

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-511778

(P2011-511778A)

(43) 公表日 平成23年4月14日 (2011.4.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 3	
A 6 1 K 38/28 (2006.01)	A 6 1 K 37/26	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 209 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-545058 (P2010-545058)
 (86) (22) 出願日 平成21年1月21日 (2009.1.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年9月29日 (2010.9.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/031593
 (87) 国際公開番号 W02009/099763
 (87) 国際公開日 平成21年8月13日 (2009.8.13)
 (31) 優先権主張番号 61/024,672
 (32) 優先日 平成20年1月30日 (2008.1.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507277642
 インディアナ ユニバーシティー 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・インディアナ州 462
 02・インディアナポリス・10ストリー
 ト 351 ウェスト
 (74) 代理人 110000176
 一色国際特許業務法人

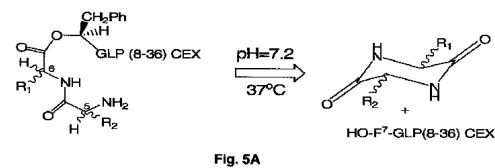
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エステルに基づいたペプチドプロドラッグ

(57) 【要約】

生体活性ポリペプチドのプロドラッグ製剤が提供され、ここで生体活性ポリペプチドは、ジペプチドの、エステル結合を介した生体活性ポリペプチドへの結合により修飾されている。本明細書に開示されているプロドラッグは、幾つかの実施態様において、少なくとも1.5時間 (例えば、少なくとも10時間)、より典型的には20時間を超えて70時間未満の延長された半減期を有し、化学不安定性により駆動される非酵素反応により、生理学的条件下で活性形態に変換される。

【選択図】 図5A

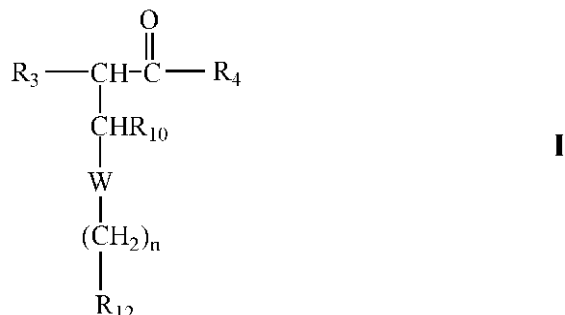


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の式 I で示される一般構造を含むプロドラッグ。

【化 1】

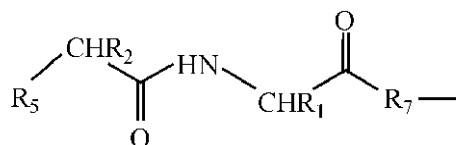


10

〔式中、

R_3 は、 NH_2 、アミノ酸配列及び下記：

【化 2】



20

からなる群より選択され、

R_4 は、 $-\text{OH}$ 、 NH_2 又はアミノ酸配列であり、

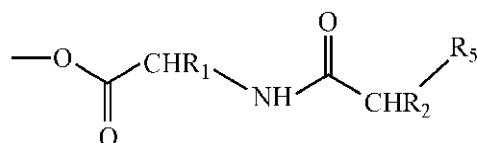
R_{10} は、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル及び $(\text{CH}_2)_n$ ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) からなる群より選択され、

W は、 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール又は結合であり、

n は、 $0 \sim 3$ の整数であり；

R_{12} は、 $-\text{OH}$ 、 H 、又は下記：

【化 3】



30

であり、

R_1 及び R_2 は、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{OH}$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{SH}$ 、 $(\text{C}_2 \sim \text{C}_3 \text{ アルキル}) \text{SCH}_3$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{CONH}_2$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{COOH}$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{NH}_2$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{NHC}(\text{NH}_2)_2$ 、 $(\text{C}_4 \sim \text{C}_6)$ シクロアルキル、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})$ ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) R_9 及び CH_2 ($\text{C}_5 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、

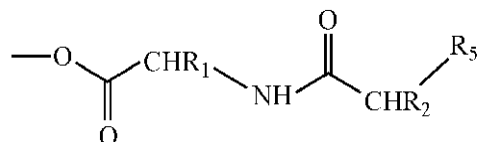
40

R_5 は、 OH 又は NH_2 であり、 R_9 は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、 NH_2 又は OH であり、そして

R_7 は、 $-\text{O}-$ アミノ酸又は O であるが、

但し R_{12} が、下記：

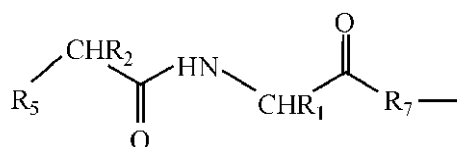
【化 4】



50

である場合、 R_3 は、下記：

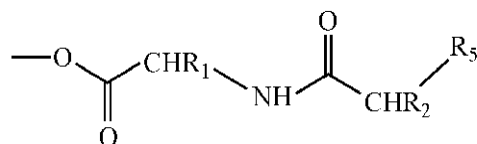
【化 5】



ではなく、

更に、 R_3 が、 NH_2 又はアミノ酸配列である場合、 R_{12} は下記：

【化 6】



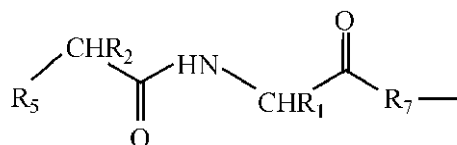
10

である]

【請求項 2】

R_3 が、下記：

【化 7】



20

であり、そして

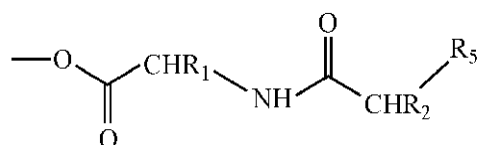
R_7 及び R_4 が、それぞれ、グルカゴン、GLP-1 又はインスリンの生体活性ペプチドから選択されるアミノ酸配列を表す、請求項 1 記載のプロドラッグ。

【請求項 3】

R_3 及び R_4 が、それぞれ、グルカゴン、GLP-1 又はインスリンの生体活性ペプチドから選択されるアミノ酸配列を表し、そして

R_{12} が、下記：

【化 8】



30

である、請求項 1 記載のプロドラッグ。

【請求項 4】

アミノ酸の側鎖に共有結合している親水性部分を更に含む、請求項 2 又は 3 記載のプロドラッグ。

【請求項 5】

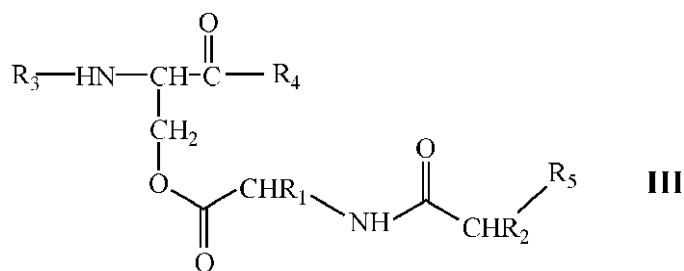
前記親水性部分がポリエチレングリコールである、請求項 4 記載のプロドラッグ。

【請求項 6】

下記の式 I I I で示される一般構造を含むプロドラッグ。

40

【化 9】



〔式中、

10

R₁ 及び R₂ は、H、C₁～C₃ アルキル、CH₂CH(CH₃)₂、CH(CH₃)(CH₂CH₃)、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂(C₆～C₁₀ アリール) 及び CH₂(C₅～C₉ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、

R₃ は、生体活性タンパク質のアミノ酸であって、前記生体活性タンパク質に存在するセリン残基の N 末端側に配置されているアミノ酸を含み、

R₄ は、前記生体活性タンパク質のアミノ酸であって、前記生体活性タンパク質に存在するセリン残基の C 末端側に配置されているアミノ酸を含み、そして

R₅ は、OH 又は NH₂ である〕

【請求項 7】

20

R₁ が、CH₂(CH₃)₂、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂(C₆ アリール) 及び CH₂(C₅～C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択され、R₂ が、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂(C₆ アリール) 及び CH₂(C₅～C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択される、請求項 6 記載のプロドラッグ。

【請求項 8】

前記生体活性ペプチドが、グルカゴン、GLP-1 からなる群より選択され、前記修飾されたセリン残基が、対応する天然配列に対して、グルカゴン又は GLP-1 の 2、5、7、8 又は 11 位に配置されている、請求項 6 記載のプロドラッグ。

【請求項 9】

30

前記生体活性ペプチドがインスリンであり、前記修飾されたセリン残基が、天然インスリン A 及び B 鎖配列に対して、A4、A21、B5 又は B9 位に配置されている、請求項 6 記載のプロドラッグ。

【請求項 10】

親水性部分を更に含み、前記親水性部分は、対応する天然配列に対して、グルカゴン又は GLP-1 プロドラッグの 20、21 又は 24 位のアミノ酸に共有結合しているか、或いは追加のアミノ酸がプロドラッグのカルボキシ末端に付加されており、前記親水性部分が前記付加されたアミノ酸に共有結合している、請求項 8 記載のプロドラッグ。

【請求項 11】

天然インスリン B 鎖配列に対して、B 鎖のアミノ末端又は B 鎖の B29 位のアミノ酸に共有結合している親水性部分を更に含む、請求項 9 記載のプロドラッグ。

【請求項 12】

40

前記親水性部分が、血漿タンパク質、ポリエチレングリコール鎖及び免疫グロブリンの Fc 部分からなる群より選択される、請求項 10 又は 11 記載のプロドラッグ。

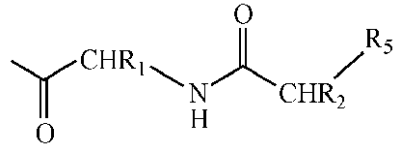
【請求項 13】

A 鎖と、

B 鎖と、

下記の式：

【化 10】



のジペプチドとを含むインスリンプロドラッグであって、

前記A鎖が、 X_5 I V X_6 Q C C X_7 S I C S L Y Q L E N Y C X_8 (配列番号626) の配列を含み、前記B鎖が、 X_{13} L C G X_9 X_{10} L V E A L X_{11} L V C G E R G F X_{12} (配列番号628) の配列を含み、前記ジペプチドが、エステル結合を介して、
配列番号626の1、4若しくは21位又は配列番号628の1、5、12若しくは21位に配置されているアミノ酸の側鎖に結合しており、

10

更に、

X_5 が、グリシン又はデスアミノグリシンであり；

X_6 が、グルタミン酸、セリン又はトレオニンであり；

X_7 が、トレオニン、ヒスチジン、アルギニン又はリシンであり；

X_8 が、アスパラギン、セリン、トレオニン又はグリシンであり；

X_9 が、セリン又はトレオニンであり；

X_{10} が、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

20

；
 X_{11} 及び X_{12} が、T y r、フェニルアラニン及び4-ヒドロキシメチル P h e からなる群より独立して選択され；

X_{13} が、ヒスチジン、セリン又はトレオニンであり；

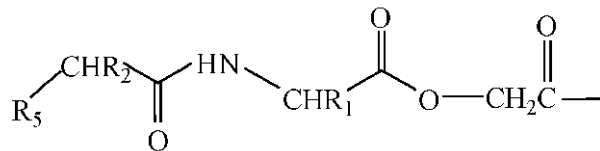
R_1 及び R_2 が、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)(CH_2CH_3)$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10})$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、そして R_5 が、OH又は NH_2 である、
インスリンプロドラッグ。

【請求項14】

X_6 がグルタミン酸であり、 X_7 が、トレオニン、ヒスチジン、アルギニン及びリシンからなる群より選択され、 X_8 がアスパラギンであり、 X_9 がセリンであり、 X_{10} が、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なる群より選択され、 X_{11} 及び X_{12} が、両方ともチロシンであり、そして X_5 が、下記構造：

30

【化 11】



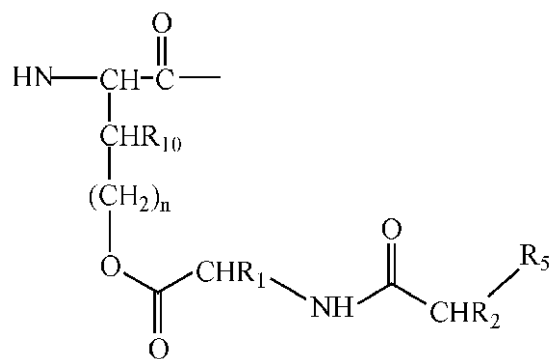
を有し、式中、 R_1 が、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6)$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6)$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_5 が、OH又は NH_2 である、
請求項13記載のインスリンプロドラッグ。

40

【請求項15】

X_5 がグリシンであり、 X_7 が、トレオニン、ヒスチジン、アルギニン及びリシンからなる群より選択され、 X_{10} が、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なる群より選択され、 X_{11} 及び X_{12} が、両方ともチロシンであり、そして X_6 、 X_8 又は X_9 の1つが、下記構造：

