトキシチロシン、0-(ビス-ジメチルアミノ-ホスホノ)-チロシン、チロシンスルフェートテトラブチルアミン、メチル-バリン(MeVal)、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸(Acx)、アミノ吉草酸、ベータ-シクロプロピル-アラニン(Cpa)、プロパルギルグリシン(Prg)、アリルグリシン(Alg)、2-アミノ-2-シクロヘキシル-プロパン酸(2-Cha)、タルトブチルグリシン(Tbg)、ビニルグリシン(Vg)、1-アミノ-1-シクロプロパンカルボン酸(Acp)、1-アミノ-1-シクロペタンカルボン酸(Acpe)、アルキル化3-メルカプトプロピオン酸、1-アミノ-1-シクロブantanカルボン酸(Acb)。いくつかの実施態様では、ジペプチドスペーサーは、Ala-Ala、-Ala- -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、アミノ酪酸- -アミノ酪酸、及び-Glu- -Gluから成る群から選択される。

10

【0092】

グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は、改変され、任意のサイズの長鎖アルカンのアシル化によってアシル基を含むように改変でき、任意の長さの炭素鎖を含むことができる。長鎖アルカンは長鎖状でも分枝状でもよい。ある種の特徴では、長鎖アルカンはC₄からC₃₀アルカンである。例えば長鎖アルカンは、C₄アルカン、C₆アルカン、C₈アルカン、C₁₀アルカン、C₁₂アルカン、C₁₄アルカン、C₁₆アルカン、C₁₈アルカン、C₂₀アルカン、C₂₂アルカン、C₂₄アルカン、C₂₆アルカン、C₂₈アルカン又はC₃₀アルカンのいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、長鎖アルカンはC₈からC₂₀アルカン、例えばC₁₄アルカン、C₁₆アルカン又はC₁₈アルカンを含む。

いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミン、ヒドロキシル又はチオール基はコレステロール酸でアシル化される。具体的な実施態様では、ペプチドは、アルキル化デスアミノCysスペーサー(すなわちアルキル化3-メルカプトプロピオン酸スペーサー)を介してコレステロール酸に連結される。アミン、ヒドロキシル及びチオールを介するペプチドアシル化の適切な方法は当業界で公知である。例えば以下を参照されたい: Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 377-382, 1996; Shimohigashi and Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62, 1982; 及びPreviero et al., Biophys Acta 263: 7-13, 1972(ヒドロキシル介するアシル化の方法); 並びにSan and Silvius, J Pept Res 66: 169-180, 2005(チオールを介するアシル化の方法); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pp.2-12, 1990; Hashimoto et al., Pharmacuetical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol.6, No:2 pp.171-176, 1989。

20

グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアシル化ペプチドのアシル基は任意のサイズ、例えば任意の長さの炭素鎖が可能であり、直鎖状でも分枝状でもよい。本発明のいくつかの具体的な実施態様では、アシル基はC₄からC₃₀脂肪酸である。例えばアシル基はC₄脂肪酸、C₆脂肪酸、C₈脂肪酸、C₁₀脂肪酸、C₁₂脂肪酸、C₁₄脂肪酸、C₁₆脂肪酸、C₁₈脂肪酸、C₂₀脂肪酸、C₂₂脂肪酸、C₂₄脂肪酸、C₂₆脂肪酸、C₂₈脂肪酸又はC₃₀脂肪酸のいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、アシル基はC₈からC₂₀脂肪酸、例えばC₁₄脂肪酸又はC₁₆脂肪酸である。

また別の実施態様では、アシル基は胆汁酸である。胆汁酸は任意の適切な胆汁酸でよい。前記にはコレール酸、ケノデオキシコレール酸、デオキシコレール酸、リトコレール酸、タウロコレール酸、グリココレール酸及びコレステロール酸が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

30

【0093】

アルキル化

いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物はアルキル基を含むように改変される。アルキル基は、インスリンアナローグのアミノ酸に直接的に、又はグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸にスペーサーを介して間接的に共有結合により連結でき、該スペーサーはグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸とアルキル基との間に配置される。アルキル基は、エーテル、チオエーテル又は

40

50

アミノ結合を介してグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物に付加できる。例えば、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は、親水性部分が連結される同じアミノ酸の位置で、又は異なるアミノ酸の位置でアルキル化できる。アルキル化はグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物内の任意の位置で実施でき、前記には例えばB鎖のC-末端領域又は連結部分内の位置が含まれるが、ただしインスリン活性が維持されることを条件とする。本発明の具体的な特徴では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は、当該グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシル又はチオールの直接的アルキル化によりアルキル基を含むように改変される。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は、アミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して直接的にアルキル化される。本発明のいくつかの具体的な実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物の直接的アルキル化は、A14、A15、B1位（インスリン系B鎖について）、B2位（IGF-1系B鎖について）、B10、B22、B28又はB29位（天然インスリンのA及びB鎖の番号付けによる）のアミノ酸の側鎖アミン、ヒドロキシル又はチオールを介して生じる。10

【0094】

本発明のいくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は当該ペプチドとアルキル基との間にスペーサーを含む。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物はスペーサーと共有結合され、スペーサーはアルキル基と共有結合される。

いくつかの例示的実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は改変され、スペーサーのアミン、ヒドロキシル又はチオールのアルキル化によってアルキル基を含み、前記スペーサーは、A14、A15、B1位（インスリン系B鎖について）、B2位（IGF-1系B鎖について）、B10、B22、B28又はB29位（天然のインスリンのA及びB鎖の番号付けによる）のアミノ酸の側鎖に付加される。スペーサーが付加されるグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸は、スペーサーとの結合を許容する部分を含む任意のアミノ酸（例えば-一置換アミノ酸又は-二置換アミノ酸）であり得る。側鎖-NH₂、-OH又は-COOHを含むグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアミノ酸（例えばLys、Orn、Ser、Asp又はGlu）が適切である。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のペプチドとアルキル基との間のスペーサーは、側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオールを含むアミノ酸、又は側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオールを含むアミノ酸を含むジペプチド又はトリペプチドである。20

【0095】

アルファアミンがアルキル化される事例では、スペーサーアミノ酸は任意のアミノ酸であり得る。例えばスペーサーアミノ酸は、疎水性アミノ酸、例えばGly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyrであり得る。また別には、スペーサーアミノ酸は酸性残基（例えばAsp及びGlu）であり得る。例示的な実施態様では、スペーサーアミノ酸は、疎水性アミノ酸、例えばGly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr、6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノオクタン酸であり得る。また別には、スペーサーアミノ酸は酸性残基、例えばAsp、Gluであり得るが、ただしアルキル化は酸性残基のアルファアミンで生じることを条件とする。スペーサーアミノ酸の側鎖アミンがアルキル化される事例では、スペーサーアミノ酸は、側鎖アミンを含むアミノ酸（例えば式Iのアミノ酸（例えばLys又はOrn））である。この事例では、アルファアミン及びスペーサーの側鎖アミンの双方がアルキル化され、したがってペプチドは二アルキル化され得る。本発明の実施態様はそのような二アルキル化分子を含む。40

いくつかの実施態様では、スペーサーは親水性二官能性スペーサーを含む。具体的な実施態様では、スペーサーはアミノポリ（アルキルオキシ）カルボキシレートを含む。これに關して、スペーサーは、例えばNH₂(CH₂CH₂O)_n(CH₂)_mCOOHを含むことができる。式中、mは1から6の任意の整数で、nは2から12の任意の整数であり、スペーサーは例えば8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸で、前記は、ペプチドインターナショナルズ社（Louisville, KY）から市場で入手できる。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリ50

ン複合物とアルキル基との間のスペーサーは親水性二官能性スペーサーである。ある種の実施態様では、親水性二官能性スペーサーは、2つ以上の反応基（例えばアミン、ヒドロキシル、チオール及びカルボキシル基又は前記の任意の組み合わせ）を含む。ある種の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはヒドロキシル基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはアミン基及びカルボキシレートを含む。他の実施態様では、親水性二官能性スペーサーはチオール基及びカルボキシレートを含む。

【0096】

スペーサー（例えばアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能性スペーサー又は疎水性二官能性スペーサー）は、長さが3から10原子である（例えば6から10原子、例えば6、7、8、9又は10原子）。より具体的な実施態様では、スペーサーは長さが約3から10原子（例えば6から10原子）であり、アルキルはC₁₂からC₁₈アルキル基、例えばC₁₄アルキル基、C₁₆アルキル基であり、したがってスペーサーとアルキル基の全長は14から28原子、例えば約14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27又は28原子である。いくつかの実施態様では、スペーサーとアルキル基の長さは17から28（例えば19から26、19から21）原子である。

ある実施態様にしたがえば、二官能性スペーサーは合成又は自然には生じないアミノ酸であり、長さが3から10原子のアミノ酸骨格を含む（例えば6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸及び8-アミノオクタン酸）。また別には、スペーサーは、長さが3から10原子（例えば6から10原子）のペプチド骨格を有するジペプチド又はトリペプチドであり得る。グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物に付加されるジペプチド又はトリペプチドは、自然に生じるアミノ酸及び/又は自然には生じないアミノ酸を含むことができ、前記には例えば本明細書に教示するアミノ酸のいずれかが含まれる。いくつかの実施態様では、スペーサーは全体的に陰性荷電を含み、例えば1つ又は2つの陰性荷電アミノ酸を含む。いくつかの実施態様では、ジペプチドスペーサーは、Ala-Ala、-Ala-Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、アミノ酪酸-アミノ酪酸、及び-Glu-Gluから成る群から選択される。ある実施態様では、ジペプチドスペーサーは-Glu-Gluである。

【0097】

アミン、ヒドロキシル及びチオールを介するペプチドアルキル化の適切な方法は当業界で公知である。例えばウィリアムソンエーテル合成を用いて、インスリンペプチドとアルキル基の間でエーテル結合を形成できる。ハロゲン化アルキルによるペプチドの求核置換反応もまたエーテル、チオエーテル又はアミノ結合のいずれかをもたらし得る。アルキル化グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のアルキル基は任意のサイズ、例えば任意の長さの炭素鎖が可能で、直鎖状でも分枝状でもよい。本発明のいくつかの実施態様では、アルキル基はC₄からC₃₀アルキルである。例えばアルキル基は、C₄アルキル、C₆アルキル、C₈アルキル、C₁₀アルキル、C₁₂アルキル、C₁₆アルキル、C₁₈アルキル、C₂₀アルキル、C₂₂アルキル、C₂₄アルキル、C₂₆アルキル、C₂₈アルキル又はC₃₀アルキルのいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、アルキル基はC₈からC₂₀アルキル、例えばC₁₄アルキル又はC₁₆アルキルである。

いくつかの具体的な実施態様では、アルキル基は、胆汁酸のステロイド部分、例えばコレール酸、ケノデオキシコレール酸、デオキシコレール酸、リトコレール酸、タウロコレール酸、グリココレール酸及びコレステロール酸を含む。

長鎖アルカンがグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物又はスペーサーによってアルキル化されるとき、該長鎖アルカンは任意のサイズでよく、任意の長さの炭素鎖を含むことができる。長鎖アルカンは直鎖状でも分枝状でもよい。ある種の特徴では、長鎖アルカンはC₄からC₃₀アルカンである。例えば長鎖アルカンは、C₄アルカン、C₆アルカン、C₈アルカン、C₁₀アルカン、C₁₂アルカン、C₁₄アルカン、C₁₆アルカン、C₁₈アルカン、C₂₀アルカン、C₂₂アルカン、C₂₄アルカン、C₂₆アルカン、C₂₈アルカン又はC₃₀アルカンのいずれかであり得る。いくつかの実施態様では、長鎖アルカンはC₈からC₂₀アルカン、例えばC₁₄アルカン、C₁₆アルカン又はC₁₈アルカンを含む。

10

20

30

40

50

さらにまた、いくつかの実施態様では、アルキル化はインスリンアナローグとコレステロール部分との間で生じ得る。例えば、コレステロールのヒドロキシル基は長鎖アルカンの脱離基を追い出してコレステロール-インスリンペプチド生成物を形成する。

【0098】

制御放出処方物

また別には、本明細書に記載のインスリン/インクレチン複合物はデポー形型に改変でき、したがって本開示の複合物が投与された体内に本開示の複合物が放出される態様を時間及び体内の位置分布について制御することができる（例えば米国特許4,450,150号を参照されたい）。本開示の複合物のデポー形は、例えば本開示の複合物及び多孔性又は無孔性物質（例えばポリマー）を含む移植可能な組成物であり、ここで、本開示の複合物は、当該物質によって被包化されるか若しくは当該物質全体に拡散されるか、及び/又は当該無孔物質の分解によって拡散される。デポーは体内の所望の位置に移植され、本開示の複合物は該移植植物から予め定められた速度で放出される。

また別には、大きなデポーポリマーを、本明細書に記載の複合物に共有結合させた自己切断ジペプチド成分に連結することができる。この実施態様では、該デポーポリマーは、当該グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物がその後非酵素的反応を介して予め定めた速度で単一鎖アナローグから切断されるまで当該グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物をその投与部位に効果的に隔離する。自己切断ジペプチドを用いるインスリンアナローグのデポー処方物は公開国際出願WO2010/080607に記載されている（前記文献の開示内容は本明細書に含まれる）。ある実施態様では、ジペプチドプロドラッグ成分を含むグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物が提供され、ここで、該ジペプチドプロドラッグ成分は大きなポリマー（例えばPEG又はデキストラン）に連結される。ある実施態様では、大きなデポーポリマー（例えばPEGを含む）を含む自己切断ジペプチド成分は、連結部分のアミノ酸（例えば連結部分のC8位のアミノ酸を含む）の側鎖に連結される。

【0099】

単一鎖アナローグを含み、所望の *in vivo* 放出プロフィールを有するように処方された医薬組成物を調製することができる。いくつかの特徴では、医薬組成物は即時放出、制御放出、持続放出、長期放出、遅延放出又は二相性放出処方物である。制御放出のためのペプチド又は複合物を処方する方法は当業界では公知である。例えば以下を参照されたい：J Pharm 374: 46-52, 2009；及び国際特許出願公開公報WO 2008/130158；WO2004/033036；WO2000/032218；及び1999/040942。本組成物はさらに、例えばミセル若しくはリポソーム又は他のいくつかの被包化形を含むことができ、また長期放出形で投与して長期貯蔵及び/又はデリバリー作用を提供することができる。本開示の医薬処方物は、例えば以下を含む任意のレジメンにしたがって投与できる：毎日（1日1回、1日2回、1日3回、1日4回、1日5回、1日6回）、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月又は2カ月毎。

【0100】

ある実施態様にしたがえば、デポーポリマーは当業者に公知の生物適合ポリマーから選択される。デポーポリマーは、典型的には約20,000から120,000ダルトンの範囲から選択されるサイズを有する。ある実施態様では、デポーポリマーは、約40,000から100,000又は約40,000から80,000ダルトンの範囲から選択されるサイズを有する。ある実施態様では、デポーポリマーは、約40,000、50,000、60,000、70,000又は80,000ダルトンのサイズを有する。適切なデポーポリマーには以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：デキストラン、ポリラクチド、ポリグリコリド、カプロラクトン系ポリマー、ポリ(カプロラクトン)、ポリ酸無水物、ポリアミン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリジオキサン、ポリアセタール、ポリケタール、ポリカーボネート、ポリホスホエステル、ポリエステル、ポリブチレンテレフタレート、ポリオルトカーボネート、ポリホスファゼン、スクシネット、ポリ(マレイン酸)、ポリ(アミノ酸)、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリヒドロキシセルロース、多糖類、キチン、キトサン、ヒアルロン酸、並びに前記のコポリマー、ターポリマー及び混合物、並びに生物分解性ポリマー

10

20

30

40

50

及びそれらのコポリマー（カプロラクトン系ポリマー、ポリカプロラクトン、及びポリブチレンテレフタレート含有コポリマーを含む）。ある実施態様では、デポーポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ酪酸、ポリグリコール酸、並びに乳酸及びグリコール酸のコポリマーから成る群から選択され、ある具体的な実施態様では、デポーポリマーはポリエチレングリコールである。ある実施態様では、デポーポリマーはポリエチレングリコールであり、ジペプチド成分に連結されるデポーポリマーの合計分子量は約40,000から80,000ダルトンである。

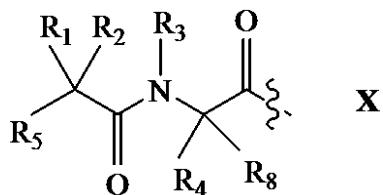
【0101】

ある実施態様にしたがえば、構造U-Jを含む自己切断ジペプチド成分が提供され、式中、Uはアミノ酸又はヒドロキシル酸であり、JはN-アルキル化アミノ酸である。ある実施態様では、1つ以上のジペプチド成分は、インスリン成分のB鎖のN-末端アミノ基、グルカゴン関連ペプチド成分のN-末端、又は複合物に存在するアミノ酸の側鎖アミノ基から選択される1つ以上のアミノ基を介して形成されるアミド結合により、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物に連結される。ある実施態様にしたがえば、1つ以上のジペプチド成分は、複合物のN-末端アミノ基、又は天然のインスリンのA19、B16又はB25位に対応する位置に存在する4-アミノ-フェニルアラニン残基の側鎖アミノ基、又は単一鎖インスリンアナローグの連結部分のアミノ酸の側鎖、又は複合物のグルカゴン関連ペプチド若しくはインスリンペプチド成分のN-末端から選択されるアミノ基でグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合に連結される。

ある実施態様にしたがえば、ジペプチドプロドラッグ成分は下記式Xの一般構造を含み：

【0102】

【化5】



【0103】

式中、R₁、R₂、R₄及びR₈は別個に、H、C₁-C₁₈アルキル、C₂-C₁₈アルケニル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₂-C₃アルキル)SCH₃、(C₁-C₄アルキル)CONH₂、(C₁-C₄アルキル)COOH、(C₁-C₄アルキル)NH₂、(C₁-C₄アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)、及びC₁-C₁₂アルキル(W)C₁-C₁₂アルキル(式中Wは、N、S及びOから成る群から選択されるヘテロ原子である)から成る群から選択されるか、又はR₁及びR₂はそれらが付加される原子と一緒にになってC₃-C₁₂シクロアルキル又はアリールを形成するか；又はR₄及びR₈はそれらが付加される原子と一緒にになってC₃-C₆シクロアルキルを形成し；

R₃は、C₁-C₁₈アルキル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)NH₂、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆シクロアルキル)、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及び(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択されるか、又はR₄及びR₃は、それらが付加される原子と一緒にになって4、5又は6員複素環式環を形成し；

R₅はNHR₆又はOHであり；

R₆はH、C₁-C₈アルキルであるか、又はR₆及びR₂は、それらが付加される原子と一緒にになって4、5又は6員複素環式環を形成し；さらに

R₇はH及びOHから成る群から選択される。ある実施態様では、プロドラッグ成分がグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物のN-末端アミンに連結され、さらにR₄及びR₃が、それらが付加される原子と一緒にになって4、5又は6員複素環式環を形成するとき、R₁及びR₂

10

20

30

40

50

の少なくとも1つはH以外である。

【0104】

グルカゴン関連ペプチド

出願人らは、グルカゴン、GLP1及びGIP受容体で改変された活性を有するグルカゴンのアナローグを見出した。これらのアナローグはいずれもグルカゴン関連ペプチドとして用いることができる。より具体的には、グルカゴン関連ペプチドは、本明細書に記載するクラス1、クラス2又はクラス3グルカゴンペプチドのいずれでもよい。

クラス1グルカゴン関連ペプチド

ある種の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドはクラス1グルカゴン関連ペプチドであり、前記ペプチドは、本明細書、並びに国際特許出願PCT US2009/47437（2009年6月16日出願）及び国際特許出願公開公報WO2008/086086（2008年7月17日公開）に記載されている（前記文献の内容は参照によりその全体が組み入れられる）。

クラス1グルカゴン関連ペプチドに関して以下の節で述べる生物学的配列（配列番号：801-915）は国際特許出願PCT US2009/47437の配列番号：1-115に対応する。

活性

クラス1グルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴンペプチド（配列番号：801）に相対するグルカゴン受容体活性を維持する。例えば、グルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴンの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%活性、80%活性、85%活性又は90%活性を維持する（例えば実施例7に一般的に記載したアッセイを用いてcAMP生成により測定されるグルカゴン関連ペプチド対グルカゴンのEC50の逆非として算出される）。いくつかの実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴンより同じか又は高い活性（本明細書の“効能”という用語と同義語として用いられる）を有する。いくつかの実施態様では、本明細書に記載するグルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴンペプチドの活性の約100%、1000%、10,000%、100,000%、又は1,000,000%を超えない活性を示す。

【0105】

溶解性の改善

天然のグルカゴンは水溶液中で、特に生理学的pHでは貧弱な溶解性を示し、時間の経過で凝集及び沈殿する傾向がある。対照的に、いくつかの実施態様でクラス1グルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴンと比較して、6から8又は6から9のpHで（例えばpH7で25、24時間後に）少なくとも2倍、5倍又はさらに高い溶解性を示す。

したがって、いくつかの実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、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（配列番号：801）の野生型ペプチドに対して改変されて、特に約5.5から約8.0の範囲のpHの水溶液で当該ペプチドの溶解性が改善されるが、天然のペプチドの生物学的活性は維持される。

例えば、本明細書に記載するいずれのクラス1グルカゴン関連ペプチドの溶解性も当該ペプチドに親水性部分を付加することによってさらに改善することができる。そのような基の導入はまた作用の持続時間を増加させる（例えば循環中の半減期の延長によって測定される）。親水性部分は本明細書でさらにまた記載される。

【0106】

荷電残基による改変

いくつかの実施態様では、溶解性はクラス1グルカゴン関連ペプチドに電荷を加えることによって改善される。前記は、天然の非荷電アミノ酸を荷電アミノ酸（リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択される）で置換することによって、又は荷電アミノ酸を当該ペプチドのアミノ若しくはカルボキシ末端に加えることによって実施される。

いくつかの実施態様にしたがえば、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、当該ペプチドのC-末端部分に、さらにいくつかの実施態様では配列番号：801のC-末端の位置から27位に荷電アミノ酸を導入するアミノ酸置換及び/又はアミノ酸付加によってペプチドが改変さ

10

20

30

40

50

れるという事実にしたがって溶解性が改善された。場合によって、1つ、2つ又は3つの荷電アミノ酸をC-末端部分に、さらにいくつかの実施態様ではC-末端から27位に導入できる。いくつかの実施態様にしたがえば、28位及び／又は29位の天然のアミノ酸が荷電アミノ酸で置換され、及び／又は1つから3つの荷電アミノ酸が、当該ペプチドのC-末端、例えば27、28又は29位の後に加えられる。例示的実施態様では、荷電アミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが陰性荷電である。他の実施態様では、荷電アミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが陽性荷電である。

【0107】

具体的な例示的実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、以下の改変の1つ又は2つを含む：EによるN28の置換；DによるN28の置換；DによるT29の置換；EによるT29の置換；27、28又は29位の後にEの挿入；27、28又は29位の後のDの挿入。例えばD28E29、E28E29、E29E30、E28E30、D28E30。

ある例示的実施態様にしたがえば、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:811、又は天然のグルカゴンと対比して1つから3つのさらに別のアミノ酸改変（本明細書でグルカゴンアゴニストに関する記載される）を含む配列番号:811のアナローグ、又は前記のグルカゴンアゴニストアナローグを含む。配列番号:811は改変されたクラス1グルカゴン関連ペプチドを表し、前記ペプチドでは天然のタンパク質の28位のアスパラギン残基がアスパラギン酸で置換されてある。別の例示的実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドは配列番号:838のアミノ酸配列を含み、前記配列では天然のタンパク質の28位のアスパラギン残基はグルタミン酸で置換されてある。他の例示的実施態様は、配列番号：824、825、826、833、835、836及び837のクラス1グルカゴン関連ペプチドを含む。

【0108】

安定性の改善

クラス1グルカゴン関連ペプチドのいずれも安定性の改善及び／又は分解の減少をさらにまた示すことができ、例えば25で24時間後に元のペプチドの少なくとも95%が維持される。クラス1グルカゴン関連ペプチドは、その医薬的特性を変化させるさらに別の改変を含むことができる（例えば効能の増加、循環半減期の延長、半減期の増加、沈殿又は凝集の減少、及び／又は分解の減少（例えば貯蔵後の切断又は化学的変化の減少））。

さらに別の例示的実施態様では、前述のクラス1グルカゴン関連ペプチドのいずれもさらに改変して安定性を改善できる。前記は、配列番号:801の15位のアミノ酸を改変して、時間経過時におけるペプチドの分解を特に酸性又はアルカリ性緩衝液で減少させることによる。例示的実施態様では、15位のAspがGlu、ホモGlu、システイン酸又はホモシステイン酸で置換される。

また別に、本明細書に記載するクラス1グルカゴン関連ペプチドのいずれも、配列番号:801の16位のアミノ酸を改変することによりさらに改変されて安定性を改善できる。例示的実施態様では、16位のSerは、Thr若しくはAIBで、又はグルカゴン受容体での効能を強化するクラス1グルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に記載する任意のアミノ酸置換で置換される。そのような改変は、Asp15-Ser16間のペプチド結合の切断を減少させる。

いくつかの実施態様では、本明細書に記載するクラス1グルカゴン関連ペプチドのいずれもさらに改変して、多様なアミノ酸の位置における分解を減少させることができる。前記は、20、21、24又は27位の1つ、2つ、3つ又は全てのいずれかの改変によって実施される。例示的実施態様は、20位のGlnのSer、Thr、Ala又はAIBによる置換、21位のAspのGluによる置換、24位のGlnのAla又はAIBによる置換、27位のMetのLeu又はNleによる置換を含む。メチオニンの除去又は置換はメチオニンの酸化による分解を減少させる。Gln又はAsnの除去又は置換はGln又はAsnの脱アミド化による分解を減少させる。Aspの除去又は置換は、Aspが脱水されて環状スクシンイミド中間体を形成しその後に続くイソアスパルテートへの異性化を介して生じる分解を減少させる。

【0109】

効能の強化

別の実施態様にしたがえば、グルカゴン受容体で強化された効能を有するクラス1グル

10

20

30

40

50

カゴン関連ペプチドが提供され、ここで、前記ペプチドは天然のグルカゴン（配列番号:801）の16位にアミノ酸改変を含む。非限定的な例によれば、そのような強化された効能は、自然に生じる16位のセリンの以下による置換によって提供できる：グルタミン酸；又は別の4原子の長さの側鎖を有する陰性荷電アミノ酸；又別にはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸、又は少なくとも1つのヘテロ原子（例えばN、O、S、P）を含む側鎖を有しあつ約4（又は3-5）原子の長さの側鎖を有する荷電アミノ酸。16位のセリンのグルタミン酸による置換は、グルカゴン受容体で少なくとも2倍、4倍、5倍及び10倍まで高くグルカゴン活性を強化する。いくつかの実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体と対比してグルカゴン受容体に対する選択性を、少なくとも5倍、10倍又は15倍の選択性を維持する。

10

【0110】

DPP-IV耐性

いくつかの実施態様では、本明細書に開示するクラス1グルカゴン関連ペプチドはさらに1又は2位で改変されて、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対する感受性が減少する。より具体的には、いくつかの実施態様で、クラス1グルカゴン関連ペプチドの1及び/又は2位は、本明細書に記載するDPP-IV耐性アミノ酸で置換される。いくつかの実施態様では、該アナローグペプチドの2位はアミノイソ酪酸で置換される。いくつかの実施態様では、アナローグペプチドの2位は、D-セリン、D-アラニン、グリシン、N-メチルセリン及び-アミノ酪酸から成る群から選択されるアミノ酸で置換される。別の実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドの2位は、D-セリン、グリシン及びアミノイソ酪酸から成る群から選択されるアミノ酸で置換される。いくつかの実施態様では、2位のアミノ酸はD-セリンではない。

20

グルカゴン関連ペプチドの1及び/又は2位のアミノ酸の改変時におけるグルカゴン活性の減少は、当該グルカゴン関連ペプチドのC-末端部分（アミノ酸12-29周辺）におけるアルファヘリックス構造の安定化によって回復させることができる。アルファヘリックス構造は、本明細書でさらに記載するように、例えば共有結合的又は非共有結合的分子内橋（例えば“i”及び“i+4”位（iは12から25の整数）のアミノ酸の側鎖間のラクタム架橋）の形成、12-29位周辺のアミノ酸のアルファヘリックス安定化アミノ酸（例えば、-二置換アミノ酸）による置換及び/又は挿入によって安定化させることができる。

30

【0111】

3位の改変

グルカゴン受容体活性は、3位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のアミノ酸改変によって減少させることができる。前記改変は、例えば自然に生じる3位のグルタミンの酸性、塩基性又は疎水性アミノ酸による置換である。例えば、グルタミン酸、オルニチン又はノルロイシンによる3位の置換は、グルカゴン受容体活性を実質的に減少させ又は破壊する。

該グルカゴン受容体における活性の維持又は強化は、本明細書に記載するように3位のGlnのグルタミンアナローグによる改変によって達成できる。例えば、グルカゴンアゴニストは、配列番号:863、配列番号:869、配列番号:870、配列番号:871、配列番号:872、配列番号:873及び配列番号:874のアミノ酸配列を含むことができる。

40

【0112】

C-末端アミド及びエステルによるGLP-1活性の強化

GLP-1受容体における活性の強化は、C-末端アミノ酸のカルボン酸を中性荷電基（例えばアミド又はエステル）で取り替えることによって提供される。逆に、当該ペプチドのC-末端における天然のカルボン酸の維持は、クラス1グルカゴン関連ペプチドのグルカゴン受容体に対する選択性をGLP-1受容体に対するよりも相対的に高く維持する（例えば5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20倍）。

【0113】

さらに別の改変及び組み合わせ

溶解性及び/又は安定性及び/又はグルカゴン活性をさらにまた増加させる、さらに別

50

の改変をクラス1グルカゴン関連ペプチドに対して実施できる。クラス1グルカゴン関連ペプチドは、実質的に溶解性又は安定性に影響せず、かつ実質的にグルカゴン活性を低下させずにまた別の他の改変を含むことができる。例示的実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴン配列と対比して合計11まで、又は12まで、又は13まで、又は14までのアミノ酸改変を含むことができる。例えば、保存的若しくは非保存的置換、付加又は欠失を2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位のいずれかで実施できる。

クラス1グルカゴン関連ペプチドの例示的改変には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：

(a) 非保存的置換、保存的置換、付加又は欠失であるが少なくとも部分的なグルカゴンアゴニスト活性は維持される、例えば2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位の1つ以上における保存的置換、10位のTyrのVal又はPheによる置換、12位のLysのArgによる置換、これらの位置の1つ以上のAlaによる置換； 10

(b) 29及び/又は28位、さらに場合によって27位のアミノ酸の欠失であるが、少なくとも部分的なグルカゴンアゴニスト活性は維持される；

(c) 15位のアスパラギン酸の、例えばグルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸又はホモシステイン酸による置換による改変（前記は分解を減少させる）、又は16位のセリンの、例えばスレオニン、AIB、グルタミン酸、又は別の陰性荷電アミノ酸で4原子の長さの側鎖を有するもの、また別にはグルタミン、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸（前記は同様にAsp-Ser16結合の切断による分解を減少させることができる）による置換による改変； 20

(d) 親水性部分、例えば水溶性ポリマーポリエチレングリコールの、例えば本明細書に記載するように、例えば16、17、20、21、24、29、40位又はC-末端アミノ酸への付加（前記は溶解性及び/又は半減期を高める）；

(e) 27位のメチオニンの、例えばロイシン又はノルロイシンの置換による改変であり、酸化的分解を減少させる；

(f) 20位又は24位のGlnの、例えばSer、Thr、Ala又はAIBによる置換による改変であり、Glnの脱アミド化により生じる分解を減少させる；

(g) 21位のAspの、例えばGluによる置換による改変であり、Aspの脱水による環状スクシンイミド中間体の形成とその後のイソアスパルテートの異性化により生じる分解を減少させる； 30

(h) 本明細書に記載の1又は2位の改変であり、DPP-IV切断に対する耐性を改善し、前記改変は、場合によって“i”及び“i+4”位（iは12から25の整数、例えば12、16、20、24）の間の分子内橋（例えばラクタム架橋）と組み合わされる；

(i) 本明細書に記載のアシル化又はアルキル化（前記はグルカゴン受容体及び/又はGLP-1受容体での活性を高め、循環中の半減期を延長し、及び/又は作用の持続時間を引き延ばし、及び/又は作用の開始を先送りすることができる）、前記改変は場合によって、親水性部分の付加と組み合わされ、場合によって前記に追加して或いは前記とは別にGLP-1ペプチドでの活性を選択的に減少させる改変と組み合わされ、前記は例えば7位のThrの改変（例えば7位のThrのヒドロキシル基を欠くアミノ酸（例えばAbuまたはIle）による置換）である；C-末端から27位のアミノ酸のアミノ酸欠失（例えば28位及び29位の一方又は双方の欠失により長さが27アミノ酸又は28アミノ酸のペプチドを生じる）； 40

(j) 本明細書に記載のC-末端の延長；

(k) 本明細書に記載のホモダイマー化又はヘテロダイマー化、及び(a)から(k)の組み合わせ。

【0114】

いくつかの実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドの例示的改変は、グループAから選択される少なくとも1つのアミノ酸改変、及びグループB及び/又はグループCから選択される1つ以上のアミノ酸改変を含み、ここでグループAは、

28位のAsnの荷電アミノ酸による置換、

10

20

30

40

50

28位のAsnのLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換、

28位におけるAsn、Asp又はGluによる置換、

28位におけるAspによる置換、

28位におけるGluによる置換、

29位のThrの荷電アミノ酸による置換、

29位のThrのLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換、

29位におけるAsp、Glu又はLysによる置換、

29位におけるGluによる置換、

29位の後に1から3つの荷電アミノ酸の挿入、

29位の後にGly又はLysの挿入、

29位の後にGly-Lys又はLys-Lysの挿入、

又は前記の組み合わせであり、

ここでグループBは、

15位のAspのGluによる置換、

16位のSerのThr又はAIBによる置換であり、

さらにここでグループCは、

1位のHisのジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による切断に対するグルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、

2位のSerのジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による切断に対するグルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、

12位のLysのArgによる置換、

20位のGlnのSer、Thr、Ala又はAIBによる置換、

21位のAspのGluによる置換、

24位のGlnのSer、Thr、Ala又はAIBによる置換、

27位のMetのLeu又はNleによる置換、

27 - 29位のアミノ酸の欠失、

28 - 29位のアミノ酸の欠失、

29位のアミノ酸の欠失、

又は前記の組み合わせである。

例示的実施態様では、12位のLysはArgにより置換される。他の例示的実施態様では、29及び/又は28位、及び場合によって27位のアミノ酸は欠失される。

【0115】

いくつかの具体的な実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、(a) DPP-IV耐性を付与する1及び/又は2位のアミノ酸改変(例えば1位のDMIAによる置換又は2位のAIBによる置換)、(b) 12 - 29位内での(例えば16及び20位における)分子内橋、又は16、20、21及び24位のアミノ酸の、二置換アミノ酸による置換、場合によって(c) 24、29位のCysを介して又はC-末端アミノ酸での親水性部分(例えばPEG)との連結、場合によって(d)