【化 1 2】



10

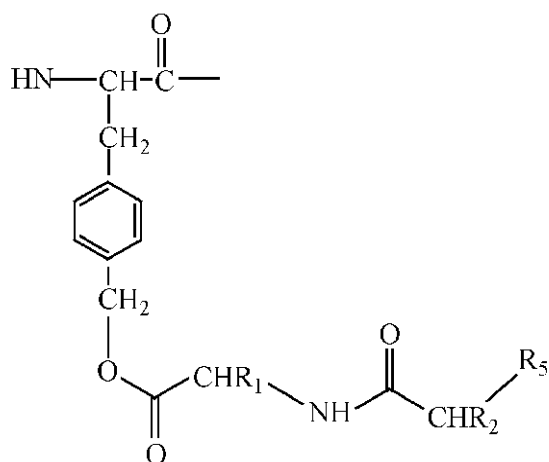
を有し、式中、 R_{10} が、H又は CH_3 からなる群より選択され、 n が、0又は3であり、 R_1 が、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \text{ アリール})$ 及び $CH_2(C_5 \sim C_6 \text{ ヘテロアリール})$ からなる群より選択され、 R_2 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \text{ アリール})$ 及び $CH_2(C_5 \sim C_6 \text{ ヘテロアリール})$ からなる群より選択され、そして R_5 が、OH又は NH_2 である、請求項13記載のインスリンプロドラッグ。

【請求項 1 6】

X_5 がグリシンであり、 X_6 がグルタミン酸であり、 X_7 が、トレオニン、ヒスチジン、アルギニン及びリシンからなる群より選択され、 X_8 がアスパラギンであり、 X_9 がセリンであり、 X_{10} が、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なる群より選択され、 X_{11} 及び X_{12} の一方がチロシンであり、他方が、下記構造：

20

【化 1 3】



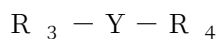
30

を有し、式中、 R_1 が、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \text{ アリール})$ 及び $CH_2(C_5 \sim C_6 \text{ ヘテロアリール})$ からなる群より選択され、 R_2 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \text{ アリール})$ 及び $CH_2(C_5 \sim C_6 \text{ ヘテロアリール})$ からなる群より選択され、そして R_5 が、OH又は NH_2 である、請求項13記載のインスリンプロドラッグ。

40

【請求項 1 7】

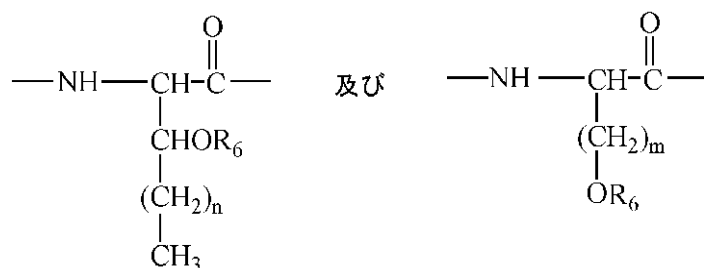
一般構造：



のポリペプチドを含む、GLP-1又はグルカゴンのプロドラッグ誘導体。

〔式中、Yは、下記：

【化 1 4】

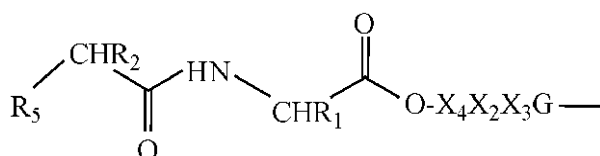


からなる群より選択される構造であり、

10

n は、0 ～ 3 から選択される整数であり、m は、1 ～ 4 から選択される整数であり、R₃ は、X₁ X₂ X₃ G —（配列番号 6 2 1）又は下記：

【化 1 5】



からなる群より選択されるアミノ酸を含み、

20

X₁ は、ヒスチジン、デスアミノヒスチジン、ホモヒスチジン、チロシン及びフェニルアラニンからなる群より選択され；

X₂ は、グリシン、アラニン、セリン、バリン、D-アラニン、アミノイソ酪酸、N-メチルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸であり；

X₃ は、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン及びアスパラギンからなる群より選択され；

X₄ は、デスアミノヒスチジン、デスアミノホモヒスチジン、デスアミノチロシン及びデスアミノフェニルアラニンからなる群より選択され；

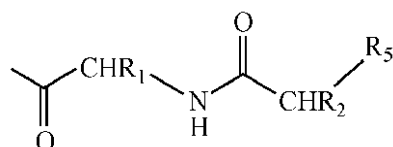
R₄ は、配列番号 6 1 5、配列番号 6 1 6、配列番号 6 1 7、配列番号 6 1 8 及び配列番号 6 1 9 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み；

R₅ は、NH₂ 又は H であり；

30

R₆ は、H であるか、又は下記：

【化 1 6】



であり；

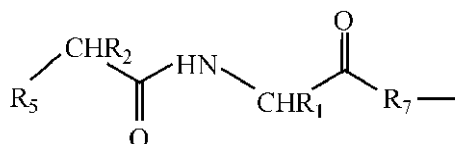
R₇ は、O 又は O X₄ X₂ X₃ G（配列番号 6 3 4）であり；

40

R₁ 及び R₂ は、H、C₁ ～ C₃ アルキル、CH₂ CH (CH₃)₂、CH (CH₃) (CH₂ CH₃)、(C₄ ～ C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ ～ C₁₀ アリール) 及び CH₂ (C₅ ～ C₉ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択されるが、

但し、R₃ が下記：

【化 1 7】



である場合、R₆ は H であり、そして

R₆ が H である場合、R₃ は X₁ X₂ X₃ G —（配列番号 6 2 1）ではない]

50

【請求項 18】

R₄ が、下記：

FTSDVSSSYLEGQA AKEFI A WL VK GRG (配列番号 603)、
 FTSDVSSSYLEGQA AKEFI A WL VK GR-アミド (配列番号 604)、
 FTSDVSSSYLEGQA AKEFI A WL VK GX₁₄ PSSGAPPPS-アミ
 ド (配列番号 605) (ここで X₁₄ は、Arg 又は Gly である)、
 FTSDY SKYLDSRRAQDFVQWLMNT (配列番号 618) 及び
 FTSDY SKYLDSRRAQDFVQWLMNT PSSGAPPPS-アミド (配
 列番号 620)

からなる群より選択されるペプチドを含む、請求項 17 記載のプロドラッグ誘導体。

10

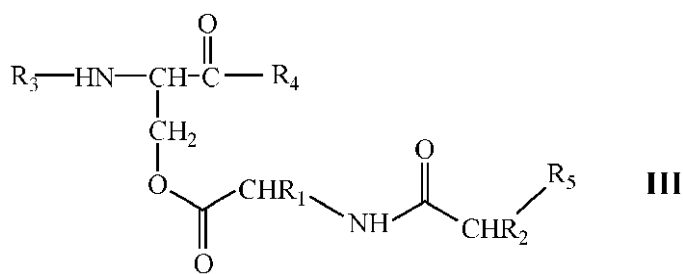
【請求項 19】

R₁ が、CH₂ (CH₃)₂、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ アリール)
) 及び CH₂ (C₅～C₆ ヘテロアリール) からなる群より選択され、R₂ が、(C₄～
 C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ アリール) からなる群より選択され、そして R₅ が
 、OH 又は NH₂ である、請求項 18 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 20】

下記の式 III で示される構造を含む、請求項 17 記載のプロドラッグ誘導体。

【化 18】



20

〔式中、

R₄ は、R₁₄ HAEG (配列番号 643)、R₁₄ HAQG- (配列番号 639)、
 R₁₄ FAEG (配列番号 644)、R₁₄ FAQG (配列番号 640) からなる群より
 選択されるアミノ酸配列であり；

30

R₄ は、下記：

FTSDVSSSYLEGQA AKEFI A WL VK GRG (配列番号 603)、
 FTSDVSSSYLEGQA AKEFI A WL VK GR-アミド (配列番号 604) 及
 び

FTSDVSSSYLEGQA AKEFI A WL VK GRX₁₄ PSSGAPPPS-ア
 ミド (配列番号 605) (ここで X₁₄ は、Arg 又は Gly である)
 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み；

R₅ 及び R₁₄ は、独立して、NH₂ 又は HO であり；

R₁ 及び R₂ は、H、C₁～C₃ アルキル、CH₂CH (CH₃)₂、CH (CH₃)
 (CH₂CH₃)、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ アリール) 及び CH₂
 (C₅～C₆ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、そして

40

R₅ は、OH 又は NH₂ である]

【請求項 21】

R₅ が OH である、請求項 20 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 22】

R₁ が、CH₂ (CH₃)₂、CH₂CH (CH₃)₂、CH (CH₃) (CH₂CH
₃) からなる群より選択され、そして R₂ が、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆
 アリール) 及び CH₂ (C₅～C₆ ヘテロアリール) からなる群より選択される、請
 求項 20 又は 21 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 23】

50

R_1 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 CH_2 (C_6 アリール) 及び CH_2 ($C_5 \sim C_6$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_2 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 CH_2 (C_6 アリール) 及び CH_2 ($C_5 \sim C_6$ ヘテロアリール) からなる群より選択される、請求項 20 又は 21 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 24】

R_1 が、 CH_2 (CH_3)₂、 CH_2CH (CH_3)₂ 及び CH (CH_3) (CH_2CH_3) からなる群より選択され、 R_2 が、 H 及び $C_1 \sim C_3$ アルキルからなる群より選択され、そして R_5 が NH_2 である、請求項 20 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 25】

R_1 が、 CH_2 (CH_3)₂、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 CH_2 (C_6 アリール) 及び CH_2 ($C_5 \sim C_6$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_2 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 CH_2 (C_6 アリール) からなる群より選択される、請求項 20 記載のプロドラッグ誘導体。

10

【請求項 26】

親水性部分を更に含み、前記親水性部分は、GLP-1 又はグルカゴンペプチドの天然配列に対して、前記プロドラッグの 20、21 又は 24 位のアミノ酸残基に共有結合しているか、或いは、追加のアミノ酸がプロドラッグのカルボキシ末端に付加されており、前記親水性部分は前記付加アミノ酸に共有結合している、請求項 20 記載のプロドラッグ。

【請求項 27】

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 26 記載のプロドラッグ誘導体。

20

【請求項 28】

ポリエチレングリコールが、少なくとも約 40,000 ダルトンの分子量を有する、請求項 27 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 29】

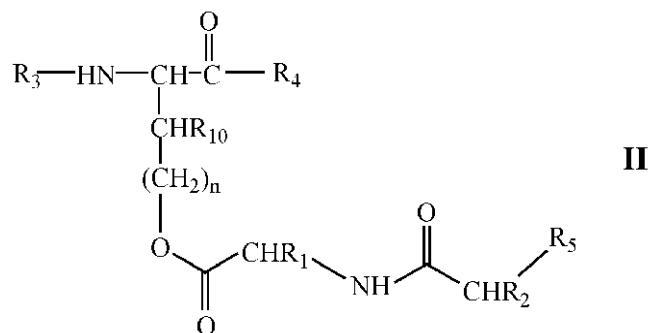
前記親水性部分が、血漿タンパク質又は免疫グロブリンの Fc 部分である、請求項 26 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 30】

下記構造を有する、請求項 17 記載のプロドラッグ誘導体。

【化 19】

30



〔式中、

40

R_4 は、下記：

FTSDVSSYLEGQA AKEFI A WL VKGRG (配列番号 603)、

FTSDVSSYLEGQA AKEFI A WL VKGR-アミド (配列番号 604)、

FTSDVSSYLEGQA AKEFI A WL VKGX₁₋₄ PSSGAPPPS-アミド (配列番号 605) (ここで X₁₋₄ は、Arg 又は Gly である) 及び

FTSDVSSYLEGQA AKEFI A WL VKGRG KRN RNNIA (配列番号 606)

からなる群より選択されるアミノ酸配列であり；

R_5 は、 NH_2 又は HO であり；

R_7 は、O-HAEG- (配列番号 640)、O-HAQG- (配列番号 639)、O

50

－F A E G－（配列番号 6 4 4）及び O－F A Q G－（配列番号 6 4 0）からなる群より選択されるアミノ酸配列であり；そして

R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)(CH_2CH_3)$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10})$ アリール）及び $CH_2(C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール）からなる群より独立して選択される]

【請求項 3 1】

R_5 が OH である、請求項 3 0 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 3 2】

R_1 が、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)(CH_2CH_3)$ からなる群より選択され、そして R_2 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6)$ アリール）及び $CH_2(C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール）からなる群より選択される、請求項 3 0 又は 3 1 記載のプロドラッグ誘導体。

10

【請求項 3 3】

R_1 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6)$ アリール）及び $CH_2(C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール）からなる群より選択され、そして R_2 が、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6)$ アリール）及び $CH_2(C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール）からなる群より選択される、請求項 3 0 又は 3 1 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 3 4】

R_1 が、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 及び $CH(CH_3)(CH_2CH_3)$ からなる群より選択され、 R_2 が、H 及び $C_1 \sim C_3$ アルキルからなる群より選択され、そして R_5 が NH_2 である、請求項 3 0 記載のプロドラッグ誘導体。

20

【請求項 3 5】

R_1 が、 $CH_2(CH_3)_2$ 及び $CH_2(C_6)$ アリール）からなる群より選択され、 R_2 が $CH_2(C_6)$ アリール）であり、そして R_5 が OH である、請求項 3 0 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 3 6】

R_1 が $CH_2(CH_3)_2$ であり、 R_2 が、H 又は $CH_2(C_6)$ アリール）であり、そして R_5 が、 NH_2 である、請求項 3 0 記載のプロドラッグ誘導体。

【請求項 3 7】

請求項 1 記載のプロドラッグと薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

30

【請求項 3 8】

糖尿病を治療する方法であって、請求項 2 又は 3 記載のプロドラッグを含む医薬組成物の有効量を投与することを含む方法。

【請求項 3 9】

食欲を抑制する、体重増加を減少する又は減量を誘導する方法であって、請求項 2 又は 3 記載のプロドラッグの有効量を投与することを含む方法。

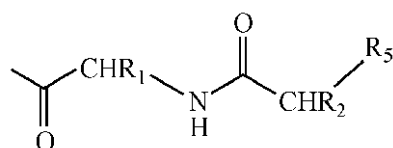
【請求項 4 0】

配列番号 6 2 2 又は配列番号 6 2 3 の配列と、

前記配列番号 6 2 2 又は配列番号 6 2 3 の 1、2、5、7、8 及び 1 1 位から選択される位置のアミノ酸におけるエステル結合を介して結合している、下記の式：

40

【化 2 0】



のジペプチドとを含み、

式中、 R_1 及び R_2 が、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)(CH_2CH_3)$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6)$ アリール）及び $CH_2(C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール）からなる群より独立して選択され、そして R_5 が、

50

OH又はNH₂である、
生体活性ペプチドプロドラッグ。

【請求項 4 1】

R₁が、CH₂(CH₃)₂、(C₄～C₅)シクロアルキル、CH₂(C₆アリール)及びCH₂(C₅～C₆ヘテロアリール)からなる群より選択され、そしてR₂が、(C₄～C₅)シクロアルキル、CH₂(C₆～C₁₀アリール)からなる群より選択される、請求項 4 0 記載の生体活性ペプチドプロドラッグ。

【請求項 4 2】

2、5、7、8又は11位のアミノ酸が、セリン残基であり、ジペプチドが、セリン側鎖と形成したエステル結合を介して結合している、請求項 4 0 記載の生体活性ペプチドプロドラッグ。

10

【請求項 4 3】

カルボキシ末端延長ペプチドを更に含み、前記延長ペプチドがGPS SGAPPPS (配列番号 6 2 4) の配列を含む、請求項 4 0 記載の生体活性ペプチドプロドラッグ。

【請求項 4 4】

20、21、24位のアミノ酸残基の一つ、又は配列番号 6 2 4 のカルボキシ末端に付加されている単一アミノ酸に共有結合している親水性部分を更に含む、請求項 4 3 記載の生体活性ペプチドプロドラッグ。

【請求項 4 5】

前記親水性部分がポリエチレングリコール鎖である、請求項 4 4 記載の生体活性ペプチドプロドラッグ。

20

【請求項 4 6】

2つ以上のポリエチレン鎖が、20、21、24の群から選択される位置の2つ以上のアミノ酸側鎖、又は配列番号 6 2 4 のカルボキシ末端に付加されている単一アミノ酸に共有結合している、請求項 4 5 記載の生体活性ペプチドプロドラッグ。

【請求項 4 7】

配列番号 6 2 4 のカルボキシ末端に付加されている単一アミノ酸がシステインである、請求項 4 4 又は 4 6 記載の生体活性ペプチドプロドラッグ。

【請求項 4 8】

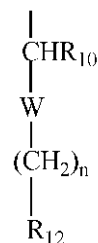
R₃又はR₄が、生体活性ペプチドのアミノ酸配列である、請求項 1 記載のプロドラッグ。

30

【請求項 4 9】

R₃が、下記構造：

【化 2 1】



40

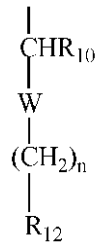
の側鎖を含む生体活性ペプチドのアミノ酸のN末端側のアミノ酸配列であり、そしてR₄が、前記生体活性ペプチドのアミノ酸のC末端側のアミノ酸配列である、請求項 4 8 記載のプロドラッグ。

【請求項 5 0】

R₃が、下記：

$$\text{R}_5-\text{CHR}_2-\text{C}(=\text{O})\text{HN}-\text{CHR}_1-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_7$$

【化 2 3】



【請求項 5 1】

【請求項 5 2】

【請求項 5 3】

【請求項 54】

【請求項 55】

X 1 及び／又は X 2 が、ジペプチジルペプチダーゼ I V (D P P - I V) による切断に対する前記グルカゴン関連類縁体ペプチドの感受性を低減する非天然（配列番号 6 1 2 に対して）アミノ酸であり、

Zが、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{Asn}-\text{COOH}$ 、 $\text{Asn}-\text{Thr}-\text{COOH}$ 及び $\text{Y}-\text{COOH}$ からなる群より選択され、Yが1～2個のアミノ酸であり、

ここで、(1)ラクタム架橋がiの位置のアミノ酸及びi+4の位置のアミノ酸の側鎖を連結するか(ここでiは、12、16、20若しくは24である)又は(2)グルカゴン関連類縁体ペプチドの16、20、21及び24位の1、2、3個又は全てのアミノ酸が α 、 α -二置換アミノ酸で置換されており；

グルカゴン関連類縁体ペプチドが、グルカゴンアゴニスト活性を示す、請求項53又は54記載のプロドラッグ。

【請求項56】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、

下記からなる群より選択される少なくとも1個のアミノ酸修飾を有する、配列番号612のアミノ酸配列を含み；

荷電アミノ酸による28位のAsnの置換；

Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択される荷電アミノ酸による28位のAsnの置換；

Asn、Asp又はGluによる28位での置換；

Aspによる28位での置換；

Gluによる28位での置換；

荷電アミノ酸による29位のThrの置換；

Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択される荷電アミノ酸による29位のThrの置換；

Asn、Glu又はLysによる29位での置換；

Gluによる29位での置換；

29位の後への1～3個の荷電アミノ酸の挿入；

29位の後へのGlu又はLysの挿入；

29位の後へのGlu-Lys又はLys-Lysの挿入；或いは

これらの組み合わせ、

並びに、

A群若しくはB群又はこれらの組み合わせから選択される少なくとも1個のアミノ酸修飾

〔ここで、A群は、Gluによる15位のAspの置換及びThr又はAIBによる16位のSerの置換からなる群より選択されるアミノ酸修飾であり；

B群は、下記からなる群より選択されるアミノ酸修飾を含む；

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ペプチドの感受性を低減する、非天然アミノ酸による1位のHisの置換；

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ペプチドの感受性を低減する、非天然アミノ酸による2位のSerの置換；

Phe又はValによる10位のTyrの置換；

Argによる12位のLysの置換；

Ala又はAIBによる20位のGlnの置換；

Gluによる21位のAspの置換；

Ala又はAIBによる24位のGlnの置換；

Leu又はNleによる27位のMetの置換；

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；或いは

これらの組み合わせ〕；

そして、前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、グルカゴンアゴニスト活性を示す、請求項53又は54記載のプロドラッグ。

【請求項57】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、以下の修飾：

(a) G I P アゴニスト活性を付与する 1 位でのアミノ酸修飾、

(b) (1) i 及び i + 4 の位置のアミノ酸の側鎖の間又は j 及び j + 3 の位置のアミノ酸の側鎖の間のラクタム架橋（ここで、i は、12、13、16、17、20 又は 24 であり、j は 17 である）、或いは (2) グルカゴン関連類縁体ペプチドの 16、20、21 及び 24 位の 1、2、3 つ又は全てのアミノ酸が α 、 α -二置換アミノ酸で置換されている、

(c) 27、28 及び 29 の 1、2 つ又は全てにおけるアミノ酸修飾、並びに

(d) 1～6 個の更なるアミノ酸修飾、

を有する配列番号 612 のアミノ酸配列を含み、

G I P 受容体活性化についての前記グルカゴン関連類縁体ペプチドの EC_{50} が約 10 nM 以下である、

請求項 53 又は 54 記載のプロドラッグ。

【請求項 58】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、配列番号 55 の配列又は配列番号 55 の類縁体を含み、前記類縁体が、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 1～3 個のアミノ酸修飾により配列番号 55 と異なり、前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、G L P-1 受容体において天然 G L P-1 の活性の少なくとも 20 % を示す、請求項 53 又は 54 記載のプロドラッグ。

【請求項 59】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、10 個以下のアミノ酸修飾により配列番号 612 と異なるアミノ酸配列を含み、前記修飾が、16、20、21、及び／又は 24 位での A I B による 1 個以上のアミノ酸置換、並びに、ジペプチジルペプチダーゼ I V による切断に対する感受性の低減をもたらす、1 及び／又は 2 位でのアミノ酸修飾を含み、前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、G L P-1 受容体において天然 G L P-1 の活性の少なくとも 20 % を示す、請求項 53 又は 54 記載のプロドラッグ。

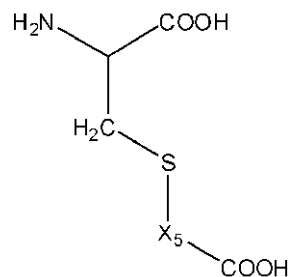
【請求項 60】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、配列番号 942 の配列又はそのオキシ誘導体を含み、前記グルカゴン関連類縁体ペプチドがグルカゴンアンタゴニスト活性を示す、請求項 53 又は 54 記載のプロドラッグ。

【請求項 61】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、配列番号 612 の N 末端からの 2～5 個のアミノ酸残基の欠失、及び、配列番号 612 の 9 位のアスパラギン残基の、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、 β -ホモグルタミン酸、システインのスルホン酸誘導体、又は下記構造：

【化 24】



を有するシステインのアルキル化誘導体による置換、によって修飾されている天然グルカゴンのアミノ酸配列を含み、

式中、 X_5 が、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_2 \sim C_4$ アルケニル又は $C_2 \sim C_4$ アルキニルであり、そして、グルカゴン関連類縁体ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を示す、請求項 53 又は 54 記載のプロドラッグ。

【請求項 6 2】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、一般構造 A－B－C を含み、

A が、下記：

(i) フェニル乳酸 (P L A) ；

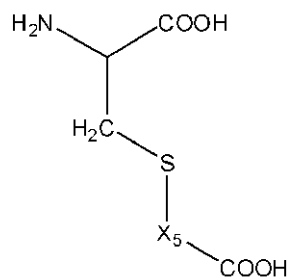
(i i) P L A のオキシ誘導体；

(i i i) 連続した 2 個のアミノ酸がエステル又はエーテル結合を介して結合しているアミノ酸 2～6 個のペプチド、
 からなる群より選択され、

B が、配列番号 6 1 2 のアミノ酸 i ～ 2 6 を表し（ここで i は、3、4、5、6 又は 7 である）、更に、下記 (i v) ～ (i x) からなる群より選択される 1 個以上のアミノ酸置換を含んでもよく；

(i v) G l u、C y s のスルホン酸誘導体、ホモグルタミン酸、β－ホモグルタミン酸、又は下記構造：

【化 2 5】



〔式中、X₅ は、C₁～C₄ アルキル、C₂～C₄ アルケニル若しくは C₂～C₄ アルキニルである〕

を有するシステインのアルキル化誘導体による、9 位（配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる）の A s p の置換；

(v) エステル、エーテル、チオエーテル、アミド又はアルキルアミン結合を介してアシル又はアルキル基に共有結合しているアミノ酸による 1 0、2 0 及び 2 4 位（配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる）の 1 又は 2 個のアミノ酸の置換；

(v i) C y s、L y s、オルチニン、ホモシステイン及びアセチル－フェニルアラニン (A c－P h e) からなる群より選択されるアミノ酸による 1 6、1 7、2 0、2 1 及び 2 4 位（配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる）の 1 又は 2 個のアミノ酸の置換（ここでアミノ酸の群は親水性部分に共有結合している）；

(v i i) システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による 1 5 位（配列番号 6 1 2 の番号付けによる）の A s p の置換；

(v i i i) システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による 1 6 位（配列番号 6 1 2 の番号付けによる）の S e r の置換；

(i x) 配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる 1 6、2 0、2 1 及び 2 4 位の 1 つ以上の位置での A I B による置換；

そして、

C が、

(x) X ；

(x i) X－Y ；

(x i i) X－Y－Z ；

(x i i i) X－Y－Z－R 1 0

（ここで X は、M e t、L e u 又は N l e であり；Y は、A s n 又は荷電アミノ酸であり；Z は、T h r、G l y、C y s、L y s、オルニチン (O r n)、ホモシステイン、アセチル－フェニルアラニン (A c－P h e) 又は荷電アミノ酸であり、R 1 0 は、配列番号 9 1 9～9 2 1 及び 9 5 3 からなる群より選択される）；