Metを例えばNleで置換する27位のアミノ酸改変、場合によって(e) 分解を減少させる20、21及び24位でのアミノ酸改変、場合によって(f) 配列番号:820との連結を含む。グルカゴン関連ペプチドが配列番号:820に連結されるとき、ある種の実施態様では29位のアミノ酸はThr又はGlyである。他の具体的な実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、(a)

Asp28Glu29、又はGlu28Glu29、又はGlu29Glu30、又はGlu28Glu30又はAsp28Glu30、及び場合によって(b) Serを例えばThr又はAIBで置換する16位におけるアミノ酸改変、及び場合によって(c) Metを例えばNleで置換する27位におけるアミノ酸改変、及び場合によつて(d) 分解を減少させる20、21及び24位におけるアミノ酸改変を含む。ある具体的な実施態様では、グルカゴン関連ペプチドはT16、A20、E21、A24、Nle27、D28、E29である。

いくつかの実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、1から3つのアミノ酸改変を有する、アミノ酸配列X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-As

10

20

30

40

50

p-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (配列番号:839) を含み、式中、
 X1及び／又はX2は、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による切断に対する当該グルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる（又は耐性を増加させる）非天然アミノ酸であり、Zは、-COOH（自然に生じるC-末端カルボキシレート）、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH、及びY-COOH（Yは1つから2つのアミノ酸）から成る群から選択され、さらに分子内橋（好ましくは共有結合）がi位のアミノ酸の側鎖とi+4位のアミノ酸を接続する（iは12、16、20又は24）。

【0116】

いくつかの実施態様では、分子内橋はラクタム架橋である、いくつかの実施態様では、配列番号:839のi位及びi+4位のアミノ酸はLys及びGlu（例えばGlu16及びLys20）である。いくつかの実施態様では、X1は、D-His、N-メチル-His、アルファ-メチル-His、イミダゾール酢酸、デス-アミノ-His、ヒドロキシ-His、アセチル-His、ホモ-His及び、-ジメチルイミダゾール酢酸 (DMIA) から成る群から選択される。他の実施態様では、X2は、D-Ser、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、Val及びアルファアミノイソ酪酸 (AIB) から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、16、17、20、21、24、29、40位のアミノ酸のいずれか、C-末端延長部内、又はC-末端アミノ酸で親水性部分と共有結合により連結される。例示的な実施態様では、この親水性部分は、これらの位置のいずれかでLys、Cys、Orn、ホモシステイン又はアセチル-フェニルアラニン残基に共有結合により連結される。例示的な親水性部分には、ポリエチレングリコール (PEG)、例えば約1,000ダルトンから約40,000ダルトン、又は約20,000ダルトンから約40,000ダルトンの分子量のものが含まれる。

他の実施態様では、クラス1グルカゴン関連ペプチドは、アミノ酸配列X1-X2-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-Z (配列番号:839) を含み、式中、
 X1及び／又はX2は、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による切断に対する当該グルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる（又は耐性を増加させる）非天然アミノ酸であり、ここでグルカゴン関連ペプチドの16、20、21及び24位の1つ、2つ、3つ又は4つ以上は、二置換アミノ酸で置換され、Zは、-COOH（自然に生じるC-末端カルボキシレート）、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH、及びY-COOH（Yは1つから2つのアミノ酸）から成る群から選択される。

【0117】

前述のクラス1グルカゴン関連ペプチド又はアナローグに対するさらに別の例示的アミノ酸改変には以下が含まれる：7位のThrのヒドロキシル基を欠くアミノ酸（例えばアミノ酪酸 (Abu)、Ile）による置換（前記は場合によって、アシル又はアルキル基（前記アシル又はアルキル基は自然に生じるアミノ酸にとって非天然である）に共有結合により（場合によってスペーサーを介して）付加される側鎖を含むアミノ酸の代用又は付加と組み合わされる）、12位のLysのArgによる置換；15位のAspのGluによる置換；16位のSerのThr又はAIBによる置換；20位のGlnのSer、Thr、Ala又はAIBによる置換；21位のAspのGluによる置換；24位のGlnのSer、Thr、Ala又はAIBによる置換；27位のMetのLeu又はNleによる置換；28位のAsnの荷電アミノ酸による置換；28位のAsnの荷電アミノ酸（Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される）による置換；Asn、Asp又はGluによる28位の置換；Aspによる28位の置換；Gluによる28位の置換；29位のThrの荷電アミノ酸による置換；29位のThrの荷電アミノ酸（Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される）による置換；Asp、Glu又はLysによる29位の置換；Gluによる29位の置換；29位の後ろに1-3の荷電アミノ酸の挿入；30位に（すなわち29位の後に）Glu又はLysの挿入；場合によって31位にLysの挿入；29位のアミノ酸がThr又はGlyである場合に、場合によって配列番号:820のC-末端への付加；親水性部分に共有結合により付加されるアミノ酸の代用又は付加；又は前記の組み合わせ。

クラス1グルカゴンアゴニストに関して上記に記載の改変（グルカゴン受容体活性を高

10

20

30

40

50

め、部分的なグルカゴン受容体活性を維持し、溶解性を改善し、安定性を高め又は分解を減少させる)のいずれも、クラス1グルカゴン関連ペプチドに個々に又は組み合わせて適用することができる。

【0118】

クラス1グルカゴン関連ペプチドの具体例

いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:801の天然のグルカゴンペプチドは、28及び/又は29位の天然のアミノ酸の陰性荷電アミノ酸(例えばアスパラギン酸又はグルタミン酸)による置換、及び場合によって陰性荷電アミノ酸(例えばアスパラギン酸又はグルタミン酸)の当該ペプチドのカルボキシ末端への付加によって改変される。また別の実施態様では、配列番号:801の天然のグルカゴンペプチドは、29位の天然のアミノ酸の陽性荷電アミノ酸(例えばリジン、アルギニン又はヒスチジン)による置換、及び場合によって1つ又は2つの陽性荷電アミノ酸(例えばリジン、アルギニン又はヒスチジン)の当該ペプチドのカルボキシ末端への付加によって改変される。いくつかの実施態様にしたがえば、溶解性及び安定性が改善されたグルカゴンアナローグが提供され、ここで当該アナローグは配列番号:834のアミノ酸を含むが、ただし28又は29位の少なくとも1つのアミノ酸は酸性アミノ酸で置換されるか、及び/又は追加の酸性アミノ酸は配列番号:834のカルボキシ末端に付加される。いくつかの実施態様では、酸性アミノ酸は、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から別個に選択される。

いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:833のアミノ酸配列を含む、溶解性及び安定性が改善されたグルカゴンアゴニストが提供され、ここで、27、28又は29位のアミノ酸の少なくとも1つは非天然アミノ酸残基で置換される(すなわち、該アナローグの27、28又は29位に存在する少なくとも1つのアミノ酸は、配列番号:801の対応する位置に存在するアミノ酸とは異なる酸性アミノ酸である)。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:833の配列を含むグルカゴンアゴニストが提供されるが、ただし28位のアミノ酸がアスパラギンで29位のアミノ酸がスレオニンであるとき、当該ペプチドは、Lys、Arg、His、Asp又はGluから成る群から別個に選択される1つ又は2つのアミノ酸をさらに含み、前記アミノ酸は当該グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端に付加される。いくつかの実施態様にしたがえば、天然のペプチドの27位に存在するメチオニン残基はロイシン又はノルロイシンに変更され、当該ペプチドの酸化的分解を防ぐ。

【0119】

いくつかの実施態様では、配列番号:833のグルカゴンアナローグが提供され、ここで、当該アナローグの1、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21又は24位から選択される1つから6つのアミノ酸は、配列番号:801の対応するアミノ酸と異なる。別の実施態様にしたがえば、配列番号:833のグルカゴンアナローグが提供され、ここで、当該アナローグの1、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21又は24位から選択される1つから3つのアミノ酸は、配列番号:801の対応するアミノ酸と異なる。別の実施態様では、配列番号:807、配列番号:808又は配列番号:834のグルカゴンアナローグが提供され、ここで、当該アナローグの1、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21又は24位から選択される1つから2つのアミノ酸は、配列番号:801の対応するアミノ酸と異なり、さらに別の実施態様では、これら1つ又は2つの異なるアミノ酸は、天然の配列(配列番号:801)に存在するアミノ酸と対比して保存的アミノ酸置換を表す。いくつかの実施態様では、配列番号:811又は配列番号:813のグルカゴン関連ペプチドが提供され、ここで、該グルカゴン関連ペプチドはさらに、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27又は29位から選択される位置に1つ、2つ又は3つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施態様では、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27又は29位の置換は保存的アミノ酸置換である。

【0120】

いくつかの実施態様では、配列番号:801のアナローグペプチドを含むグルカゴンアゴニストが提供され、ここで該アゴニストは、2位にセリン以外のアミノ酸を有することによって、及び28又は29位に天然のアミノ酸に代わって酸性アミノ酸又は配列番号:801のペプ

10

20

30

40

50

チドのカルボキシ末端に付加されるアミノ酸を有することによって配列番号:801と異なる。いくつかの実施態様では、酸性アミノ酸はアスパラギン酸又はグルタミン酸である。いくつかの実施態様では、配列番号:809、配列番号:812、配列番号:813又は配列番号:832のグルカゴンアナローグが提供され、ここで該アナローグは2位の置換によって親分子と異なる。より具体的には、アナローグペプチドの2位は、D-セリン、アラニン、D-アラニン、グリシン、n-メチルセリン及びアミノイソ酪酸から成る群から選択されるアミノ酸で置換される。

別の実施態様では、配列番号:801のアナローグペプチドを含むグルカゴンアゴニストが提供され、ここで該アナローグは、1位にヒスチジン以外のアミノ酸を有することによって、及び28又は29位に天然のアミノ酸に代わって置換された酸性アミノ酸又は配列番号:801のペプチドのカルボキシ末端に付加されるアミノ酸を有することによって配列番号:801と異なる。いくつかの実施態様では、酸性アミノ酸はアスパラギン酸又はグルタミン酸である。いくつかの実施態様では、配列番号:809、配列番号:812、配列番号:813又は配列番号:832のグルカゴンアナローグが提供され、ここで該アナローグは1位の置換によって親分子と異なる。より具体的には、該アナローグペプチドの1位は、DMIA、D-ヒスチジン、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシル-ヒスチジン、アセチル-ヒスチジン及びホモ-ヒスチジンから成る群から選択されるアミノ酸で置換される。

【0121】

いくつかの実施態様にしたがえば、改変グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:809、配列番号:812、配列番号:813及び配列番号:832から成る群から選択される配列を含む。さらに別の実施態様では、配列番号:809、配列番号:812、配列番号:813又は配列番号:832の配列を含み、さらにまた1つ又は2つのアミノ酸が配列番号:809、配列番号:812、配列番号:813又は配列番号:832のC-末端に付加されるグルカゴン関連ペプチドが提供され、ここで、追加されるアミノ酸は、Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸又はホモシステイン酸から成る群から別個に選択される。いくつかの実施態様では、カルボキシ末端に付加される追加のアミノ酸はLys、Arg、His、Asp又はGluから成る群から別個に選択されるか、又はさらに別の実施態様では、追加のアミノ酸はAsp又はGluである。

別の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:7又はそのグルカゴンアゴニストアナローグを含む。いくつかの実施態様では、該ペプチドは、配列番号:808、配列番号:810、配列番号:811、配列番号:812及び配列番号:813から成る群から選択される配列を含む。別の実施態様では、該ペプチドは配列番号:808、配列番号:810及び配列番号:811から成る群から選択される配列を含む。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:808、配列番号:810及び配列番号:811の配列を含み、さらにまたAsp及びGluから成る群から選択される追加のアミノ酸を含み、前記は当該グルカゴン関連ペプチドのC-末端に付加される。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:811又は配列番号:813の配列を含み、さらに別の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:811の配列を含む。

【0122】

いくつかの実施態様にしたがえば、以下から成る群から選択される改変グルカゴン関連ペプチドを含むグルカゴンアゴニストが提供される：

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-R (配列番号:834)、
 NH₂-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-Asp-Thr-R (配列番号:811) 及び
 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Glu-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-R (配列番号:813)、式中、

15位のXaaはAsp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸であり、28位のXaaはAsn又は酸性アミノ酸であり、29位のXaaはThr又は酸性アミノ酸であり、Rは酸性アミノ酸、COOH又はCONH₂であるが、ただし酸性アミノ酸残基が28、29又は30位の1つに存在することを条件とする。いくつかの実施態様ではRはCOOHであり、別の実施態様ではR

10

20

30

40

50

はCONH₂である。

【0123】

本開示はまたグルカゴン融合ペプチドを包含し、前記融合ペプチドでは、第二のペプチドはグルカゴン関連ペプチドのC-末端に融合されており、当該グルカゴン関連ペプチドの安定性及び溶解性が強化される。より具体的には、該融合グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン関連ペプチドNH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R(配列番号:834)を含むグルカゴンアゴニストアナローグを含むことができ、式中、

Rは、酸性アミノ酸又は結合、及び当該グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸に連結される配列番号:820(GPSSGAPPPS)、配列番号:821(KRNRNNIA)又は配列番号:822(KRNR)である。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:833、配列番号:807又は配列番号:808から成る群から選択され、さらにまた当該グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端に連結される配列番号:820(GPSSGAPPPS)、配列番号:821(KRNRNNIA)又は配列番号:822(KRNR)を含む。いくつかの実施態様では、グルカゴン融合ペプチドは、配列番号:802、配列番号:803、配列番号:804、配列番号:805及び配列番号:806又はそのグルカゴンアゴニストアナローグを含み、さらにまた当該グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29に連結される配列番号:820(GPSSGAPPPS)、配列番号:821(KRNRNNIA)又は配列番号:822(KRNR)を含む。いくつかの実施態様にしたがえば、融合ペプチドはさらに、16、17、21、24、29位のアミノ酸に、C-末端延長部内に、又はC-末端アミノ酸に連結されるPEG鎖を含み、ここでPEG鎖は500から40,000ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施態様では、配列番号:820(GPSSGAPPPS)、配列番号:821(KRNRNNIA)又は配列番号:822(KRNR)のアミノ酸配列は該グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29にペプチド結合を介して結合される。いくつかの実施態様では、グルカゴン融合ペプチドのグルカゴン関連ペプチド部分は、配列番号:810、配列番号:811及び配列番号:813から成る群から選択される配列を含む。いくつかの実施態様では、グルカゴン融合ペプチドのグルカゴン関連ペプチド部分は配列番号:811又は配列番号:813の配列を含み、ここでPEG鎖は21、24、29位に、C-末端延長部内に又はC-末端アミノ酸にそれぞれ連結される。

【0124】

別の実施態様では、融合ペプチドのグルカゴン関連ペプチド配列は配列番号:811の配列を含み、さらに該グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29に連結される配列番号:820(GPSSGAPPPS)、配列番号:821(KRNRNNIA)又は配列番号:822(KRNR)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様では、グルカゴン融合ペプチドは、配列番号:824、配列番号:825及び配列番号:826から成る群から選択される配列を含む。典型的には、本発明の融合ペプチドは標準的なカルボン酸基をもつC-末端アミノ酸を有するであろう。しかしながら、C-末端アミノ酸がカルボン酸と置換されたアミドを有する配列をもつアナローグもまた実施態様として包含される。いくつかの実施態様にしたがえば、融合グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:810、配列番号:811及び配列番号:813から成る群から選択されるグルカゴンアゴニストアナローグを含み、さらに該グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29に連結される配列番号:823(GPSSGAPPPS-CONH₂)のアミノ酸配列を含む。

【0125】

本発明のグルカゴンアゴニストをさらに改変して、当該ペプチドの水溶液中の溶解性及び安定性を改善し、一方当該グルカゴン関連ペプチドの生物学的活性を維持することができる。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:811のペプチド又はそのグルカゴンアゴニストアナローグの16、17、20、21、24及び29位から選択される1つ以上の位置で親水基を導入することにより、pH安定化グルカゴンアナローグの溶解性及び安定性が改善されることが期待される。より具体的には、いくつかの実施態様では、配列番号:810、配列番号:811、配列番号:813又は配列番号:832のグルカゴン関連ペプチドは、当該グルカゴン関連ペプチドの21及び24位に存在するアミノ酸の側鎖に共有結合により連結される1つ以上の親水基を含むように改変される。

いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:811のグルカゴン関連ペプチドは、16、17

10

20

30

40

50

、20、21、24及び／又は29位に1つ以上のアミノ酸置換を含むように改変され、ここで天然のアミノ酸は、親水性部分（例えばPEGを含む）との架橋に適切な側鎖を有するアミノ酸で置換される。天然のペプチドは、自然に生じるアミノ酸又は合成（自然には生じない）アミノ酸で置換することができる。合成又は自然には生じないアミノ酸は、*in vivo*では自然に生じないが、それにもかかわらず本明細書に記載するペプチド構造に取り込まれ得るアミノ酸を指す。

【0126】

いくつかの実施態様では、配列番号:810、配列番号:811又は配列番号:813のグルカゴンアゴニストが提供され、前記アゴニストでは、天然のグルカゴンペプチド配列は、当該天然の配列の16、17、21、24、29位の少なくとも1つで、C-末端延長部内で又はC-末端アミノ酸で自然に生じるアミノ酸又は合成のアミノ酸を含むように改変されており、前記アミノ酸置換はさらに親水性部分を含む。いくつかの実施態様では、置換は21又は24位に存在し、さらに別の実施態様では親水性部分はPEG鎖である。いくつかの実施態様では、配列番号:811のグルカゴン関連ペプチドは少なくとも1つのシステイン残基で置換され、該システイン残基の側鎖はチオール反応試薬（例えばマレイミド、ビニルスルホン、2-ピリジルチオ、ハロアルキル及びハロアシルを含む）でさらに改変される。これらのチオール反応試薬は、カルボキシ、ケト、ヒドロキシル及びエーテル基、或いは他の親水性部分（例えばポリエチレングリコールユニット）を含むことができる。また別の実施態様では、天然のグルカゴンペプチドはリジンで置換され、該置換リジン残基の側鎖は、アミン反応試薬（例えばカルボン酸の活性エステル（スクシンイミド、無水物など）又は親水性部分（例えばポリエチレングリコール）のアルデヒド）を用いてさらに改変される。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:814、配列番号:815、配列番号:816、配列番号:817、配列番号:818及び配列番号:819から成る群から選択される。

【0127】

いくつかの実施態様にしたがえば、PEG化グルカゴン関連ペプチドは、当該グルカゴン関連ペプチドに共有結合される2つ以上のポリエチレングリコール鎖を含み、該グルカゴン鎖の合計分子量は約1,000から約5,000ダルトンである。いくつかの実施態様では、PEG化グルカゴンアゴニストは配列番号:806のペプチドを含み、ここで、PEG鎖は21位及び24位のアミノ酸残基に共有結合により連結され、2つのPEG鎖の合計分子量は約1,000から約5,000ダルトンである。別の実施態様では、PEG化グルカゴンアゴニストは配列番号:806のペプチドを含み、ここで、PEG鎖は21位及び24位のアミノ酸残基に共有結合により連結され、2つのPEG鎖の合計分子量は約5,000から約20,000ダルトンである。

ポリエチレングリコール鎖は直鎖の形態でも分枝状でもよい。いくつかの実施態様にしたがえば、ポリエチレングリコール鎖は、約500から約40,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。いくつかの実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は約500から約5,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。別の実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は約20,000から約40,000ダルトンの分子量を有する。

【0128】

上記に記載したグルカゴン関連ペプチドはいずれもさらに改変して、該グルカゴン関連ペプチドのC-末端部分内（アミノ酸12-29位）に共有結合若しくは非共有結合分子内橋又はアルファヘリックス安定化アミノ酸を含むことができる。いくつかの実施態様にしたがえば、グルカゴン関連ペプチドは上記で考察した改変のいずれか1つ以上を、-二置換アミノ酸（例えばAIB）による16、20、21又は24位（又はその組み合わせ）のアミノ酸置換に加えて含む。別の実施態様にしたがえば、グルカゴン関連ペプチドは、上記で考察した改変のいずれか1つ以上を、当該グルカゴン関連ペプチドの16及び20位のアミノ酸の側鎖間の分子内橋（例えばラクタム）に加えて含む。

【0129】

いくつかの実施態様にしたがえば、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:877のアミノ酸配列を含み、ここで3位のXaaは下記構造I、II又はIIIの側鎖を含み：

【0130】

10

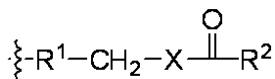
20

30

40

50

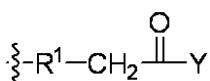
【化6】



構造I

【0131】

【化7】

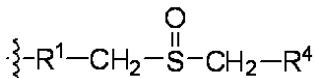


10

構造II

【0132】

【化8】



構造III

【0133】

式中、

R¹はC₀₋₃アルキル又はC₀₋₃ヘテロアルキルであり；R²はNHR⁴又はC₁₋₃アルキルであり；R³はC₁₋₃アルキルであり；R⁴はH又はC₁₋₃アルキルであり；XはNH、O又はSであり；さらにYはNHR⁴、SR³又はOR³である。いくつかの実施態様では、XはNHであるか、又はYはNHR⁴である。いくつかの実施態様では、R¹はC₀₋₂アルキル又はC₁ヘテロアルキルである。いくつかの実施態様では、R²はNHR⁴又はC₁アルキルである。いくつかの実施態様では、R⁴はH又はC₁アルキルである。例示的な実施態様では、構造Iの側鎖を含むアミノ酸が提供され、ここで、R¹はCH₂-Sであり、XはNHであり、かつR²はCH₃（アセトアミド-システイン、C(Acm)）であるか；R¹はCH₂であり、XはNHであり、かつR²はCH₃（アセチルジアミノブタン酸、Dab(Ac)）であるか；R¹はC₀アルキルであり、XはNHであり、R²はNHR⁴であり、かつR⁴はH（カルバモイルジアミノプロパン酸、Dap(尿素)）であるか；又はR¹はCH₂-CH₂であり、XはNHであり、かつR²はCH₃（アセチルオルニチン、Orn(Ac)）である。例示的な実施態様では、構造IIの側鎖を含むアミノ酸が提供され、ここで、R¹はCH₂であり、YはNHR⁴であり、かつR⁴はCH₃（メチルグルタミン、Q(Me)）である。例示的な実施態様では、構造IIIの側鎖を含むアミノ酸が提供され、ここで、R¹はCH₂であり、かつR⁴はH（メチオニン-スルホキシド、M(O)）である。具体的な実施態様では、3位のアミノ酸はDab(Ac)で置換される。例えば、グルカゴンアゴニストは、配列番号:863、配列番号:869、配列番号:871、配列番号:872、配列番号:873及び配列番号:874のアミノ酸配列を含むことができる。

20

【0134】

ある種の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:877のグルカゴン関連ペプチドのアナローグである。具体的な特徴では、該アナローグは、本明細書に記載するアミノ酸改変のいずれかを含み、前記改変には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：28位のAsnの荷電アミノ酸による置換；28位のAsnのLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換；Asn、Asp又はGluによる28位の置換；Aspによる28位の置換；Gluによる28位の置換；29位のThrの荷電アミノ酸による置換；29位のThrのLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換；Asp、Glu又はLysによる29位の置換；Gluによる29位の置換；29位の後ろに1-3の荷電アミノ酸の挿入；29位の後ろにGlu又はLysの挿入；29位の後ろにGly-Lys又はLys-Glyの挿入；及び前記の組み合わせ。

30

【0135】

ある種の実施態様では、配列番号:877のグルカゴン関連ペプチドのアナローグは、

40

ある種の実施態様では、配列番号:877のグルカゴン関連ペプチドのアナローグは、

50

-二置換アミノ酸（例えばAIB）を16、20、21及び24位の1つ、2つ、3つ又は全てに含む。ある種の実施態様では、配列番号:877のグルカゴン関連ペプチドのアナローグは以下の1つ以上を含む：1位のHisのジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）による切断に対するグルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、2位のSerのジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）による切断に対するグルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、7位のThrのヒドロキシル基を欠くアミノ酸（例えばAbu又はIle）による置換、10位のTyrのPhe又はValによる置換、12位のLysのArgによる置換、15位のAspのGluによる置換、20位のGlnのAla又はAIBによる置換、21位のAspのGluによる置換、24位のGlnのAla又はAIBによる置換、27位のMetのLeu又はNleによる置換、27 - 29位のアミノ酸の消失、28 - 29位のアミノ酸の消失、29位のアミノ酸の消失、配列番号:820のアミノ酸配列のC-末端への付加（ここで29位のアミノ酸はThr又はGlyである）、又は前記の組み合わせ。10

【0136】

具体的な実施態様にしたがえば、グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:862 - 867及び869 - 874のいずれかのアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、配列番号:877を含むグルカゴン関連ペプチドのアナローグは、16、17、20、21、24及び29位のいずれかのアミノ酸又はC-末端アミノ酸に共有結合により連結される、親水性部分（例えばPEG）を含む。。

ある種の実施態様では、配列番号:877を含むグルカゴン関連ペプチドのアナローグは、アシル又はアルキル基に共有結合により（場合によってスペーサーを介して）付加される側鎖を含むアミノ酸を含み、前記アシル基又はアルキル基は非天然或いは自然に生じるアミノ酸である。いくつかの実施態様では、アシル基はC4からC30脂肪アシル基である。他の実施態様では、アルキル基はC4からC30アルキルである。具体的な特徴では、アシル基又はアルキル基は、10位のアミノ酸の側鎖に共有結合により付加される。いくつかの実施態様では、7位のアミノ酸はIle又はAbuである。20

グルカゴンアゴニストは配列番号:801 - 919のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであり、場合によって、グルカゴンアゴニスト活性を維持する1、2、3、4又は5つまでのさらに別の改変を含むことができる。ある種の実施態様では、グルカゴンアゴニストは配列番号:859 - 919のいずれかのアミノ酸を含む。

【0137】

クラス2グルカゴン関連ペプチド

ある種の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドはクラス2グルカゴン関連ペプチドであり、前記は本明細書及び国際特許出願PCT US2009/47447（2009年6月16日出願）、米国仮特許出願No.61/090,448及び米国特許出願No.61/151,349に記載されている（前記文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。クラス2グルカゴン関連ペプチドに関する下記の節で言及する生物学的配列（配列番号:1001 - 1262）は、国際特許出願PCT US2009/47447中の配列番号:1 - 262に対応する。30

【0138】

活性

天然のグルカゴンはGIP受容体を活性化せず、さらに通常はGLP-1受容体で天然のGLP-1の活性の約1%を有する。本明細書に記載する天然のグルカゴンへの改変は、天然のグルカゴン（配列番号:1001）の活性と等しい又は前記を超える強力なグルカゴン活性、天然のGIP（配列番号:1004）の活性と等しい又は前記を超える強力なGIP活性、及び/又は天然のGLP-1の活性と等しい又は前記を超える強力なGLP-1活性を示すことができるクラス2グルカゴン関連ペプチドを生じる。これに関しては、当該クラス2グルカゴン関連ペプチドは、本明細書にさらに記述されるように、グルカゴン/GIPコアゴニスト、グルカゴン/GIP/GLP-1トリアゴニスト、GIP/GLP-1コアゴニスト、又はGIPアゴニストグルカゴン関連ペプチドの1つであり得る。40

いくつかの実施態様では、本明細書に記載するクラス2グルカゴン関連ペプチドは、GIP受容体活性化活性について約100nM以下、又は約75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2又は150

nM以下のEC50を示す。いくつかの実施態様では、クラス2グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体活性化について約100nM以下、又は約75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2又は1nM以下のEC50を示す。いくつかの実施態様では、クラス2グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体活性化について約100nM以下、又は約75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2又は1nM以下のEC50を示す。受容体活性化は、当該受容体を過剰発現するHEK293細胞でcAMP誘発を測定するin vitroアッセイによって、例えば実施例7に記載するように当該受容体コードDNA及びcAMP応答性成分に連結したルシフェラーゼ遺伝子を共トランスフェクトしたHEK293細胞をアッセイすることによって測定される。

【0139】

いくつかの実施態様では、クラス2グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体及びGIP受容体の双方で活性を示す（“グルカゴン/GIPコアゴニスト”）。これらのクラス2グルカゴン関連ペプチドは、GIP受容体と比較してグルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの選択性を喪失している。いくつかの実施態様では、GIP受容体におけるクラス2グルカゴン関連ペプチドのEC50は、グルカゴン受容体におけるそのEC50と約50倍、40倍、30倍又は20倍未満相違する。いくつかの実施態様では、クラス2グルカゴン関連ペプチドのGIPに関する効能は、そのグルカゴンに関する効能と約500倍、450倍、400倍、350倍、300倍、250倍、200倍、150倍、100倍、75倍、50倍、25倍、20倍、15倍、10倍又は5倍未満相違する（より高いか又は低い）。いくつかの実施態様では、グルカゴン受容体におけるクラス2グルカゴン関連ペプチドのEC50で割ったGIP受容体におけるクラス2グルカゴン関連ペプチドのEC50の比は、約100、75、60、50、40、30、20、15、10又は5未満である。GLP-1活性は、例えば7位のアミノ酸改変、C-末端から27又は28位のアミノ酸までのアミノ酸の欠失（27アミノ酸ペプチド又は28アミノ酸ペプチドを生じる）、又は前記の組み合わせによって顕著に減少又は破壊される。

【0140】

別の特徴では、クラス2グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン、GIP及びGLP-1受容体で活性を示す（“グルカゴン/GIP/GLP-1トリアゴニスト”）。これらのクラス2グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1及びGIP受容体の双方と比較してグルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの選択性を喪失している。いくつかの実施態様では、GIP受容体におけるクラス2グルカゴン関連ペプチドのEC50は、グルカゴン及びGLP-1受容体におけるその対応するEC50と約50倍、40倍、30倍又は20倍未満相違する（より高いか又は低い）。いくつかの実施態様では、クラス2グルカゴン関連ペプチドのGIPに関する効能は、そのグルカゴン及びGLP-1に関する効能と約500倍、450倍、400倍、350倍、300倍、250倍、200倍、150倍、100倍、75倍、50倍、25倍、20倍、15倍、10倍又は5倍未満相違する（より高いか又は低い）。いくつかの実施態様では、GLP-1受容体におけるトリアゴニストのEC50で割ったGIP受容体におけるトリアゴニストのEC50の比は、約100、75、60、50、40、30、20、15、10又は5未満である

【0141】

さらに別の特徴では、クラス2グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1及びGIP受容体で活性を示すが、前記ペプチドでは、例えば3位のアミノ酸改変によって、グルカゴン活性は顕著に減少するか又は破壊される（“GIP/GLP-1コアゴニスト”）。例えば、この位置の酸性、塩基性又は疎水性アミノ酸（グルタミン酸、オルニチン、ノルロイシン）による置換はグルカゴン活性を減少させる。いくつかの実施態様では、GIP受容体におけるクラス2グルカゴン関連ペプチドのEC50は、GLP-1受容体におけるそのEC50と約50倍、40倍、30倍又は20倍未満相違する（より高いか又は低い）。いくつかの実施態様では、クラス2グルカゴン関連ペプチドのGIPに関する効能は、そのGLP-1に関する効能と約25倍、20倍、15倍、10倍又は5倍未満相違する（より高いか又は低い）。いくつかの実施態様では、これらクラス2グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体で天然のグルカゴンの約10%以下、例えば約1-10%、又は約0.1-10%、又は約0.1%を超えるが約10%未満の活性を有する。いくつかの実施態様では、GLP-1受容体におけるクラス2グルカゴン関連ペプチドのEC50で割ったGIP受容体におけるクラス2グルカゴン関連ペプチドのEC50の比は、約100、75、6

10

20

30

40

50

0、50、40、30、20、15、10又は5であり1未満ではない。いくつかの実施態様では、クラス2グルカゴン関連ペプチドのGLP-1に関する効能と比較した当該クラス2グルカゴン関連ペプチドのGIPに関する効能の比は、約100、75、60、50、40、30、20、15、10又は5であり1未満ではない。

【0142】

さらに別の特徴では、クラス2グルカゴン関連ペプチドはGIP受容体で活性を示すが、前記ペプチドでは、例えばGluによる3位の及びIleによる7位のアミノ酸改変によって、グルカゴン及びGLP-1活性は顕著に減少するか又は破壊される（“GIPアゴニストグルカゴンペプチド”）。いくつかの実施態様では、これらクラス2グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体で天然のグルカゴンの約10%以下、例えば約1-10%、又は約0.1-10%、又は約0.1%、0.5%若しくは1%を超えるが約1%、5%若しくは10%未満の活性を有する。
いくつかの実施態様では、これらクラス2グルカゴン関連ペプチドはまた、GLP-1受容体で天然のGLP-1の約10%以下、例えば約1-10%、又は約0.1-10%、又は約0.1%、0.5%若しくは1%を超えるが約1%、5%若しくは10%未満の活性を有する。

【0143】

改变

クラス2グルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に開示する改変は、GIP活性、グルカゴン活性及び/又はGLP-1活性の増加を示すグルカゴン関連ペプチドを作出するグルカゴン（配列番号:1001）の操作を可能にする。

GIP活性に影響を及ぼす改変

GIP受容体における活性の強化は1位のアミノ酸改変によって提供される。例えば、1位のHisは、大きな芳香族アミノ酸（場合によってTyr、Phe、Trp、アミノ-Phe、ニトロ-Phe、クロロ-Phe、スルホ-Phe、4-ピリジル-Ala、メチル-Tyr又は3-アミノ-Tyr）により置換される。1位のTyrとアミノ酸12-29に対応する領域内のアルファヘリックスの安定化との組み合わせは、GIP受容体をGLP-1受容体及びグルカゴン受容体と同様に活性化するクラス2グルカゴン関連ペプチドを提供する。アルファヘリックス構造は、例えば共有結合又は非共有結合の分子内橋の形成、又は12-29位周辺のアミノ酸のアルファヘリックス安定化アミノ酸（例えば、-二置換アミノ酸）による置換及び/又は挿入によって安定化され得る。

GIP受容体における活性強化はまた、27及び/又は28位、場合によって29位のアミノ酸改変によって提供される。例えば、27位のMetは、大きな脂肪族アミノ酸（場合によってLeu）で置換され、28位のAsnは小さな脂肪族アミノ酸（場合によってAla）で置換され、29位のThrは小さな脂肪族アミノ酸（場合によってGly）で置換される。27-29位のLAGによる置換は、これらの位置で天然のMNT配列と対比してGIP活性の増加を提供する。

【0144】

GIP受容体における活性の強化はまた12位のアミノ酸改変によって提供される。例えば、12位は、大きな脂肪族非極性アミノ酸（場合によってIle）で置換される。GIP受容体における活性強化はまた、17及び/又は18位のアミノ酸改変によって提供される。例えば、17位は極性残基（場合によってGln）で置換され、18位は小さな脂肪族アミノ酸（場合によってAla）で置換される。17及び18位のQAによる置換は、これらの位置で天然のRR配列と対比してGIP活性の増加を提供する。

GIP受容体における活性の増加は、12から29位でアミノ酸側鎖間の分子内橋の形成を可能にする改変によって提供される。例えば、分子内橋は、i及びi+4位の2つのアミノ酸の側鎖間で、又はj及びj+3位の間で、又はk及びk+7位の間で共有結合によって形成することができる。例示的な実施態様では、この橋は、12と16位、16と20位、20と24位、24と28位、又は17と20位との間に存在する。他の実施態様では、非共有結合による相互反応（例えば塩橋）が、これらの位置で陽性及び陰性荷電アミノ酸間で形成され得る。

GIP受容体活性を増加させる上記に記載の改変はいずれも個々に又は組み合わせて適用することができる。GIP受容体活性を増加させる改変の組み合わせは、一般的にそのような改変の単独利用よりも高いGIP活性を提供する。

10

20

30

40

50

【0145】

グルカゴン活性に影響を及ぼす改変

いくつかの実施態様では、グルカゴンに関する効能の強化は、天然のグルカゴン（配列番号:1001）の16位におけるアミノ酸改変によって提供される。非限定的な例によれば、そのような効能の強化は、16位の自然に生じるセリンを、グルタミン酸又は4原子の長さの側鎖を有する別の陰性荷電アミノ酸で置換するか、また別にはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれか1つ、又は少なくとも1つのヘテロ原子（例えばN、O、S、P）を含み、かつ約4（又は3-5）原子の長さの側鎖を有する荷電アミノ酸で置換することによって提供され得る。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体と対比してグルカゴン受容体に対に対するその最初の選択性を維持する。

10

グルカゴン受容体活性は、3位のアミノ酸改変（例えば自然に生じる3位のグルタミンの酸性、塩基性又は疎水性アミノ酸による置換）によって減少させることができる。例えば、グルタミン酸、オルニチン、又はノルロイシンによる3位の置換は、グルカゴン受容体活性を実質的に減少させ又は破壊する。

グルカゴン受容体活性の維持又は強化は、本明細書に記載するように3位のGlnをグルタミンアナローグで改変することによって達成できる。例えば、グルカゴンアゴニストは、配列番号:1243 - 1248、1250、1251及び1253 - 1256のいずれかのアミノ酸配列を含むことができる。

1及び2位のアミノ酸改変によって減少したグルカゴン活性の回復は、当該グルカゴン関連ペプチド又はそのアナローグのC-末端部分（アミノ酸12 - 29）のアルファヘリックス構造を安定化させることによって提供される。例えば、分子内橋は、i及びi+4位の2つのアミノ酸の側鎖間で、又はj及びj+3位の間で、又はk及びk+7位の間で共有結合によって形成することができる。他の実施態様では、非共有結合による相互反応（例えば塩橋）が、これらの位置の陽性及び陰性荷電アミノ酸間で形成され得る。さらにまた他の実施態様では、1つ以上の α - α 置換アミノ酸が、所望の活性を維持するこのC-末端部分（アミノ酸12 - 29）の位置に挿入又は代用される。例えば、16、20、21又は24位の1つ、2つ、3つ又は全てが α - α 置換アミノ酸（例えばAIB）で置換される。

20

【0146】

GLP-1活性に影響を及ぼす改変

30

GLP-1受容体における活性の強化は、C-末端アミノ酸のカルボン酸を中性荷電基（例えばアミド又はエステル）に取り替えることによって提供される。GLP-1受容体における活性の強化はまた、グルカゴンのC-末端部分（アミノ酸19 - 29周辺）のアルファヘリックス構造を安定化させることによって提供され、例えば本明細書でさらに記載するように、2つのアミノ酸の側鎖間における分子内橋の形成、又は12 - 29位周辺アミノ酸へのアルファヘリックス安定化アミノ酸（例えば α - α 置換アミノ酸）による代用及び/又は挿入を介する。例示的実施態様では、アミノ酸対12及び16、13及び17、16及び20、17及び21、20及び24又は24及び28（i = 12、16、20又は24のアミノ酸対）の側鎖が互いに連結され、したがってグルカゴンアルファヘリックスを安定化させる。いくつかの実施態様では、特に当該橋がi及びi+4位の間に存在するときは、橋又はリンカーは長さが約8（又は7-9）原子である。いくつかの実施態様では、特に当該橋がj及びj+3位の間に存在するときは、橋又はリンカーは長さが約6（又は5-7）原子である。

40

いくつかの実施態様では、分子内橋は以下によって形成される：(a) 6位の自然に生じるセリンをグルタミン酸、又は4原子の長さの側鎖を有する別の陰性荷電アミノ酸で置換するか、また別にはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれか1つ、又は少なくとも1つのヘテロ原子（例えばN、O、S、P）を含み、かつ約4（又は3-5）原子の長さの側鎖を有する荷電アミノ酸で置換する、及び(b) 20位の自然に生じるグルタミンを、荷電を有するか又は水素結合形成能を有し、かつ長さが少なくとも約5（又は約4-6）原子である別の親水性アミノ酸（例えばリジン、シトルリン、アルギニン又はオルニチン）で置換する。16及び20位のそのようなアミノ酸の側鎖は塩橋を形成できるか

50

、又は共有結合により連結され得る。いくつかの実施態様では、2つのアミノ酸は互いに結合してラクタム環を形成する。

【0147】

いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドのC-末端部分のアルファヘリックス構造の安定化は、ラクタム架橋以外の分子内橋の形成により達成される。例えば、適切な共有結合の方法には、オレフィンメタセシス、ランチオニン系環状化、ジスルフィド橋又は改変含硫橋形成、 α 、 β -ジアミノアルカン鎖の使用、金属原子橋の形成のいずれか1つ以上が含まれ、さらにペプチド環状化の他の手段がアルファヘリックス安定化に用いられる。

さらにまた他の実施態様では、1つ以上の α 、 β -二置換アミノ酸が、所望の活性を維持するこのC-末端部分（アミノ酸12-29）の位置に挿入又は代用される。例えば、16、20、21又は24位の1つ、2つ、3つ又は全てが α 、 β -二置換アミノ酸（例えばAIB）で置換される。GLP-1受容体における活性の増加は、本明細書に記載するように20位のアミノ酸改変によって提供される。GLP-1受容体における活性の増加はまた、C-末端へのGPSSGAPPPS（配列番号:1095）又はXGPSSGAPPPS（配列番号:1096）の付加によって提供される。そのようなアナローグのGLP-1活性は、本明細書に記載するように18、28若しくは29位又は18及び29位のアミノ酸を改変することによってさらに増加させることができる。さらに別のGLP-1に関する効能の穏やかな増加は、10位のアミノ酸を大きな芳香族アミノ酸残基（場合によってTrp）に改変することによって提供される。GLP-1受容体における効能は、18位の天然のアルギニンをアラニンで置換することによってさらに強化することができる。

【0148】

GLP-1受容体における活性の減少は、本明細書に記載するように7位のアミノ酸改変によって提供される。

クラス2グルカゴン関連ペプチドに関して上記に記載したGLP-1受容体活性を増加させる改変のいずれも、個々に又は組み合わせて適用することができる。GLP-1受容体活性を増加させる改変の組み合わせは、一般的にそのような改変の単独利用よりも高いGLP-1活性を提供する。例えば、本発明は以下のグルカゴン関連ペプチドを提供する：16位に、20位に、及びC-末端カルボン酸基に、場合によって16位及び20位のアミノ酸間の共有結合による改変を含むグルカゴン関連ペプチド；16位に及びC-末端カルボン酸基に改変を含むグルカゴン関連ペプチド；16及び20位に、場合によって16位及び20位のアミノ酸間の共有結合による改変を含むグルカゴン関連ペプチド；及び20位及びC-末端カルボン酸基に改変を含むグルカゴン関連ペプチド。

【0149】

DPP-IV耐性を改善する改変

1及び/又は2位の改変は、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）切断に対する当該ペプチドの耐性を高めることができる。例えば、1及び/又は2位は、本明細書に記載するDPP-IV耐性アミノ酸で置換され得る。いくつかの実施態様では、2位のアミノ酸はN-メチルアラニンで置換される。

2位の改変（例えば2位にAIB）及びいくつかの事例では1位の改変（例えば1位にDMIA）は、グルカゴン活性を（時には顕著に）減少させることができ、驚くべきことにグルカゴン活性におけるこの減少は、グルカゴンのC-末端部分（アミノ酸12-29周辺）のアルファヘリックス構造を、例えば、本明細書に記載するように2つのアミノ酸の側鎖間での共有結合の形成を介して安定化することによって回復させることができる。いくつかの実施態様では、共有結合は、“i”及び“i+4”位又は“j”及び“j+3”位のアミノ酸の間、例えば12及び16、16及び20、20及び24、24及び28位の間に存在する。例示的な実施態様では、この共有結合は、16位のグルタミン酸及び20位のリジンとの間のラクタム架橋である。いくつかの実施態様では、この共有結合は、本明細書に記載するようにラクタム架橋以外の分子内橋である。

【0150】

分解を減少させる改変

10

20

30

40

50

さらにまた別の例示的実施態様では、クラス2グルカゴン関連ペプチドのいずれもさらに改変して、配列番号:1001の15位及び/又は16位のアミノ酸の改変により安定性を改善し、時間経過時における当該ペプチドの分解を特に酸性又はアルカリ性緩衝液で減少させることができる。そのような改変はAsp15-Ser16ペプチド結合の切断を減少させる。例示的な実施態様では、15位のアミノ酸改変は、欠失又はグルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸又はホモシステイン酸によるAspの置換である。他の例示的な実施態様では、16位のアミノ酸改変は、欠失又はThr又はAIBによるSerの置換である。他の例示的な実施態様では、16位のSerは、グルタミン酸により、又は4原子の長さの側鎖を有する別の陰性荷電アミノ酸により、また別にはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれか1つにより置換される。

10

いくつかの実施態様では、天然のペプチドの27位に存在するメチオニン残基は、例えば欠失又は置換によって改変される。そのような改変はペプチドの酸化的分解を防ぐ。いくつかの実施態様では、27位のMetはロイシン、イソロイシン又はノルロイシンで置換される。いくつかの具体的な実施態様では、27位のMetはロイシン又はノルロイシンで置換される。

いくつかの実施態様では、20及び/又は24位のGlnは、例えば欠失又は置換によって改変される。そのような改変は、Glnの脱アミド化により生じる分解を減少させることができる。いくつかの実施態様では、20及び/又は24位のGlnはSer、Thr、Ala又はAIBで置換される。いくつかの実施態様では、20及び/又は24位のGlnはLys、Arg、Orn又はシトルリンで置換される。

20

いくつかの実施態様では、21位のAspは例えば欠失又は置換によって改変される。そのような改変は、Aspの脱水による環状スクシンイミド中間体の形成とその後に続くイソアスパルテートへの異性化により生じる分解を減少させることができる。いくつかの実施態様では、21位はGlu、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸で置換される。いくつかの具体的な実施態様では、21位はGluで置換される。

【0151】

アルファヘリックス構造の安定化

クラス2グルカゴン関連ペプチドのC-末端部分（アミノ酸12 - 29周辺）のアルファヘリックス構造の安定化は、GLP-1及び/又はGIP活性の強化を提供し、さらに1及び/又は2位のアミノ酸改変によって減少したグルカゴン活性を回復させる。アルファヘリックス構造は、例えば共有結合若しくは非共有結合による分子内橋の形成又はアルファヘリックス安定化アミノ酸（例えば、-二置換アミノ酸）によるアミノ酸12 - 29周辺への代用及び/又は挿入によって安定化させることができる。GIPアゴニストのアルファヘリックス構造の安定化は本明細書に記載するように実施できる。

30

【0152】

例示的実施態様

本発明のいくつかの実施態様にしたがえば、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号:1001）のアナローグは配列番号:1001の配列を含み、（a）GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変、（b）該アナローグのC-末端部分（アミノ酸12 - 19）のアルファヘリックス構造を安定化させる改変、及び（c）場合によって1から10（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）のさらに別の改変を有する。いくつかの実施態様では、アナローグは、天然のGIPのGIP受容体における活性の少なくとも約1%又は本明細書に記載するGIP受容体における他の任意の活性レベルを示す。

40

ある種の実施態様では、アルファヘリックス構造を安定化させる改変は、分子内橋（例えば共有結合分子内橋（例えば本明細書に記載するもののいずれか）を含む）を提供又は導入するものである。いくつかの実施態様の共有結合分子内橋はラクタム架橋である。これら実施態様のアナローグのラクタム架橋は、本明細書に記載のラクタム架橋であり得る。例えば、“アルファヘリックス構造の安定化”の節のラクタム架橋の教示を参照されたい。例えば、ラクタム架橋は、i位及びi+4位のアミノ酸の側鎖間又はj位及びj+3位のアミノ酸の側鎖間に存在するものであり得る（式中iは12、13、16、17、20又は24で、jは17で

50

ある）。ある種の実施態様では、ラクタム架橋は、16及び20位のアミノ酸の間に存在することができ、ここで16及び20位のアミノ酸の一方はGluで置換され、16及び20位の他方のアミノ酸はLysで置換される。

【0153】

また別の実施態様では、アルファヘリックス構造を安定化させる改変は、当該アナローグの16、20、21及び24位への1つ、2つ、3つ又は4つの¹⁰、-二置換アミノ酸の導入である。いくつかの実施態様では、¹¹、-二置換アミノ酸はAIBである。ある種の特徴では、¹²、-二置換アミノ酸（例えばAIB）は20位に存在し、16位のアミノ酸は陽性荷電アミノ酸（例えば式IVのアミノ酸（前記は本明細書に記載される））で置換される。式IVのアミノ酸はホモLys、Lys、Orn又は2,4-ジアミノ酪酸（Dab）であり得る。

本発明の具体的な特徴では、1位のアミノ酸改変は、イミダゾール側鎖を欠くアミノ酸（例えば大きな芳香族アミノ酸（例えばTyr））によるHisの置換である。

ある種の特徴では、グルカゴンのアナローグは、27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変を含む。例えば、27位のMetは大きな脂肪族アミノ酸（場合によってLeu）で置換でき、28位のAsnは小さな脂肪族アミノ酸（場合によってAla）で置換でき、29位のThrは小さな脂肪族アミノ酸（場合によってGly）で置換できるか、又は前述の2つ若しくは3つの組み合わせである。具体的な実施態様では、グルカゴンのアナローグは、27位にLeu、28位にAla、及び29位にThrを含む。

本発明のある種の実施態様では、グルカゴンのアナローグは、1から21アミノ酸の延長部をC-末端から29位のアミノ酸に含む（the analog of glucagon comprises an extension of 1 to 21 amino acids C-terminal to the amino acid at position 29）。該延長部は、例えば配列番号:1095又は1096のアミノ酸配列を含むことができる。上記に加えて或いはまた別に、グルカゴンのアナローグは延長部を含み、当該延長部の1つから6つのアミノ酸は陽性荷電アミノ酸である。陽性荷電アミノ酸は式IVのアミノ酸であり、Lys、ホモLys、Orn及びDabが含まれ得るが、ただしこれらに限定されない。²⁰

【0154】

いくつかの実施態様のグルカゴンのアナローグは、本明細書に記載するようにアシル化又はアルキル化される。例えば、アシル基又はアルキル基は、本明細書にさらに別に記載されるように当該アナローグの10又は40位にスペーサーを用いて又はスペーサーを用いないで付加することができる。上記に加えて或いはまた別に、アナローグは、本明細書にさらに記載するように改変されて親水性部分を含むことができる。さらにまた、いくつかの実施態様では、アナローグは以下の改変のいずれか1つ又は組み合わせを含む：³⁰

- (a) D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val又は¹³ -アミノ-N-酪酸で置換される2位のSer；
- (b) Trp、Lys、Orn、Glu、Phe又はValで置換される10位のTyr；
- (c) 10位のLysへのアシル基の連結；
- (d) Arg又はIleで置換される12位のLys；
- (e) Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、Gly又はAIBで置換される16位のSer；
- (f) Glnで置換される17位のArg；
- (g) Ala、Ser、Thr又はGlyで置換される18位のArg；
- (h) Ser、Thr、Ala、Lys、シトルリン、Arg、Orn又はAIBで置換される20位のGln；
- (i) Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換される21位のAsp；
- (j) Ileで置換される23位のVal；
- (k) Asn、Ser、Thr、Ala又はAIBで置換される24位のGln；及び
- (l) 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、8、19、20、21、24、27、28及び29位のいずれかにおける保存的置換。

【0155】

例示的実施態様では、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号:1001）のアナローグは、以下の改変、⁵⁰

- (a) GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変、
 (b) i及びi+4位のアミノ酸の側鎖間又はj及びj+3位のアミノ酸の側鎖間のラクタム架橋
 (iは12、13、16、17、20又は24であり、jは17である)、
 (c) 27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変、例えば27及び/又は28位のアミノ酸改変、及び
 (d) 1-9又は1-6のさらに別のアミノ酸改変(例えば1、2、3、4、5、6、7、8又は9のさらに別のアミノ酸改変)を含み、
 さらに該アナローグのGIP受容体活性化のためのEC50は約10nM未満である。

これらの実施態様のアナローグのラクタム架橋は本明細書に記載のラクタム架橋であり得る。例えば、ラクタム架橋は16及び20位のアミノ酸の間に存在でき、ここで16及び20位のアミノ酸の一方はGluで置換され、16及び20位の他方のアミノ酸はLysで置換される。これらの実施態様にしたがえば、アナローグは、例えば、配列番号:1005-1094のいずれかのアミノ酸配列を含むことができる。
 10

【0156】

他の例示的実施態様では、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン(配列番号:1001)のアナローグは、以下の改変、

- (a) GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変、
 (b) アナローグの16、20、21及び24位のアミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全ての，-二置換アミノ酸による置換、
 (c) 27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変、例えば27及び/又は28位のアミノ酸改変、及び
 (d) 1-9又は1-6のさらに別のアミノ酸改変(例えば1、2、3、4、5、6、7、8又は9のさらに別のアミノ酸改変)を含み、
 20

さらに該アナローグのGIP受容体活性化のためのEC50は約10nM以下である。

これら実施態様のアナローグの，-二置換アミノ酸は任意の，-二置換アミノ酸が可能であり、前記には以下が含まれる(ただしこれらに限定されない)：アミノイソ酪酸(AIB)、メチル、エチル、プロピル及びn-ブチルから選択される同じ基若しくは異なる基により、又はシクロオクタン若しくはシクロヘプタンにより(例えば1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸)二置換されたアミノ酸。ある種の実施態様では、，-二置換アミノ酸はAIBである。ある種の実施態様では、20位のアミノ酸は，-二置換アミノ酸(例えばAIB)で置換される。これらの実施態様にしたがえば、アナローグは、例えば、配列番号:1099-1141、1144-1164、1166-1169及び1173-1178のいずれかのアミノ酸配列を含む。
 30

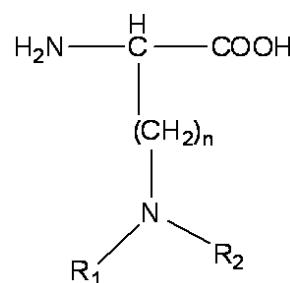
【0157】

さらにまた他の例示的実施態様では、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン(配列番号:1001)のアナローグは、以下の改変、

- (a) GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変、
 (b) 下記式IVのアミノ酸による16位のSerのアミノ酸置換：

【0158】

【化9】



[式IV]

【0159】

40

50

(式中、nは1から16又は1から10又は1から7又は1から6又は2から6であり、R₁及びR₂の各々は別個にH、C₁-C₁₈アルキル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)NH₂、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆)シクロアルキル、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及び(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択され、R₇はH又はOHであり、さらに式IVのアミノ酸の側鎖は遊離アミノ基を含む)、

(c) , -二置換アミノ酸による20位のGluのアミノ酸置換、

(d) 27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変、例えば27及び/又は28位のアミノ酸改変、及び

(e) 1-9又は1-6のさらに別のアミノ酸改変(例えば1、2、3、4、5、6、7、8又は9のさらに別のアミノ酸改変)を含み、

さらに該アナローグのGIP受容体活性化のためのEC50は約10nM以下である。

これらの実施態様のアナローグの式IVのアミノ酸は任意のアミノ酸であり、例えば式IVのアミノ酸であり得る(ここでnは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16である)。ある種の実施態様では、nは1、2、3、4又は5であり、この事例ではアミノ酸はそれぞれDab、Orn、Lys又はホモLysである。

これらの実施態様のアナローグの , -二置換アミノ酸は任意の , -二置換アミノ酸が可能であり、前記には以下が含まれる(ただしこれらに限定されない)：アミノイソ酪酸(AIB)、メチル、エチル、プロピル及びn-ブチルから選択される同じ基若しくは異なる基により、又はシクロオクタン若しくはシクロヘプタンにより(例えば1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸)二置換されたアミノ酸。ある種の実施態様では、 , -二置換アミノ酸はAIBである。これらの実施態様にしたがえば、アナローグは、例えば配列番号:1099-1165のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0160】

さらにまた他の例示的実施態様では、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン(配列番号:1001)のアナローグは、

(a) GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変、

(b) C-末端からアミノ酸29位に約1から約21アミノ酸の延長部(ここで該延長部のアミノ酸の少なくとも1つはアシル化又はアルキル化される)を含み、

さらに該アナローグのGIP受容体活性化のためのEC50は約10nM以下である。

いくつかの実施態様では、アシル化又はアルキル化アミノ酸は式I、II又はIIIのアミノ酸である。より具体的な実施態様では、式Iのアミノ酸はDab、Orn、Lys又はホモLysである。さらに、いくつかの実施態様では、約1から約21アミノ酸の延長部は、GPSSGAPPPS(配列番号:1095)又はXGPSSGAPPPS(配列番号:1096)のアミノ酸配列を含み、式中Xは、任意のアミノ酸、又はGPSSGAPPK(配列番号:1170)、又はXGPSSGAPPK(配列番号:1171)、又はXGPSSGAPPSK(配列番号:1172)であり、式中Xは、Gly又は小さな脂肪族又は非極性又はわずかに極性のアミノ酸である。いくつかの実施態様では、約1から約21アミノ酸は、配列番号:1095、1096、1170、1171又は1172に対して1つ以上の保存的置換を含む配列を含むことができる。いくつかの実施態様では、アシル化又はアルキル化アミノ酸は、C-末端が延長されたアナローグの37、38、39、40、41、42又は43位に配置される。ある種の実施態様では、アシル化又はアルキル化アミノ酸はC-末端延長アナローグの40位に配置される。

【0161】

いくつかの実施態様では、GIPアゴニスト活性を有するアナローグはさらに、27、28及び29位の1つ、2つ又は全てにアミノ酸改変、例えば27及び/又は28位にアミノ酸改変を含む。

上記の例示的実施態様のいずれにおいても、GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸置換は、イミダゾール側鎖を欠くアミノ酸によるHisの置換であり得る。1位のアミノ酸改変は例えば大きな芳香族アミノ酸によるHisの置換であり得る。いくつかの実施態様では、大きな芳香族アミノ酸は本明細書に記載するアミノ酸のいずれかであり、例えばTyr

10

20

30

40

50

が含まれる。

同様に上記の例示的実施態様に関して、27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変は、本明細書に記載するこれらの位置における改変のいずれでもよい。例えば、27位のMetは大きな脂肪族アミノ酸（場合によってLeu）で置換でき、28位のAsnは小さな脂肪族アミノ酸（場合によってAla）で置換でき、及び／又は29位のThrは小さな脂肪族アミノ酸（場合によってGly）で置換できる。また別には、アナローグは27及び／又は28位にそのようなアミノ酸改変を含むことができる。

【0162】

上記の例示的実施態様のアナローグはさらに、1-9又は1-6の追加されるさらに別のアミノ酸改変、例えば1、2、3、4、5、6、7、8又は9のさらに別のアミノ酸改変、例えばGIP、GLP-1及びグルカゴン受容体のいずれかにおける活性を増加若しくは低下させるか、溶解性を改善するか、作用の持続時間若しくは循環中の半減期を改善するか、作用の開始を先送りするか、又は安定性を高める、本明細書に記載の改変のいずれかを含む。アナローグはさらに、例えば12位のアミノ酸改変（場合によってIleによる置換）、及び／又は17及び18位におけるアミノ酸改変（場合によって17位でQによる、及び18位でAによる置換）、及び／又はGPSSGAPPPS（配列番号：1095）若しくはXGPSSGAPPPS（配列番号：1096）又は配列番号：1095若しくは1096に対して1つ以上の保存的置換を含む配列のC-末端への付加を含むことができる。アナローグは以下の改変の1つ以上を含むことができる：

- (i) D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val又は-アミノ-N-酪酸で置換される2位のSer；
- (ii) Trp、Lys、Orn、Glu、Phe又はValで置換される10位のTyr；
- (iii) 10位のLysへのアシル基の連結；
- (iv) Argで置換される12位のLys；
- (v) Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、Gly又はAIBで置換される16位のSer；
- (vi) Glnで置換される17位のArg；
- (vii) Ala、Ser、Thr又はGlyで置換される18位のArg；
- (viii) Ala、Ser、Thr、Lys、シトルリン、Arg、Orn又はAIBで置換される20位のGln；
- (ix) Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換される21位のAsp；
- (x) Ileで置換される23位のVal；
- (xi) Asn、Ala、Ser、Thr又はAIBで置換される24位のGln；及び
- (xii) 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28及び29位のいずれかにおける保存的置換。

いくつかの実施態様のアナローグは(i)から(xii)の改変の組み合わせを含む。また別に或いはさらに加えて、アナローグは3位のアミノ酸改変を含むことができ（例えばGluによるGlnのアミノ酸置換）、ここで当該アナローグは、グルカゴン受容体におけるグルカゴンの活性の1%未満を有する。また別に或いはさらに加えて、アナローグは7位にアミノ酸改変を含むことができ（例えばヒドロキシル基を欠くアミノ酸（例えばAbu又はIle）によるThrのアミノ酸置換）、ここで該アナローグはGLP-1受容体でGLP-1活性の約10%未満を有する。

【0163】

当該例示的実施態様に関して、アナローグは親水性部分に共有結合により連結することができる。いくつかの実施態様では、アナローグは、アミノ酸16、17、20、21、24、29、40位又はC-末端のいずれかで親水性部分に共有結合により連結される。ある種の実施態様では、アナローグはC-末端延長部（例えば配列番号：1095のアミノ酸配列）及び親水性部分を含む付加物を含み、したがって親水性部分は40位で共有結合によりアナローグに連結される。

さらにまた別の例示的実施態様では、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴンアナローグは、配列番号：1227、1228、1229又は1230のいずれかのアミノ酸配列を含み、前記配列はさらに、以下の改変、

10

20

30

40

50

- (a) 場合によって、GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変、
 (b) C-末端からアミノ酸29位に約1から約21アミノ酸の延長部（ここで該延長部のアミノ酸の少なくとも1つはアシル化又はアルキル化される）、及び
 (d) 6つまでのさらに別のアミノ酸改変を含み、

ここで、当該アナローグのGIP受容体活性化のためのEC50は約10nM以下である。いくつかの特徴では、アシル化又はアルキル化アミノ酸は式I、II又はIIIのアミノ酸である。より具体的な実施態様では、式Iのアミノ酸はDab、Orn、Lys又はホモLysである。同様にいくつかの実施態様では、約1から約21アミノ酸は、GPSSGAPPPS（配列番号:1095）又はXGPSSGAPPPS（配列番号:1096）のアミノ酸配列を含み、式中Xは、任意のアミノ酸、又はGPSSGAPPK（配列番号:1170）、又はXGPSSGAPPPK（配列番号:1171）、又はXGPSSGAPPPSK（配列番号:1172）であり、式中Xは、Gly又は小さな脂肪族又は非極性又はわずかに極性のアミノ酸である。いくつかの実施態様では、約1から約21アミノ酸は、配列番号:1095, 1096, 1170、1171又は1172に対して1つ以上の保存的置換を含む配列を含むことができる。いくつかの実施態様では、アシル化又はアルキル化アミノ酸は、C-末端が延長されたアナローグの37、38、39、40、41、42又は43位に配置される。ある種の実施態様では、アシル化又はアルキル化アミノ酸はC-末端延長アナローグの40位に配置される。上記の例示的実施態様のいずれにおいても、GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸は、イミダゾール側鎖を欠くアミノ酸であり得る。
 10

【0164】

上記の例示的実施態様のアナローグはさらに、1つから6つのさらに別のアミノ酸改変、
 20 例えばGIP、GLP-1及びグルカゴン受容体のいずれかにおける活性を増加若しくは低下させるか、溶解性を改善するか、作用の持続時間若しくは循環中の半減期を改善するか、作用の開始を先送りするか、又は安定性を高める、本明細書に記載の改変のいずれかを含むことができる。

ある種の特徴では、上記の例示的実施態様に記載のグルカゴンアナローグはさらに、27
 28及び29位の1つ、2つ又は全てにアミノ酸改変を含む。これらの位置における改変は、
 これら的位置に関して本明細書に記載した改変のいずれかであり得る。例えば、配列番号
 :1227、1228、1229又は1230に対して、27位は大きな脂肪族アミノ酸（例えばLeu、Ile又
 はノルロイシン）又はMetで置換でき、28位は別の小さな脂肪族アミノ酸（例えばGly又は
 Ala）又はAsnで置換でき、及び/又は29位は別の小さな脂肪族アミノ酸（例えばAla又はG
 ly）又はThrで置換できる。また別に、アナローグは27及び/又は28位にアミノ酸改変を
 含むことができる。
 30

【0165】

アナローグはさらに以下の追加の改変の1つ以上を含むことができる：
 (i) 2位のアミノ酸は、D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val又は-アミ
 ノ-N-酪酸のいずれか1つである；
 (ii) 10位のアミノ酸はTyr、Trp、Lys、Orn、Glu、Phe又はValである；
 (iii) 10位のLysへのアシル基の連結；
 (iv) 12位のアミノ酸はIle、Lys又はArgである；
 (v) 16位のアミノ酸は、Ser、Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、G
 ly又はAIBのいずれか1つである；
 (vi) 17位のアミノ酸はGln又はArgである；
 (vii) 18位のアミノ酸は、Ala、Arg、Ser、Thr又はGlyである；
 (viii) 20位のアミノ酸は、Ala、Ser、Thr、Lys、シトルリン、Arg、Orn、又はAIB若し
 くは別の-, -二置換アミノ酸のいずれか1つである；
 (ix) 21位のアミノ酸は、Glu、Asp、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸のいずれか1
 つである；
 (x) 23位のアミノ酸はVal又はIleである；
 (xi) 24位のアミノ酸は、Gln、Asn、Ala、Ser、Thr又はAIBのいずれか1つである；及び
 (xii) 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28及び2
 40 50

9位のいずれかにおける1つ以上の保存的置換。

いくつかの実施態様のアナローグは(i)から(xii)の改変の組み合わせを含む。また別に或いはさらに加えて、アナローグは3位のアミノ酸改変を含むことができ(例えばGluによるGlnのアミノ酸置換)、ここで当該アナローグは、グルカゴン受容体におけるグルカゴンの活性の1%未満を有する。また別に或いはさらに加えて、アナローグは7位にアミノ酸改変を含むことができ(例えばヒドロキシル基を欠くアミノ酸(例えばAbu又はIle)によるThrのアミノ酸置換)、ここで該アナローグはGLP-1受容体でGLP-1活性の約10%未満を有する。

【0166】

上記の例示的実施態様(アナローグがアシル又はアルキル基を含む)では、アナローグは、本明細書に記載するようにアシル又はアルキル基にスペーサーを介して結合され得る。スペーサーは例えば長さが3から10原子であり得る。さらにスペーサーは、例えばアミノ酸(例えば6-アミノヘキサン酸、本明細書に記載の任意のアミノ酸)、ジペプチド(例えばAla-Ala、Ala-Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、Glu-Glu)、トリペプチド、又は親水性若しくは疎水性二官能性スペーサーであり得る。ある種の特徴では、スペーサー及びアシル又はアルキル基の合計長は約14から約28原子である。いくつかの実施態様では、アミノ酸スペーサーは-Gluではない。いくつかの実施態様では、ジペプチドスペーサーはGlu-Gluではない。

いくつかの極めて具体的な実施態様では、本発明のアナローグは、配列番号:1099-1141、1144-1164、1166、1192-1207、1209-1221及び1223から成る群から選択されるか、又は配列番号:1167-1169、1173-1178及び1225から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

さらにまた別の例示的実施態様では、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴンアナローグはアシル又はアルキル基(例えば非天然或いは自然に生じるアミノ酸のアシル又はアルキル基)を含み、ここでアシル又はアルキル基はスペーサーに付加され、(i)当該スペーサーはアナローグの10位のアミノ酸の側鎖に付加されるか、又は(ii)当該アナローグは1から21アミノ酸の延長部をC-末端から29位のアミノ酸に含み、スペーサーは配列番号:1001と対比して37-43位の1つに対応するアミノ酸の側鎖に付加され、当該アナローグのGIP受容体活性化のためのEC50は約10nM以下である。

【0167】

そのような実施態様では、アナローグは配列番号:1001のアミノ酸配列を含み、前記配列は以下を有する:(i)GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変、(ii)27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変、(iii)以下の(A)-(C)の少なくとも1つ:

(A) アナローグは、i及びi+4位のアミノ酸の側鎖間又はj及びj+3位のアミノ酸の側鎖間にラクタム架橋を含む(iは12、13、16、17、20又は24であり、jは17である);

(B) アナローグの16、20、21及び24位の1つ、2つ、3つ又は全てが-, -二置換アミノ酸で置換される;又は

(C) アナローグは、(i)下記式IVのアミノ酸による16位のSerのアミノ酸置換、及び(ii)-, -二置換アミノ酸による20位のGlnのアミノ酸置換、及び(iv)6つまでのさらに別のアミノ酸改変を含む:

【0168】

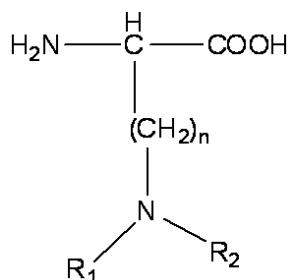
10

20

30

40

【化10】



【式IV】

10

【0169】

式中、nは1から7であり、R1及びR2の各々は別個にH、C₁-C₁₈アルキル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)NH₂、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆)シクロアルキル、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及び(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択され、R₇はH又はOHであり、さらに式IVのアミノ酸の側鎖は遊離アミノ基を含む。