(x i v) C 末端カルボキシレートがアミドで置換されている (x) ～ (x i i i)

のいずれか、

からなる群より選択され、

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、グルカゴンアンタゴニスト活性を示す、請求項 5 3 又は 5 4 記載のプロドラッグ。

【請求項 6 3】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、配列番号 1 0 5 1 の配列を含み、配列番号 1 0 5 1 の 4 と 7 位、7 と 1 1 位、1 1 と 1 5 位、1 5 と 1 9 位又は 1 9 と 2 3 位のアミノ酸が、ラクタム架橋を介して又はそのオキシ誘導体を介して結合しており、前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、グルカゴンアンタゴニスト活性及び G L P - 1 アゴニスト活性を示す、請求項 5 3 又は 5 4 記載のプロドラッグ。

10

【請求項 6 4】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、(1) 分子内架橋若しくはアルファ、アルファ-二置換アミノ酸若しくは 1 6 位 (配列番号 6 1 2 の番号付けによる) の酸性アミノ酸又はそれらの組み合わせ、(2) C 末端カルボキシレートに代わって C 末端アミド又はエステル、及び (3) 一般構造 A - B - C を含むペプチド、を含み、

A が、下記：

(i) P L A ；

(i i) P L A のオキシ誘導体；及び

(i i i) 連続した 2 個のアミノ酸がエステル又はエーテル結合を介して結合しているアミノ酸 2 ～ 6 個のペプチド、

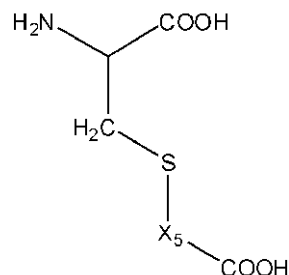
20

からなる群より選択され、

B が、配列番号 6 1 2 のアミノ酸 p ～ 2 6 を表し (ここで p は、3、4、5、6 又は 7 である)、更に、下記 (i v) ～ (x) からなる群より選択される 1 個以上のアミノ酸修飾を含んでもよく：

(i v) G l u、C y s のスルホン酸誘導体、ホモグルタミン酸、β - ホモグルタミン酸、又は下記構造：

【化 2 6】



30

〔式中、X₅ は、C₁ ～ C₄ アルキル、C₂ ～ C₄ アルケニル若しくは C₂ ～ C₄ アルキニルである〕

を有するシステインのアルキル化誘導体による、9 位 (配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる) の A s p の置換；

(v) エステル、エーテル、チオエーテル、アミド又はアルキルアミン結合を介してアシル又はアルキル基に共有結合しているアミノ酸による 1 0、2 0 及び 2 4 位 (配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる) の 1 又は 2 個のアミノ酸の置換；

40

(v i) C y s、L y s、オルチニン、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニン (A c - P h e) からなる群より選択されるアミノ酸による 1 6、1 7、2 0、2 1 及び 2 4 位 (配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる) のうちの 1 又は 2 個のアミノ酸の置換 (ここでアミノ酸の群は親水性部分に共有結合している) ；

(v i i) システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による 1 5 位 (配列番号 6 1 2 の番号付けによる) の A s p の置換；

(v i i i) システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による 1 6 位 (配列番号 6 1 2 の番号付けによる) の S e r の置換；

50

(i x) G l n による 1 7 位の A r g の交換、 A l a による 1 8 位の A r g の交換、 G l u による 2 1 位の A s p の交換、 I l e による 2 3 位の V a l の交換及び A l a による 2 4 位の G l n の交換（配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる）；

(x) G l u による 1 6 位の S e r の交換、 G l u による 2 0 位の G l n の交換又は G l u による 2 4 位の G l n の交換（配列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる）、そして、

C が、

(v i i) X ；

(v i i i) X - Y ；

(i x) X - Y - Z ；

(x) X - Y - Z - R 1 0

10

〔式中、Xは、M e t、L e u 又は N l e であり；Yは、A s n 又は荷電アミノ酸であり；Zは、T h r、G l y、C y s、L y s、オルニチン（O r n）、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン（A c - P h e）又は荷電アミノ酸であり、R 1 0 は、配列番号 1 0 2 1、1 0 2 6、1 0 2 7 及び 1 0 5 0 からなる群より選択される〕からなる群より選択され、

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、グルカゴンアンタゴニスト活性及び G L P - 1 アゴニスト活性を示す、請求項 5 3 又は 5 4 記載のプロドラッグ。

【請求項 6 5】

20

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドの 1 6、2 0、2 1 及び 2 4 位のうちの 1、2、3 つ又は全てが、 α 、 α -二置換アミノ酸で置換されている、請求項 5 5 又は 5 7 記載のプロドラッグ。

【請求項 6 6】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、A I B による 1 6、2 0 若しくは 2 4 位のアミノ酸の置換、2 7 ~ 2 9 位での、2 8 及び 2 9 位での、若しくは 2 9 位でのアミノ酸の欠失、又はこれらの組み合わせを含む、請求項 5 6 記載のプロドラッグ。

【請求項 6 7】

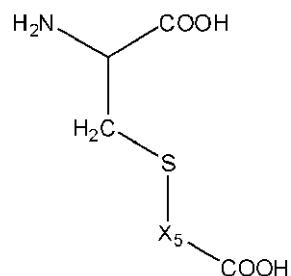
前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが配列番号 9 4 2 のオキシ誘導体である、請求項 6 0 記載のプロドラッグ。

30

【請求項 6 8】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、 β -ホモグルタミン酸、又は下記構造：

【化 2 7】



40

〔式中、X₅は、C₁ ~ C₄ アルキル、C₂ ~ C₄ アルケニル又は C₂ ~ C₄ アルキニルである〕

を有するシステインのアルキル化誘導体による、配列番号 6 1 2 の 9 位の A s p の置換を含む、請求項 6 1 記載のプロドラッグ。

【請求項 6 9】

下記の少なくとも 1 つが当てはまることを特徴とする、請求項 6 2 記載のプロドラッグ：

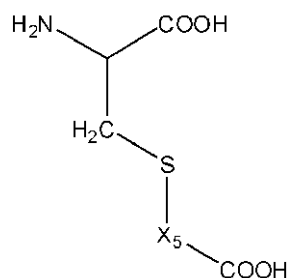
A が、P L A のオキシ誘導体であるか、又は、連続した 2 個のアミノ酸がエステル又はエーテル結合を介して結合しているアミノ酸 2 ~ 6 個のペプチドである；

50

Bが、下記 (i) ~ (iii) からなる群より選択される 1 個以上のアミノ酸修飾を含む：

(i) β -ホモグルタミン酸、又は下記構造：

【化 28】



10

〔式中、 X_5 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_2 \sim C_4$ アルケニル若しくは $C_2 \sim C_4$ アルキニルである〕

を有するシステインのアルキル化誘導体による、9 位（配列番号 612 のアミノ酸番号付けによる）の Asp の置換；

(ii) エステル、エーテル、チオエーテル、アミド又はアルキルアミン結合を介してアシル又はアルキル基に共有結合しているアミノ酸による、10、20 及び 24 位（配列番号 612 のアミノ酸番号付けによる）のうちの 1 又は 2 個のアミノ酸の置換；

(iii) 配列番号 612 のアミノ酸番号付けによる 16、20、21 及び 24 位のうちの 1 つ以上の位置での AIB による置換；或いは

20

C が、X 又は X-Y である。

【請求項 70】

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、ラクタム架橋を介して結合している配列番号 1051 の配列を含むグルカゴン関連類縁体ペプチドのオキシ誘導体である、請求項 63 記載のプロドラッグ。

【請求項 71】

下記の少なくとも 1 つが当てはまることを特徴とする、請求項 64 記載のプロドラッグ：

前記グルカゴン関連類縁体ペプチドが、アルファ、アルファ-二置換アミノ酸を含む；

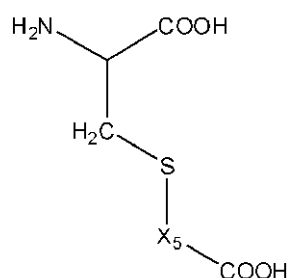
30

A が、PLA のオキシ誘導体であるか、又は、連続した 2 個のアミノ酸がエステル若しくはエーテル結合を介して結合しているアミノ酸 2 ~ 6 個のペプチドである；

B が、下記 (i) ~ (ii) からなる群より選択される 1 個以上のアミノ酸修飾を含む：

(i) β -ホモグルタミン酸、又は下記構造：

【化 29】



40

〔式中、 X_5 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_2 \sim C_4$ アルケニル若しくは $C_2 \sim C_4$ アルキニルである〕

を有するシステインのアルキル化誘導体による、9 位（配列番号 612 のアミノ酸番号付けによる）の Asp の置換；

(ii) エステル、エーテル、チオエーテル、アミド又はアルキルアミン結合を介してアシル又はアルキル基に共有結合しているアミノ酸による、10、20 及び 24 位（配

50

列番号 6 1 2 のアミノ酸番号付けによる) のうちの 1 又は 2 個のアミノ酸の置換;
或いは、

C が、X 又は X-Y である。

【請求項 7 2】

請求項 4 8 ~ 7 3 のいずれか 1 項記載のプロドラッグと薬学的に許容される担体とを含む滅菌医薬組成物。

【請求項 7 3】

高血糖症又は糖尿病を治療する方法であって、請求項 7 2 記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む方法。

【請求項 7 4】

食欲を抑制する、体重増加を減少する又は減量を誘導する方法であって、請求項 7 2 記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む方法。

【請求項 7 5】

腸管の一過性麻痺を、そのような必要性のある患者において起こす方法であって、請求項 7 2 記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む方法。

【請求項 7 6】

低血糖症の治療又は予防を、そのような必要性のある患者において行う方法であって、請求項 7 2 記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む方法。

【請求項 7 7】

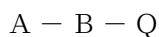
第 2 治療剤を投与することを更に含む、請求項 7 3 ~ 7 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7 8】

第 2 治療剤が、グルカゴン関連類縁体ペプチド又は第 2 プロドラッグである、請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 7 9】

一般構造：



を含む複合体。

〔式中、

Q は、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質であり、

A は、アミノ酸又はヒドロキシル酸であり、

B はアミノ酸であり、A-B は、B と Q のヒドロキシル基との間のエステル結合の形成により Q に結合しているジペプチドであり、ここで、Q からの A-B の化学切断半減期 ($t_{1/2}$) は、生理学的条件下で標準的 P B S 溶液中において、少なくとも約 1 時間から約 1 週間である〕

【請求項 8 0】

A、B、又は A-B が結合している Q のアミノ基が、非標準アミノ酸 (non-coded amino acid) である、請求項 7 9 記載の複合体。

【請求項 8 1】

デポ・ポリマーが A 又は B の側鎖に結合している、請求項 7 9 又は 8 0 記載の複合体。

【請求項 8 2】

前記デポ・ポリマーが、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及び乳酸とグリコール酸のコポリマーからなる群より選択される、請求項 8 1 記載の複合体。

【請求項 8 3】

前記デポ・ポリマーの分子量が、約 20,000 ~ 約 120,000 ダルトンの範囲から選択される、請求項 8 1 記載の複合体。

【請求項 8 4】

前記デポ・ポリマーが、40,000 ~ 80,000 ダルトンの範囲から選択される分子量を有するポリエチレングリコールである、請求項 8 1 記載の複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 85】

前記デポ・ポリマーが、共有結合 C 1 6 又は C 1 8 アシル又はアルキル基への結合を介して A 又は B の側鎖に結合している、請求項 8 1 記載の複合体。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ペプチドに基づいた薬剤は、比較的短い作用持続時間及び変動する療指数を有する極めて効果的な医薬である。本開示は、プロドラッグ誘導体が薬剤の作用開始を遅延し、半減期を延長するように設計されている、ペプチドに基づいたプロドラッグを対象とする。遅延された作用開始は、プロドラッグの活性化の前にその全身分布を可能にするという点において有利である。したがって、プロドラッグの投与は、投与時のピーク活性により引き起こされる合併症を排除し、母体薬剤の治療指数を増加させる。

10

【0002】

ペプチド及びタンパク質アゴニストの受容体認識、続くプロセッシングは、多くのペプチド及びタンパク質に基づいた薬剤の主要な分解の経路である。したがって、受容体へのペプチド薬剤の結合は、生物学的刺激をもたらすが、続く、ペプチド又はタンパク質の酵素分解を介したペプチド／タンパク質誘導薬理学の不活性化も開始する。本開示によると、プロドラッグは、対応する受容体によるプロドラッグの認識を阻害する戦略に基づいて、ペプチド又はタンパク質の生物学的半減期を延長するように調製することができる。

【0003】

20

本明細書に開示されているプロドラッグは、最終的に、受容体により認識されうる構造に化学的に変換され、この化学変換の速度は、インビボでの生物学的作用の開始時間及び持続時間を決定する。本出願に開示された分子設計は、追加的な化学添加剤又は酵素に依存しないで、分子内化学反応に依存している。プロドラッグ化学は、脂肪族ヒドロキシル基が活性部位に収容されうる場合及び化学的に修飾された誘導体が活性の不十分なペプチド又はタンパク質を生じる場合、ペプチド及びタンパク質に基づいた薬剤に広く適用可能である。この点を例示する特定の例は、活性部位のセリンに、セリンプロテアーゼのファミリーの可逆セリンエステルを形成することである。