【0170】

これら実施態様のアナローグの、-二置換アミノ酸は任意の、-二置換アミノ酸が可能で、前記には以下が含まれる(ただしこれらに限定されない)：アミノイソ酪酸(AIB)、メチル、エチル、プロピル及びn-ブチルから選択される同じ基若しくは異なる基により、又はシクロオクタン若しくはシクロヘプタンにより(例えば1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸)二置換されたアミノ酸。ある種の実施態様では、-二置換アミノ酸はAIBである。

20

これらの実施態様におけるアナローグの式IVのアミノ酸は任意のアミノ酸、例えばnが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16の式IVのアミノ酸である。ある種の実施態様では、nは2、3、4又は5であり、この事例ではアミノ酸はそれぞれDab、Orn、Lys又はホモLysである。上記の例示的実施態様のいずれにおいても、GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変は、イミダゾール側鎖を欠くアミノ酸によるHisの置換であり得る。

同様に上記の例示的実施態様に関して、27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変は、本明細書に記載するこれらの位置における改変のいずれかでもよい。例えば、27位のMetは大きな脂肪族アミノ酸(場合によってLeu)で置換でき、28位のAsnは小さな脂肪族アミノ酸(場合によってAla)で置換でき、及び/又は29位のThrは小さな脂肪族アミノ酸(場合によってGly)で置換できる。また別には、アナローグは27及び/又は28位にそのようなアミノ酸改変を含むことができる。

30

【0171】

アナローグはさらに、例えば12位のアミノ酸改変(場合によってIleによる置換)、及び/又は17及び18位におけるアミノ酸改変(場合によって17位でQによる、及び18位でAによる置換)、及び/又はGPSSGAPPPS(配列番号:1095)若しくはXGPSSGAPPPS(配列番号:1096)又は配列番号:1095若しくは1096に対して1つ以上の保存的置換を含む配列のC-末端への付加を含むことができる。アナローグは以下の改変の1つ以上を含むことができる：

40

- (i) D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val又は-アミノ-N-酪酸で置換される2位のSer；
- (ii) Trp、Lys、Orn、Glu、Phe又はValで置換される10位のTyr；
- (iii) 10位のLysへのアシリル基の連結；
- (iv) Argで置換される12位のLys；
- (v) Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、Gly又はAIBで置換される16位のSer；
- (vi) Glnで置換される17位のArg；
- (vii) Ala、Ser、Thr又はGlyで置換される18位のArg；

50

(viii) Ala、Ser、Thr、Lys、シトルリン、Arg、Orn又はAIBで置換される20位のGln；

(ix) Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換される21位のAsp:

(x) 11eで置換される23位のVal ;

(xi) Asn、Ala、Ser、Thr又はAIBで置換される24位のGln；及び

(xi) 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28及び29位のいずれかにおける保存的置換。

いくつかの実施態様のアナローグは(i)から(xii)の改変の組み合わせを含む。また別に或いはさらに加えて、アナローグは3位のアミノ酸改変を含むことができ(例えばGluによるGlnのアミノ酸置換)、ここで当該アナローグは、グルカゴン受容体におけるグルカゴンの活性の1%未満を有する。また別に或いはさらに加えて、アナローグは、7位のアミノ酸改変(例えばヒドロキシル基を欠くアミノ酸(例えばAbu又はIle)によるThrのアミノ酸置換)、C-末端から27若しくは28位におけるアミノ酸欠失(27又は28アミノ酸ペプチドを生じる)、又は前記の組合せを含むことができ、ここで該アナローグはGLP-1受容体でGLP-1活性の約10%未満を有する。

(0 1 7 2)

当該例示的実施態様に関して、アナローグは親水性部分に共有結合により連結することができる。いくつかの実施態様では、アナローグは、アミノ酸16、17、20、21、24、29、40位又はC-末端のいずれかで親水性部分に共有結合により連結される。ある種の実施態様では、アナローグはC-末端延長部（例えば配列番号:1095のアミノ酸配列）及び親水性部分を含む付加物を含み、したがって親水性部分は40位でアナローグに共有結合により連結される。

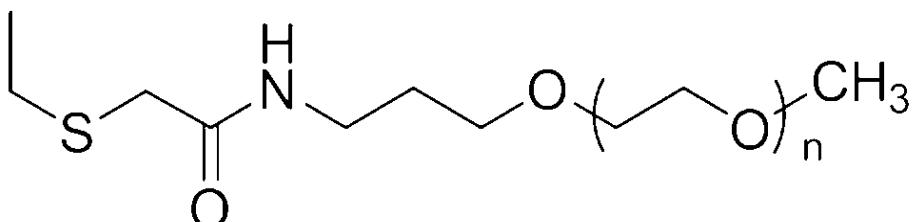
いくつかの実施態様では、親水性部分は、当該アナローグのLys、Cys、Orn、ホモシステイン又はアセチルフェニルアラニンに共有結合により連結される。前記Lys、Cys、Orn、ホモシステイン又はアセチルフェニルアラニンは、当該グルカゴン配列（配列番号：1001）にとって天然であるアミノ酸であっても、又は配列番号：1001の天然のアミノ酸の取り替えであるアミノ酸でもよい。該親水性部分がCysに付加されるいくつかの実施態様では、親水性部分との連結は以下の構造を含むことができる：

[0 1 7 3]

【化 1 1】

又は

ペブモト



〔 0 1 7 4 〕

親水性部分を含む当該アナローグに関して、親水性部分は本明細書に記載するもののいずれでもよい。例えば“親水性部分の連結”の節の教示を参照されたい。いくつかの実施

10

30

30

40

50

態様では、親水性部分はポリエチレングリコール(PEG)である。ある種の実施態様のPEGは、約1,000ダルトンから約40,000ダルトン、例えば約20,000ダルトンから約40,000ダルトンの分子量を有する。

例示的実施態様(アナローグがアシル又はアルキル基を含み、前記の基はスペーサーを介してアナローグに付加される)では、スペーサーは本明細書に記載の任意のスペーサーであり得る。スペーサーは、例えば長さが3から10原子が可能であり、例えばアミノ酸(例えば6-アミノヘキサン酸、本明細書に記載の任意のアミノ酸)、ジペプチド(例えばAla-a-Ala、Ala-Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、Glu-Glu)、トリペプチド、又は親水性若しくは疎水性二官能性スペーサーであり得る。ある種の特徴では、スペーサー及びアシル又はアルキル基の合計長は約14から約28原子である。いくつかの実施態様では、アミノ酸スペーサーは-Gluではない。いくつかの実施態様では、ジペプチドスペーサーはGlu-Gluではない。10

アシル又はアルキル基は、本明細書に記載の任意のアシル又はアルキル基で、例えば非天然或いは自然に生じるアミノ酸であるアシル又はアルキル基である。いくつかの実施態様のアシル又はアルキル基はC4からC30脂肪アシル基、例えばC10脂肪アシル又はアルキル基、C12脂肪アシル又はアルキル基、C14脂肪アシル又はアルキル基、C16脂肪アシル又はアルキル基、C18脂肪アシル又はアルキル基、C20アシル又はアルキル基、又はC22アシル又はアルキル基、又はC4からC30アルキル基である。具体的な実施態様では、アシル基は、C12からC18脂肪アシル基(例えばC14又はC16脂肪アシル基)である。20

【0175】

いくつかの実施態様では、アナローグのC-末端からアミノ酸29位の約1から約21アミノ酸の延長部は、GPSSGAPPS(配列番号:1095)又はXGPSSGAPPS(配列番号:1096)のアミノ酸配列を含み、式中Xは、任意のアミノ酸、又はGPSSGAPPK(配列番号:1170)、又はXGPSSGAPPK(配列番号:1171)、又はXGPSSGAPPSK(配列番号:1172)であり、式中Xは、Gly又は小さな脂肪族又は非極性又はわずかに極性のアミノ酸である。いくつかの実施態様では、約1から約21アミノ酸は、配列番号:1095, 1096, 1170, 1171又は1172に対して1つ以上の保存的置換を含む配列を含むことができる。いくつかの実施態様では、アシル化又はアルキル化アミノ酸は、C-末端が延長されたアナローグの37、38、39、40、41、42又は43位に配置される。ある種の実施態様では、アシル化又はアルキル化アミノ酸はC-末端延長アナローグの40位に配置される。ある種の実施態様では、アシル又はアルキル基は、配列番号:1001、1227、1228、1229又は1230にとって天然であるアミノ酸に共有結合により連結されるか、又は置換されたアミノ酸に連結され得る。ある種の実施態様では、アシル又はアルキル基は、配列番号:1095、1096、1171又は1172にとって天然であるアミノ酸に共有結合により連結される。30

GIPアゴニストは、例えば配列番号:1005-1094(場合によって、GIPアゴニスト活性を維持する1、2、3、4又は5つまでのさらに別の改変を有する)のアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであり得る。ある種の実施態様では、GIPアゴニストは配列番号:1099-1262のいずれかのアミノ酸を含む。

【0176】

クラス3グルカゴン関連ペプチド

ある種の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドはクラス3グルカゴン関連ペプチドであり、前記は、本明細書並びに国際特許出願PCT/US2009/47438(2009年6月16日出願)、国際特許出願公開公報WO 2008/101017(2008年8月21日公開)及び米国仮特許出願No.61/090,412及び米国特許出願61/177,476号に記載されている(前記文献の内容は参照によりその全体が組み入れられる)。

クラス3グルカゴン関連ペプチドに関する以下の節で言及される生物学的配列のいくつか(配列番号:89-108、114-128及び146-656)は、国際特許出願PCT/US2009/47438の配列番号:89-108、114-128及び146-656に対応する。

【0177】

活性

10

20

30

40

50

クラス3グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体で活性の増加を示し、さらに別の実施態様では生物物理的安定性及び水溶性の増加を示すペプチドであり得る。さらに加えて、いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体に対比してグルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの選択性を喪失している。クラス3グルカゴン関連ペプチドで選択されるアミノ酸改変は、グルカゴン受容体に対比してGLP-1受容体における当該ペプチドの相対的活性を制御することができる。したがって、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体に対してグルカゴン受容体でより高い活性を有するグルカゴン/GLP-1コアゴニスト、両受容体でほぼ等価の活性を有するグルカゴン/GLP-1コアゴニスト、又はグルカゴン受容体に対比してGLP-1受容体でより高い活性を有するグルカゴン/GLP-1コアゴニストであり得る。コアゴニストの後者のカテゴリーは、グルカゴン受容体でほとんど又は全く活性を示さないが、GLP-1受容体で天然のGLP-1と同じ若しくは高い効能でGLP-1受容体を活性化する能力をなお維持するように操作することができる。これらコアゴニストのいずれもまた、生物物理的安定性及び/又は水溶性の強化を付与するアミノ酸改変を含むことができる。10

【0178】

クラス3グルカゴン関連ペプチドの改変を実施して、天然のGLP-1に対比してGLP-1受容体での活性が少なくとも約1%（少なくとも約1.5%、2%、5%、7%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%を含む）から約200%以上のいずれかの値、及び天然のグルカゴンに対比してグルカゴン受容体での活性が少なくとも約1%（少なくとも約1.5%、2%、5%、7%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%を含む）から約500%以上のいずれかの値を有するグルカゴン関連ペプチドを生成することができる。20 天然のグルカゴンのアミノ酸配列は配列番号:701であり、GLP-1(7-37)酸のアミノ酸配列は配列番号:704である。

クラス3グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体又はGLP-1受容体又は双方で活性が増加又は減少するグルカゴン関連ペプチドであり得る。クラス3グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体に対比してグルカゴン受容体に対する選択性が変化したグルカゴン関連ペプチドであり得る。本明細書に開示するように、溶解性及び/又は安定性の改善もまた示す、高い効能をもつクラス3グルカゴン関連ペプチドが提供される。30

【0179】

グルカゴン活性に影響を及ぼす改変
グルカゴン受容体における活性の増加は、天然のグルカゴン（配列番号:701）の16位のアミノ酸改変によって提供される。いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体におけるペプチドの効能を強化するために、野生型ペプチド（His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-rg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr（配列番号:701））に対して改変を実施されてあるグルカゴンアゴニストである。天然のグルカゴン（配列番号:701）の16位で通常生じるセリンを選別酸性アミノ酸で置換し、有効性が実証されたin vitroモデルアッセイ（実施例7参照）でcAMP合成を刺激するその能力に関してグルカゴンの効能を強化することができる。より具体的には、この置換は、グルカゴン受容体におけるアナローグの効能を少なくとも2倍、4倍、5倍、及び10倍まで強化する。この置換はまた、GLP-1受容体におけるアナローグの活性を天然のグルカゴンに対比して少なくとも5倍、10倍又は15倍強化するが、しかしながらGLP-1受容体を超えるグルカゴン受容体に対する選択性は維持される。40

【0180】

非限定的に例示すれば、そのような効能の強化は、16位の自然に生じるセリンをグルタミン酸で、又は4原子の長さの側鎖を有する別の陰性荷電アミノ酸で、或いはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸又は少なくとも1つのヘテロ原子（例えばN、O、S、P）を含みかつ約4（又は3-5）原子の側鎖長をもつ側鎖を有する荷電アミノ酸のいずれか1つで置換することにより提供できる。いくつかの実施態様にしたがえば、天然のグルカゴンの16位のセリン残基は、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸、ホ50

モシステイン酸、スレオニン又はグリシンから成る群から選択されるアミノ酸で置換される。いくつかの実施態様にしたがえば、天然のグルカゴンの16位のセリン残基は、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択されるアミノ酸で置換され、さらに、いくつかの実施態様では、セリン残基はグルタミン酸で置換される。

【0181】

いくつかの実施態様では、効能が強化されたクラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:90、配列番号:91、配列番号:92、配列番号:93、配列番号:94、配列番号:95のペプチド又は配列番号:93のグルカゴンアゴニストアナローグを含む。いくつかの実施態様にしたがえば、野生型グルカゴンと対比してグルカゴン受容体で効能が強化されたクラス3グルカゴン関連ペプチドが提供され、ここで、当該ペプチドは、配列番号:95、配列番号:96、配列番号:97又は配列番号:98の配列を含み、当該グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体と対比してグルカゴン受容体に対しその選択性を維持する。いくつかの実施態様では、グルカゴン受容体に対して特異性が強化されたクラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:96、配列番号:97、配列番号:98のペプチド又はそのグルカゴンアゴニストアナローグを含み、ここで、カルボキシ末端アミノ酸はその天然のカルボン酸基を保持する。いくつかの実施態様にしたがえば、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH(配列番号:98)の配列を含み、ここで、当該ペプチドは、実施例7のin vitro cAMPアッセイで測定したとき天然のグルカゴンと対比してグルカゴン受容体で約5倍強化された効能を示す。

【0182】

グルカゴン受容体活性は、3位のアミノ酸改変(例えば3位の自然に生じるグルタミンの置換)によって減少、維持又は強化させることができる。いくつかの実施態様では、酸性、塩基性又は疎水性アミノ酸(グルタミン酸、オルニチン、ノルロイシン)による3位のアミノ酸の置換は、グルカゴン受容体活性を実質的に減少又は破壊することが示された。例えばグルタミン酸、オルニチン又はノルロイシンで置換されるアナローグは、グルカゴン受容体で天然のグルカゴンの活性の約10%以下、例えば約1-10%又は約0.1-10%又は約0.1%を超えるが約10%未満を有し、一方、GLP-1受容体ではGLP-1活性の少なくとも20%を示す。例えば、本明細書に記載する例示的アナローグは、天然のグルカゴンの活性の約0.5%、約0.1%又は約7%を有するが、GLP-1受容体ではGLP-1活性の少なくとも20%を示す。具体的には、クラス3グルカゴン関連ペプチドのいずれも(本明細書に記載するグルカゴンアナローグ、グルカゴンアゴニストアナローグ、グルカゴンコアゴニスト、及びグルカゴン/GLP-1コアゴニスト分子を含む)3位の改変(例えばGluによるGlnの置換)を含むように改変して、グルカゴン受容体に対する選択性と比較してGLP-1受容体に対して高い選択性(例えば10倍の選択性)を有するペプチドを生成することができる。

【0183】

別の実施態様では、本明細書に記載するように、クラス3グルカゴン関連ペプチドのいずれかの3位の自然に生じるグルタミンをグルタミンアナローグで置換してグルカゴン受容体における活性の実質的な減少をもたらさず、いくつかの事例ではグルカゴン受容体活性の強化をもたらすことができる。具体的な実施態様では、3位のアミノ酸はDab(Ac)で置換される。例えば、グルカゴンアゴニストは、配列番号:595、配列番号:601、配列番号:603、配列番号:604、配列番号:605及び配列番号:606のアミノ酸配列を含むことができる。

2位の改変(例えば2位にAIB)及びいくつかの事例では1位の改変はグルカゴン活性を減少させ得ることが観察された。グルカゴン活性のこの減少は、例えば本明細書に記載する手段を介して(例えば“i”及び“i+4”位(例えば12及び16、16及び20、又は20及び24位)のアミノ酸の側鎖間の共有結合を介して)、グルカゴンのC-末端部分でアルファヘリックスを安定化させることによって回復させることができる。いくつかの実施態様では、この共有結合はラクタム架橋以外の分子内橋である。例えば、共有結合形成方法には、オレフィンメタセシス、ランチオニン系環状化、ジスルフィド架橋又は改変含硫架橋形成、

10

20

30

40

50

, -ジアミノアルカン鎖の使用、金属原子架橋の形成及びペプチド環状化の他の手段のいずれか1つ以上が含まれる。

【0184】

GLP-1活性に影響を及ぼす改変

GLP-1受容体での活性の強化は、C-末端アミノ酸のカルボン酸を中性荷電基（例えばアミド又はエステル）で入れ替えることによって提供される。いくつかの実施態様では、これらのクラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:108を含み、前記ではカルボキシ末端アミノ酸は、天然のアミノ酸で見出されるカルボン酸基の代わりにアミド基を有する。これらのクラス3グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン及びGLP-1受容体の両受容体で強力な活性を有し、したがって両受容体でコアゴニストとして機能する。いくつかの実施態様にしたがえば、クラス3グルカゴン関連ペプチドはグルカゴン及びGLP-1受容体コアゴニストであり、前記ではペプチドは配列番号:108を含み、28位のアミノ酸はAsn又はLysで、29位のアミノ酸はThr-アミドである。

GLP-1受容体での活性の増加は、グルカゴンのC-末端部分（例えば残基12 - 29周辺）でアルファヘリックスを安定化させる改変によって提供される。いくつかの実施態様では、そのような改変は、3つの介在アミノ酸によって（すなわち“i”位のアミノ酸及び“i+4”位のアミノ酸でiは12から25の任意の整数）、又は2つの介在アミノ酸によって（すなわち“j”位のアミノ酸及び“j+3”位のアミノ酸で、jは12から27の任意の整数）、又は6つの介在アミノ酸によって（すなわち“k”位のアミノ酸及び“k+7”位のアミノ酸でkは12から22の任意の整数）分離される2つのアミノ酸の側鎖間で分子内橋の形成を可能にする。例示的な実施態様では、当該橋又はリンカーは長さが約8（又は約7 - 9）原子であり、それらは、12及び16位、又は16及び20位、又は20及び24位、又は24及び28位のアミノ酸の側鎖間で形成される。当該2つのアミノ酸側鎖は、非共有結合によって（例えば水素結合、イオン性相互作用（例えば塩橋の形成））又は共有結合によって互いに連結され得る。

【0185】

いくつかの実施態様にしたがえば、クラス3グルカゴン関連ペプチドはグルカゴン/GLP-1受容体コアゴニスト活性を示し、配列番号:99、101、102及び103から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様では、当該側鎖は共有結合により互いに結合され、さらにいくつかの実施態様では、2つのアミノ酸は互いに結合してラクタム環を形成する。

いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:108のグルカゴン関連ペプチドアナローグを含み、ここで、当該ペプチドは、12及び16位のアミノ酸の間で、又は16及び20位のアミノ酸の間で形成される分子内ラクタム架橋を含む。いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:108のグルカゴン関連ペプチドアナローグを含み、ここで、分子内ラクタム架橋は、12及び16位のアミノ酸の間で、16及び20位のアミノ酸の間で、又は20及び24位のアミノ酸の間で形成され、かつ29位のアミノ酸はグリシンであり、配列番号:29の配列は配列番号:108のC-末端アミノ酸に連結される。さらに別の実施態様では、28位のアミノ酸はアスパラギン酸である。

【0186】

いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドのC-末端部分のアルファヘリックス構造の安定化は、ラクタム架橋以外の分子内橋の形成により達成される。例えば、適切な共有結合の方法には、オレフィンメタセシス、ランチオニン系環状化、ジスルフイド橋又は改変含硫橋形成、, -ジアミノアルカン鎖の使用、金属原子橋の形成のいずれか1つ以上が含まれ、さらにペプチド環状化の他の手段がアルファヘリックス安定化に用いられる。

さらにまた、GLP-1受容体における活性強化は、所望の活性を維持する位置への1つ以上の, -二置換アミノ酸の意図的な導入を介して、グルカゴン関連ペプチドのC-末端部分（アミノ酸12 - 29周辺）のアルファヘリックス構造を安定化させることによって達成できる。そのようなペプチドは本明細書では分子内橋を欠くペプチドと考えることができる。いくつかの特徴では、アルファヘリックスの安定化は、前記の態様の分子内橋（例えば塩

10

20

30

40

50

橋又は共有結合)を導入することなく達成される。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドの16、17、18、19、20、21、24又は29位の1つ、2つ、3つ又は4つ以上が、-二置換アミノ酸で置換される。例えば、アミノイソ酪酸(AIB)によるクラス3グルカゴン関連ペプチドの16位の置換は、塩橋又はラクタムの非存在下でGLP-1活性を強化する。いくつかの実施態様では、16、20、21又は24位の1つ、2つ、又は3つ以上がAIBで置換される。

【0187】

GLP-1受容体における活性の強化は20位のアミノ酸の改変によって達成できる。いくつかの実施態様では、20位のグルタミンは、荷電を有するか又は水素結合能力を有し、かつ長さが少なくとも約5(又は約4-6)原子である側鎖をもつ別の親水性アミノ酸(例えばリジン、シトルリン、アルギニン又はオルニチン)で取り替えられる。10

GLP-1受容体における活性の増加は、配列番号:78のC-末端延長部を含むクラス3グルカゴン関連ペプチドで示される。配列番号:78を含むそのようなクラス3グルカゴン関連ペプチドのGLP-1活性は、本明細書で述べるように18、28又は29位のアミノ酸を改変することによってさらに増加させることができる。GLP-1効力におけるさらに別の穏やかな増加は、10位のアミノ酸がTrpとなるように改変することによって達成できる。

GLP-1受容体活性を増加させる改変の組み合わせは、そのような改変のいずれの単独実施よりも高いGLP-1活性を提供できる。例えば、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、16位、20位及びC-末端カルボン酸基の改変を、場合によって16及び20位のアミノ酸間の共有結合とともに含むか、16位及びC-末端カルボン酸基の改変を含むか、16位及び20位の改変を、場合によって16及び20位のアミノ酸間の共有結合とともに含むか、又は20位及びC-末端カルボン酸基の改変を含むことができ、ただし場合によって12位のアミノ酸はArgでないことを条件とするか、又は場合によって9位のアミノ酸はGluでないことを条件とする。20

【0188】

溶解性に影響を及ぼす改変

親水性部分の添加

クラス3グルカゴン関連ペプチドはさらに改変して、生理学的pHの水溶液における当該ペプチドの溶解性及び安定性を改善し、一方、天然のグルカゴンと対比して高い生物学的活性を維持できる。本明細書に記載する親水性部分をクラス3グルカゴン関連ペプチドに本明細書でさらに考察するように付加することができる。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:97又は配列番号:98を含むクラス3グルカゴン関連ペプチドの17、21及び24位への親水基の導入は、生理学的pHの溶液で高い効能を有するグルカゴンの溶解性及び安定性を改善することが予想される。そのような基の導入はまた、例えば循環中の半減期の延長によって測定したとき作用の持続時間を延長する。30

いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:99、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105、配列番号:106及び配列番号:107から成る群から選択される配列を含み、ここで、前記クラス3グルカゴン関連ペプチドの16、17、21又は24位の1つのアミノ酸残基の側鎖はさらにポリエチレングリコール鎖(約500から約40,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する)を含む。いくつかの実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は、約500から約50,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。別の実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は約10,000から約20,000ダルトンの分子量を有する。さらに他の例示的実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は約20,000から約40,000ダルトンの分子量を有する。いくつかの実施態様にしたがえば、親水基はポリエチレングリコール(PEG)鎖を含む。より具体的には、いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:94又は配列番号:95の配列を含み、ここでPEG鎖は、当該クラス3グルカゴン関連ペプチドの21及び24位に存在するアミノ酸の側鎖に共有結合により連結され、当該クラス3グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸はカルボン酸基を有する。いくつかの実施態様にしたがえば、ポリエチレングリコール鎖は、約500から約10,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。40

いくつかの実施態様にしたがえば、PEG化クラス3グルカゴン関連ペプチドは、当該クラス3グルカゴン関連ペプチドに共有結合される2つ以上のポリエチレンギリコール鎖を含み、該グルカゴン鎖の合計分子量は約1,000から約5,000ダルトンである。いくつかの実施態様では、PEG化グルカゴンアゴニストは配列番号:93又は配列番号:93のグルカゴンアゴニストアナローグから成るペプチドを含み、ここで、PEG鎖は21位及び24位のアミノ酸残基に共有結合により連結され、2つのPEG鎖の合計分子量は約1,000から約5,000ダルトンである。

【0189】

荷電C-末端

配列番号:20を含むクラス3グルカゴン関連ペプチドの溶解性は、例えば配列番号:108のグルカゴン関連ペプチドのC-末端部分（好ましくはC-末端位から27位）に1つ、2つ又は3つ以上の荷電アミノ酸を導入することによってさらに改善できる。そのような荷電アミノ酸は、天然のアミノ酸を荷電アミノ酸で（例えば28又は29位で）置換することによって、また別には、例えば27、28又は29位の後ろに荷電アミノ酸を添加することによって導入できる。例示的実施態様では、荷電アミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが陰性荷電である。当該クラス3グルカゴン関連ペプチドになおグルカゴン活性を保持させる追加の改変（例えば保存的置換）を前記ペプチドに対して実施してもよい。いくつかの実施態様では、配列番号:108のクラス3グルカゴン関連ペプチドのアナローグが提供され、ここで、該アナローグは17 - 26位における1つから2つのアミノ酸置換により配列番号:108と異なり、いくつかの実施態様では、該アナローグは20位のアミノ酸置換により配列番号:108のペプチドと異なる。

10

【0190】

アシル化/アルキル化

いくつかの実施態様にしたがえば、グルカゴン関連ペプチドは、アシル又はアルキル基（例えばC4からC30アシル又はアルキル基）を含むように改変される。いくつかの実施態様では、本発明は、クラス3グルカゴン関連ペプチドの10位のアミノ酸に共有結合により連結されたアシル基又はアルキル基を含むように改変される当該グルカゴン関連ペプチドを提供する。グルカゴン関連ペプチドはさらに、当該クラス3グルカゴン関連ペプチドの10位のアミノ酸とアシル基又はアルキル基との間にスペーサーを含むことができる。前述のクラス3グルカゴン関連ペプチドのいずれも2つのアシル基又は2つのアルキル基又は前記の組合せを含むことができる。本発明の具体的な特徴では、アシル化クラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:534 - 544及び546 - 549のいずれかのアミノ酸配列を含む。

20

【0191】

C-末端短縮

いくつかの実施態様では、本明細書に記載するクラス3グルカゴン関連ペプチドはさらに、グルカゴン及びGLP-1受容体における活性及び/又は効能に影響を及ぼすことなく、当該グルカゴンペプチドのC-末端（すなわち29及び/又は28位）の1つ又は2つのアミノ酸の短縮又は欠失によって改変される。これに関しては、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴンペプチド（配列番号:1）のアミノ酸1 - 27又は1 - 28を含み、前記は場合によって本明細書に記載の1つ以上の改変を含む。いくつかの実施態様では、切端クラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:550又は配列番号:551を含む。別の実施態様では、切端グルカゴンアゴニストペプチドは配列番号:552又は配列番号:553を含む。

30

【0192】

C-末端延長部

いくつかの実施態様にしたがえば、本明細書に開示するクラス3グルカゴン関連ペプチドは、当該グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端に第二のペプチド（例えば配列番号:78、配列番号:117又は配列番号:118）を添加することによって改変される。いくつかの実施態様では、配列番号:99、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105、配列番号:106、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:110、配列番号:111及び配列番号:69から成る群から選択される配列を有するクラス3グ

40

50

ルカゴン関連ペプチドは、第二のペプチドにペプチド結合を介して共有結合され、ここで第二のペプチドは配列番号:78、配列番号:117及び配列番号:118から成る群から選択される配列を含む。さらに別の実施態様では、C-末端延長部を含むクラス3グルカゴン関連ペプチドで、天然のグルカゴン関連ペプチドの29位のスレオニンはグリシンで取り替えられる。29のスレオニンがグリシンに置換され、かつ配列番号:78のカルボキシ末端延長部を有するクラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:78のカルボキシ末端延長部を含むように改変された天然のグルカゴンよりGLP-1受容体で4倍強力である。GLP-1受容体における効能はさらに、18位の天然のアルギニンのアラニン置換によって強化できる。

【 0 1 9 3 】

したがって、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:117 (KRNRRNNIA) 又は配列番号:118のカルボキシ末端延長部を有することができる。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:81又は配列番号:108を含むクラス3グルカゴン関連ペプチドはさらに、当該グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29に連結される配列番号:117 (KRNRRNNIA) 又は配列番号:118のアミノ酸配列を含む。より具体的には、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103から成る群から選択される配列を含み、さらに当該グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29に連結される配列番号:117 (KRNRRNNIA) 又は配列番号:118のアミノ酸配列を含む。より具体的には、グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105、配列番号:106、配列番号:109、配列番号:110、配列番号:111、配列番号:112、配列番号:72及び配列番号:120から成る群から選択される配列を含み、さらに当該クラス3グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29に連結される配列番号:78 (GPSSGAPPPS) 又は配列番号:79のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:121の配列を含む。

【 0 1 9 4 】

グルカゴン受容体活性が増加又は減少しかつGLP-1受容体活性が増加するクラス3グルカゴン関連ペプチドに関して上記に記載した改変のいずれも個々に又は組み合わせて適用することができる。例示的改変には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：

(A) 溶解性の改善、例えば1つ、2つ又は3つ以上の荷電アミノ酸を天然のグルカゴンのC-末端部分（好ましくはC-末端位から27位）への導入による。そのような荷電アミノ酸は、天然のアミノ酸を荷電アミノ酸により（例えば28又は29位で）置換することによって、また別には例えば27、28又は29位の後ろに荷電アミノ酸を付加することによって導入できる。例示的実施態様では、荷電アミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが陰性荷電である。他の実施態様では、荷電アミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが陽性荷電である。そのような改変は溶解性を増加させ、例えば、25で24時間後に測定したとき、約5.5から8の間の与えられたpH（例えばpH 7）で天然のグルカゴンと対比して少なくとも2倍、5倍、10倍、15倍、25倍又は30倍以上の溶解性を提供する；

(B) 溶解性及び作用の持続時間又は循環中の半減期の増加、親水性部分（例えば本明細書に記載のポリエチレングリコール）の例えば当該ペプチドの16、17、20、21、24若しくは29位に又はC-末端アミノ酸に付加することによる；

(C) 15位のアスパラギン酸の改変による溶解性の増加、例えば欠失又はグルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸又はホモシステイン酸による置換による。そのような改変は、5.5から8の範囲内のpHでの分解又は切断を特に酸性又はアルカリ性緩衝液中で減少させ、例えば25で24時間後に本来のペプチドの少なくとも75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%を維持する；

(D) 27位のメチオニンの改変による安定性の増加、例えばロイシン又はノルロイシンによる置換による。そのような改変は酸化的分解を減少させることができる。安定性はまた、20又は24位のGlnの改変（例えばSer、Thr、Ala又はAIBによる置換）によって高めることができる。そのような改変は、Glnの脱アミド化を介して生じる分解を減少させることができる。安定性は、21位のAspの改変（例えばGluによる置換）によって高めることができる。そのような改変は、Aspが脱水されて環状スクシンイミド中間体を形成しその後に

10

20

30

40

50

続くイソアスパルテートへの異性化を介して生じる分解を減少させる；

(E) 1又は2位のアミノ酸の本明細書に記載のDPP-IV耐性アミノ酸による改変によるジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) に対する耐性の増加 (2位のアミノ酸のN-メチル-アラニンによる改変が含まれる)；

(F) 活性に影響を及ぼさない保存的若しくは非保存的置換、付加又は欠失、例えば2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位の1つ以上の保存的置換；27、28又は29位の1つ以上の欠失；又は場合によってC-末端カルボン酸基の代わりにC-末端アミド又はエステルと一体化されるアミノ酸29の欠失が含まれる。

(G) 本明細書に記載するC-末端延長部の付加；

(H) 循環中の半減期の増加及び／又は作用時間の延長及び／又は作用開始の先送り、例 10 えば本明細書に記載するグルカゴン関連ペプチドのアシル化又はアルキル化による；

(I) 本明細書に記載するホモダイマー化又はヘテロダイマー化。

他の改変には以下が含まれる：大きな芳香族アミノ酸（例えばTyr、Phe、Trp又はアミノ-Phe）による1位のHisの置換；Alaによる2位のSerの置換；Val又はPheによる10位のTyrの置換；Argによる12位のLysの置換；Gluによる15位のAspの置換；Thr又はAIBによる16位のSerの置換。

GLP-1活性を有するクラス3グルカゴン関連ペプチド（大きな芳香族アミノ酸（例えばTyr）による1位のHisの非保存的置換を含む）は、アルファヘリックスが分子内橋（例えば本明細書に記載した分子内橋のいずれか）を介して安定化されることを条件としてGLP-1活性を維持することができる。 20

【0195】

複合物及び融合物

クラス3グルカゴン関連ペプチドは複合物部分と、場合によって共有結合を介して、場合によってリンカーを介して連結できる。クラス3グルカゴン関連ペプチドはまた融合ペプチド又はタンパク質の部分でもよく、ここで第二のペプチド又はポリペプチドは末端（例えばクラス3グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端）に融合されてある。より具体的には、融合クラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:72、配列番号:97又は配列番号:98のグルカゴンアゴニストを含むことができ、前記はさらに当該グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29に連結された配列番号:78 (GPSSGAPPPS)、配列番号:117 (KRNRRNNIA) 又は配列番号:118 (KRNRR) を含む。いくつかの実施態様では、配列番号:78 (GPSSGAPPPS)、配列番号:117 (KRNRRNNIA) 又は配列番号:118 (KRNRR) のアミノ酸配列は、当該クラス3グルカゴン関連ペプチドのアミノ酸29にペプチド結合を介して結合される。出願人らは、エクスペンジン-4のC-末端延長ペプチド（例えば配列番号:78又は配列番号:79）、29位の天然のスレオニン残基のグリシンによる置換を含むクラス3グルカゴン関連ペプチド融合ペプチドは、GLP-1受容体活性を劇的に増加させることを発見した。このアミノ酸置換をクラス3グルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に開示した他の改変と一緒に用いて、GLP-1受容体に対するグルカゴンアナローグの親和性を強化できる。例えば、T29G置換を、S16E及びN20Kアミノ酸置換、場合によってアミノ酸16と20間のラクタム架橋、及び場合によって本明細書に記載のPEG鎖の付加と組み合わせることができる。 30

【0196】

いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:121の配列を含む。いくつかの実施態様では、グルカゴン融合ペプチドのクラス3グルカゴン関連ペプチド部分は、配列番号:72、配列番号:90、配列番号:91、配列番号:92及び配列番号:93から成る群から選択され、ここでPEG鎖は、それが17、21、24位又はC-末端アミノ酸又は21及び24位の双方に存在するときは、500から40,000ダルトンの範囲から選択される。より具体的には、いくつかの実施態様で、クラス3グルカゴン関連ペプチドセグメントは配列番号:95、配列番号:96及び配列番号:122から成る群から選択され、ここでPEG鎖は500から5,000の範囲から選択される。いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:72及び配列番号:80の配列を含む融合ペプチドであり、ここで配列番号:80のペプチドは配列番号:72のカルボキシ末端に連結される。 40 50

いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:98のクラス3グルカゴン関連ペプチドの化学的改変の追加は、GLP-1受容体における効能を増加させ、ここでグルカゴン受容体及びGLP-1受容体における相対的活性は実質的に同等である。したがって、いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、天然のアミノ酸に存在するカルボン酸基の代わりにアミド基を含む末端アミノ酸を含む。それぞれグルカゴン及びGLP-1受容体におけるクラス3グルカゴン関連ペプチドの相対的活性を、当該クラス3グルカゴン関連ペプチドに対するさらに別の改変によって調整して、天然のグルカゴンのグルカゴン受容体における活性の約40%から約500%以上、及び天然のGLP-1のGLP-1受容体における活性の約20%から約200%、例えばGLP-1受容体におけるグルカゴンの通常の活性と対比して50倍又は100倍以上を示すアナローグを製造することができる。

10

【0197】

例示的実施態様

いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:72の配列を含むグルカゴンアナローグが提供され、ここで、前記アナローグは、1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28及び29位から選択される1つから3つのアミノ酸により配列番号:72と異なり、前記グルカゴン関連ペプチドはGLP-1受容体における天然のGLP-1の活性の少なくとも20%を示す。

いくつかの実施態様にしたがえば、以下の配列を含むグルカゴン/GLP1受容体コアゴニストが提供される：

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (配列番号:81)、式中、15位のXaaはAsp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成るアミノ酸群から選択され、16位のXaaはSer、Glu、Gln、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成るアミノ酸群から選択され、20位のXaaはGln又はLysであり、24位のXaaはGln又はGluであり、28位のXaaはAsn、Lys又は酸性アミノ酸であり、29位のXaaはThr、Gly又は酸性アミノ酸であり、RはCOOH又はCONH₂であるが、ただし16位がセリンであるとき20位はLysであるか、或いは16位がセリンであるとき24位はGluであり、かつ20位又は28位はLysであることを条件とする。いくつかの実施態様では、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストは配列番号:81の配列を含み、ここで、28位のアミノ酸はアスパラギン酸であり、29位のアミノ酸はグルタミン酸である。別の実施態様では、28位のアミノ酸は天然のアスパラギンであり、29位のアミノ酸はグリシンであり、配列番号:79又は配列番号:80のアミノ酸配列は、配列番号:81のカルボキシ末端に共有結合により連結される。

20

【0198】

いくつかの実施態様では、配列番号:81の配列を含むコアゴニストが提供され、前記では追加の酸性アミノ酸が当該ペプチドのカルボキシ末端に付加される。さらに別の実施態様では、グルカゴンアナローグのカルボキシ末端アミノ酸は、自然のアミノ酸のカルボン酸基の代わりにアミドを有する。いくつかの実施態様では、グルカゴンアナローグは、配列番号:85、配列番号:86、配列番号:87及び配列番号:88から成る群から選択される配列を含む。

30

いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:81のグルカゴン関連ペプチドが提供され、ここで、前記アナローグは、1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21及び27位から選択される1つから3つのアミノ酸により配列番号:81と異なるが、ただし16位のアミノ酸がセリンであるときは、20位はリジンであるか、又はラクタム架橋は24位と20位又は28位のアミノ酸との間で形成されることを条件とする。いくつかの実施態様にしたがえば、当該アナローグは、1、2、3、21及び27位から選択される1つから3つのアミノ酸により配列番号:81と異なる。いくつかの実施態様では、配列番号:81のグルカゴンペプチドは1つから2つのアミノ酸により当該配列と異なるか、又はいくつかの実施態様では、1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21及び27位から選択されるただ1つのアミノ酸により当該配列と異なるが、ただし16位のアミノ酸がセリンであるとき、20位はリジンであるか、又はラクタム架橋は24位のアミノ酸と20位又は28位のアミノ酸との間で形成される

40

50

ことを条件とする。

【0199】

別の実施態様にしたがえば、以下の配列を含む、相対的に選択性を有するGLP-1受容体アゴニストが提供される：

NH₂-His-Ser-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (配列番号:83)、式中、3位のXaaはGlu、0rn又はNleから成るアミノ酸群から選択され、15位のXaaはAsp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成るアミノ酸群から選択され、16位のXaaはSer、Glu、Gln、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成るアミノ酸群から選択され、20位のXaaはGln又はLysであり、24位のXaaはGln又はGluであり、28位のXaaはAsn、Lys又は酸性アミノ酸であり、29位のXaaはThr、Gly又は酸性アミノ酸であり、RはCOOH、CONH₂、配列番号:78又は配列番号:79であるが、ただし16位がセリンであるとき20位はLysであるか、或いは16位がセリンであるとき24位はGluであり、かつ20位又は28位はLysであることを条件とする。いくつかの実施態様では、3位のアミノ酸はグルタミン酸である。いくつかの実施態様では、28及び/又は29位での置換に用いられる酸性アミノ酸はアスパラギン酸又はグルタミン酸である。

いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチド（コアゴニストペプチドを含む）は配列番号:81の配列を含み、前記はさらに当該ペプチドのカルボキシ末端に付加される追加の酸性アミノ酸を含む。さらに別の実施態様では、グルカゴンアナローグのカルボキシ末端アミノ酸は、自然のアミノ酸のカルボン酸基の代わりにアミドを有する。

【0200】

いくつかの実施態様にしたがえば、以下から成る群から選択される改変グルカゴン関連ペプチドを含むグルカゴン/GLP1受容体コアゴニストが提供される：

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (配列番号:82)、式中、15位のXaaはAsp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成るアミノ酸群から選択され、16位のXaaはSer、Glu、Gln、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成るアミノ酸群から選択され、20位のXaaはGln又はLysであり、24位のXaaはGln又はGluであり、28位のXaaはAsn、Asp又はLysであり、RはCOOH、CONH₂であり、29位のXaaはThr又はGlyであり、RはCOOH、CONH₂、配列番号:78又は配列番号:79であるが、ただし16位がセリンであるとき20位はLysであるか、或いは16位がセリンであるとき24位はGluであり、かつ20位又は28位はLysであることを条件とする。いくつかの実施態様では、RはCONH₂であり、15位のXaaはAspであり、16位のXaaは、Glu、Gln、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸から成るアミノ酸群から選択され、20及び24位のXaaは各々Glnであり、28位のXaaはAsn又はAspであり、29位のXaaはThrである。いくつかの実施態様では、15及び16位のXaaは各々Gluであり、20及び24位のXaaは各々Glnであり、28位のXaaはAsn又はAspであり、29位のXaaはThrであり、RはCONH₂である。

【0201】

天然のグルカゴンペプチドの一定の位置は、親ペプチドの少なくともある程度の活性を維持しつつ改変され得ることが報告されている。したがって、出願人らは、配列番号:99のペプチドの2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位に配置されるアミノ酸の1つ以上を、天然のグルカゴンペプチドに存在するアミノ酸と異なるもので置換し、グルカゴン受容体でなお活性を維持できることを期待する。いくつかの実施態様では、天然のペプチドの27位に存在するメチオニン残基をロイシン又はノルロイシンに変更してペプチドの酸化的分解を妨げる。別の実施態様では、20位のアミノ酸はLys、Arg、Orn又はシトルリンで置換され、及び/又は21位はGlu、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸で置換される。

いくつかの実施態様では、配列番号:108のグルカゴンアナローグが提供され、当該アナローグの1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、27、28又は29位から選択される1つから6つのアミノ酸は配列番号:701の対応するアミノ酸と異なるが、ただし16位のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸がセリンのとき20位はLysであるか、或いは16位がセリンのとき24位はGluであり、かつ20位又は28位はLysである。別の実施態様にしたがえば、配列番号:108のグルカゴンアナローグが提供され、当該アナローグの1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20、21、27、28又は29位から選択される1つから3つのアミノ酸は配列番号:701の対応するアミノ酸と異なる。別の実施態様では、配列番号:96、配列番号:97又は配列番号:99のグルカゴンアナローグが提供され、当該アナローグの1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20又は21位から選択される1つから2つのアミノ酸は配列番号:701の対応するアミノ酸と異なり、さらに別の実施態様では、当該1つから2つの異なるアミノ酸は、天然のグルカゴン配列（配列番号:701）に存在するアミノ酸と対比して保存的アミノ酸置換を表す。いくつかの実施態様では、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102又は配列番号:103のグルカゴンペプチドが提供され、ここで、当該グルカゴンペプチドはさらに2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20、21、27又は29位から選択される位置に1つ、2つ又は3つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施態様では、2、5、7、10、11、13、14、16、17、18、19、20、21、27又は29位の置換は保存的アミノ酸置換である。

【0202】

いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:81の配列の変種を含むグルカゴン/GLP1受容体コアゴニストが提供され、ここで、変種のそれぞれ16、17、18、20、21、23、24、27、28及び29位から選択される1から10のアミノ酸は、配列番号:701の対応するアミノ酸と異なる。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:81の配列の変種が提供され、ここで、当該変種は、Gln17、Ala18、Glu21、Ile23、Ala24、Val27及びGly29から成る群から選択される1つ以上のアミノ酸置換によって配列番号:81と異なる。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:81の配列の変種を含むグルカゴン/GLP1受容体コアゴニストが提供され、ここで、当該変種の17 - 26位から選択される1つから2つのアミノ酸は、配列番号:701の対応するアミノ酸と異なる。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:81の配列の変種が提供され、ここで、当該変種は、Gln17、Ala18、Glu21、Ile23及びAla24から成る群から選択されるアミノ酸置換によって配列番号:81と異なる。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:81の配列の変種が提供され、ここで、当該変種は18位のアミノ酸置換によって配列番号:81と異なり、置換に用いられるアミノ酸はAla、Ser、Thr及びGlyから成る群から選択される。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:81の配列の変種が提供され、ここで、当該変種は18位のAlaによるアミノ酸置換によって配列番号:81と異なる。そのような変種は配列番号:72に包含される。別の実施態様では、配列番号:81の配列の変種を含むグルカゴン/GLP1受容体コアゴニストが提供され、ここで、当該変種の17 - 22位から選択される1つから2つのアミノ酸は配列番号:701の対応するアミノ酸と異なり、さらに別の実施態様では、配列番号:81の変種が提供され、ここで、当該変種は20及び21位の1つ又は2つのアミノ酸置換によって配列番号:81と異なる。

【0203】

いくつかの実施態様にしたがえば、以下の配列を含むグルカゴン/GLP1受容体コアゴニストが提供される：

NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R（配列番号:123）、式中、15位のXaaはAsp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸であり、16位のXaaはSer、Glu、Gln、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸であり、20位のXaaはGln、Lys、Arg、Orn又はシトルリンであり、21位のXaaはAsp、Glu、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸であり、24位のXaaはGln又はGluであり、28位のXaaはAsn、Lys又は酸性アミノ酸であり、29位のXaaはThr又は酸性アミノ酸であり、RはCOOH、CONH₂である。いくつかの実施態様では、RはCONH₂である。いくつかの実施態様にしたがえば、配列番号:99、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:114、配列番号:115又は配列番号:116の変種を含むグルカゴン/GLP1受容体コアゴニストが提供され、ここで、当該変種は、20位のアミノ酸置換によって前記配列と異なる。いくつかの実施態様では、当該アミノ酸置換は20位のためにLys、Arg、Orn又はシトルリンから成る群から選択される。

【0204】

いくつかの実施態様では、配列番号:82のアナローグペプチドを含むグルカゴンアゴニストが提供され、ここで当該アナローグは、2位にセリン以外のアミノ酸を有することによって配列番号:82と異なる。いくつかの実施態様では、セリン残基はアミノイソ酪酸、D-アラニンにより置換され、いくつかの実施態様では、セリン残基はアミノイソ酪酸により置換される。そのような改変は、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断を抑制するが、親化合物の固有の効能は維持する（例えば親化合物の効能の少なくとも75、80、85、90又は95%以上）。いくつかの実施態様では、アナローグの溶解性は、例えば天然のグルカゴンのC-末端（好ましくはC-末端位から27位）に1つ、2つ又は3つ以上の荷電アミノ酸を導入することによって高められる。例示的実施態様では、荷電アミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが陰性荷電である。別の実施態様では、アナローグはさらに、28若しくは29位の天然のアミノ酸を置換する酸性アミノ酸又は配列番号:82のペプチドのカルボキシ末端に付加される酸性アミノ酸を含む。

【0205】

いくつかの実施態様では、本明細書に開示するグルカゴンアナローグをさらに1又は2位で改変し、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対する感受性を減少させる。いくつかの実施態様では、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102又は配列番号:103のアナローグが提供され、ここで、当該アナローグは、2位の置換によって親分子と異なり、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対する感受性の減少（すなわち耐性）を示す。より具体的には、いくつかの実施態様で、当該アナローグペプチドの2位は、D-セリン、D-アラニン、バリン、アミノn-酪酸、グリシン、N-メチルセリン及びアミノイソ酪酸から成る群から選択されるアミノ酸により置換される。いくつかの実施態様では、アナローグペプチドの2位は、D-セリン、D-アラニン、グリシン、N-メチルセリン及びアミノイソ酪酸から成る群から選択されるアミノ酸により置換される。別の実施態様では、アナローグペプチドの2位は、D-セリン、グリシン、N-メチルセリン及びアミノイソ酪酸から成る群から選択されるアミノ酸により置換される。いくつかの実施態様では、2位のアミノ酸はD-セリンではない。いくつかの実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:127又は配列番号:128の配列を含む。

【0206】

いくつかの実施態様では、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102又は配列番号:103のグルカゴンアナローグが提供され、ここで、当該アナローグは1位の置換によって親分子と異なり、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対する感受性の減少（すなわち耐性）を示す。より具体的には、アナローグペプチドの1位は、D-ヒスチジン、-, -ジメチルイミダゾール酢酸 (DMIA)、N-メチルヒスチジン、-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスマミノヒスチジン、ヒドロキシリ-ヒスチジン、アセチル-ヒスチジン及びホモ-ヒスチジンから成る群から選択されるアミノ酸で置換される。別の実施態様では、配列番号:82のアナローグペプチドを含むグルカゴンアゴニストが提供され、ここで、当該アナローグは1位にヒスチジン以外のアミノ酸を有することによって配列番号:82と異なる。いくつかの実施態様では、アナローグの溶解性は、例えば天然のグルカゴンのC-末端部分（好ましくはC-末端位から27位）に1つ、2つ、又は3つ以上の荷電アミノ酸を導入することによって高められる。例示的実施態様では、荷電アミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが陰性荷電である。別の実施態様では、アナローグはさらに、28若しくは29位の天然のアミノ酸を置換する酸性アミノ酸又は配列番号:82のペプチドのカルボキシ末端に付加される酸性アミノ酸を含む。いくつかの実施態様では、酸性アミノ酸はアスパラギン酸又はグルタミン酸である。

いくつかの実施態様では、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストは配列番号:108の配列を含み、前記はさらに、追加の一アミノ酸又は配列番号:78、配列番号:117及び配列番号:118から成る群から選択されるペプチドのカルボキシ末端延長部を含む。一アミノ酸が配列番号:108のカルボキシ末端に付加される実施態様では、典型的には、アミノ酸は20の通常アミノ酸の1つから選択され、いくつかの実施態様では、追加されるカルボキシ末端ア

10

20

30

40

50

ミノ酸は天然のアミノ酸のカルボン酸の代わりにアミド基を有する。いくつかの実施態様では、追加のアミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸及びグリシンから成る群から選択される。

【0207】

また別の実施態様では、グルタミン酸残基及びリジン残基の側鎖間に形成される少なくとも1つのラクタム環を含む、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストが提供され、ここでグルタミン酸残基及びリジン残基は3つのアミノ酸によって分離される。いくつかの実施態様では、ラクタム保持グルカゴンペプチドのカルボキシ末端アミノ酸は、天然のアミノ酸のカルボン酸の代わりにアミド基を有する。より具体的には、いくつかの実施態様で、以下から成る群から選択される改変グルカゴンペプチドを含むグルカゴンGLP-1コアゴニストが提供される：

NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (配列番号:66) ;

NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (配列番号:109) ;

NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (配列番号:111) ;

NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Xaa-R (配列番号:112) ;

NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-R (配列番号:104) ;

NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (配列番号:105) ;

NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (配列番号:106) ,

式中、28位のXaaはAsp又はAsnであり、29位のXaaはThr又はGlyであり、RはCOOH、CONH₂、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシン、配列番号:78、配列番号:117及び配列番号:118から成る群から選択され、さらにラクタム架橋は、配列番号:109については12位のLysと16位のGluの間で、配列番号:110については16位のGluと20位のLysの間で、配列番号:111については20位のLysと24位のGluの間で、配列番号:112については24位のGluと28位のLysの間で、配列番号:104については12位のLysと16位のGluの間及び20位のLysと24位のGluの間で、配列番号:105については12位のLysと16位のGluの間及び24位のGluと28位のLysの間で、配列番号:106については16位のGluと20位のLysの間及び24位のGluと28位のLysの間で形成される。いくつかの実施態様では、RはCOOH、CONH₂、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンから成る群から選択され、28位のアミノ酸はAsnであり、29位のアミノ酸はスレオニンである。いくつかの実施態様では、RはCONH₂であり、28位のアミノ酸はAsnであり、29位のアミノ酸はスレオニンである。別の実施態様では、Rは配列番号:78、配列番号:79及び配列番号:80から成る群から選択され、29位のアミノ酸はグリシンである。

【0208】

さらに別の実施態様では、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストは、配列番号:99、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105、及び配列番号:106から成る群から選択され、ここで、当該ペプチドはさらに、一アミノ酸又は配列番号:78、配列番号:117及び配列番号:118から成る群から選択されるペプチドのカルボキシ末端延長部を追加される。いくつかの実施態様では、末端延長部は配列番号:78、配列番号:79又は配列番号:80の配列を含み、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:72の配列を含む。いくつかの実施態様では、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストは配列番号:81を含み、ここで、16位のアミノ酸はグルタミン酸であり、20位のアミノ酸はリジンであり、28位のアミノ酸はアスパラギンであり、配列番号:78又は配列番号:79のアミノ酸配列は配列番号:81のカルボキシ末端に連結される。

—アミノ酸が配列番号:108のカルボキシ末端に付加される実施態様では、当該アミノ酸

10

20

30

40

50

は、典型的には20の通常アミノ酸の1つから選択され、いくつかの実施態様では、当該アミノ酸は天然のアミノ酸のカルボン酸の代わりにアミド基を有する。いくつかの実施態様では、追加のアミノ酸は、グルタミン酸及びアスパラギン酸及びグリシンから成る群から選択される。グルカゴンアゴニストアナローグがさらにカルボキシ末端延長部を含む実施態様では、当該延長部のカルボキシ末端アミノ酸は、いくつかの実施態様ではカルボン酸ではなくアミド基又はエステル基で終わる。

【0209】

別の実施態様では、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストは、配列NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Xaa-CONH₂（配列番号:107）を含み、式中、30位のXaaは任意のアミノ酸を表す。いくつかの実施態様では、Xaaは20の通常アミノ酸の1つから選択され、さらに、いくつかの実施態様ではアミノ酸はグルタミン酸、アスパラギン酸又はグリシンである。このペプチドの溶解性はさらに、配列番号:107の17、21、24又は30位のアミノ酸の側鎖にPEG鎖を共有結合により連結することによって改善できる。さらに別の実施態様では、当該ペプチドは、配列番号:78、配列番号:117及び配列番号:118から成る群から選択されるペプチドを追加される。いくつかの実施態様にしたがえば、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストは、配列番号:129、配列番号:130及び配列番号:131の配列を含む。

配列番号:99、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105、配列番号:106、配列番号:107及び配列番号:121のグルカゴン配列の内部に追加の位置特異的改変を実施して、種々の程度のGLP-1アゴニスト作用を有する一組のグルカゴンアゴニストを得ることができる。したがって、各受容体で実質的に同一の*in vitro*の効能を有するペプチドが調製され特徴付けられている。同様に、2つの受容体の各々で10倍選択的強化された効能を有するペプチドが調製され特徴付けられている。上記に特記したように、16位のセリン残基のグルタミン酸による置換はグルカゴン及びGLP-1受容体の双方で天然のグルカゴンの効能を強化するが、グルカゴン受容体に対してはほぼ10倍の選択性を維持する。加えて、3位の天然のグルタミンをグルタミン酸で置換することによって（配列番号:128）、GLP-1受容体に対してほぼ10倍の選択性を示すグルカゴンアナローグが生成される。

【0210】

生理学的pHの水溶液におけるグルカゴン/GLP1コアゴニストペプチドの溶解性は、当該ペプチドの16、17、21及び24位に親水基を導入することによって、又はグルカゴン/GLP1コアゴニストペプチドのカルボキシ末端にただ1つの改変アミノ酸を付加（すなわち親水基を含むように一アミノ酸を改変）することによってさらに強化され、一方、天然のグルカゴンと対比して高い生物学的活性を維持することができる。いくつかの実施態様にしたがえば、親水基はポリエチレングリコール（PEG）鎖を含む。より具体的には、いくつかの実施態様では、グルカゴンペプチドは、配列番号:98、配列番号:99、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105又は配列番号:106の配列を含み、ここで、PEG鎖は当該グルカゴンペプチドの16、17、21、24、29位のアミノ酸の側鎖に又はC-末端アミノ酸に共有結合により連結されるが、ただし当該ペプチドが配列番号:98、配列番号:99、配列番号:100又は配列番号:101を含むときポリエチレングリコール鎖は17、21又は24位のアミノ酸残基に共有結合され、当該ペプチドが配列番号:102又は配列番号:103を含むときポリエチレングリコール鎖は16、27又は21位のアミノ酸残基に共有結合され、さらに当該ペプチドが配列番号:104、配列番号:105又は配列番号:106を含むときポリエチレングリコール鎖は17又は21位のアミノ酸残基に共有結合されることを条件とする。

【0211】

いくつかの実施態様では、グルカゴンペプチドは配列番号:99、配列番号:100又は配列番号:101の配列を含み、ここで、PEG鎖は当該グルカゴンペプチドの17、21、24位のアミノ酸の側鎖に又はC-末端アミノ酸に共有結合により連結され、さらに当該ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸は、天然のアミノ酸のカルボン酸基の代わりにアミド基を有する。い

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様では、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストペプチドは、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105、配列番号:106及び配列番号:107から成る群から選択される配列を含み、ここで、PEG鎖は、当該グルカゴンペプチドの配列番号:100、配列番号:101及び配列番号:107の17、21若しくは24位、又は配列番号:102及び103の16、17若しくは21位、又は配列番号:104、配列番号:105及び配列番号:106の17若しくは21位のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結される。別の実施態様では、グルカゴン/GLP1受容体コアゴニストペプチドは配列番号:99又は配列番号:107の配列を含み、ここで、PEG鎖は当該グルカゴンペプチドの17、21若しくは24位のアミノ酸の側鎖又はC-末端アミノ酸に共有結合により連結される。

いくつかの実施態様では、配列番号:100、配列番号:101、配列番号:102、配列番号:103、配列番号:104、配列番号:105、配列番号:106及び配列番号:107から成る群から選択されるグルカゴンペプチドはさらに改変されて、当該グルカゴンペプチドの17又は21位のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結されるPEG鎖を含む。いくつかの実施態様では、PRG化グルカゴン/GLP-1受容体コアゴニストはさらに、配列番号:78、配列番号:117又は配列番号:79の配列を含む。

【0212】

別の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:72又は配列番号:120の配列を含み、前記はさらに配列番号:72又は配列番号:120のC-末端アミノ酸に連結される、配列番号:78、配列番号:79又は配列番号:80のC-末端延長部を含み、場合によってさらに当該ペプチドの17、18、21、24又は29位のアミノ酸の側鎖又はC-末端アミノ酸に共有結合により連結されるPEG鎖を含む。別の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:72又は配列番号:120の配列を含み、ここで、PEG鎖は当該グルカゴン関連ペプチドの21又は24位のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結され、当該ペプチドはさらに配列番号:78又は配列番号:79のC-末端延長部を含む。

別の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:72又は配列番号:81又は配列番号:82の配列を含み、ここで、追加のアミノ酸が配列番号:81又は配列番号:82のカルボキシ末端に付加され、さらにPEG鎖が前記付加アミノ酸の側鎖に共有結合により連結される。さらに別の実施態様では、PEG化グルカゴンアナローグはさらに配列番号:78又は配列番号:79のC-末端延長部を含み、前記延長部は配列番号:81又は配列番号:82のC-末端アミノ酸に連結される。別の実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは配列番号:107を含み、ここでPEG鎖は当該グルカゴン関連ペプチドの30位のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結され、当該ペプチドはさらに、配列番号:107のC-末端アミノ酸に連結される配列番号:78又は配列番号:79のC-末端延長部を含む。

【0213】

ポリエチレングリコール鎖は直鎖の形態でもよく、又は分枝していてもよい。いくつかの実施態様にしたがえば、ポリエチレングリコール鎖は、約500から約10,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。いくつかの実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は、約1,000から約5,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。また別の実施態様では、ポリエチレングリコール鎖は、約10,000から約20,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。いくつかの実施態様にしたがえば、PEG化グルカゴン関連ペプチドは、前記ペプチドに共有結合される2つ以上のポリエチレングリコール鎖を含み、前記では当該グルカゴン鎖の合計分子量は約1,000から約5,000ダルトンである。いくつかの実施態様では、PEG化グルカゴンアナローグから成るペプチドを含み、ここで、PEG鎖は21位及び24位のアミノ酸残基に共有結合により連結され、さらに2つのPEG鎖の合体分子量は約1,000から約5,000ダルトンである。

【0214】

ある種の例示的実施態様では、グルカゴンペプチドは、10までのアミノ酸改変を有する配列番号:701のアミノ酸配列を含み、さらにアシル化又はアルキル化される10位のアミノ酸を含む。いくつかの実施態様では、10位のアミノ酸はC4からC30の脂肪酸でアシル化又

10

20

30

40

50

はアルキル化される。ある種の特徴では、10位のアミノ酸は、非天然或いは自然に生じるアミノ酸であるアシル基又はアルキル基を含む。

ある種の実施態様では、アシル化又はアルキル化される10位のアミノ酸を含むグルカゴンペプチドは、安定化アルファヘリックスを含む。したがって、ある種の特徴では、グルカゴンペプチドは、本明細書に記載するアシル又はアルキル基、並びにi位のアミノ酸及びi+4位のアミノ酸の側鎖間の分子内橋、例えば共有結合分子内橋（例えばラクタム架橋）を含む（iは12、16、20又は24である）。また別に或いはさらに加えて、グルカゴンペプチドは本明細書に記載のアシル又はアルキル基を含み、さらに当該グルカゴンペプチドの16、20、21及び/又は24位の1つ、2つ又は3つ以上は、¹⁰ -二置換アミノ酸（例えばAIB）で置換される。いくつかの事例では、非天然のグルカゴンペプチドは16位にGlu及び20位にLysを含み、ここで、場合によってラクタム架橋はGlu及びLysを連結し、場合によって当該グルカゴンペプチドはさらに、17位のGln、18位のAla、21位のGlu、23位のIle及び24位のAlaから成る群から選択される1つ以上の改変をさらに含む。

【0215】

さらにまた、グルカゴン関連ペプチドがアシル化又はアルキル化される10位のアミノ酸を含む実施態様のいずれかでは、当該グルカゴン関連ペプチドはさらにC-末端アルファカルボキシレートの代わりにC-末端アミドを含む。

いくつかの実施態様では、本明細書に記載のアシル又はアルキル基を含むグルカゴン関連ペプチドはさらに、1位に、2位に、又は1及び2位にアミノ酸置換を含み、ここで当該アミノ酸置換はDPP-IVプロテアーゼ耐性を達成する。ある種の具体的な実施態様では、グルカゴン関連ペプチドは、10位に本明細書に記載するアシル化又はアルキル化アミノ酸を有する配列番号:72を含むペプチドである。これらの実施態様のアシル又はアルキル基は本明細書に記載する任意のアシル又はアルキル基である。例えばアシル基はC4からC30（例えばC8からC24）脂肪アシル基であり、アルキル基はC4からC30（例えばC8からC24）アルキル基であり得る。

アシル又はアルキル基が付加されるアミノ酸は本明細書に記載のアミノ酸のいずれか、例えば式I（例えばLys）、式II及び式IIIのいずれかのアミノ酸であり得る。

いくつかの実施態様では、アシル基又はアルキル基は10位のアミノ酸に直に付加される。いくつかの実施態様では、アシル又はアルキル基は、10位のアミノ酸にスペーサー（例えば長さが3から10原子のスペーサー（例えばーアミノ酸又はジペプチド））を介して付加される。アシル又はアルキル基の付加を目的とする適切なスペーサーは本明細書に記載される。

【0216】

ある種の特徴では、グルカゴンアナローグは少なくとも1つのアミノ酸改変及び15までのアミノ酸改変（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15のアミノ酸改変）又は10までのアミノ酸改変を含む。ある種の実施態様では、少なくとも1つのアミノ酸改変及び10までのアミノ酸改変を含むアナローグは保存的アミノ酸改変を表す。保存的アミノ酸改変は本明細書に記載される。

したがって、いくつかの特徴では、グルカゴンアナローグは以下の1つ以上を有する配列番号:701の配列を含む：17位にGln、18位にAla、21位にGlu、23位にIle及び24位にAla又はCys、前記の保存的アミノ酸置換。いくつかの特徴では、アナローグはC-末端アルファカルボキシレートの代わりにC-末端アミドを含む。ある種の実施態様では、アナローグは1位に、2位に又は1及び2位にアミノ酸置換を含み、前記置換はDPP-IVプロテアーゼ耐性を達成する。適切なアミノ酸置換は本明細書に記載される。例えば1位のD-Met及び/又は2位のD-Ser又はAIBである。いくつかの実施態様では、2位のアミノ酸はD-セリンではない。

【0217】

さらに加えるに或いはまた別に、アナローグは以下の1つ又は組み合わせを含む：(a) Alaで置換される2位のSer；(b) Gluで置換される3位のGln；(c) Ileで置換される7位のThr；(d) Trp又は非天然或いは自然に生じるアミノ酸のアシル若しくはアルキル基を含むア

10

20

30

40

50

ミノ酸で置換される10位のTyr；(e) Ileで置換される12位のLys；(f) Gluで置換される15位のAsp；(g) Gluで置換される16位のSer；(h) Ser、Thr、Ala、AIBで置換される20位のGln；(i) Ser、Thr、Ala、AIBで置換される24位のGln；(j) Leu又はNleで置換される27位のMet；(k) 荷電アミノ酸(場合によってAsp又はGlu)で置換される29位のAsn；(l) Gly又は荷電アミノ酸(場合によってAsp又はGlu)で置換される29位のThr。ある種の特徴では、アナローグは配列番号:657 - 669のいずれかのアミノ酸配列を含む。

GIP受容体でアゴニスト活性を示すアナローグに関して、アナローグは1 - 21アミノ酸(例えば5 - 19, 7 - 15, 9 - 12アミノ酸)の延長部を含む。アナローグの延長部は、延長部が1から21アミノ酸であることを条件として任意のアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの特徴では、延長部は7から15アミノ酸であり、他の特徴では、延長部は9から12アミノ酸である。いくつかの実施態様では、延長部は、(i)配列番号:78又は674のアミノ酸配列、(ii)配列番号:78又は674のアミノ酸配列と高い配列同一性(例えば少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%)を有するアミノ酸配列、又は(iii)1つ以上の保存的アミノ酸改変を有する(i)又は(ii)のアミノ酸配列を含む。

【0218】

いくつかの実施態様では、延長部のアミノ酸の少なくとも1つはアシル化又はアルキル化される。アシル又はアルキル基を含むアミノ酸はアナローグの延長部の任意の位置に配置され得る。ある種の実施態様では、延長部のアシル化又はアルキル化アミノ酸は、アナローグの37、38、39、40、41又は42位(配列番号:701の番号付与にしたがう)の1つに配置される。ある種の実施態様では、アシル化又はアルキル化アミノ酸はアナローグの40位に配置される。

例示的実施態様では、アシル又はアルキル基は、非天然或いは自然に生じるアミノ酸のアシル又はアルキル基である。例えば、アシル又はアルキル基はC4からC30(例えばC12からC18)脂肪アシル基又はC4からC30(例えばC12からC18)アルキル基であり得る。アシル又はアルキル基は本明細書で考察されるもののいずれかであり得る。

いくつかの実施態様では、アシル又はアルキル基は、例えばアミノ酸の側鎖を介して当該アミノ酸に直に付加される。他の実施態様では、アシル又はアルキル基は、スペーサー(例えば一アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能性スペーサー、疎水性二官能性スペーサー)を介してアミノ酸に付加される。ある種の特徴では、スペーサーは長さが3から10原子である。いくつかの実施態様では、アミノ酸スペーサーは-Gluではない。いくつかの実施態様では、ジペプチドスペーサーはGlu-Gluではない。

【0219】

さらにまた、例示的実施態様では、アシル又はアルキル基が付加されるアミノ酸は本明細書に記載するもののいずれかであり得る。前記には、例えば式I、II又はIIIのアミノ酸が含まれる。アシル化又はアルキル化されるアミノ酸は例えばLysであり得る。アシル又はアルキル基を含む適切なアミノ酸、或いは適切なアシル基及びアルキル基は本明細書に記載される。例えば、アシル化及びアルキル化と題する節の教示を参照されたい。