【0004】

インスリンは、奇跡的なペプチドホルモンである。ほとんど全ての形態の糖尿病においてグルコースを低下する、比類のない能力を示す。残念ながら、その薬理学は、グルコース感受性ではなく、したがって、生命を脅かす低血糖症をもたらしうる過剰作用の能力がある。相反する薬理学は、インスリン治療の顕著な特徴であり、そのため、低血糖症を生じることなく血中グルコースを正常化することが極めて困難である。更に、天然インスリンは、作用の持続時間が短く、基礎グルコースの制御における使用に適するように修飾する必要がある。インスリン作用の開始を遅延する確立された手法には、溶解性の低減及びアルブミン結合が含まれる。プロドラッグ化学は、投与部位からのクリアランス及び高度に規定された濃度での血漿中の平衡化の後、インスリン作用の開始及び持続時間を正確に制御する機会を提供する。

30

【0005】

40

インスリン構造機能関係を詳述する豊富な研究の歴史が、プロドラッグを成功裏に用いることができるアミノ酸の位置を導く。インスリンは、酵素プロセッシングを介して、低効力の単鎖プロインスリンから生合成的に誘導される二本鎖ヘテロ二量体である。ヒトインスリンは、ジスルフィド結合により一緒に結合し、合計で 51 個のアミノ酸を有する、2つのペプチド鎖（「A 鎖」（配列番号 613）及び「B 鎖」（配列番号 614）から構成される。B 鎖の C 末端領域及び A 鎖の 2 つの末端は、インスリン受容体への高親和性結合の部位を構築する三次元構造に関係する。ヒドロキシル基の選択的挿入は、この活性部位領域内の多数の位置で効力を失うことなく収容されうる。特定のジペプチドによるこれらの活性部位のヒドロキシル基の化学エステル化は、活性を著しく減少させ、適切なプロドラッグとして役立つ。

50

【0006】

プレプログルカゴンは、158アミノ酸前駆体ポリペプチドであり、異なる組織においてプロセッシングされて、グルコースホメオスタシス、インスリン分泌、胃排出及び腸管成長、並びに食物摂取の調節を含む多種多様な生理学的機能に関わる、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 及びオキシントモジュリン (OXM) を含む多数の異なるプログルカゴン誘導ペプチドを形成する。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アミノ酸ペプチド (配列番号612) 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産生される。GLP-1 (7-36) アミド (配列番号602; C末端はアルギニンアミドである) 又はGLP-1 (7-37) 酸 (配列番号601; C末端はグリシンである) は、GLP受容体で実質的に同等の活性を示す、生物学的に活性のある形態のGLP-1である。

10

【0007】

グルカゴンは、重篤な低血糖症の緊急の治療に使用される命を救う医薬である。オキシントモジュリンは、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ている。GLP-1様アゴニストによる臨床研究は、このペプチドのファミリーがI型糖尿病の有効な治療であることを実証している。加えて、このグルコース依存性作用のため、インスリン療法よりも本質的に安全であり、したがって低血糖症の可能性を排除する。構造活性関係研究は、これらの3つのペプチド (グルカゴン、GLP-1 及びオキシントモジュリン) のそれぞれのN末端ヒスチジンが、完全な作用のために特に重要であることを示し、N末端延長形態は、生物学的効力を激しく減少させることを示した。

20

【0008】

これらの3つのペプチドの治療上の使用に関する一つの欠点は、これらの血漿における顕著に短い半減期 (およそ2分間) である。したがって、妥当な血糖制御を得るために、天然グルカゴン関連類縁体ペプチドを、長期間連続的に投与する必要がある。短い半減期は、第2と第3のアミノ酸の間を切断するジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) による急速な分解によりもたらされる。この切断は、天然ペプチドを不活性にするばかりでなく、グルカゴン及びGLP-1の場合では、短縮形態は、それらの対応する受容体において機能的アンタゴニストとなる。したがって、グルカゴン、GLP-1 及びオキシントモジュリン、並びの関連するペプチドの、これらの構造の薬剤作用の完全な治療可能性を実現する長期作用変種の必要性が存在する。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

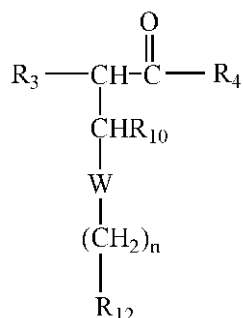
一つの実施態様によると、生体活性ポリペプチドのプロドラッグ誘導体は、好ましくは、エステル結合を介して生体活性ポリペプチドにジペプチドを共有結合させることによって調製される。一つの実施態様において、ジペプチドは、対応する受容体又は補助因子と相互作用する生体活性ポリペプチドの能力を妨げる位置で、生体活性ポリペプチドに共有結合する。続く、生理学的条件下及び酵素作用の不在下でのジペプチドの除去は、ポリペプチドの完全な活性を回復する。

40

【0010】

一つの実施態様によると、式I:

【化 1】



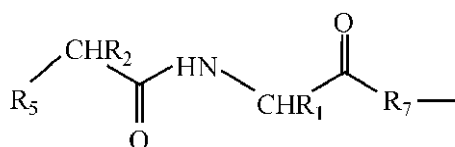
I

10

の一般構造を含むプロドラッグが提供され、
式中、

R_3 は、 NH_2 、アミノ酸配列及び下記：

【化 2】



からなる群より選択され、

R_4 は、 $-\text{OH}$ 、 NH_2 又はアミノ酸配列であり、

20

R_{10} は、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル及び $(\text{CH}_2)_n$ ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) からなる群より選択され、

W は、 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール又は結合であり、

n は、 $0 \sim 3$ の整数であり、

R_1 及び R_2 は、 H 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{OH}$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{SH}$ 、 $(\text{C}_2 \sim \text{C}_3 \text{ アルキル}) \text{SCH}_3$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{CONH}_2$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{COOH}$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{NH}_2$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル}) \text{NHC}(\text{NH}_2)_2$ 、 $(\text{C}_4 \sim \text{C}_6)$ シクロアルキル、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})$ ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) R_9 及び CH_2 ($\text{C}_5 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、

30

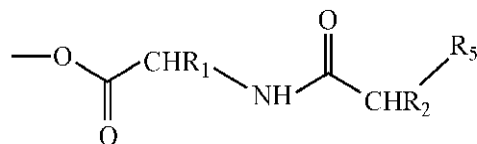
R_5 は、 OH 又は NH_2 であり、

R_9 は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、 NH_2 又は OH であり、

R_7 は、 $-\text{O}-$ アミノ酸又は O であり、

R_{12} は、 $-\text{OH}$ 、 H か、又は下記：

【化 3】

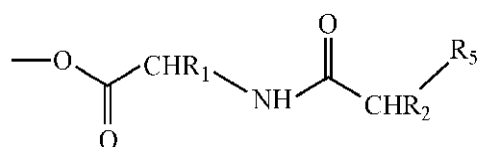


40

であるが、

但し、 R_{12} が下記：

【化 4】



である場合、 R_3 は下記：

$$\text{R}_5-\text{CHR}_2-\text{C}(=\text{O})\text{HN}-\text{CHR}_1-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_7$$

更に、 R_3 が、 NH_2 又はアミノ酸配列である場合、 $R_{1,2}$ は下記：

$$\text{---O---C(=O)---CHR}_1\text{---NH---C(=O)---CHR}_2\text{---R}_5$$

幾つかの実施態様において、 R_3 又は R_4 は、生体活性ペプチドのアミノ酸配列である。より特定の実施態様において、 R_3 は、下記構造：

$$\begin{array}{c} | \\ \text{CHR}_{10} \\ | \\ \text{W} \\ | \\ (\text{CH}_2)_n \\ | \\ \text{R}_{12} \end{array}$$

幾つかの実施態様において、 R_3 が下記：

$$\begin{array}{c} \text{CHR}_2 \\ \diagup \\ \text{R}_5 \end{array} \text{C}(=\text{O})\text{HN}-\begin{array}{c} \text{CHR}_1 \\ \diagdown \\ \text{R}_7 \end{array} \text{C}(=\text{O})$$
$$\begin{array}{c} | \\ \text{CHR}_{10} \\ | \\ \text{W} \\ | \\ (\text{CH}_2)_n \\ | \\ \text{R}_{12} \end{array}$$

一つの実施態様において、 R_3 は、下記：

$$\text{R}_5-\text{CHR}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{HN}-\text{CHR}_1-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{R}_7-$$

【 0 0 1 4 】

10

$$\text{—O—C(=O)—CHR}_1\text{—NH—C(=O)—CHR}_2\text{—R}_5$$

【 0 0 1 5 】

20

$$\begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \text{R}_3\text{—HN—CH—C—R}_4 \\
 | \\
 \text{CHR}_{10} \\
 | \\
 (\text{CH}_2)_n \\
 | \\
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \text{O—C—CHR}_1\text{—NH—C—CHR}_2\text{—R}_5 \\
 \parallel \\
 \text{O}
 \end{array}$$

II

30

40

一つの実施態様において、ジペプチドは、セリン又はトレオニン残基のヒドロキシル基を介して生体活性ポリペプチドに結合している（すなわち、式 I I の化合物において、 n は 0 であり、 R_{10} は H であるか、又は n は 0 であり、 R_1 は CH_3 である）。より詳細には、修飾されたセリン又はトレオニン残基は、ジペプチド結合が、天然受容体又は基質と相互作用する生体活性ポリペプチドの能力を妨げるように、タンパク質結合ドメイン又は活性部位に配置されている。

式 I I の一般構造のプロドラッグに関して、 R_3 又は R_4 の少なくとも一方は、生体活性ペプチドのアミノ酸を表す。幾つかの実施態様において、 R_3 及び R は、生体活性ペプチドのアミノ酸を表す。

幾つかの実施態様において、プロドラッグは、一般式 A-B-Q を含み、ここで、A は、B に共有結合しているヒドロキシ酸又はアミノ酸であり、B は、エステル結合を介して Q に共有結合しているアミノ酸であり、そして Q は、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質、例えばグルカゴンスーパーファミリーペプチド（例えば、グルカゴン関連類縁体ペプチド）であり、Q からの A-B の化学切断半減期（ $t_{1/2}$ ）は、生理学的条件下、PBS 中で約 1 週間以下である。

一つの実施態様によると、一般構造 A-B-Q を含む非触媒自己切断複合体が提供され、ここで、Q は、既知の生体活性ペプチドであり、A-B は、ジペプチドを表す。より詳細には、A は、アミノ酸又はヒドロキシ酸のいずれかであることができ、B は、アミノ酸である。ジペプチド (A-B) は、対応する受容体又は補助因子と相互作用する Q の能力を妨げる位置で、エステル結合を介して Q に共有結合している。一つの実施態様において、Q は、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質、例えばグルカゴン関連類縁体ペプチドのようなグルカゴンスーパーファミリーペプチドであり、そして A-B は、下記構造：

$$\text{R}_5-\text{CHR}_2-\text{C}(=\text{O})\text{HN}-\text{CHR}_1-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_7$$

式中、

R₁ 及び R₂ は、H、C₁ ~ C₄ アルキル、(C₁ ~ C₄ アルキル) OH、(C₁ ~ C₄ 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、(C₄ ~ C₆) シクロアルキル、(C₀ ~ C₄ アルキル) (C₆ ~ C₁₀ アリール) R₉ 及び CH₂ (C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、

R_9 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 NH_2 又は OH であり、そして

R₇ は、 $-O-$ アミノ酸又はOである。

一つの実施態様において、一般構造 A-B-Q を有する複合体を含む注射用デポ組成物が提供され、ここで

Bは、エステル結合を介してQに共有結合しているアミノ酸であり、そしてQは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質、例えばグルカゴン関連類縁体ペプチドのようなグルカゴンスーパーファミリーペプチドであり、ジペプチドA-Bは、更に、A又は

Bの側鎖に結合しているデポ・ポリマーを含む。デポ・ポリマーは、複合体A-B-Qが注射部位において有効に捕捉されているか、そうでなければその標的（例えば、受容体）と相互作用することができない十分な大きさであるように選択される。QからのA-Bの化学切断は、ジケトピペラジン又はジケトモルホリンを産生し、活性な生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を、投与後に所定の持続期間にわたって制御された方法で患者に放出する。

【0021】

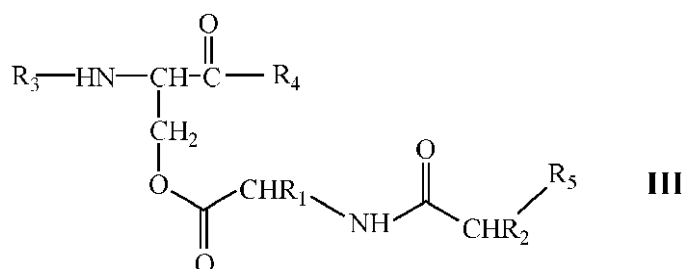
一つの実施態様によると、生体活性ペプチドは、インスリン、グルカゴン及びGLP-1、並びに前記ポリペプチドの誘導体から選択され、ここでポリペプチドの誘導体は、天然配列に対して1～6個のアミノ酸置換を含む。置換するアミノ酸は、天然アミノ酸又は合成アミノ酸のいずれかであることができ、一つの実施態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換を表す。