他の実施態様では、延長部の1 - 6アミノ酸(例えば1 - 2、1 - 3、1 - 4、1 - 5アミノ酸)は陽性荷電アミノ酸、例えば式IVのアミノ酸(例えばLys)である。本明細書で用いられるように、“陽性荷電アミノ酸”という用語は任意のアミノ酸(自然に生じるもの又は自然には生じないもの)を指し、前記アミノ酸は生理学的pHでその側鎖の原子上に陽性荷電を含む。ある種の特徴では、陽性荷電アミノ酸は37、38、39、40、41、42及び43位のいずれかに配置される。具体的な実施態様では、陽性荷電アミノ酸は40位に配置される。他の事例では、延長部は本明細書に記載するようにアシル化又はアルキル化され、本明細書に記載するように1 - 6陽性荷電アミノ酸を含む。

【0220】

さらにまた他の実施態様では、GIP受容体でアゴニスト活性を示すアナローグは、(i)少なくとも1つのアミノ酸改変を有する配列番号:701、(ii)アナローグのC-末端から29位のアミノ酸に1から21アミノ酸の延長部、及び(iii)C-末端延長部の外部に配置される(例えば1 - 29位のいずれか配置される)、非天然或いは自然に生じるアミノ酸のアシル

10

20

30

40

50

又はアルキル基を含むアミノ酸を含む。いくつかの実施態様では、アナローグは10位にアシル化又はアルキル化アミノ酸を含む。具体的な特徴では、アシル又はアルキル基はC4からC30脂肪アシル又はC4からC30アルキル基である。いくつかの実施態様では、アシル又はアルキル基は、スペーサー（例えばーアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性二官能性スペーサー、疎水性二官能性スペーサー）を介して付加される。ある種の特徴では、アナローグは、アルファヘリックスを安定化させるアミノ酸改変、例えば16位のGluと20位のLysとの間の塩橋、又は16、20、21及び24位の1つ、2つ若しくは3つ以上のいずれかにおける α 、 β -二置換アミノ酸を含む。具体的な特徴では、アナローグはさらに別にDPP-IVプロテアーゼ耐性を付与するアミノ酸改変、例えば1位のDMIA、2位のAIBを含む。更なるアミノ酸改変を含むアナローグが本明細書で意図される。ある実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは配列番号:657 - 669のいずれかの構造を含む。 10

【0221】

いくつかの実施態様にしたがえば、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、以下の改変（2位にAIB、3位にGlu、10位にLys、16位にGlu、17位にGln、18位にAla、20位にLys、21位にGlu、23位にIle、24位にAla）を含む天然のグルカゴン（配列番号:701）のアミノ酸配列を含み、ここで10位のLysはC14又はC16脂肪酸でアシル化され、C-末端カルボキシレートはアミドに取り替えられる。具体的な実施態様では、このクラス3グルカゴン関連ペプチドは、そのN-末端アミノ酸を介してジペプチド（D-Lys-サルコシン）に付加される。

いくつかの実施態様にしたがえば、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:514、517 - 534又は554のいずれかのアミノ酸配列を含むか、本質的に前記から成るか又は前記から成り、前記アミノ酸配列は、場合によって、GLP1アゴニスト及び/又はグルカゴンアゴニスト活性を保持する1、2、3、4又は5つまでのさらに別の改変を有する。ある種の実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:562 - 684及び1701 - 1776のいずれかのアミノ酸を含む。いくつかの実施態様では、クラス3グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:801 - 1908のいずれかのアミノ酸配列を含む。 20

【0222】

開示のグルカゴン関連ペプチド-インスリンペプチド複合物は、以前にインスリンペプチドについて記載されたいずれの使用にも適切であると考えられる。したがって、本明細書に記載したグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物を用いて、高血糖症又は高血中グルコースレベルから生じる他の代謝性疾患を治療できる。したがって、本発明は、本明細書記載のグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物及び医薬的に許容できる担体を含む、高血中グルコースレベルを罹患する患者の治療に使用される医薬組成物を包含する。ある実施態様にしたがえば、本明細書開示のグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物を用いて治療されるべき罹患動物は家畜化動物であり、別の実施態様では治療されるべき罹患動物は人間である。 30

本開示にしたがって高血糖症を治療するある方法は、本明細書開示のグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物を任意の標準的な投与ルートを用いて投与する工程を含む。前記ルートには非経口的（例えば静脈内、腹腔内、皮下又は筋肉内）、脊髄内、皮内、直腸的、経口的、経鼻的、又は吸入が含まれる。ある実施態様では、組成物は皮下又は筋肉内に投与される。ある実施態様では、組成物は非経口的に投与され、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は注射筒内に予め包装されている。 40

【0223】

本明細書開示のグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物は、単独で又は他の抗糖尿病薬剤と併用して投与できる。当業界で公知の又は研究中の抗糖尿病薬剤には以下が含まれる：天然のインスリン、天然のグルカゴン及びその機能的アナローグ、スルホニルウレア（例えばトルブタミド（Orinase）、アセトヘキサミド（Dymelor）、トラザミド（Tolinase）、クロルプロパミド（Diabinese）、グリビジド（Glucotrol）、グリブリド（Diabeta, Micronase, Glynase）、グリメピリド（Amaryl）、又はグリクラジド（Diamicron））；メグリチニド（例えばレパグリニド（Prandin）又はナテグリニド（Starlix））；ビグアニド（例えばメトフォルミン（Glucophage）又はフェンフォルミン）；チアゾリジン 50

ジオン（例えばロシグリタゾン（Avandia）、ピオグリタゾン（Actos）又はトログリタゾン（Rezulin））、又は他のPPAR 阻害剤；炭水化物消化を阻害するアルファアグルコシダーゼ阻害剤（例えばミグリトール（Glyset）、アカルボース（Precose/Glucobay）；エクセナチド（Byetta）又はプラムリンチド；ジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）阻害剤（例えばビルダグリブチン又はシタグリブチン；SGLT（ナトリウム依存グルコーストランスポーター-1）阻害剤；又はFBPase（フラクトース1,6-ビスフォスファターゼ）阻害剤。

【0224】

本明細書に開示するグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物を含む医薬組成物は、医薬的に許容できる標準的な担体及び当業者に公知の投与ルートを用いて患者に処方及び投与することができる。したがって、本開示はまた、本明細書開示のグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物又はその医薬的に許容できる塩の1つ以上を医薬的に許容できる担体と一緒に含む医薬組成物を包含する。ある実施態様では、医薬組成物は1mg/mL濃度のグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物を約4.0から約7.0のpHのリン酸緩衝系に含む。医薬組成物はグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物を唯一の医薬的に活性な成分として含むことができ、またグルカゴン関連ペプチド-インスリン複合ペプチドは追加される1つ以上の活性薬剤と組み合わせることができる。

全ての治療方法、医薬組成物、キット及び本明細書に記載する同様な実施態様は、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合ペプチドにはその全ての医薬的に許容できる塩が含まれることを想定する。

ある実施態様では、キットは、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物を患者に投与するための装置とともに提供される。キットはさらに多様な容器（例えばバイアル、チューブ、ピンなど）を含むことができる。好ましくは、キットはまた使用のための指示を含むであろう。ある実施態様にしたがえば、キットの装置はエーロゾルディスペンサー装置であり、前記装置では組成物はエーロゾル装置内に予め包装されている。別の実施態様では、キットは注射筒及び注射針を含み、ある実施態様では、グルカゴン関連ペプチド-インスリン複合物の組成物は注射筒内に予め包装されている。

本発明の化合物は、標準的合成方法、組換えDNA技術、又は任意の他のペプチド及び融合タンパク質調製方法によって調製できる。ある種の非天然アミノ酸は標準的な組換えDNA技術では発現できないが、それらを調製する技術は当業界で公知である。非ペプチド部分を包含する本発明の化合物は、応用可能なときは標準的なペプチド化学反応に加えて、標準的な有機化学反応によって合成できる。

【0225】

実施態様1にしたがえば、グルカゴン関連ペプチド及びインスリンペプチドを含むインスリンアゴニスト/インクレチン複合物が提供され、ここでグルカゴン関連ペプチドはインスリンに直に又はリンカーを介して連結される。実施態様2では、実施態様1の複合物は、インスリンペプチドと共有結合により連結されるグルカゴン関連ペプチドのC-末端領域を有し、前記連結は、A鎖のA9、A14及びA15、B鎖のB1、B2、B10、B22、B28若しくはB29から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖、B鎖のN-末端アルファアミン、B鎖のカルボキシ末端、及び単一鎖インスリンアナローグのA鎖及びB鎖を連結する連結部分の任意の位置のアミノ酸側鎖から別個に選択される位置を介する。実施態様3では、実施態様1又は2は、インスリンペプチドのB鎖のアミノ末端に共有結合により連結されるグルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端を有する。実施態様4では、実施態様1-3のいずれか1つの複合物は単一鎖インスリンアナローグとしてインスリンペプチドを含む。実施態様5では、実施態様1-4のいずれかの複合物は単一鎖インスリンアナローグを含み、ここでグルカゴン関連ペプチドは、単一鎖インスリンアナローグのA鎖及びB鎖を連結する連結部分のアミノ酸の側鎖に連結される。実施態様6では、実施態様1-4のいずれかの複合物は二鎖インスリンアナローグを含み、前記複合物は第一及び第二のグルカゴン関連ペプチドを含み、ここで各グルカゴン関連ペプチドは、B鎖のアミノ末端、A鎖のカルボキシ末端、及びB鎖のカルボキシ末端から成る群から選択される位置でインスリンペプチドに別個に共有結合により連結される。

10

20

30

40

50

【0226】

実施態様7では、グルカゴン関連ペプチドが以下の(i) - (v)を含む、実施態様1 - 6のいずれか1つの複合物が提供される：

(i) 1つから3つのアミノ酸改変を有する、アミノ酸配列X1-X2-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-Z(配列番号:839)、式中、

X1及び/又はX2は、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対するグルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然の(配列番号:701に対して)アミノ酸であり、

Zは、Asn-Thr-COOH及びY-COOHから成る群から選択され(式中Yは1から2アミノ酸)、さら 10
にまた、

(1) ラクタム架橋がi位のアミノ酸及びi+4位のアミノ酸の側鎖を接続するか(式中iは12、16、20又は24)、又は

(2) グルカゴン関連ペプチドの16、20、21及び24位のアミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが、-二置換アミノ酸で置換され、

かつ前記グルカゴン関連ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する、前記アミノ酸配列；

(ii) 配列番号:701のアミノ酸配列であって、

28位のAsnの荷電アミノ酸による置換、

28位のAsnのAsp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換、

28位におけるAsn、Asp又はGluによる置換、

28位におけるGluによる置換、

29位のThrの荷電アミノ酸による置換、

29位のThrのLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換、

29位におけるAsp、Glu又はLysによる置換、

29位におけるGluによる置換、

29位の後ろに1から3つの荷電アミノ酸の挿入、

29位の後ろにGlu又はLysの挿入、

29位の後ろにGly-Lys又はLys-Lysの挿入、

又は前記の組み合わせ、

及びグループA若しくはグループB又は前記の組み合わせから選択される少なくとも1つのアミノ酸改変、

から成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸改変を含むように改変され、

ここで、グループAは、16位のSerのThr又はAIBによる置換から成る群から選択されるアミノ酸改変であり、さらに

グループBは、

1位のHisのジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対する当該グルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、

2位のSerのジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対する当該グルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、

10位のTyrのPhe又はValによる置換、

12位のLysのArgによる置換、

20位のGlnのAla又はAIBによる置換、

21位のAspのGluによる置換、

24位のGlnのAla又はAIBによる置換、

27位のMetのLeu又はNleによる置換、

又は前記の組み合わせから成る群から選択されるアミノ酸改変であり、

かつ前記グルカゴン関連ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する、前記アミノ酸配 50

X_{45} は、チロシン又はフェニルアラニンであり、

R_{22} は、AYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、PGPE（配列番号:11）、グリシン-プロリン-グルタミン酸トリペプチド、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、プロリン-グルタミン酸ジペプチド、アスパラギン-グルタミンジペプチド、グルタミン、グルタミン酸及びN-末端アミンから成る群から選択され、さらに

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

【0228】

実施態様9では、実施態様1-7のいずれか1つの複合物が提供され、ここで前記A鎖は配列GIVEQCCX₈X₉ICSLYQLENYCX₂₁-R₁₃（配列番号:73）を含み、前記B鎖は配列R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅（配列番号:20）を含み、式中、

10

X_8 は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X_9 は、セリン、リジン又はアラニンであり、

X_{21} は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X_{25} は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X_{29} は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X_{33} は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X_{34} は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X_{41} は、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、

20

X_{42} は、アラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され、

X_{45} は、チロシン又はフェニルアラニンであり、

R_{22} は、FVNQ（配列番号:12）、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、アスパラ

ギン-グルタミンジペプチド、グルタミン及びN-末端アミンから成る群から選択され、

さらに R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

【0229】

実施態様10では、実施態様1-7のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、前記A鎖は配列GIVDECCX₈X₉SCDLRRLEMX₁₉CX₂₁-R₁₃（配列番号:74）を含み、前記B鎖は配列R₂₂-X₂₅LC

30

GAX₃₀LVDALYLVCGDX₄₂GFY（配列番号:75）を含み、式中、

X_8 は、フェニルアラニン又はヒスチジンであり、

X_9 は、アルギニン、オルニチン又はアラニンであり、

X_{19} は、チロシン、4-メトキシ-フェニルアラニン又は4-アミノ-フェニルアラニンであり

、

X_{21} は、アラニン又はアスパラギンであり、

X_{25} は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X_{30} は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X_{42} は、アラニン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択されて R_{13} はCOOH又はCONH₂であり、

R_{22} は、AYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、PGPE（配列番号:11）、グリシン-プロリン-グルタミン酸トリペプチド、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、プロリン-グルタミン酸ジペプチド、アスパラギン-グルタミンジペプチド、グルタミン、グルタミン酸及びN-末端アミンから成る群から選択され、さらに

40

R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

【0230】

実施態様11では、実施態様1-7のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、前記B鎖は配列R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅YT-Z₁-B₁（配列番号:142）を含み、式中、

Z_1 は、アスパルテート-リジン、リジン-プロリン及びプロリン-リジンから成る群から選択されるジペプチドであり、さらに

50

B₁は、スレオニン、アラニン又はスレオニン-アルギニン-アルギニントリペプチドから成る群から選択される。

実施態様12では、実施態様1-7のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、前記A鎖は配列GIVEQCCTS1CSLYQLENYCN-R₁₃ (配列番号:1) を含み、前記B鎖は配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (配列番号:2) を含む。

実施態様13では、実施態様1-12のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該インスリンペプチドは単一鎖インスリンであり、さらにB及びA鎖を継ぎ合わせるペプチドリンカーは、SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTP1LPQR (配列番号:52) 、SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTP1LPQK (配列番号:51) 、GAGSSSX₅₇X₅₈ (配列番号:76) 、GYGSSSX₅₇X₅₈ (配列番号:21) 及びGYGSSSX₅₇X₅₈APQT (配列番号:77) から成る群から選択され、式中、X₅₇及びX₅₈は別個にアルギニン、リジン又はオルニチンである。

実施態様14では、実施態様1-13のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該ペプチドリンカーはGYGSSSR (配列番号:18) 及びGAGSSRR (配列番号:22) から成る群から選択される。

実施態様15では、実施態様1-14のいずれか1つの複合物又は医薬的に許容できるその塩が提供され、ここで、当該グルカゴン関連ペプチドは配列番号:72又は配列番号:72のアナローグの配列を含み、前記アナローグは、1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28及び29位から選択される、1つから3つのアミノ酸改変によって配列番号:72と異なり、当該グルカゴン関連ペプチドは、12及び16、16及び20、20及び24、又は24及び28位のアミノ酸の側鎖間に分子内橋を含む。

実施態様16では、実施態様1-15のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該グルカゴン関連ペプチドは、16及び20位のアミノ酸の間に塩橋又はラクタム架橋を含む。

【0231】

実施態様17では、前記グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端に連結されてある、配列番号:78、79及び80から成る群から選択されるペプチドをさらに含む、実施態様1-16のいずれか1つの複合物が提供される。実施態様18では、当該グルカゴン関連ペプチドの3位のアミノ酸がグルタミン酸である、実施態様1-17のいずれか1つの複合物が提供される。実施態様19では、当該グルカゴン関連ペプチドの28位のアミノ酸がAsp、Asn又はLysであり、かつ当該グルカゴン関連ペプチドの29位のアミノ酸がGly又はThrである、実施態様1-18のいずれか1つの複合物が提供される。実施態様20では、当該グルカゴン関連ペプチドの16位のアミノ酸がグルタミン酸であり、当該グルカゴン関連ペプチドの20位のアミノ酸がリジンであり、さらに当該グルカゴン関連ペプチドのC-末端カルボン酸基がアミドで取り替えられ、場合によって当該グルカゴン関連ペプチドの16位のグルタミン酸及び20位のリジンの間でラクタム架橋を有する、実施態様1-19のいずれか1つの複合物が提供される。実施態様21では、当該グルカゴン関連ペプチドの1位又は2位のアミノ酸が、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による切断に対する感受性の減少を示すように改変される、実施態様1-20のいずれか1つの複合物が提供される。実施態様22では、当該グルカゴン関連ペプチドが以下から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施態様1-21のいずれか1つの複合物が提供される：

- a . 配列番号:81、
- b . 配列番号:83、
- c . 配列番号:89、
- d . 配列番号:84 - 88のいずれか1つ、
- e . 配列番号:100 - 103のいずれか1つ、
- f . 配列番号:108であって、20位のアミノ酸がアルギニン、オルニチン及びシトルリンから成る群から選択されるもの、
- g . 配列番号:98、99、109 - 112、104 - 106、及び配列番号:72のいずれか1つであって、当該ペプチドの28位のXaaがアスパラギン又はアスパラギン酸で、当該ペプチドの29位のXaaがスレオニン又はグリシンで、さらに当該ペプチドのC-末端がさらに配列番号:78、配列番号:79、COOH又はCONH₂を含むもの、及び

10

20

30

40

50

h. 配列番号:251、319及び510のいずれか1つ。

【0232】

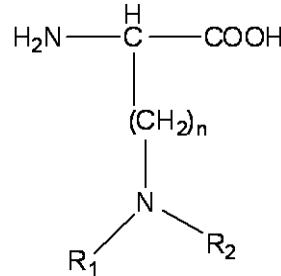
実施態様23では、当該グルカゴン関連ペプチドが、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号:701）のアナローグを含み、前記アナローグが、

(a) GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変（場合によって1位のアミノ酸はイミダゾール側鎖を欠くアミノ酸である）、

(b) 16位のSerの下記式IVのアミノ酸によるアミノ酸置換

【0233】

【化12】



10

[式IV]

【0234】

(式中、nは1から7でありR1及びR2は別個にH、C₁-C₁₈アルキル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)NH₂、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆)シクロアルキル、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及び(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択され、R₇はH又はOHであり、さらに式IVのアミノ酸の側鎖は遊離アミノ基を含み、式IVのアミノ酸は場合によってホモLys、Lys、Orn又は2,4-ジアミノ酪酸(Dab)である)、

20

(c) 当該アナローグの16、20、21及び24位のアミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全ての、-二置換アミノ酸による置換、

(d) 27、28及び29位の1つ、2つ又は全てにおけるアミノ酸改変、及び

(e) 当該グルカゴン配列（配列番号:701）に対する1-9の更なるアミノ酸改変
という上記改変の1つ以上を含み、

30

GIP受容体活性化のための当該アナローグのEC50が約10nM以下である、実施態様1-14のいずれか1つの複合物が提供される。

【0235】

実施態様24では、実施態様1-14のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該グルカゴン関連ペプチドは、(a)1位のアミノ酸は大きな芳香族アミノ酸（場合によってTyr）であること、及び(b)(i)27位のMetの大きな脂肪族アミノ酸（場合によってLeu）による置換、(ii)28位のAsnの小さな脂肪族アミノ酸（場合によってAla）による置換、若しくは(iii)29位のThrの小さな脂肪族アミノ酸（場合によってGly）による置換、又は当該アナローグは(i)、(ii)及び(iii)の組み合わせを含むという上記改変を含む。

実施態様25では、実施態様23又は24のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該グルカゴン関連ペプチドはさらにGPSSGAPPPS（配列番号:95）又はXGPSSGAPPPS（配列番号:96）のアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸配列はC-末端から29位のアミノ酸の位置で前記ペプチドに連結される。実施態様26では、実施態様1-14及び23-25のいずれか1つの複合物が提供され、ここで当該グルカゴン関連ペプチドはさらに、

40

(a) 2位のSerのD-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val又は-アミノ-N-酪酸による置換、

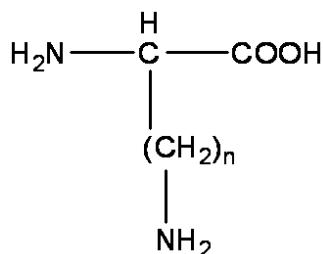
(b) 3位のGlnのGluによる置換、

(c) 10位のアミノ酸Tyrのアシル基又はアルキル基に共有結合により連結される側鎖を含むアミノ酸、場合によって下記式Iのアミノ酸による置換

【0236】

50

【化13】



【0237】

10

(式中、n=1から4)、

(d) 当該アナローグのC-末端アミノ酸として、アシル基又はアルキル基に共有結合により連結される側鎖を含むアミノ酸、場合によって式Iのアミノ酸の付加、

(e) 12位のLysのIleによる置換、

(f) 17位のArgのGlnによる置換、

(g) 18位のArgのAlaによる置換、

(h) 21位のAspのGluによる置換、

(i) 24位のGlnのAsnによる置換、及び

(j) C-末端アミノ酸のカルボン酸の中性荷電基、場合によってアミドによる取り替え、
という上記改変の1つ以上を含む。

20

【0238】

実施態様27では、実施態様1-14及び23-25のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該グルカゴン関連ペプチドは配列番号:227、228、229又は230のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、前記配列はさらにGPSSGAPPPS(配列番号:820)又はXGPSSGAPPPS(配列番号:1096)(式中Xは任意のアミノ酸)のアミノ酸配列の末端延長部をC-末端から29位アミノ酸に含む。実施態様28では、実施態様1-14又は23のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該グルカゴン関連ペプチドは、配列番号:920-964、146-164、166、192-207、209-221及び223から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。実施態様29では、実施態様1-14のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該グルカゴン関連ペプチドは配列番号:701又は改変配列番号:701の配列を含み、前記改変配列番号:701は、当該グルカゴン関連ペプチドのC-末端から27位アミノ酸の位置に1つ、2つ、又は3つ以上の荷電アミノ酸及び配列番号:701に対して7つまでの追加のアミノ酸改変を含む。実施態様30では、実施態様1-14又は23のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、C-末端から27位アミノ酸の位置に1つ、2つ、又は3つ以上の荷電アミノ酸が提供され、当該荷電アミノ酸はGlu又はAspである。

30

【0239】

実施態様31では、実施態様1-30のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該グルカゴン関連ペプチドは、HAEGTFTSDVSSYLEQAAREFIAWLVRGRG(配列番号:700)、HAEGTFTSDVSSYLEQAAKEFIAWLVKGRG(配列番号:703)、HAEGTFTSDVSSYLEQAAKEFICWLVKGR(配列番号:717)、HSQGTFTSDYSKYLDSSRRAQDFVQWLMNT(配列番号:701)又はHSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT(配列番号:699)の配列を含む。実施態様29では、実施態様1-31のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該インスリンアナローグは単一鎖インスリンアナローグであり、前記アナローグは、配列GPEX₂₅LCGAX₃₀LVDALYLVCGLDX₄₂GFYFNX₄₈X₄₉GAGSSSRRGIVDECX₈RSCDLRRLENYCN-R₁₃(配列番号:144)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTTGAGSSSRRGIVQCCTSICSLYQLENYCN-R₁₃(配列番号:143)又はGPEHLCGAHLVDALYLVCGLDRGFYFNDRGAGSSSRRGIVDECCHRSCDLRRLENYCN(配列番号:145)を含み、式中、

40

X₈は、フェニルアラニン又はヒスチジンであり、X₂₅は、ヒスチジン又はスレオニンであり、X₃₀は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸であり、

50

X_{42} は、アラニン、オルニチン又はアルギニンであり、
 X_{48} は、リジン又はアスパラギン酸であり、
 X_{49} は、プロリン、オルニチン又はアルギニンであり、さらに
 R_{13} はCOOH又はCONH₂である。

【0240】

実施態様33では、実施態様1-32のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該複合物はさらに構造U-Jを含むように改変され、式中、Uはアミノ酸又はヒドロキシ酸であり、Jは、Jのカルボキシル部分と当該複合物のアミンとの間でアミド結合を介して前記複合物に連結されるN-アルキル化アミノ酸であり、ここで、U、J又はU-Jが連結される当該複合物のアミノ酸は非コードアミノ酸であり、さらに当該複合物からU-Jが化学的に切断される半減期($t_{1/2}$)は、生理学的条件下のPBS中で少なくとも約1時間から約1週間である。

10

実施態様34では、実施態様33のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該複合物はさらに構造U-Jに共有結合により連結される親水性部分を含むか、或いはまた別に親水性部分は前記複合物のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結される親水性部分を含み、後者には、A14、A15、B0、B1、B10、B22、B28、B29又は天然のグルカゴン(配列番号:701)の16、17、20、21、24若しくは29の対応する1つ以上の位置に、又は当該グルカゴン関連ペプチドのC-末端領域に共有結合により連結される親水性部分が含まれる。これらの実施態様のいずれでも、場合によって親水性部分はポリエチレングリコールである。

実施態様35では、実施態様1-32のいずれか1つの複合物が提供され、ここで、当該複合物はさらに、アミノ酸側鎖に共有結合により連結されるアシル基又はアルキル基を含むように改変される。さらに別の実施態様では、前記アシル基又はアルキル基は、天然のグルカゴン(配列番号:701)の10位に対応するグルカゴン関連ペプチドの位置に、又はインスリンペプチドのA14、A15、B0、B1、B10、B22、B28、B29から選択される1つ以上の位置に、又は構造U-Jのアミノ酸の側鎖に共有結合により連結される。先行する実施態様のいずれか1つの複合物、又は医薬的に許容できるその塩、及び医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物もまた本開示にしたがって提供される。

20

【実施例1】

【0241】

インスリンA及びB鎖の合成

Boc化学反応を用いて、インスリンA及びB鎖を4-メチルベンゾヒドリルアミン(MBHA)樹脂又は4-ヒドロキシメチル-フェニルアセトアミドメチル(PAM)樹脂上で合成した。HF/p-クレゾール(95:5)を0で1時間用いて、樹脂からペプチドを切断した。HF除去及びエーテル沈殿に続いて、ペプチドを50%酢酸水溶液に溶解し凍結乾燥させた。また別には、ペプチドはFmoc化学反応を用いて合成した。前記ペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)/トリイソプロピルシラン(TIS)/H₂O(95:2.5:2.5)を室温で2時間用いて樹脂から切断した。ペプチドを過剰量のジエチルエーテルの添加により沈殿させ、ペレットを酸性緩衝水に溶解した。ペプチドの品質はRP-HPLCによってモニターし、質量分析(ESI又はMALDI)によって確認した。

30

インスリンA鎖は、アミノ酸7位のただ1つの遊離システインを用いて合成し、他の全てのシステインはアセトアミドメチルA-(SH)⁷(AcM)^{6,11,20}として保護した。インスリンB鎖は、7位のただ1つの遊離システインを用いて合成し、他のシステインはアセトアミドメチルB-(SH)⁷(AcM)¹⁹として保護した。粗ペプチドは通常のRP-HPLCによって精製した。

40

合成したA及びB鎖は、図1に概略した一般的な方法にしたがって、それらの天然のジスルフィド結合により互いに連結させた。それぞれのB鎖を、DMF又はDMSOへの溶解によりCy^{s7}-Npysに活性化させ、2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン)(Npys)と1:1のモル比及び室温で反応させた。前記活性化はRP-HPLCでモニターし、生成物はESI-MSで確認した。

第一のB7-A7ジスルフィド結合は、それぞれA-(SH)⁷(AcM)^{6,11,20}及びB-(Npys)⁷(AcM)¹⁹を1:1のモル比で総ペプチド濃度10mg/mLにて溶解することによって形成された。鎖の結合反応が完了したとき、混合物を50%酢酸水濃度に稀釈した。最後の2つのジスルフィド結合はヨウ素の添加により同時に形成された。40倍モル過剰のヨウ素を前記溶液に添加し

50

、この混合物を室温でさらに1時間攪拌した。アスコルビン酸水溶液を添加して反応を終了させた。混合物をRP-HPLCで精製し、最終化合物をMALDI-MSによって確認した。図2及び表1のデータが示すように、この方法にしたがって調製した合成インスリンは、インスリン受容体結合について精製インスリンと良好な類似を示す。

改変アミノ酸（例えばA19位の4-アミノフェニルアラニン）を含むインスリンペプチドもまた、非コードアミノ酸のタンパク質への取り込みを可能にする系を用いて *in vivo* で合成できる。前記系には、例えば米国特許第7,045,337号及び7,083,970号に教示された系が含まれる。

【0242】

【表1】

10

天然のインスリンと対比した合成インスリンの活性

	インスリン標準物		A7-B7インスリン	
	AVER.	STDEV	AVER.	STDEV
IC ₅₀ (nM)	0.24	0.07	0.13	0.08
インスリン活性の%	100		176.9	

20

【実施例2】

【0243】

還元アルキル化によるアミン基（N-末端及びリジン）のPEG化

a. 合成

インスリン（又はインスリンアナローグ）、mPEG20k-アルデヒド及びNaBH₃CN（モル比1:2:30）を酢酸緩衝液（pH4.1-4.4）に溶解した。反応溶液は、0.1NのNaCl、0.2N酢酸及び0.1NのNa₂CO₃を含んでいた。インスリンペプチド濃度は約0.5mg/mLであった。反応は室温で6時間にわたって生じた。反応の程度はRP-HPLCでモニターし、反応収量は約50%であった。

30

b. 精製

反応混合物を0.1%のTFAで2-5倍に稀釀し、調製用RP-HPLCカラムに適用した。HPLC条件：C4カラム、流速は10mL/分、A緩衝液は水に10%ACN及び0.1%TFA、B緩衝液はACNに0.1%TFA、直線状グラジエントB%は0-40%（0-80分）。PEG-インスリン又はアナローグは約35%緩衝液Bで溶出させた。所望の化合物はMALDI-TOEとその後のスルフトリシス又はトリプシン分解による化学的改変によって立証した。

30

N-ヒドロキシスクシンイミドアシル化によるアミン基（N-末端及びリジン）のPEG化

a. 合成

インスリン（又はインスリンアナローグ）をmPEG20k-NHSとともに0.1Nのビシン緩衝液（pH8.0）に1:1のモル比で溶解した。インスリンペプチド濃度は約0.5mg/mLであった。反応の進行はHPLCでモニターした。反応収量は室温で2時間後に約90%であった。

40

b. 精製

反応混合物を2-5倍に稀釀し、RP-HPLCにロードした。HPLC条件：C4カラム、流速は10mL/分、A緩衝液は水に10%ACN及び0.1%TFA、B緩衝液はACNに0.1%TFA、直線状グラジエントB%は0-40%（0-80分）。PEG-インスリン又はアナローグは約35%Bで収集した。所望の化合物はMALDI-TOEとその後のスルフトリシス又はトリプシン分解による化学的改変によって立証した。

フェニルアラニンの芳香環のアセチル基の還元的アミノ化PEG化

50

a. 合成

インスリン（又はインスリンアナローグ）、mPEG20k-ヒドラジド及びNaBH₃CN（モル比1:2:20）を酢酸緩衝液（pH4.1-4.4）に溶解した。反応溶液は、0.1NのNaCl、0.2N酢酸及び0.1NのNa₂CO₃を含んでいた。室温、24時間のインスリン又はインスリンアナローグの濃度は約0.5mg/mLであった。反応の進行はHPLCでモニターした。反応の変換は約50%であった（HPLCによって計算）。

b. 精製

反応混合物を2-5倍に稀釀し、RP-HPLCにロードした。HPLC条件：C4カラム、流速は10mL/分、A緩衝液は水に10%ACN及び0.1%TFA、B緩衝液はACNに0.1%TFA、直線状グラジエントB%は0-40%（0-80分）。PEG-インスリン又はPEG-インスリンアナローグは約35%Bで10収集した。所望の化合物はMALDI-TOEとその後のスルフトリシス又はトリプシン分解による化学的改変によって立証した。

【実施例3】

【0244】

インスリン受容体結合アッセイ：

各ペプチドのインスリン又はIGF-1受容体に対する親和性を、シンチレーションプロクシミティ技術を利用する競合結合アッセイで測定した。ペプチドの連続3倍希釀をトリス-Cl緩衝液（0.05Mトリス-HCl（pH7.5）、0.15M NaCl、0.1%w/vウシ血清アルブミン）で作成し、96ウェルプレート（Corning Inc., Acton, MA）にて0.05nMの(3-[125I]-ヨードチロシル)A TyrA14インスリン又は(3-[125I]-iodotyrosyl)IGF-1（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）と混合した。ヒトイインスリン又はIGF-1受容体を過剰発現する細胞から調製した形質膜フラグメントの1-6マイクログラムのアリコットが各ウェルに存在し、ポリエチレンイミン処置コムギ胚芽アグルチニンA型シンチレーションプロクシミティアッセイビーズ（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）を0.25mg/ウェルで添加した。800rpmで5分振盪させた後で、プレートを室温で12時間インキュベートし、放射能をMicroBeta 1450液体シンチレーションカウンター（Perkin-Elmer, Wellesley, MA）で測定した。非特異的結合（NSB）の放射能を、テストサンプルの最高濃度の4倍濃度過剰の“コールド”の天然のリガンドを有するウェルで測定した。全結合放射能は競合物を含まないウェルで検出した。特異的結合パーセントを以下のように計算した：特異的結合パーセント＝（結合NSB / 全結合NSB）×100。IC₅₀値はオリジンソフトウェア（Origin software, Origin Lab, Northampton, MA）を用いて決定した。

【実施例4】

【0245】

インスリン受容体リン酸化アッセイ：

インスリン又はインクレチン-インスリン複合物の受容体リン酸化を測定するために、受容体をトランスフェクトしたHEK293細胞を96ウェルの組織培養プレート（Costar #3596, Cambridge, MA）にプレートし、ダルベッコ改変イーグル培養液（DMEM（Dulbecco's modified Eagle medium））で5%CO₂及び90%湿度下にて16-20時間37°で培養した。前記培養液は100IU/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、10mM HEPES及び0.25%のウシ増殖血清（HyClone SH30541, Logan, UT）が補充されてあった。インスリン又はインスリンアナローグの連続希釀を、0.5%ウシ血清アルブミン（Roche Applied Science #100350, Indianapolis, IN）補充DMEMで調製し、接着細胞を含むウェルに添加した。5%CO₂を含む湿潤雰囲気にて37°で15分インキュベートした後、細胞を5%パラホルムアルデヒドで20分間室温にて固定し、リン酸緩衝食塩水（pH7.4）で2回洗浄し、さらにPBS中の2%ウシ血清アルブミンで1時間ブロックした。続いて前記プレートを3回洗浄し、製造業者の推奨にしたがって2%ウシ血清アルブミン含有PBSで再構成したセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗ホスホチロシン抗体（Upstate biotechnology #16-105, Temecula, CA）を充填した。室温で3時間インキュベートした後、前記プレートを4回洗浄し、0.1mLのTMBシングルソリューション基質（single solution substrate, Invitrogen, #00-2023, Carlsbad, CA）を各ウェルに添加した。発色は5分後に1NのHCl（0.05mL）を添加して停止