10

【0022】

一つの実施態様において、プロドラッグは、式III：

【化14】



20

〔式中、R₃は、生体活性タンパク質（例えば、グルカゴン、GLP-1又はインスリンペプチド）のN末端アミノ酸を含み、R₄は、生体活性タンパク質（例えば、グルカゴン、GLP-1又はインスリンペプチド）のC末端アミノ酸を含み、R₁及びR₂は、H、C₁～C₃アルキル、CH₂CH(CH₃)₂、CH(CH₃)(CH₂CH₃)、(C₄～C₅)シクロアルキル、CH₂(C₆～C₁₀アリール)及びCH₂(C₅～C₉ヘテロアリール)からなる群より独立して選択され、そしてR₅は、OH又はNH₂である〕で示される一般構造を含み、ここで非酵素活性化t_{1/2}は、1～100時間であり、より典型的には、12～72時間であり、一つの実施態様では、t_{1/2}は24～48時間である。

30

【0023】

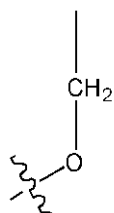
一つの実施態様において、R₁は、CH₂(CH₃)₂、(C₄～C₅)シクロアルキル、CH₂(C₆アリール)及びCH₂(C₅～C₆ヘテロアリール)からなる群より選択され、R₂は、C₄～C₅)シクロアルキル、CH₂(C₆アリール)及びCH₂(C₅～C₆ヘテロアリール)からなる群より選択され、そしてR₅は、OH又はNH₂である。

【0024】

プロドラッグが式IIIの一般構造を含む幾つかの実施態様において、R₃は、下記構造：

40

【化15】



の側鎖を含むアミノ酸のN末端側である、生体活性タンパク質のN末端側アミノ酸を含み、そしてR₄は、前記アミノ酸のC末端側である、生体活性タンパク質のC末端側アミノ

50

酸を含む。

【0025】

プロドラッグが式 I、II 又は III の一般構造を含む幾つかの態様において、生体活性ペプチド、生体活性ポリペプチド又は生体活性タンパク質は、グルカゴンスーパーファミリーペプチド（例えば、グルカゴン関連類縁体ペプチド）、オステオカルシン、インスリン、及び前記のうちの 1 つの類縁体、誘導体又は結合体からなる群より選択される。

【0026】

幾つかの態様において、グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH；配列番号 657）、血管作用性小腸ペプチド（VIP；配列番号 658）、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド 27（PACAP-27；配列番号 659）、ペプチドヒスチジンメチオニン（PHM；配列番号 660）又はセクレチン（配列番号 661）、グルカゴン（配列番号 612）、エキセンディン-4（配列番号 662）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）（配列番号 601 として提供されるアミノ酸 7～37）、グルカゴン様ペプチド-2（GLP-2）（配列番号 663）、GIP（配列番号 664）若しくはオキシントモジュリン（配列番号 665）、及び前記のうちの 1 つの類縁体、誘導体、又は結合体からなる群より選択される。

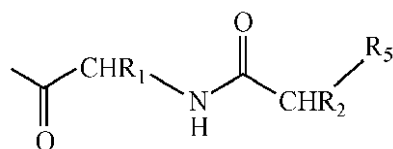
【0027】

プロドラッグが式 I、II 又は III の一般構造を含む幾つかの態様において、グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、グルカゴン関連類縁体ペプチドである。

【0028】

一つの実施態様によると、インスリンのプロドラッグ誘導体が提供され、ここでインスリンプロドラッグは、配列番号 626 の配列を含む A 鎖及び配列番号 628 の配列を含む B 鎖を含み、下記の式：

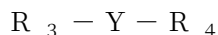
【化 16】



のジペプチドは、配列番号 626 の 1、4 若しくは 21 位又は配列番号 628 の 1、5、12 若しくは 21 位に配置されたアミノ酸の側鎖にエステル結合を介して結合しており、式中、 R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $\text{CH}_2(C_6 \sim C_{10})$ アリール）及び $\text{CH}_2(C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール）からなる群より独立して選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

【0029】

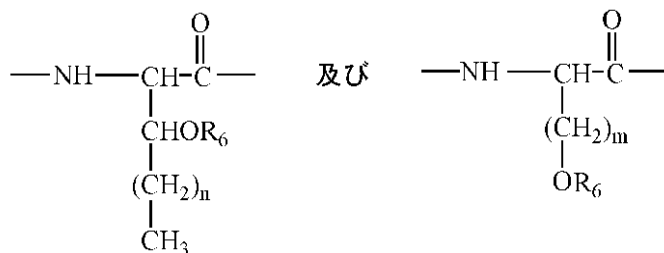
一つの実施態様によると、GLP-1 又はグルカゴンのプロドラッグ類縁体が提供され、ここでプロドラッグは、下記の一般式：



で示されるポリペプチドを含み、

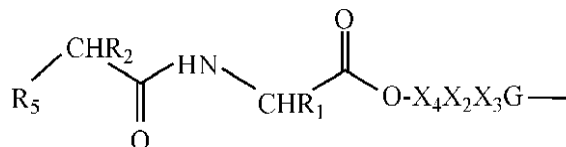
式中、Y は、下記：

【化 17】



からなる群より選択される構造であり、

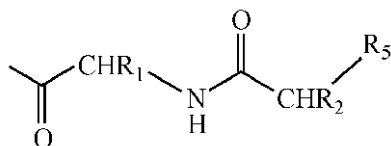
【化 1 8】



10

20

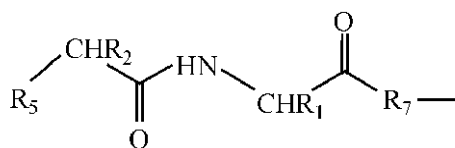
【化 1 9】



30

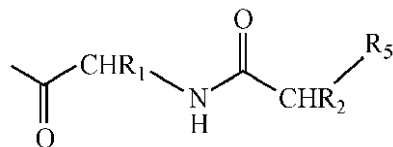
40

【化 2 0】



である場合、 R_6 は H であり、 R_6 が下記：

【化 2 1】



である場合、 R_3 は $X_1 X_2 X_3 G$ - (配列番号 6 2 1) であり、

更に、 R_6 が H である場合、 R_3 は $X_1 X_2 X_3 G$ - (配列番号 6 2 1) ではない。

【0030】

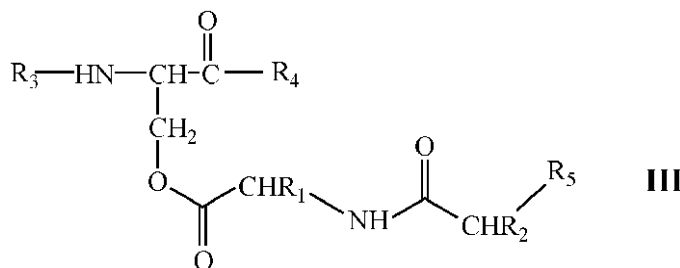
一つの実施態様において、 R_1 は、 $CH_2 (CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2 (C_6 \sim C_{10})$ アリール) 及び $CH_2 (C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2 (C_6 \sim C_{10})$ アリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

10

【0031】

一つの実施態様において、式 III :

【化 2 2】



20

の構造を含む GLP-1 プロドラッグが提供され、

式中、

R_3 は、 $R_5 HAQG$ (配列番号 6 3 9)、 $R_5 FAQG$ (配列番号 6 4 0)、 $R_5 Y A Q G$ (配列番号 6 4 1) からなる群より選択されるアミノ酸であり、

R_4 は、下記：

$FTSDVSSYLEGQA AKEFI A W L V K G R G$ (配列番号 6 0 3)、

30

$FTSDVSSYLEGQA AKEFI A W L V K G R$ - アミド (配列番号 6 0 4) 及び

$FTSDVSSYLEGQA AKEFI A W L V K G X_{14} P S S G A P P P S$ - アミド (配列番号 6 0 5) (ここで X_{14} は、Arg 又は Gly である)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、

R_5 は、 NH_2 又は HO であり、そして

R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $CH_2 CH (CH_3)_2$ 、 $CH (CH_3) (CH_2 CH_3)$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2 (C_6 \sim C_{10})$ アリール) 及び $CH_2 (C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

40

【0032】

一つの実施態様において、 R_1 は、 $CH_2 (CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2 (C_6)$ アリール) 及び $CH_2 (C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2 (C_6)$ アリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図 1】図 1 は、GLP-1 類縁体 $HO-FAEGTFTSDVSSYLEGQA AKEFI A W L V K G X P S S G A P P P S$ (配列番号 6 0 7; $HO-F_7$, GLP (8-36) - CEX) を調製する合成スキームである。

50

【図2】図2は、GLP-1 (●) に対する GLP-1 類縁体 HO-F₇, GLP (8-36)-CEX (○) のバイオアッセイの結果を示すグラフである。

【図3】図3は、エステル結合したアミン求核剤ジペプチドプロドラッグを調製する合成スキームである。

【図4】図4は、エステル結合したヒドロキシル求核剤ジペプチドプロドラッグを調製する合成スキームである。

【図5】図5A及び5Bは、アミン求核剤を有するプロドラッグによる (図5A) 及びヒドロキシル求核剤を有するプロドラッグによる (図5B) エステル結合の切断によって、活性化化合物と、ジケトピペラジン又はジケトモルホリンをそれぞれ生じることを表す概略図である。

10

【図6】図6A~6Dは、4つのプロドラッグ (A: HO-F₅dV₆-O-F₇, GLP (8-36)-CEX; 6B: F₅V₆-O-F₇, GLP (8-36)-CEX; 6C: HO-F₅F₆-O-F₇, GLP (8-36)-CEX 及び 6D: G₅V₆-O-F₇, GLP (8-36)-CEX) の構造と、それぞれの t_{1/2} 時間を示す。

【図7】図7は、適切な GLP-1 対照に対する G₅V₆-O-F₇, GLP (8-36)-CEX の相対的効力を経時的に示すバイオアッセイデータを表す棒グラフである。

【図8】図8は、適切な GLP-1 対照に対する HO-F₅F₆-O-F₇, GLP (8-36)-CEX の相対的効力を経時的に示すバイオアッセイデータを表す棒グラフである。

【図9】図9は、GLP-1 (■) に対する内部セリン/トレオニン GLP 誘導体 (F₇Q₉S₁₁GLPCEX◆ 及び F₇Q₉T₁₁GLPCEX◇) のバイオアッセイの結果を示すグラフである。

20

【図10】図10は、プロドラッグ F₇Q₉-S₁₁-(Gly-Gly)-GLP-CEX の動力学的プロフィールを示す、プロドラッグと薬剤の経時的な濃度の対数をプロットしたグラフである。このデータは、経時的なプロドラッグ (◆) の消滅及び薬剤 (□) の出現を示す。ここに示されている結果は、本明細書に開示されているプロドラッグの典型的なものである。

【図11】図11A~11Cは、(H7F), (E9Q), [T11S-Oβ-(Gly-Gly)], GLP (8-36)-CEX の合成の合成スキームを提示する。

【図12】図12は、DIOマウスにおけるグルコース注射の後の、PBSビヒクル、GLP-1 に基づいたペプチド (ペプチドB又はDを2nmol/kg) 又は2つの異なる GLP-1 に基づいたペプチドのプロドラッグ (ペプチドA、C又はEを2nmol/kg) の注射に対する反応の時間 (分) の関数としての血中グルコース (mg/dl) のグラフを表す。

30

【図13】図13は、DIOマウスにおけるグルコース注射の後の、PBSビヒクル、GLP-1 に基づいたペプチド (ペプチドFを2nmol/kg) 又は2つの異なる GLP-1 に基づいたペプチドのプロドラッグ (ペプチドG又はHを2nmol/kg) の注射に対する反応の時間 (分) の関数としての血中グルコース (mg/dl) のグラフを表す。

【図14】図14は、DIOマウスにおけるグルコース注射の後の、PBSビヒクル、GLP-1 に基づいたペプチド (ペプチドD又はFを0.67nmol/kg) 又は GLP-1 に基づいたペプチドのプロドラッグ (ペプチドE又はGを0.67nmol/kg) の注射に対する反応の時間 (分) の関数としての血中グルコース (mg/dl) のグラフを表す。

40

【図15】図15は、DIOマウスにおけるグルコース注射の後の、ビヒクル対照、GLP-1 に基づいたペグ化ペプチドの15又は70nmol/kg (ペプチドY及びF-Peg) 又は GLP-1 に基づいたペプチドのプロドラッグの15又は70nmol/kg (ペプチドZ又はG-Peg) の注射に対する反応の時間 (分) の関数としての血中グルコース (mg/dl) のグラフを表す。