10

20

30

40

50

させた。450nmでの吸収をタイターテックマルチスキャンMCC340 (Titertek Multiscan, ThermoFisher, Pittsburgh, PA) で測定した。吸収対ペプチド濃度用量応答曲線を作図し、EC₅₀値をオリジンソフトウェア (OriginLab, Northampton, MA) を用いて決定した。

【0246】

グルカゴン及びGLP-1の機能アッセイ - cAMP合成：

個々のインクレチン又はインクレチン-インスリンアナローグのcAMP誘発能力をホタルルシフェラーゼ系レポーターアッセイで測定した。受容体（グルカゴン受容体、GLP-1受容体又はGIP受容体）及びcAMP応答エレメント連結ルシフェラーゼ遺伝子を共トランスクレクトしたHEK293細胞を、0.25%ウシ増殖血清 (Hyclone, Logan, UT) 補充DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) で16時間培養することによって血清を枯渇させ、続いてグルカゴン、GLP-1、GIP又は新規なグルカゴンアナローグの連続希釈物と一緒に96ウェルのポリD-リジン被覆“バイオコート”プレート (BD Biosciences, San Jose, CA) で37°C、5%CO₂下で5時間インキュベートした。インキュベーション終了時に、100マイクロリットルのLucLiteルミネセンス基質試薬 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) を各ウェルに添加し、光の産出をMicroBeta-1450液体シンチレーションカウンター (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) で測定した。オリジンソフト (Origin Lab, Northampton, MA) を用いて、有効50%濃度を計算した。

【実施例5】

【0247】

インスリン様成長因子 (IGF) アナローグIGF1(Y^{B16}L^{B17})

出願人らは、インスリン受容体で天然のインスリンと類似の活性を示すIGFアナローグを見出した。より具体的には、IGFアナローグ (IGF1(Y^{B16}L^{B17})) は、天然のIGF A鎖 (配列番号: 5) 及び改変B鎖 (配列番号: 6) を含み、前記では、天然のIGF B鎖 (配列番号: 3) の15及び16位の天然のグルタミン及びフェニルアラニンは、それぞれチロシン及びロイシン残基で入れ替えられている。図4及び下記の表2に示されるように、IGF1(Y^{B16}L^{B17}) 及び天然のインスリンの結合活性は、各々がインスリン受容体の極めて強力なアゴニストであることを示している。

【0248】

【表2】

	インスリン標準物		IGF1(Y ^{B16} L ^{B17})	
	AVER.	STDEV	AVER.	STDEV
IC ₅₀ (nM)	1.32	0.19	0.51	0.18
%インスリン活性	100		262	

【実施例6】

【0249】

また別のIGFインスリンアナローグ

IGF1(Y^{B16}L^{B17})ペプチド配列の更なる改変によって、インスリン及びIGF1受容体でそれらの効能が変化するまた別のIGFインスリンアナローグが明らかになった。これらのアナローグの各々について表3に結合データ (実施例3のアッセイを用いる) を提示する。前記表では、改変の位置は、天然のインスリンペプチドの対応する位置を基準に示される (DP I = des B26 - 30)。例えば、本明細書で、更なる説明が一切なく“B28位”と言えば、配列番号: 2の最初のアミノ酸が欠失してあるインスリンアナローグのB鎖の対応するB27位を意味するであろう。したがって、“B(Y16)”という一般的呼称は、天然のIGF-1配列 (配列番号: 3) のB鎖の15位のチロシン残基の置換を指す。インスリン及びIGFアナローグ

10

20

30

40

50

の相対的受容体結合に関するデータは表3に提供され、IGFアナローグ刺激リン酸化に関するデータ（実施例4のアッセイを用いる）は表4に提供される。

【 0 2 5 0 】

【表 3 - 1】

アナローグ		インスリン受容体						IGF-1受容体					
		nM	IC ₅₀ :	STDev	日付	%インスリン(試験)	%天然インスリン(0.6 nM)	IC ₅₀ :	STDev	日付	%IGF-1(試験)	%天然IGF-1(0.55 nM)	活性比
IGF-1 A:B		10.41	1.65	9/4/2007	5.8	5.8							
IGF-1 A:B(E10Y16L17)	0.66	0.36	5/22/2007	58.7	90.9	7.85	1.98	6/4/2007	6.8	7.0	11.9		
	0.51	0.18	5/29/2007	98.8	117.6	12.19	2.17	9/18/2007	5.0	4.5			
IGF-1 A:B(E10 Y16L17)-E31E3 2B-COOH	1.22	0.30	3/20/2008	36.5	50.0	17.50	2.25	4/4/2007	3.0	3.1	14.3		
IGF-1 A:B(D10Y16L17) DP1 A-COOH	0.26	0.02	11/9/2007	301.0	231.0	6.79	1.50	4/4/2008	7.7	8.1			
	0.2	0.02	12/4/2007	380.1	300.0								
	0.42	0.06	6/5/2008	174.1	144.1								
IGF-1 A:B (E10Y16L17) DP1	0.38	0.08	8/10/2007	51.1	157.9	22.89	5.26	9/18/2007	3.3	2.4	60.2		
IGF-1 A:B (H5D10Y16L17) DP1	0.16	0.07	11/9/2007	479.0	4.66	0.77	4/4/2008	11.2	11.8	29.1			
IGF-1 A:B (H5D10Y16L17) (S=O)DP1	0.25	0.04	11/9/2007	316.0									
IGF-1 A (H8 A9 N21): B(H5D10Y16L17) DP1 A-COOH	0.05	0.01	12/4/2007	1576.7	4.03	0.50	4/4/2008	12.9	13.6	80.6			
	0.09	0.02	12/14/2007	1667.0									
IGF-1 A (H8 A9 N21): B(H5D10Y16L17 A22) DP1 A-COOH	0.12	0.02	12/14/2007	1171.4	22.83	3.53	4/4/2008	2.3	2.4	190.3			

【表3-2】

アナローグ	インスリン受容体				IGF-1受容体				比
	nM	%インスリン	%天然インスリン	%天然インスリン	IGF-1	%天然IGF-1	(試験) (0.55 nM)	活性 (0.55 nM)	
IC ₅₀ :	STDev	日付	(試験)	IC ₅₀ :	STDev	日付	(試験)	活性 (0.55 nM)	
IGF-1 A (H8 A9 N21).B(H5D10Y16L17A22) (S=O) DPI A-COOH	0.36	0.10	12/14/2007	400.7					
IGF-1 A:IGF-1 B(1-8)-In (9-17)-IGF-1 B(18-30)	1.59	0.62	5/22/2007	19.1	37.7	131.30	58.05	6/4/2007	0.3 0.4 82.6
IGF-1 A: In (1-17)-IGF-1 B (18-30)	2.77	1.19	5/22/2007	14.0	21.7	62.50	30.28	6/4/2007	0.9 0.9 22.6
	2.67	0.67	5/18/2007	11.3	22.5				
	2.48	1.35	5/29/2007	20.1	24.2				
IGF-1 A: In B(1-5)-IGF-1 B(Y1)(6-30)	0.31	0.19	8/10/2007	62.4	193.5	27.54	6.57	9/25/2007	3.6 2 88.8
天然IGF-2						13.33	1.85	9/25/2007	7.5 4.5
IGF-2 AB									
IGF-2 AB(YL)	6.81	3.81	10/10/2007	8.4	8.8				
In A: IGF-1 B(YL)	82.62	31.75	9/4/2007	0.9	0.7				
	107.24	65.38	9/4/2007	0.7	0.6				
In A: IGF-2 D: In B: IGF-2 C	0.53	0.11	9/4/2007	141.0	113.0	1.59	0.34	9/18/2007	47.6 34.6
	0.37	0.05	10/13/2007	179.1	162.2	14.69	3.02	9/25/2007	6.8 3.7 39.7
**特段の指定がなければ全てのC末端がアミド(DPI)である。									

【0251】

【表4-1】

IGF-1 及び IGF-2 による全リソ酸化 アナローグ	インスリン受容体				IGF-1受容体				選択率
	EC50:	STDev	日付	%インスリン	EC50:	STDev	日付	% IGF	
インスリン	1.26	0.098	12/14/2007		114.88	46.66	1/23/2008		
	1.43	0.72	4/1/2008		86.02	29.35	5/20/2008		90.89
	1.12	0.11	3/31/2008						
	1.53	0.13	4/11/2008						
	2.70	0.71	4/16/2008						
	1.22	0.40	5/20/2008						
IGF-1	54.39	21.102	12/14/2007	2.3	0.87	0.16	1/23/2008	100	0.02
					0.49	0.13	5/20/2008		
					0.97	0.48	7/23/2008		
IGF-1 AB									
IGF-1 A; B(E10Y16L17)	2.57	0.59	3/31/2008	49.2	7.42	5.59	7/23/2008	13	
IGF-1 A;B(E10Y16L17)-E31E32 B-COOH	7.00	2.82	3/31/2008	18.1					
	8.52	4.34	4/16/2008	31.7					
IGF-1 AB(D10Y16L17) DPI A-COOH	0.08	0.006	12/14/2007	1575	0.78	0.17	1/23/2008	111.538	9.75
	4.38	2.98	4/16/2008	??					
IGF-1 AB (E10Y16L17) DPI									
IGF-1 AB (H5D10Y16L17) DPI									
IGF-1 AB (H5D10Y16L17) (S=O)DPI									

【表 4 - 2】

【实施例 7】

【0252】

単一鎖インスリンアナローグの合成及び精製

IGF-I C鎖を介して連結される天然のインスリンB及びA鎖を含むインスリン-IGF-Iミニ遺伝子 ($B^0-C^1-A^0$) を、酵母ピキア・パストリス (Pichia pastoris) での組換えタンパク質の構成的発現及び精製のためにGAPプロモーター (グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH)) 下に発現ベクターpGAPZ (Invitrogenより購入) でクローニングした。組換えタンパク質の培地中への分泌のために、サッカロミセス・セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae) のアルファ-接合因子リーダーシグナルをコードするN-末端ペプチドに前記ミニ遺伝子を融合させた。該ミニ遺伝子と先導-接合因子配列との間のKex2切断部位を用いて、天然のアミノ末端を有するミニ遺伝子の分泌のためのリーダー配列を切断した。一部位アラニン変異を、 $B^0C^1A^0$ ミニ遺伝子のCペプチドの1位(G1A)、2位(Y2A)、3位(G3A)、4位(S4A)、5位(S5A)、6位(S6A)、7位(R7A)、8位(R8A)、10位(P10A)、11位(Q11A)及び12位(T12A)に導入した。10

$B^0C^1A^0$ 、11のアラニン変異体及び他の選別誘導体を含むミニ遺伝子で、エレクトロポレーションによって酵母ピキア・パストリスを形質転換した。陽性の形質転換体を最少メタノールプレートで選別し、各ピキア単離株のゲノム調製を実施し、該構築物の酵母ゲノムへの組み込みをPCRにより確認した。アガロースDNAゲル上で833塩基対PCR生成物を可視化した。対応する酵母株の発酵によってインスリンアナローグを製造した。酵母細胞は500mLのベックマン (Beckman) 遠心管にて5Kで20分遠心分離してペレットにし、培地はその後のタンパク質精製のために維持した。20

増殖培地上清を0.2 μ mのミリポア (Millipore) フィルターでろ過した。該上清にアセトニトリル (ACN) を最終体積20%で添加した。20%のACN水溶液で予め平衡化したアンバーライト (Amberlite) XAD7HP樹脂 (Sigma) で前記上清を精製した。続いて前記樹脂を30mLの20%ACN水溶液で2回洗浄し、さらに0.1%のTFAを含む30%ACN水溶液で夾雑物を除去した。部分精製インスリンアナローグを0.1%TFA含有54%ACN水溶液で前記カラムから溶出し凍結乾燥した。凍結乾燥サンプルを0.025MのNH₃HCO₃ (pH8) に再懸濁し、ルナ (Luna) C18カラム (粒子サイズ10 μ m、ポアサイズ300) で精製した。ACN水溶液の20 - 60%直線状グラジェントを用いてタンパク質をカラムから溶出した。MALDI-MS陽性分画をプールし、その後の凍結乾燥のために使い捨てシンチレーションバイアルに移した。続いて凍結乾燥サンプルを0.1%TFA含有20%ACN水溶液に再懸濁し、ルナ (Luna) C18カラム (粒子サイズ10 μ m、ポアサイズ300) で精製した。ACN水溶液の18 - 54%直線状グラジェントを用いてタンパク質をカラムから溶出した。タンパク質の溶出は280nmの吸収でモニターした。MALDI-TOF MS陽性分画をC8分析用カラムで分析して純度を確認した。30

$B^0-C^1-A^0$ アナローグは、インスリン受容体アイソフォーム及びIGF-1受容体の双方で等しく有効な効能を示した。2位のチロシンのアラニンへの変異又はC9-12の欠失による8アミノ酸へのC-ペプチド短縮は、IGF-1受容体活性の有意な低下によってインスリン作用の特異性の選択的強化を提供した。表5A及び5Bに提供するデータを参照されたい。

【0253】

【表 5 A】

インスリン結合及びリン酸化分析 (B⁰C¹A⁰)

ペプチド	インスリン結合		インスリンリン酸化	
	IC ₅₀ , nM	n	EC ₅₀ , nM	n
インスリン	0.54±0.02	4	1.67±0.13	1
IGF-1	18.81±1.77	3	29.20±8.41	1
Q10 (B ⁰ C ¹ A ⁰)	2.83±0.52	2	1.93±0.43	1
G1A	1.21±0.15	1	2.4±0.24	1
Y2A	1.95±0.28	3	1.86±0.42	1
G3A	1.41±0.05	2	2.13±0.02	1
S4A	0.84±0.47	2	0.76±0.35	1
S5A	0.93±0.44	1	2.23±1.27	1
S6A	1.15±0.24	1	2.33±1.65	2
R7A	6.04±0.82	1	5.21±4.14	1
R8A	0.63±0.09	1	2.03±0.06	2
P10A	2.86±0.93	1	2.59±1.2	1
Q11A	1.79±0.47	1	2.58±0.83	1
T12A	1.2±0.18	1	2.83±1.31	1

10

20

【0 2 5 4】

【表 5 B】

IGF-1 結合及びリン酸化分析 (B⁰C¹A⁰)

ペプチド	IGF-1 結合		IGF-1 リン酸化	
	IC ₅₀ , nM	n	EC ₅₀ , nM	n
インスリン	60.63±4.43	1	48.66±1.59	1
IGF-1	0.38±0.07	1	0.88±0.41	1
010 (B ⁰ C ¹ A ⁰)	4.49±1.04	1	1.29±2.28	1
G1A	42.36±16.24	1	1.4±0.62	1
Y2A	257.9±29.59	1	35.6±14.55	1
G3A	34.02±16.09	1	7.85±0.78	1
S4A	15.30±3.10	1	1.64±1.65	1
S5A	13.06±3.01	1	2.63±1.88	1
S6A	2.44±0.79	1	1.54±0.62	2
R7	43.86±8.72	1	1.26±1.55	1
R8	10.85±1.47	1	0.50±0.23	2
P10A	6.42±0.47	1	2.79±1.12	1
Q11A	4.23±0.43	1	0.41±0.69	1
T12A	9.15±0.83	1	1.44±1.36	1

【0255】

C-ペプチドの2及び3位はIGF-1受容体における改変にもっとも感受性が高く、インスリン受容体は改変に対して比較的免疫を有することが立証された。アナローグは全て一桁のナノモル濃度の活性を維持し、ある種の特定のアナローグは効能がわずかに強化されることを立証した（低い一桁のナノモル濃度）。もっともインスリン選択性が強いアナローグは、C-ペプチドの最後の4残基が失われたもの、C-ペプチドの2位にアラニン変異を有するもの、又は前記の組み合わせであった。

【実施例 8】

【0256】

インクレチン-インスリンハイブリッドのための発現ベクターの構築

インクレチン-インスリンハイブリッドの各々の遺伝子をPCRによって合成し、続いてpET30aから改変した発現ベクターに連結した（pET30aは融合物リーダー配列として小ユビキチン様改変因子（Small Ubiquitin-like modifier, SUMO）を含む）。タバコエッチャイルス（TEV）プロテアーゼ切断部位がSUMOとインクレチン-インスリンハイブリッドとの間に配置されていた。インフュージョンHDクローニングシステム（Clontech）を連結に用いた。インクレチン-インスリンハイブリッドの発現及び精製は以下のように実施した。オリガミB（Origami B (DE3) (Novagen)）コンピテント細胞を発現ベクターで形質転換した。細胞をルリアブロス（Luria Broth, LB）（50ug/mLのアンピシリン、25ug/mLのカナマイシン及び5ug/mLのテトラサイクリンを含む）で、OD600nmが0.8 - 1.0に達するまで37℃で培養した。その時点で温度を18℃に変化させ、IPTG（0.2mM）を培養に添加して遺伝子発現を誘導した。誘導は一晩継続し、続いて5,000rpmで15分の遠心により細胞を採取した。

10

20

30

40

50

発酵細胞ペレットを25mMトリス (pH8.0) (300mM NaCl、10mMイミダゾール、6Mグアニジン塩酸塩を含む) に懸濁し、細胞を音波破碎によって溶解させた。溶解物を15,000rpmで30分遠心分離し、上清をNi-NTAアフィニティーカラムにロードした。300mM NaCl、20mMイミダゾールを含む25mMトリス (pH8.0) でカラムを洗浄した。500mMのイミダゾールとともに300mM NaClを含む25mMの同じトリス緩衝液 (pH8.0) を用いてタンパク質を溶出させた。精製タンパク質をTEVプロテアーゼで一晩4にて消化し、MilliQ水で4倍 (v/v) に希釈した。このタンパク質溶液を10%グリセロール含有20mMトリス (pH8.0) で予め平衡させたQ-セファロースカラムに適用した。15カラム容積の100 - 600mMのNaClグラジエントを用いて前記Q-セファロースカラムを溶出させた。クロマトグラフィー精製したタンパク質の純度は分析用HPLC及びMALDI-TOF質量分析によって確認した。

10

【実施例9】

【0257】

インクレチニン-インスリン融合物のin vitro活性

一連のインクレチニン-インスリン融合ペプチドを構築し、実施例4に開示したin vitroアッセイを用いてインスリン受容体及び対応するインクレチニン受容体における当該化合物の活性を測定した。図6は、単一鎖インスリンアナローグを用いて形成した一組のGLP1及びGIP融合ペプチドの配列を示す。さらに別のインクレチニン-インスリン誘導体を形成し、前記では、複合物のインスリン成分又はインクレチニン成分の配列は当該複合物の1つの成分又は2つの成分の活性を除去するために改変された。

より具体的には、GLP-1親ペプチド (GLP1-DP8；配列番号:132) がGLP-1ペプチド (GLP-1受容体でアゴニスト活性を有する) とインスリンペプチド (DP8) (インスリン受容体でアゴニスト活性を有する)との間で形成された。GLP1-DP8の誘導体が調製され、前記では、インスリン配列はA19位のチロシンをアラニンで置換することによって改変されて (GLP1-DP8A19；配列番号:133) 効果的にインスリン活性が除去されるか、或いはGLP配列は22位のフェニルアラニンをアラニンで置換することによって改変されて (GLP1-A22；配列番号:134) 効果的にGLP-1活性が除去された。同様に、グルカゴン親ペプチド (Glu-DP8；配列番号:135) が、グルカゴン受容体でアゴニスト活性を有するグルカゴンペプチドとインスリン受容体でアゴニスト活性を有するインスリンペプチドとの間で形成された。Glu-DP8の誘導体が調製され、前記では、インスリン配列はA19位のチロシンをアラニンで置換することによって改変されて (GLP1-DP8A19；配列番号:136) 効果的にインスリン活性が除去されるか、或いはグルカゴン配列は3位のグルタミンをグルタミン酸で置換することによって改変されてグルカゴン活性が除去された。加えて、インスリン、グルカゴン及びGLP-1受容体で活性を有するGlu-DP8のさらに別の誘導体が設計された。前記では、Glu-DP8配列は16位のセリンをグルタミン酸で置換することによって改変された (グルカゴンE16 (配列番号:138))。

20

【0258】

複合物の各々は実施例8に開示したように合成し、クロマトグラフィーにより精製した。図7及び8は、インスリン受容体、GLP1受容体及びグルカゴン受容体における、合成GLP1-DP8及びGlu-DP8複合物のクロマトグラフィー単離プール分画のEC₅₀値を、天然インスリン、IGF-1及び天然グルカゴンと対比してそれぞれ示す。単離GLP1-DP8複合物分画については、プール1はインスリン受容体で天然のインスリンとほぼ同一の活性を示す (図7参照)。3プール全てがGLP1受容体で高い活性を示した。したがって、プール1の複合物は、天然のインスリン及び天然のGLP1と同じ高い効能をそれらの対応する2つの受容体で示す。単離Glu-DP8複合物分画については、プール1はインスリン受容体で天然のインスリンと同様な活性を、インスリン受容体における複合物の活性を緩和するグルカゴン配列の存在とともに示した。プール1及び3はグルカゴン受容体における高い活性を示す。3つにプールは全てGLP-1受容体における貧弱な活性を示す。したがって、プール1の複合物はインスリン及びグルカゴン受容体で高い効能を示すが、GLP-1受容体に関しては選択性を維持する。したがって、精製複合物は期待される活性をそれらの対応する受容体で示し、当該複合物が、継ぎ合わされた2つの元の活性ペプチドの双方の活性を維持することを示している

40

50

。

【0259】

Glu-DP8複合物及びGLP1-DP8複合物の血中グルコースレベルを低下させる能力を、C57BL/6マウスに当該化合物を投与し血中グルコースを測定することによって精査した。天然のインスリンを2通りの用量(12nmol/kg又は60nmol/kg)で(図9A)、又は複合物(GLP1-DP8(図9B)又はGlu-DP8(図9C))の1つを3通りの異なる濃度(12nmol/kg、60nmol/kg及び300nmol/kg)でマウスに皮下注射した。複合物は、天然のインスリンよりも急激でない血中グルコースの下降及びより長期の半減期を示した(作用のより長い持続時間)。加えて、GLP1-DP8(図9B)は、Glu-DP8(図9C)よりもグルコース低下でより活性が高い。このことは、インスリン活性を和らげるグルカゴンの作用に依ると考えられる。したがって、複合物はin vivoで血中グルコースを低下させる能力を示し、かつ天然のインスリンのプロフィールと異なるプロフィールを有する。

公知の変異導入を用いてGlu-DP8及びGLP1-DP8複合物の活性を改変し、当該複合物の2つの(インクレチン又はインスリン)活性の1つをノックアウトすることができる。改変Glu-DP8及びGLP1-DP8複合物の各々(GLP1-DP8A19、GLP1-A22、Glu-DP8A19、グルカゴンE3及びグルカゴンE16)をインスリン受容体、グルカゴン受容体及びGLP-1受容体で試験し、複合物の活性を各化合物の期待される活性に調整した。図10はGLP1-DP8及びGLP1-DP8A19のin vitro活性を提供する。A19位のアラニンの置換は、インスリン受容体におけるインスリンの活性を効果的に除去する。EC₅₀値は、インスリン及びGLP1-DP8の双方が強力なインスリン受容体アゴニストあるが、GLP-1及びGLP1-DP8A19はインスリン受容体で貧弱な活性を有することを示している。

【0260】

図11は、Glu-DP8及び誘導体複合物のin vitroインスリン受容体活性(EC₅₀値)を提示する。要約すれば、当該化合物の各々はグルカゴン受容体及びインスリン受容体で活性を示し、当該活性はインスリン又はグルカゴン配列を改変することによって破壊できる。複合物の各々は市のペプチド配列と一致する活性を示し、当該複合物は交差反応しない。特に、EC₅₀値は、インスリン及びGlu-DP8の双方が強力なインスリン受容体アゴニストであるが、グルカゴン及びGlu-DP8A19はインスリン受容体で貧弱な活性を有することを示している。GluE3-DP8及びGluE16-DP8もまた、DP8インスリン配列の存在によりインスリン受容体で高い効能を示した。

図12は、Glu-DP8、GluE3-DP8及びGluE16-DP8、Glu-DP8A19及びGLP1-DP8のin vitroグルカゴン受容体活性(EC₅₀値)を提示する。グルカゴン3位のグルタミン酸置換は効果的にグルカゴン活性を除去することが知られ、さらにインスリンのA19位のアラニン置換はインスリン受容体におけるインスリン活性を効果的に除去することが知られている。グルカゴン16位のグルタミン酸置換はグルカゴン及びGLP-1のコアゴニストを生じる。EC₅₀値は、グルカゴン、Glu-DP8及びGluE16-DP8は強力なグルカゴン受容体アゴニストであり、一方、GLP-1及びGLP1-DP8並びにGluE3-DP8はグルカゴン受容体で貧弱な活性を有することを示している。したがって、複合物は期待される活性を示す。

【0261】

図13は、GLP-1、GLP1-DP8、GLP1A22-DP8、GLP1-DP8A19、Glu-DP8及びGluE16-DP8のin vitro GLP-1受容体活性(EC₅₀値)を提示する。GLP1A22-DP8はインスリンとGLP-1との複合物を表し、前記複合物では22位はアラニンで置換されてある(GLP-1活性を効果的に除去することが判明している改変である)。EC₅₀値は、GLP-1、GLP1-DP8及びGLP1-DP8A19は強力なGLP-1受容体アゴニストであるが、GLP1A22-DP8、Glu-DP8及びGluE16-DP8はGLP-1受容体でより低い活性を有することを示している。したがって、複合物は期待される活性を示す。

GLP1-DP8及びGlu-DP8複合物を、血中グルコースレベルを低下させるそれらの能力についてin vivoで試験した。in vivoの結果はin vitroの受容体データと一致した。図14A - 14Bは、DP8(図14A)又はGLP1-DP8A19(図14B)を投与したC57BL/6マウスにおける血中グルコースレベルに対する前記列挙複合物の天然インスリンと対比したin vivo効果を示す。D

8は首尾よく血中グルコースを低下させたが、GLP1-DP8A19は血中グルコースレベルを有意には低下させることができなかった。図15A - 15Cは、Glu-DP8A19(図15A)又はGLP1A22-DP8(図15B)又はGluE3/DP8(図15C)を投与したC57BL/6マウスにおける血中グルコースレベルに対する前記列挙複合物の天然インスリンと対比したin vivo効果を示す。Glu-DP8A19複合物はインスリン活性を欠くが、グルカゴン刺激インスリン分泌の結果としてin vivoで血中グルコース低下をなお誘発する。GLP1A22-DP8は、22位の置換の結果としてグルカゴン活性を減少させたが、しかしながら、複合物のインスリン成分は血中グルコース減少活性を提供し、したがって複合物はインスリンの約1/5の活性を有する。GluE3/DP8はE3位における置換によりグルカゴン活性を減少させたが、しかしながら当該複合物は、天然のインスリンと対比してわずかに弱められたグルコース低下活性を有する。

10

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

[1] グルカゴン関連ペプチド及びインスリンペプチドを含むインスリンアゴニスト/インクレチン複合物であって、該グルカゴン関連ペプチドが、該インスリンペプチドに直に又はリンカーを介して連結されている、前記複合物。

[2] 該グルカゴン関連ペプチドのC-末端領域が、A鎖のA9、A14及びA15、B鎖のB1、B2、B10、B22、B28又はB29位から成る群から選択される位置のアミノ酸の側鎖、B鎖のN-末端アルファアミン、B鎖のカルボキシ末端、及び単一鎖インスリンアナローグのA鎖及びB鎖を連結する連結部分の任意の位置のアミノ酸側鎖から別個に選択される位置を介してインスリンペプチドに共有結合により連結されている、前記[1]に記載の複合物。

20

[3] 該グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端が、該インスリンペプチドのB鎖のアミノ末端に共有結合により連結されている、前記[1]に記載の複合物。

[4] 該インスリンペプチドが単一鎖インスリンアナローグである、前記[1] - [3]のいずれか1項に記載の複合物。

[5] 該グルカゴン関連ペプチドが、単一鎖インスリンアナローグのA鎖及びB鎖を連結する連結部分のアミノ酸のアミノ酸側鎖に連結されている、前記[4]に記載の複合物。

[6] 該インスリンペプチドが二鎖インスリンアナローグであり、かつ前記複合物が第一及び第二のグルカゴン関連ペプチドを含み、各グルカゴン関連ペプチドが、該B鎖のアミノ末端、該A鎖のカルボキシ末端及び該B鎖のカルボキシ末端から成る群から選択される位置で該インスリンペプチドに共有結合により連結されている、前記[1]に記載の複合物。

30

[7] 該グルカゴン関連ペプチドが以下を含む、前記[1] - [6]のいずれか1項に記載の複合物：

(i) アミノ酸配列X1 - X2 - 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 - Z(配列番号:839)であって、前記に対して1つから3つのアミノ酸改変を有するもの：式中、X1及び/又はX2は、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対するグルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然の(配列番号:701と対比して)アミノ酸であり、

Zは、Asn - Thr - COOH及びY - COOHから成る群から選択され(式中Yは1つから2つのアミノ酸)、さらにまた、

40

(1) ラクタム架橋がi位のアミノ酸及びi+4位のアミノ酸の側鎖を接続するか(式中iは12、16、20又は24)、又は

(2) グルカゴン関連ペプチドの16、20、21及び24位のアミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全てが、-二置換アミノ酸で置換され、

かつ前記グルカゴン関連ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する、前記アミノ酸配列；

(ii) 配列番号:701のアミノ酸配列であって、前記配列が28位のAsnの荷電アミノ酸による置換、

28位のAsnのAsp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される

50

荷電アミノ酸による置換、

28位におけるAsn、Asp又はGluによる置換、

28位におけるGluによる置換、

29位のThrの荷電アミノ酸による置換、

29位のThrのLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸から成る群から選択される荷電アミノ酸による置換、

29位におけるAsp、Glu又はLysによる置換、

29位におけるGluによる置換、

29位の後ろに1から3つの荷電アミノ酸の挿入、

29位の後にGlu又はLysの挿入、

29位の後にGly - Lys又はLys - Lysの挿入、

又は前記の組み合わせ、

及びグループA若しくはグループB又は前記の組み合わせから選択される少なくとも1つのアミノ酸改変、

から成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸改変を含むように改変され、

ここで、グループAは、16位のSerのThr又はAIBによる置換から成る群から選択されるアミノ酸改変であり、さらに

グループBは、

1位のHisのジペプチジルペプチダーゼIV (DPP - IV) による切断に対する当該グルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、

2位のSerのジペプチジルペプチダーゼIV (DPP - IV) による切断に対する当該グルカゴン関連ペプチドの感受性を減少させる非天然アミノ酸による置換、

10位のTyrのPhe又はValによる置換、

12位のLysのArgによる置換、

20位のGlnのAla又はAIBによる置換、

21位のAspのGluによる置換、

24位のGlnのAla又はAIBによる置換、

27位のMetのLeu又はNleによる置換、

又は前記の組み合わせから成る群から選択されるアミノ酸改変であり、

かつ前記グルカゴン関連ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する、前記アミノ酸配列；

(iii) 配列番号:701のグルカゴン関連ペプチドであって、前記ペプチドが、

(a) GIPアゴニスト活性を付与する、1位のアミノ酸改変、

(b) (1) i位及びi+4位のアミノ酸の側鎖間又はj位及びj+3位のアミノ酸の側鎖間のラクタム架橋 (式中iは12、13、16、17、20又は24で、jは17である)、又は(2) 該アナローグの16、20、21及び24位のアミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全ての - 二置換アミノ酸による置換、

(c) 27、28及び29位の1つ、2つ又は全てのアミノ酸改変、及び

(d) 1つから6つの更なるアミノ酸改変、

を含むように改変され、ここで該アナローグのGIP受容体活性化のためのEC50が約10nM以下である、前記グルカゴン関連ペプチド；

(iv) 配列番号:72又は配列番号:72のアナローグの配列であって、ここで前記アナローグが、1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28及び29位から選択される1つから3つのアミノ酸改変によって配列番号:72と異なり、

前記グルカゴン関連ペプチドが、GLP - 1受容体で天然のGLP - 1の活性の少なくとも20%を示す、前記配列；

(v) 10を超えないアミノ酸改変によって配列番号:701と異なるアミノ酸であって、16、20、21及び/又は24位にAIBによる1つ以上のアミノ酸置換並びにジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対する感受性の減少を提供する1位及び/又は2位のアミノ酸改変を含み、前記グルカゴン関連ペプチドが、GLP - 1受容体で天然のGLP - 1の活性の少なくとも20%

10

20

30

40

50

を示す、前記アミノ酸。

[8] 前記インスリンペプチドがA鎖及びB鎖を含み、前記A鎖が配列GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁
₂LX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈YCX₂₁ - R₁₃ (配列番号:19) を含み、前記B鎖が配列R₂₂ - X₂₅LCGX₂₉X₃₀LV
X₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅ (配列番号:20) を含む、前記〔7〕に記載の複合物：

式中、

X₄は、グルタミン酸又はアスパラギン酸であり、

X₅は、グルタミン又はグルタミン酸であり、

X₈は、ヒスチジン、スレオニン又はフェニルアラニンであり、

X₉は、セリン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₀は、イソロイシン又はセリンであり、

X₁₂は、セリン又はアスパラギン酸であり、

X₁₄は、チロシン、アルギニン、リジン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₅は、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、アラニン、リジン、オルニチン又はロイシンであり、

X₁₇は、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、リジン、オルニチン又はグルタミンであり、

X₁₈は、メチオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はスレオニンであり、

X₂₁は、アラニン、グリシン、セリン、バリン、スレオニン、イソロイシン、ロイシン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジン、トリプトファン、チロシン及びメチオニンから成る群から選択され、

X₂₅は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X₂₉は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X₃₀は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X₃₃は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X₃₄は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X₄₁は、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、

X₄₂は、アラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され、

X₄₅は、チロシン又はフェニルアラニンであり、

R₂₂は、AYRPSE (配列番号:14) 、FVNQ (配列番号:12) 、PGPE (配列番号:11) 、グリシン-プロリン-グルタミン酸トリペプチド、バリン-アスパラギン-グルタミントリペプチド、プロリン-グルタミン酸ジペプチド、アスパラギン-グルタミンジペプチド、グルタミン、グルタミン酸及びN-末端アミンから成る群から選択され、さらに