【図16】図16は、ビヒクル対照、GLP-1 に基づいたペグ化ペプチドの15又は70nmol/kg (ペプチドY及びF-Peg) 又は GLP-1 に基づいたペプチドのプロドラッグの15又は70nmol/kg (ペプチドZ又はG-Peg) を注射したDIOマウスの体重の総変化のグラフを表す。

50

【図 17】図 17 は、ビヒクル対照、G L P-1 に基づいたペグ化ペプチドの 15 又は 70 nmol/kg (ペプチド Y 及び F-P e g) 又は G L P-1 に基づいたペプチドのプロドラッグの 15 又は 70 nmol/kg (ペプチド Z 又は G-P e g) を注射した D I O マウスの総食餌摂取のグラフを表す。

【図 18】図 18 は、特定のグルカゴンスーパーファミリーペプチドのアミノ酸配列の整列である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

〔定義〕

本発明を記載し、請求するに際し、以下の用語を下記に記載した定義に従って使用する。

【0035】

本明細書で使用されるとき、用語「プロドラッグ」は、その薬理学的効果を示す前に生体内変化を受ける任意の化合物と定義される。

【0036】

「生体活性ポリペプチド」は、生物学的効果をインビトロ及び／又はインビボで発揮することができるポリペプチドを意味する。

【0037】

本明細書で使用されるとき、あるペプチドに対する一般的な参照は、修飾されたアミノ及びカルボキシ末端を有するペプチドも包含することが意図される。例えば、末端カルボン酸の代わりにアミノ基を含むアミノ酸鎖は、標準的なアミノ酸を示すアミノ酸配列に包含されることが意図される。本明細書で使用されるとき、用語「O-アミノ酸」又は「HO-アミノ酸」は、アミノ酸又はアミノ酸配列の N 末端の天然アミノ基が、酸素基又はヒドロキシル基にそれぞれ置換されているアミノ酸を示す。例えば、「O-H A E G」又は「H O-H A E G」は、N 末端の天然アミノ基が、酸素基又はヒドロキシル基にそれぞれ置換されているアミノ酸配列 (H A E G) を示すことが意図される。本明細書で使用されるとき、用語「ヒドロキシル酸」又は「ヒドロキシル酸」は、天然アルファアミノ基がヒドロキシル基で置換されているアミノ酸を意味する。同様に、名称「-アミノ酸-アミド」は、天然カルボキシ基がアミド基で置換されているアミノ酸配列を表す。

【0038】

立体化学を特定していないアミノ酸の名称は、アミノ酸又はラセミ混合物の L 又は D 型のいずれも包含することが意図される。

【0039】

本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容される担体」には、リン酸緩衝食塩水、水、油／水又は水／油乳剤のような乳剤、並びに多様な種類の湿潤剤のような標準的な医薬担体のいずれかが含まれる。この用語は、また、ヒトを含む動物における使用が米国連邦政府の規制当局により承認されているか又は米国薬局方に記載されている作用物質のいずれかを包含する。

【0040】

本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容される塩」は、母体化合物の生物学的活性を保持し、生物学的にも非生物学的にも有害ではない化合物の塩を意味する。本明細書に開示されている化合物の多くは、アミノ及び／若しくはカルボキシル基又は同様の基の存在によって酸性及び／又は塩基性の塩を形成することができる。

【0041】

薬学的に許容される塩基性付加塩は、無機又は有機塩基から調製することができる。無機塩基から誘導される塩には、単なる例として、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム及びマグネシウム塩が含まれる。有機塩基から誘導される塩には、第一級、第二級及び第三級アミンの塩が含まれるが、これらに限定されない。

【0042】

薬学的に許容される酸性付加塩は、無機又は有機塩基から調製することができる。無機

10

20

30

40

50

酸から誘導される塩には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などが含まれる。有機酸から誘導される塩には、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、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、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などが含まれる。

【0043】

本明細書で使用されるとき、用語「治療する」には、特定の障害若しくは状態を予防すること、又は特定の障害若しくは状態に関連する症状を緩和すること、及び／又は前記症状を防止若しくは排除することが含まれる。例えば、本明細書で使用されるとき、用語「糖尿病を治療する」は、一般に血中グルコースレベルをほぼ正常なレベルに維持すること

10

【0044】

本明細書で使用されるとき、プロドラッグの「有効」量又は「治療有効量」は、所望の効果をもたらすプロドラッグの非毒性であるが十分な量を意味する。例えば、一つの望ましい効果は、高血糖症の予防又は治療である。「有効」である量は、個体の年齢及び全身状態、投与様式などによって被験者毎に変わる。したがって、正確な「有効量」を規定することがいつも可能というわけではない。しかし、個別の症例における適切な「有効」量は、慣用的な実験を使用して当業者によって決定することができる。

【0045】

用語「非経口的」は、消化管を介するのではなく、皮下、筋肉内、脊髄内又は静脈内のような他の経路によることを意味する。

20

【0046】

用語「グルカゴンスーパーファミリーペプチド」は、N末端及びC末端領域の構造に関連するペプチド群を意味する（例えば、Sherwood et al., Endocrine Reviews 21: 619-670 (2000)を参照すること）。この群のメンバーには、全てのグルカゴン関連類縁体ペプチド、また、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH；配列番号657）、血管作用性小腸ペプチド（VIP；配列番号658）、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド27（PACAP-27；配列番号659）、ペプチドヒスチジンメチオニン（PHM；配列番号660）及びセクレチン（配列番号661）、並びに天然ペプチドに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個までのアミノ酸修飾を有するそれらの類縁体、誘導体又は結合体が含まれる。グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、好ましくは、対応する受容体と相互作用する能力を保持する。例えば、グルカゴン、並びにグルカゴン類縁体、誘導体及び結合体は、好ましくは、グルカゴン受容体と相互作用する能力を保持する。

30

【0047】

特に記述のない限り、グルカゴンスーパーファミリーペプチドにおける、あるアミノ酸位置（例えば、プロドラッグ部分、結合体部分、親水性ポリマーの結合、アシル化又はアルキル化、アミノ酸修飾などのための）に対するあらゆる参照は、天然グルカゴンアミノ酸配列（配列番号612）を基準とする位置を参照し、代表的なグルカゴンスーパーファミリーペプチドの整列については、図18を参照すること。

40

【0048】

用語「グルカゴン関連類縁体ペプチド」は、グルカゴン、GLP-1、GLP-2及びGIP受容体の1つ以上のいずれかにおいて生物学的活性（アゴニスト又はアンタゴニストとして）を有し、天然グルカゴン（配列番号612）、天然オキシントモジュリン（配列番号665）、天然エキセンディン-4（配列番号662）、天然GLP-1（配列番号601及び602）、天然GLP-2（配列番号663）又は天然GIP（配列番号664）のうちの少なくとも1つと、少なくとも40%の配列同一性（例えば、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%）を共有するアミノ酸を含む、ペプチドを意味する。特に記述のない限り、グルカゴン関連類

50

縁体ペプチドにおける、あるアミノ酸位置（例えば、プロドラッグ部分、結合体部分、親水性ポリマーの結合、アシル化又はアルキル化、アミノ酸修飾などのための）に対するあらゆる参照は、天然グルカゴンアミノ酸配列（配列番号 6 1 2）を基準とする位置を意味する。

【0049】

本明細書で使用されるとき、用語「同一性」は、2つ以上の配列の類似性に関する。同一性は、同一の残基の数を残基の総数で割り、積に 100 を掛けて百分率を得ることによって測定される。したがって、全く同じ配列の 2 つのコピーが 100 % の同一性を有し、互いにアミノ酸欠失、付加又は置換を有する 2 つの配列は、低い程度の同一性を有する。当業者は、BLAST (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用いるもののような幾つかのコンピュータープログラムが配列同一性の決定のために利用可能なことを認識している。 10

【0050】

用語「GLP-1 アゴニスト」は、実施例 2 に記載されているような検証済インビトロモデルアッセイを使用した cAMP 産生により測定される GLP-1 受容体活性を刺激する化合物を意味する。

【0051】

本明細書で使用されるとき、用語「天然 GLP-1」は、GLP-1 (7-36) アミド（配列番号 602 の配列から構成される）、GLP-1 (7-37) 酸（配列番号 601 の配列から構成される）又はこれらの 2 つの化合物の混合物を示す総称である。本明細書で使用されるとき、更なる名称が不在なときの「GLP-1」への一般的な参照は、それぞれ天然 GLP-1 を意味することが意図される。 20

【0052】

本明細書で使用されるとき、用語「グルカゴンペプチド」は、配列番号 612 の天然グルカゴンペプチドを示すとともに、配列番号 612 の配列に対して 1、2、5、7、8、10、12、13、14、16、17、18、24、28 及び 29 位のアミノ酸位置で 1 つ以上のアミノ酸置換を有する、修飾された誘導体をも示す総称である。

【0053】

本明細書で使用されるとき、用語「GLP-1 ペプチド」は、天然 GLP-1 を示すとともに、天然 GLP-1 配列に対して 1、2、5、7、8、10、12、13、14、16、17、18、24、28 及び 29 位のアミノ酸位置で 1 つ以上のアミノ酸置換を有する修飾された誘導体をも示す総称である。 30

【0054】

本明細書で使用されるとき、用語「インスリンペプチド」は、配列番号 613 の A 鎖及び配列番号 614 の B 鎖、並びに、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で 1 つ以上のアミノ酸置換又は B1～5 及び B26～30 のいずれか若しくは全ての位置で欠失を有する A 鎖及び／又は B 鎖の修飾誘導体を含む、51 アミノ酸二量体を示す総称である。 40

【0055】

本明細書で使用されるとき、アミノ酸「修飾」は、アミノ酸の置換、付加又は欠失を意味し、ヒトタンパク質において一般に見出される 20 個のアミノ酸に加え、異形又は非天然のアミノ酸のいずれかによる、置換又は付加が含まれる。異形アミノ酸の商業供給源には、Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)、ChemPep Inc. (Miami, FL) 及び Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA) が含まれる。異形アミノ酸を、商業供給者から購入する、新規に合成する又は天然アミノ酸から化学的に修飾する若しくは誘導体化することができる。

【0056】

本明細書で使用されるとき、アミノ酸「置換」は、1 個のアミノ酸残基を異なるアミノ酸 50

残基に代えることを意味する。

【0057】

本明細書で使用されるとき、用語「保存的アミノ酸置換」は、以下の5つの群の1つの範囲内の交換として本明細書において定義される：

I. 小型で脂肪族の非極性又は僅かに極性の残基：

Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

II. 極性の負荷電残基及びそれらのアミド：

Asp、Asn、Glu、Gln；

III. 極性の正荷電残基：

His、Arg、Lys、オルニチン(Orn)；

IV. 大型で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. 大型の芳香族残基：

Phe、Tyr、Trp、アセチルフェニルアラニン。

【0058】

本明細書で使用されるとき、総称「ポリエチレングリコール鎖」又は「PEG鎖」は、一般式： $H(OCH_2CH_2)_nOH$ (nは9以上)により表される、分岐鎖又は直鎖の、エチレンオキシドと水の縮合ポリマーの混合物を意味する。更なる特定がない限り、この用語は、500～80,000ダルトンの範囲から選択される平均総分子量を有するエチレングリコールのポリマーを含むことが意図される。「ポリエチレングリコール鎖」又は「PEG鎖」を数字の接尾辞と組み合わせて使用して、およその平均分子量を示す。例えば、PEG-5,000は、平均約5,000ダルトンの総分子量を有するポリエチレングリコール鎖を意味する。

【0059】

本明細書で使用されるとき、用語「ペグ化」及び同様の用語は、ポリエチレングリコール鎖を化合物に結合することにより天然の状態が修飾された化合物を意味する。「ペグ化ポリペプチド」は、共有結合しているPEG鎖を有するポリペプチドである。

【0060】

本明細書で使用されるとき、「リンカー」は、2つの別々の実体を互いに結合する結合、分子又は分子群である。リンカーは、2つの実体に最適な間隔をもたらしてもよいし、更に2つの実体が互いに分離することを可能にする不安定な結合を提供してもよい。不安定な結合には、光切断基、酸不安定部分、塩基不安定部分及び酵素切断基が含まれる。

【0061】

本明細書で使用される「二量体」は、リンカーを介して互いに共有結合している2つのサブユニットを含む複合体である。二量体という用語は、意味を限定する言葉がなく使用される場合、ホモ二量体とヘテロ二量体の両方を包含する。ホモ二量体は、2つの同一のサブユニットを含み、一方、ヘテロ二量体は、異なる2つのサブユニットを含むが、2つのサブユニットは、実質的に互いに類似している。

【0062】

本明細書で使用されるとき、用語「 $C_1 \sim C_n$ アルキル」(ここでnは1～6であることができる)は、1個から特定の個数までの炭素原子を有する分岐鎖又は直鎖のアルキル基を表す。典型的な $C_1 \sim C_6$ アルキル基には、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0063】