R₁₃はCOOH又はCONH₂である。

[9] 前記A鎖が配列GIVEQCCX₈X₉ICSLYQLENYCX₂₁ - R₁₃ (配列番号:73) を含み、前記B鎖が配列R₂₂ - X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅ (配列番号:20) を含む、前記〔8〕に記載の複合物：

式中、

X₈は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X₉は、セリン、リジン又はアラニンであり、

X₂₁は、アラニン、グリシン又はアスパラギンであり、

X₂₅は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X₂₉は、アラニン、グリシン及びセリンから成る群から選択され、

X₃₀は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X₃₃は、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選択され、

X₃₄は、アラニン及びスレオニンから成る群から選択され、

X₄₁は、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアスパラギンから成る群から選択され、

X₄₂は、アラニン、オルニチン、リジン及びアルギニンから成る群から選択され、

10

20

30

40

50

X₄₅は、チロシン又はフェニルアラニンであり、

R₂₂は、FVNQ（配列番号:12）、バリン - アスパラギン - グルタミントリペプチド、アスパラギン - グルタミンジペプチド、グルタミン及びN - 末端アミンから成る群から選択され

さらにR₁₃はCOOH又はCONH₂である。

〔10〕前記A鎖が配列GIVDECCX₈X₉SCDLRRLEMX₁₉CX₂₁ - R₁₃（配列番号:74）を含み、前記B鎖が配列R₂₂ - X₂₅LCGAX₃₀LVDALYLVCGDX₄₂GFY（配列番号:75）を含む、前記〔8〕に記載の複合物：

式中、

X₈は、フェニルアラニン又はヒスチジンであり、

10

X₉は、アルギニン、オルニチン又はアラニンであり、

X₁₉は、チロシン、4 - メトキシ - フェニルアラニン又は4 - アミノ - フェニルアラニンであり、

X₂₁は、アラニン又はアスパラギンであり、

X₂₅は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X₃₀は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸から成る群から選択され、

X₄₂は、アラニン、オルニチン及びアルギニンから成る群から選択され、R₁₃はCOOH又はCONH₂であり、

R₂₂は、AYRPSE（配列番号:14）、FVNQ（配列番号:12）、PGPE（配列番号:11）、グリシン - プロリン - グルタミン酸トリペプチド、バリン - アスパラギン - グルタミントリペプチド、プロリン - グルタミン酸ジペプチド、アスパラギン - グルタミンジペプチド、グルタミン、グルタミン酸及びN - 末端アミンから成る群から選択され、さらに

R₁₃はCOOH又はCONH₂である。

20

〔11〕前記B鎖が配列R₂₂ - X₂₅LCGAX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFY₄₅YT - Z₁ - B₁（配列番号:142）を含む、前記〔8〕に記載の複合物：

式中、

Z₁は、アスパルテート - リジン、リジン - プロリン及びプロリン - リジンから成る群から選択されるジペプチドであり、さらに

30

B₁は、スレオニン、アラニン又はスレオニン - アルギニン - アルギニントリペプチドから成る群から選択される。

〔12〕前記A鎖が配列GIVEQCCTS1CSLYQLENYCN - R₁₃（配列番号:1）を含み、前記B鎖が配列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT（配列番号:2）を含む、前記〔8〕に記載の複合物。

〔13〕該インスリンペプチドが単一鎖インスリンであり、さらにB及びA鎖を継ぎ合わせるペプチドリンカーが、SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTP1LPQR（配列番号:52）、SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTP1LPQK（配列番号:51）、GAGSSSX₅₇X₅₈（配列番号:76）、GYGSSSX₅₇X₅₈（配列番号:21）及びGYGSSSX₅₇X₅₈APQT（配列番号:77）から成る群から選択される、前記〔8〕 - 〔12〕のいずれか1項に記載の複合物：

式中、X₅₇及びX₅₈は別個にアルギニン、リジン又はオルニチンである。

〔14〕該ペプチドリンカーがGYGSSSRR（配列番号:18）及びGAGSSSRR（配列番号:22）から成る群から選択される、前記〔13〕に記載の複合物。

40

〔15〕該グルカゴン関連ペプチドが配列番号:72又は配列番号:72のアナローグの配列を含み、前記アナローグが、1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、24、27、28及び29位から選択される、1つから3つのアミノ酸改変によって配列番号:72と異なり、該グルカゴン関連ペプチドが、12及び16、16及び20、20及び24、又は24及び28位のアミノ酸の側鎖間に分子内橋を含む、前記〔8〕 - 〔14〕のいずれか1項に記載の複合物又は医薬的に許容できるその塩。

〔16〕該グルカゴン関連ペプチドが、16及び20位のアミノ酸の間に塩橋又はラクタム架橋を含む、前記〔15〕に記載の複合物。

〔17〕前記グルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端に連結されている、配列番号:78

50

、79及び80から成る群から選択されるペプチドをさらに含む、前記〔15〕又は〔16〕に記載の複合物。

〔18〕該グルカゴン関連ペプチドの3位のアミノ酸がグルタミン酸である、前記〔15〕-〔17〕のいずれか1項に記載の複合物。

〔19〕該グルカゴン関連ペプチドの28位のアミノ酸がAsp、Asn又はLysであり、かつ該グルカゴン関連ペプチドの29位のアミノ酸がGly又はThrである、前記〔18〕に記載の複合物。

〔20〕該グルカゴン関連ペプチドの16位のアミノ酸がグルタミン酸であり、該グルカゴン関連ペプチドの20位のアミノ酸がリジンであり、かつ該グルカゴン関連ペプチドのC-末端カルボン酸基がアミドで取り替えられ、場合によって該グルカゴン関連ペプチドの16位のグルタミン酸及び20位のリジンの間でラクタム架橋を有する、前記〔15〕-〔19〕のいずれか1項に記載の複合物。
10

〔21〕該グルカゴン関連ペプチドの1位又は2位のアミノ酸が、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対する感受性の減少を示すように改変される、前記〔20〕に記載の複合物。

〔22〕該グルカゴン関連ペプチドが以下から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、前記〔9〕-〔12〕のいずれか1項に記載の複合物：

i. 配列番号:81、

j. 配列番号:83、

k. 配列番号:89、

l. 配列番号:84-88のいずれか1つ、

m. 配列番号:100-103のいずれか1つ、

n. 配列番号:108であって、20位のアミノ酸がアルギニン、オルニチン及びシトルリンから成る群から選択されるもの、

o. 配列番号:98、99、109-112、104-106、及び配列番号:72のいずれか1つであって、該ペプチドの28位のXaaがアスパラギン又はアスパラギン酸で、該ペプチドの29位のXaaがスレオニン又はグリシンで、かつ該ペプチドのC-末端がさらに配列番号:78、配列番号:79、COOH又はCONH₂を含むもの、及び

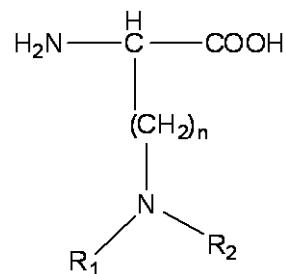
p. 配列番号:251、319及び510のいずれか1つ。

〔23〕該グルカゴン関連ペプチドが、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン(配列番号:701)のアナローグを含み、前記アナローグが、

(a) GIPアゴニスト活性を付与する1位のアミノ酸改変(場合によって1位のアミノ酸はイミダゾール側鎖を欠くアミノ酸)、

(b) 16位のSerの下記式IVのアミノ酸によるアミノ酸置換

【化1】



[式IV]

(式中、nは1から7であり、R1及びR2は別個にH、C₁-C₁₈アルキル、(C₁-C₁₈アルキル)OH、(C₁-C₁₈アルキル)NH₂、(C₁-C₁₈アルキル)SH、(C₀-C₄アルキル)(C₃-C₆)シクロアルキル、(C₀-C₄アルキル)(C₂-C₅複素環)、(C₀-C₄アルキル)(C₆-C₁₀アリール)R₇、及び(C₁-C₄アルキル)(C₃-C₉ヘテロアリール)から成る群から選択され、R₇はH又はOHであり、さらに式IVのアミノ酸の側鎖は遊離アミノ基を含み、式IVのアミノ酸は場合によってホモLys、Lys、Orn又は2,4-ジアミノ酪酸(Dab)である)、

10

20

30

40

50

(c) 該アナローグの16、20、21及び24位のアミノ酸の1つ、2つ、3つ又は全ての、-二置換アミノ酸による置換、

(d) 27、28及び29位の1つ、2つ又は全てにおけるアミノ酸改変、及び

(e) 該グルカゴン配列(配列番号:701)に対する1つから9つの更なるアミノ酸改変、という上記改変の1つ以上を含み、

GIP受容体活性化のための該アナローグのEC50が約10nM以下である、前記〔8〕-〔14〕のいずれか1項に記載の複合物。

〔24〕該グルカゴン関連ペプチドが、

(a) 1位のアミノ酸が大きな芳香族アミノ酸(場合によってTyr)であり、さらに

(b) (i) 27位のMetの大きな脂肪族アミノ酸(場合によってLeu)による置換、(ii) 28位のAsnの小さな脂肪族アミノ酸(場合によってAla)による置換か、若しくは(iii) 29位のThrの小さな脂肪族アミノ酸(場合によってGly)による置換、又は該アナローグが(i)、(ii)及び(iii)の組み合わせを含むという改変を含む、前記〔23〕に記載の複合物。

10

〔25〕該グルカゴン関連ペプチドがさらに、C-末端から29位アミノ酸に設けられた位置で前記ペプチドに連結されているGPSSGAPPPS(配列番号:95)又はXGPSSGAPPPS(配列番号:96)を含む、前記〔23〕又は〔24〕に記載の複合物。

〔26〕該グルカゴン関連ペプチドがさらに、

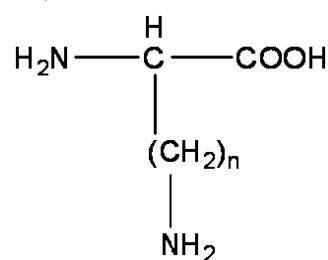
(a) 2位のSerのD-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、AIB、Val又は-アミノ-N-酪酸による置換、

20

(b) 3位のGlnのGluによる置換、

(c) 10位のアミノ酸Tyrのアシル基又はアルキル基に共有結合により連結されている側鎖を含むアミノ酸、場合によって下記式Iのアミノ酸による置換

【化2】



30

(式中、n=1から4)、

(d) 該アナローグのC-末端アミノ酸として、アシル基又はアルキル基に共有結合により連結されている側鎖を含むアミノ酸、場合によって式Iのアミノ酸の付加、

(e) 12位のLysのIleによる置換、

(f) 17位のArgのGlnによる置換、

(g) 18位のArgのAlaによる置換、

(h) 21位のAspのGluによる置換、

(i) 24位のGlnのAsnによる置換、及び

(j) C-末端アミノ酸のカルボン酸の中性荷電基、場合によってアミドによる取り替え、という上記改変の1つ以上を含む、前記〔23〕-〔25〕のいずれか1項に記載の複合物。

40

〔27〕該グルカゴン関連ペプチドが配列番号:227、228、229又は230のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、前記配列がさらに、GPSSGAPPPS(配列番号:820)又はXGPSSGAPPPS(配列番号:1096)(式中Xは任意のアミノ酸)のアミノ酸配列の末端延長をC-末端から29位アミノ酸に含む、前記〔23〕-〔25〕のいずれか1項に記載の複合物。

〔28〕該グルカゴン関連ペプチドが、配列番号:920-964、146-164、166、192-207、209-221及び223から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、前記〔23〕に記載の複合物。

〔29〕該グルカゴン関連ペプチドが配列番号:701又は改変配列番号:701の配列を含み、前記改変配列番号:701が、該グルカゴン関連ペプチドのC-末端から27位のアミノ酸の位

50

置に1つ、2つ、又は3つ以上の荷電アミノ酸及び配列番号:701に対して7つまでの追加のアミノ酸改変を含む、前記〔8〕-〔14〕のいずれか1項に記載の複合物。

〔30〕該荷電アミノ酸がGlu又はAspである、前記〔29〕に記載の複合物。

〔31〕該グルカゴン関連ペプチドが、HAEGTFTSDVSSYLEQAAREFIAWLVRGRG (配列番号:700)、HAEGTFTSDVSSYLEQAAKEFIAWLVKGRG (配列番号:703)、HAEGTFTSDVSSYLEQAAKEFICWLVKGR (配列番号:717)、HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (配列番号:701) 又はHSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT (配列番号:699) の配列を含む、前記〔8〕-〔14〕のいずれか1項に記載の複合物。

〔32〕該インスリンペプチドが、配列GPEX₂₅LCGAX₃₀LVDALYLVCGDX₄₂GFYFNX₄₈X₄₉GAGSSSRRGIVDECCX₈RSCDLRRLENYCN - R₁₃ (配列番号:144)、FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFYTPKTGAGSSSSRRGIVVEQCCTS1CSLYQLENYCN - R₁₃ (配列番号:143) 又はGPEHLCGAHLVDALYLVCGDRGFYFNDRGAGSSSSRRGIVDECCCHRSCDLRRLENYCN (配列番号:145) を含む単一鎖インスリンアナローグである、前記〔15〕、〔22〕、〔23〕、〔29〕及び31のいずれか1項に記載の複合物：

式中、

X₈は、フェニルアラニン又はヒスチジンであり、

X₂₅は、ヒスチジン又はスレオニンであり、

X₃₀は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸であり、

X₄₂は、アラニン、オルニチン又はアルギニンであり、

X₄₈は、リジン又はアスパラギン酸であり、

X₄₉は、プロリン、オルニチン又はアルギニンであり、さらに

R₁₃はCOOH又はCONH₂である。

〔33〕さらに構造U - Jを含む、前記〔1〕-〔32〕のいずれか1項に記載の複合物の誘導体であって、式中、Uはアミノ酸又はヒドロキシ酸であり、Jは、Jのカルボキシル部分と該複合物のアミンとの間のアミド結合を介して前記複合物に連結されているN - アルキル化アミノ酸であり、ここで、U、J又はU - Jが連結されている該複合物のアミノ酸は非コードアミノ酸であり、さらに該複合物からU - Jが化学的に切断される半減期 (t_{1/2}) が、生理学的条件下のPBS中で少なくとも約1時間から約1週間である、前記複合物の誘導体。

〔34〕X₁₉が4 - アミノフェニルアラニンであり、かつ該複合物がさらに構造U - Jを含むジペプチドを含み、式中、Uはアミノ酸又はヒドロキシル酸であり、Jは、Jのカルボキシル部分とA19位の4 - アミノフェニルアラニンのパラアミンとの間のアミド結合を介して前記インスリンペプチドに連結されているN - アルキル化アミノ酸である、前記〔10〕に記載の複合物。

〔35〕構造U - Jに共有結合により連結されている親水性部分をさらに含む、前記〔33〕又は〔34〕に記載の複合物。

〔36〕親水性部分が、前記複合物のアミノ酸の側鎖に共有結合により連結されている、前記〔1〕から〔35〕のいずれか1項に記載の複合物。

〔37〕親水性部分が、A14、A15、B0、B1、B10、B22、B28、B29又は天然のグルカゴン (配列番号:701) の16、17、20、21、24若しくは29の対応する1つ以上の位置に、又は該グルカゴン関連ペプチドのC - 末端領域に共有結合により連結されている、前記〔36〕に記載の複合物。

〔38〕該親水性部分がポリエチレングリコールである、前記〔35〕、〔36〕又は〔37〕に記載の複合物。

〔39〕あるアミノ酸側鎖に共有結合により連結されているアシル基又はアルキル基をさらに含む、前記〔1〕から〔38〕のいずれか1項に記載の複合物。

〔40〕前記アシル基又はアルキル基が、天然のグルカゴン (配列番号:701) の10位に対応するグルカゴン関連ペプチドの位置に、又はインスリンペプチドのA14、A15、B0、B1、B10、B22、B28、B29から選択される1つ以上の位置に、又は構造U - Jのアミノ酸の側鎖に共有結合に取り連結されている、前記〔39〕に記載の複合物。

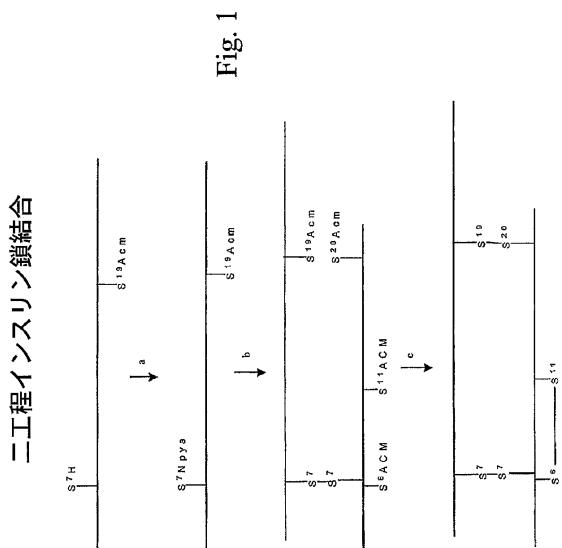
〔41〕前記〔1〕から〔40〕のいずれか1項に記載の複合物、又は医薬的に許容できるそ

の塩、及び医薬的に許容できる担体を含む医薬組成物。

〔42〕インスリンアゴニスト/インクレチン複合物をその必要がある患者に投与するためのキットであって、前記キットが前記〔41〕に記載の医薬組成物及び前記組成物を患者に投与するための装置を含む、前記キット。

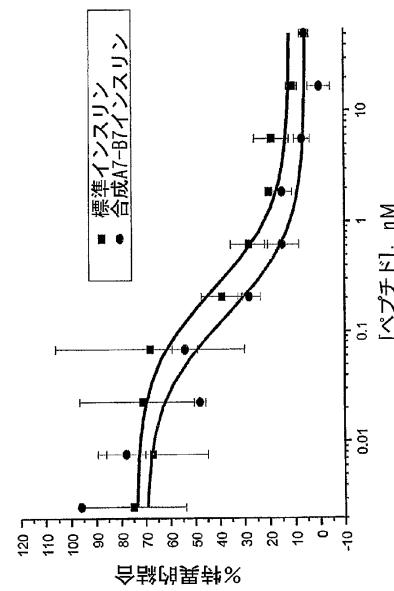
〔43〕前記〔41〕に記載の組成物の複合物又は医薬的に許容できるその塩の糖尿病治療のための使用。

【図1】



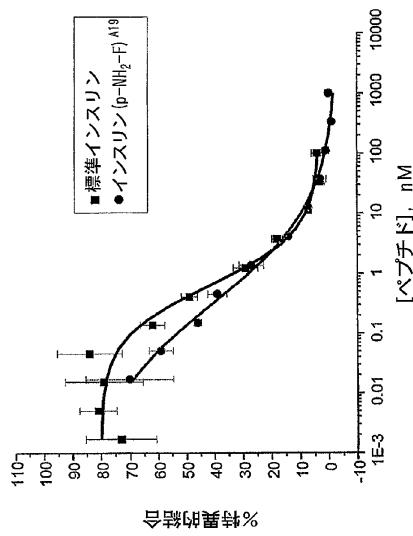
【図2】

合成" A⁷-B⁷" 誘導インスリンの
受容体結合



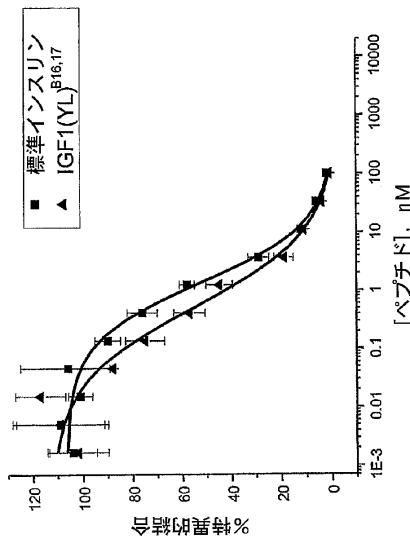
【図3】

Fig. 3



【図4】

Fig. 4



【図5】

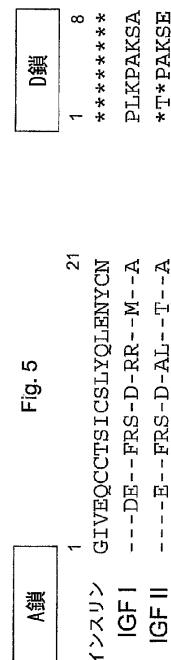
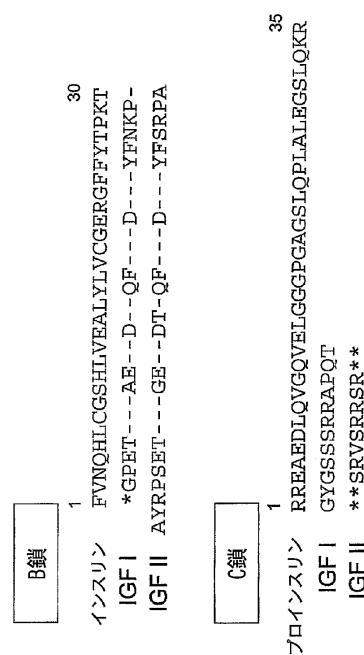
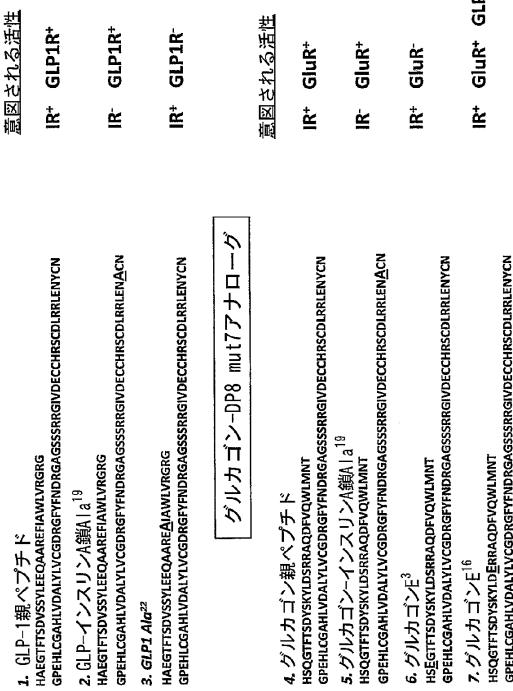


Fig. 5



【図6】

Fig. 6



(7)

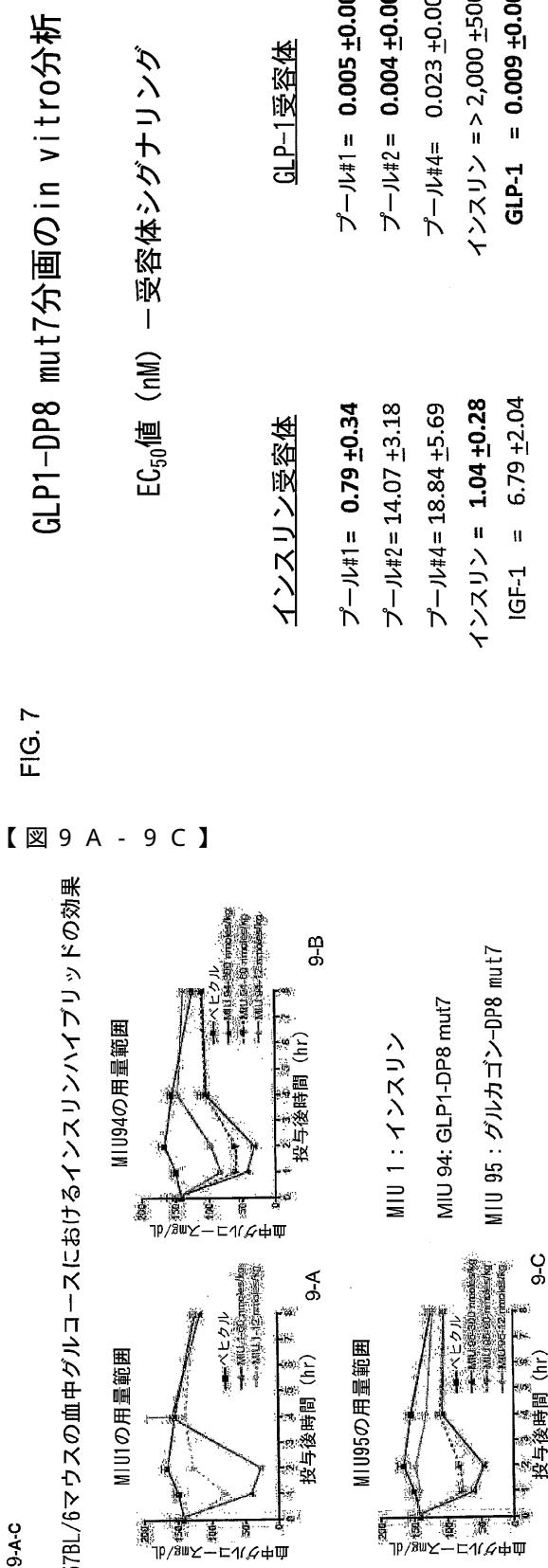


FIG. 9-A-C

FIG. 7

GLP1-DP8 mult分画のin vitro分析

〔 8 〕

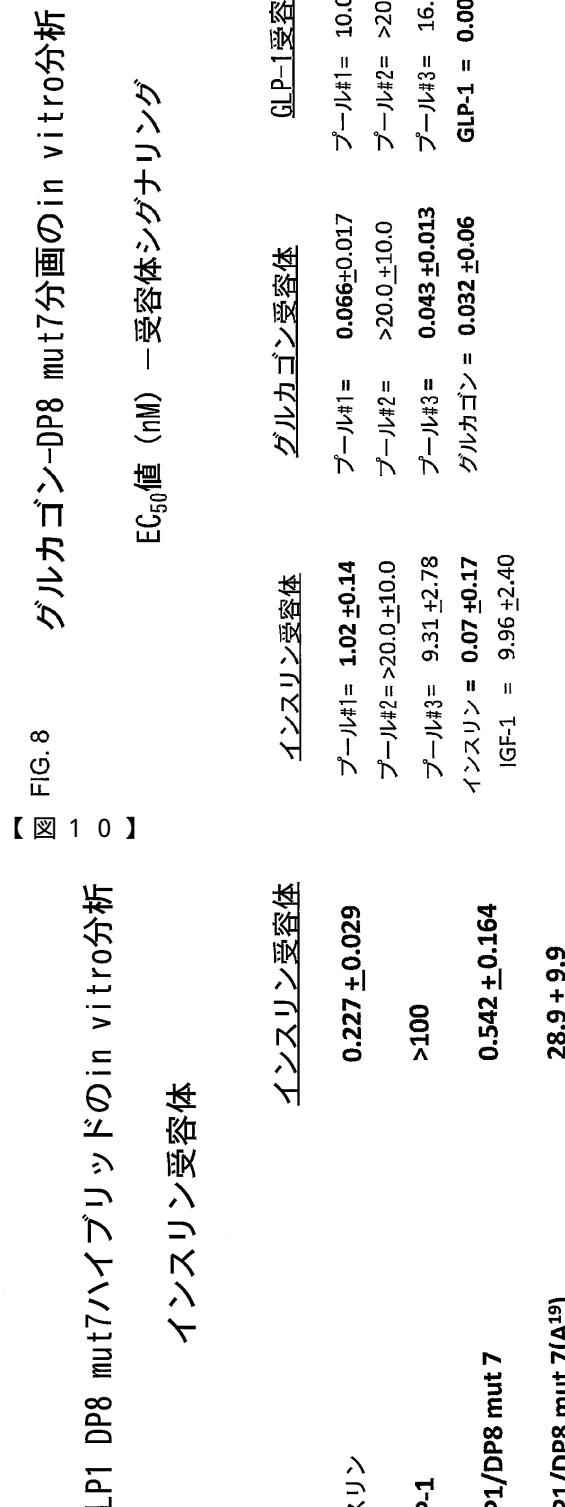


FIG. 10

FIG. 13

GLP1及びグルカゴンDP8 mut7ハイブリッドのin vitro分析
GLP-1受容体

	GLP-1受容体	インスリン受容体
GLP-1	0.025 ± 0.005	インスリン 0.091 ± 0.014
GLP1/DP8 mut 7	0.002 ± 0.007	グルカゴン >100
GLP1(A ²²)/DP8 mut 7	2.242 ± 0.603	グルカゴン/DP8 mut7 0.093 ± 0.062
GLP1/DP8 mut 7(A ¹⁹)	0.003 ± 0.004	グルカゴン/DP8 mut7 (A ¹⁹) >100
グルカゴン/DP8 mut7	2.679 ± 0.201	グルカゴン (E ³)/DP8 mut7 0.125 ± 0.069
グルカゴン (E ¹⁶)/DP8 mut7	1.349 ± 0.120	グルカゴン (E ¹⁶)/DP8 mut7 0.159 ± 0.128

FIG. 14-A-B

C57BL/6マウスの血中グルコースにおけるインスリンハイブリッドの効果

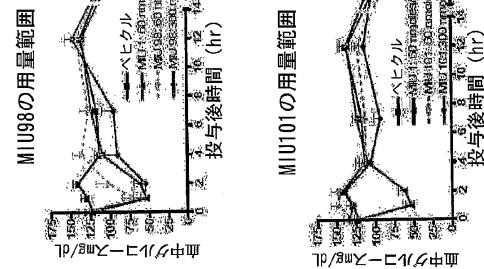


FIG. 11

グルカゴンDP8 mut7ハイブリッドのin vitro分析
GLP-1受容体

	GLP-1受容体	インスリン受容体
GLP-1	0.091 ± 0.014	インスリン 0.091 ± 0.014
グルカゴン	>100	グルカゴン/DP8 mut7 0.093 ± 0.062
グルカゴン/DP8 mut7	2.242 ± 0.603	グルカゴン/DP8 mut7 (A ¹⁹) >100
グルカゴン (E ³)/DP8 mut7	0.125 ± 0.069	グルカゴン (E ³)/DP8 mut7 0.159 ± 0.128
グルカゴン (E ¹⁶)/DP8 mut7	0.159 ± 0.128	

【図 1-1】

(116)

JP 6538645 B2 2019.7.3

【図 1-2】

	GLP1受容体	グルカゴン受容体
GLP1	0.091 ± 0.014	インスリン 0.091 ± 0.014
グルカゴン	>100	グルカゴン/DP8 mut7 0.093 ± 0.062
グルカゴン/DP8 mut7	2.242 ± 0.603	グルカゴン/DP8 mut7 (A ¹⁹) >100
グルカゴン (E ³)/DP8 mut7	0.125 ± 0.069	グルカゴン (E ³)/DP8 mut7 0.159 ± 0.128
グルカゴン (E ¹⁶)/DP8 mut7	0.159 ± 0.128	

FIG. 12

GLP1及びグルカゴンDP8 mut7ハイブリッドのin vitro分析

	GLP1受容体	グルカゴン受容体
GLP1	0.091 ± 0.014	インスリン 0.091 ± 0.014
グルカゴン	>100	グルカゴン/DP8 mut7 0.093 ± 0.062
グルカゴン/DP8 mut7	2.242 ± 0.603	グルカゴン/DP8 mut7 (A ¹⁹) >100
グルカゴン (E ³)/DP8 mut7	0.125 ± 0.069	グルカゴン (E ³)/DP8 mut7 0.159 ± 0.128
グルカゴン (E ¹⁶)/DP8 mut7	0.159 ± 0.128	

【図 1-4 A - 1-4 B】

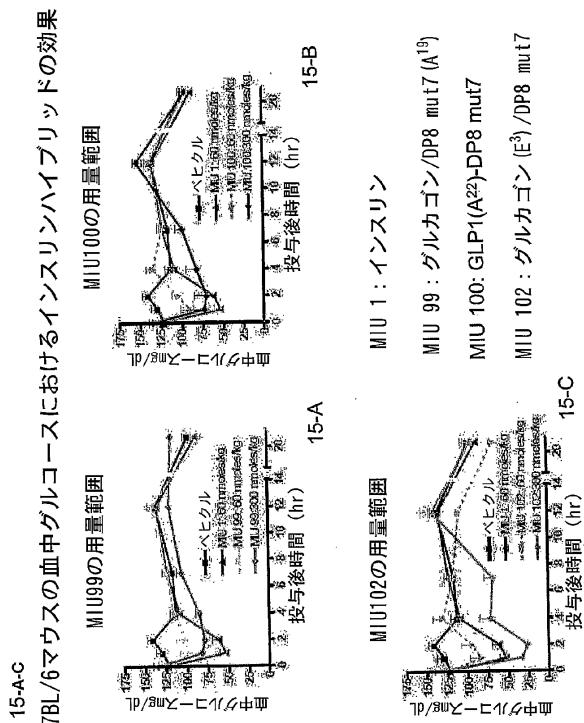
FIG. 14-A-B

C57BL/6マウスの血中グルコースにおけるインスリンハイブリッドの効果

	GLP1受容体	グルカゴン受容体
GLP-1	0.025 ± 0.004	インスリン 0.091 ± 0.014
グルカゴン	>100	グルカゴン/DP8 mut7 0.093 ± 0.062
グルカゴン/DP8 mut7	2.242 ± 0.603	グルカゴン/DP8 mut7 (A ¹⁹) >100
グルカゴン (E ³)/DP8 mut7	0.125 ± 0.069	グルカゴン (E ³)/DP8 mut7 0.159 ± 0.128
グルカゴン (E ¹⁶)/DP8 mut7	0.159 ± 0.128	

【図 1-2】

【図 15 A - 15 C】



【配列表】

0006538645000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 38/26 (2006.01)	A 6 1 K 38/26
A 6 1 K 38/28 (2006.01)	A 6 1 K 38/28
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02
	E

(74)代理人 100094569
弁理士 田中 伸一郎

(74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100136249
弁理士 星野 貴光

(72)発明者 ディマーチ リチャード ディー
アメリカ合衆国 インディアナ州 46033 カーメル ウィルミントン ドライブ 1089
0

(72)発明者 パロディー トッド
アメリカ合衆国 インディアナ州 47408 ブルーミントン イースト エイス ストリート
2400

(72)発明者 ハン ジエ
中華人民共和国 ベイジン 100097 ハイダン ディストリクト センチュリー シティー
シユ ガーデン ビルディング 9 ユニット 2

(72)発明者 リ ペンyun
アメリカ合衆国 インディアナ州 47401 ブルーミントン サウス シャドー グローブ
コート 2426

審査官 田名部 拓也

(56)参考文献 特表2007-525495 (JP, A)
国際公開第2012/165915 (WO, A1)
特表2012-512901 (JP, A)
国際公開第2012/167744 (WO, A1)
特表2012-512899 (JP, A)
特開2012-254086 (JP, A)
Finan, B. et al., Targeted estrogen delivery reverses the metabolic syndrome, Nat. Med., 2012年, Vol. 18, pp. 1847-1856

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
UniProt/GenSeq
Capplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
PubMed