本明細書で使用されるとき、用語「 $C_2 \sim C_n$ アルケニル」(ここでnは2～6であることができる)は、2個から特定の個数までの炭素原子及び少なくとも1つの二重結合を有するオレフィン性不飽和の分岐鎖又は直鎖基を表す。そのような基の例には、1-プロペニル、2-プロペニル($-CH_2-CH=CH_2$)、1,3-ブタジエニル($-CH=$

10

20

30

40

50

$\text{CHCH}=\text{CH}_2$ ）、1-ブテニル（ $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ）、ヘキセニル、ペンテニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

用語「 $\text{C}_2 \sim \text{C}_n$ アルキニル」（ここで n は 2～6 であることができる）は、2 から n 個の炭素原子及び少なくとも 1 つの三重結合を有する不飽和の分岐鎖又は直鎖基を意味する。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-ペンチニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0065】

本明細書で使用されるとき、用語「アリール」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、これらに限定されない、1 又は 2 つの芳香族環を有する単環式又は二環式の炭素環系を意味する。アリール環の大きさ及び置換基又は結合基の存在は、存在する炭素の数によって示される。例えば、用語「（ $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル）（ $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール）」は、1 員～3 員のアルキル鎖を介して母体部分に結合している 5 員～10 員アリールを意味する。

【0066】

本明細書で使用されるとき、用語「ヘテロアリール」は、1 又は 2 つの芳香族環を含有し、芳香族環に少なくとも 1 個の窒素、酸素又は硫黄原子を含有する、単環式又は二環式の環系を意味する。ヘテロアリール環の大きさ及び置換基又は結合基の存在は、存在する炭素の数によって示される。例えば、用語「（ $\text{C}_1 \sim \text{C}_n$ アルキル）（ $\text{C}_5 \sim \text{C}_6$ ヘテロアリール）」は、1 員から「 n 」員のアルキル鎖を介して母体部分に結合している 5 員又は 6 員ヘテロアリールを意味する。

【0067】

本明細書で使用されるとき、用語「荷電アミノ酸」は、生理学的 pH の水溶液中に負に荷電（すなわち、脱プロトン化）している、又は正に荷電（すなわち、プロトン化）している側鎖を含むアミノ酸を意味する。例えば、負荷電アミノ酸には、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、正荷電アミノ酸には、アルギニン、リシン及びヒスチジンが含まれる。荷電アミノ酸には、ヒトタンパク質において一般的に見出される 20 個のアミノ酸、また異形又は非天然のアミノ酸のうちの荷電アミノ酸が含まれる。

【0068】

本明細書で使用されるとき、用語「酸性アミノ酸」は、例えばカルボン酸又はスルホン酸基のような第 2 の酸性部分を含むアミノ酸を意味する。

【0069】

本明細書で使用されるとき、用語「患者」は、更なる指定のない限り、任意の家畜化された温血脊椎動物（例えば、家畜類、ウマ、ネコ、イヌ及び他のペット類が含まれるが、これらに限定されない）並びにヒトを包含することが意図される。

【0070】

〔実施態様〕

本開示は、既知の生体活性ポリペプチドのプロドラッグ誘導体の製剤を記載する。より詳細には、本明細書に開示されるプロドラッグは、母体生体活性ペプチド又はタンパク質の半減期を増強しながら、同時に、非酵素分解機構を介したプロドラッグの活性化を可能にするように配合される。理想的なプロドラッグは、生理学的条件下（例えば、 pH 7.2 及び 37°C ）において水に溶解性であるべきであり、長期保存において粉末形態で安定するべきである。また、免疫学的に無症状であり、母体薬剤と比べて低い活性を示すべきである。典型的には、プロドラッグは、母体薬剤の活性の 10 % 未満を示し、一つの実施態様において、プロドラッグは、母体薬剤と比べて 10 % 未満、5 % 未満、約 1 % 又は 1 % 未満の活性を示す。更に、体内に注射されたとき、プロドラッグは、確定された時間内に活性薬剤に定量的に変換されるべきである。本明細書に開示されているように、出願人たちは、それぞれの目的を満たす既知の生体活性ポリペプチドのプロドラッグを製造する一般的技術を提供する。

【0071】

より詳細には、エステル結合を介して生体活性ポリペプチドに共有結合しているジペプチドを有するように修飾された既知の生体活性ポリペプチドの配列を含む化学可逆性プロドラッグが、提供される。一つの実施態様において、生理学的条件下で非酵素活性化半減時間 ($t_{1/2}$) の1~100時間を有するプロドラッグが提供される。本明細書に開示されている生理学的条件は、約35~40℃の温度、約7.0~約7.4のpHを含むこと、より典型的には7.2~7.4のpH及び36~38℃の温度を含むことが意図される。

【0072】

有利なことには、切断の速度、したがってプロドラッグの活性化の速度は、ジペプチドプロ部分の構造及び立体化学、また求核剤の強度によって決まる。本明細書に開示されているプロドラッグは、最終的に、薬剤の天然受容体により認識されうる構造に化学的に変換され、この化学変換の速度は、インビボでの生物学的作用の開始時間及び持続時間を決定する。本出願に開示された分子設計は、追加的な化学添加剤又は酵素に依存しないで、分子内化学反応に依存している。変換の速度は、ジペプチド置換基の化学的性質及び生理学的条件下でのその切断により制御される。生理学的pH及び温度は高度に確定された範囲内で厳しく規定されているので、プロドラッグから薬剤への変換速度は、患者内及び患者間で高度な再現性を示す。

【0073】

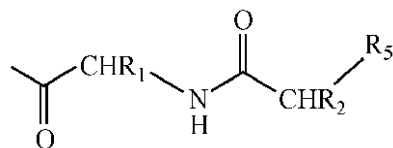
本明細書に開示されているように、生体活性ポリペプチドが半減期を少なくとも1時間、より典型的には20時間を超えるが100時間未満延長し、固有の化学不安定性により駆動される非酵素反応を介して生理学的条件下で活性形態に変換される、プロドラッグが提供される。一つの実施態様において、プロドラッグの非酵素活性化 $t_{1/2}$ 時間は、1~100時間、より典型的には12~72時間であり、一つの実施態様では、 $t_{1/2}$ は、37℃及びpH7.2でリン酸緩衝溶液（例えば、PBS）においてプロドラッグをインキュベートすることにより測定すると、24~48時間である。多様なプロドラッグの半減期は、式： $t_{1/2} = 0.693/k$ を使用して計算され、ここで「k」は、プロドラッグの分解の一次反応速度定数である。一つの実施態様において、プロドラッグの活性化は、エステル結合で結合したジペプチドの切断と、ジケトピペラジン又はジケトモルホリン及び活性な生体活性ポリペプチドの形成の後で生じる（図5A及び5Bを参照すること）。天然又は合成アミノ酸から構成される特定のジペプチドは、生理学的条件下で分子内分解を促進して生体活性ペプチドを放出することが確認されている。

プロドラッグ化学は、脂肪族ヒドロキシル基が活性部位に収容されうる場合及び化学的に修飾された誘導体が活性の不十分な（例えば、母体に対して10%以下の活性を有する）ペプチド又はタンパク質を生じる場合、ペプチド及びタンパク質に基づいた薬剤に広く適用可能である。この点を例示する特定の例は、活性部位のセリンに、セリンプロテアーゼのファミリーの可逆セリンエステルを形成することである。このプロドラッグ技術を用いることができる医学的に重要なペプチド及びタンパク質には、インスリン、グルカゴン及びグルカゴン関連ペプチド（GLP、オキシントモジュリン）、ガストリン阻害ペプチド（GIP）、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）、カルシトニン、副甲状腺ホルモン（PTH）、ニューロペプチドY（NPY）、腓ポリペプチド（PP）、並びに関連する物質が含まれるが、これらに限定されない。このプロドラッグ技術を用いることができる医学的に重要なタンパク質には、成長ホルモン、エリスロポエチン（EPO）、好中球刺激成長因子（CSF）、インターフェロン、血液凝固酵素、抗体、レプチンなどが含まれるが、これらに限定されない。一つの実施態様によると、グルカゴン、インスリン、GLP-1のプロドラッグ又はグルカゴン、インスリン若しくはGLP-1の修飾誘導体が提供される。本明細書で使用されるとき、グルカゴン、インスリン又はGLP-1の修飾誘導体には、例えば、1、2、3、4、5又は6個のアミノ酸置換によってグルカゴン、インスリン又はGLPそれぞれの天然配列と異なるポリペプチドが含まれる。

【0074】

一つの実施態様によると、例えばセリン若しくはトレオニン残基の側鎖を有するヒドロキシル又はN末端ヒドロキシル化アミノ酸（HO-アミノ酸）のヒドロキシル基を含む、生体活性ペプチド又はタンパク質の脂肪族ヒドロキシル基は、下記の基：

【化23】



の、エステル結合を介した生体活性ポリペプチドへの共有結合により改質されており、式中、 R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル}) \text{OH}$ 、 $(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル}) \text{SH}$ 、 $(C_2 \sim C_3 \text{ アルキル}) \text{SCH}_3$ 、 $(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル}) \text{CONH}_2$ 、 $(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル}) \text{COOH}$ 、 $(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル}) \text{NH}_2$ 、 $(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル}) \text{NHC}(\text{NH}_2 +) \text{NH}_2$ 、 $(C_4 \sim C_6)$ シクロアルキル、 $(C_0 \sim C_4 \text{ アルキル}) (C_6 \sim C_{10} \text{ アリール}) R_9$ 及び $\text{CH}_2 (C_5 \sim C_9 \text{ ヘテロアリール})$ からなる群より独立して選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

10

【0075】

幾つかの実施態様において、生体活性ペプチドは、グルカゴンスーパーファミリーペプチド（例えば、グルカゴン関連類縁体ペプチド）、オステオカルシン又は前記のうちの1つの類縁体、誘導体若しくは結合体である。

20

【0076】

一つの実施態様において、生体活性タンパク質は、GLP-1 又はインスリンである。

【0077】

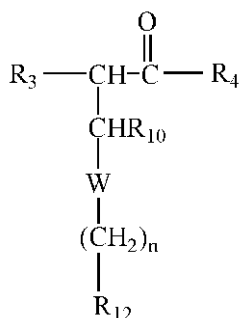
一つの実施態様において、 R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $\text{CH}_2 \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2 \text{CH}_3)$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $\text{CH}_2 (C_6 \sim C_{10} \text{ アリール})$ 及び $\text{CH}_2 (C_5 \sim C_9 \text{ ヘテロアリール})$ からなる群より独立して選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。一つの実施態様において、 R_1 は、 $\text{CH}_2 (\text{CH}_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $\text{CH}_2 (C_6 \sim C_{10} \text{ アリール})$ 及び $\text{CH}_2 (C_5 \sim C_9 \text{ ヘテロアリール})$ からなる群より選択され、 R_2 は、 $C_4 \sim C_5$ シクロアルキル、 $\text{CH}_2 (C_6 \sim C_{10} \text{ アリール})$ 及び $\text{CH}_2 (C_5 \sim C_9 \text{ ヘテロアリール})$ からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

30

【0078】

一つの実施態様によると、式 I：

【化24】



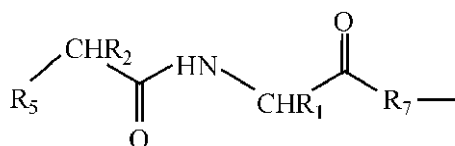
I

40

の一般構造を含むプロドラッグが提供され、

式中、 R_3 は、 NH_2 、HO-、アミノ酸配列及び下記：

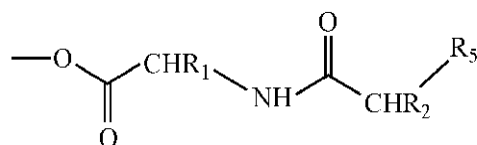
【化25】



50

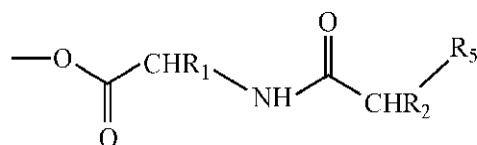
10

【化 2 6】



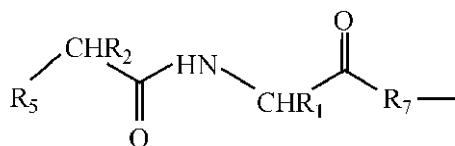
20

【化 2 7】

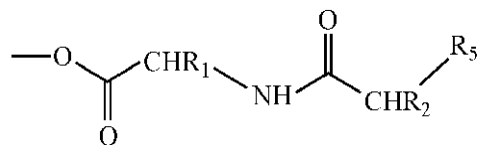


30

【化 2 8】



【化 2 9】

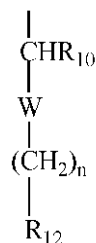


40

【 0 0 7 9 】

幾つかの実施態様において、 R_3 又は R_4 は、生体活性ペプチドのアミノ酸配列である。より特定の実施態様において、 R_3 は、下記構造：

【化 3 0】



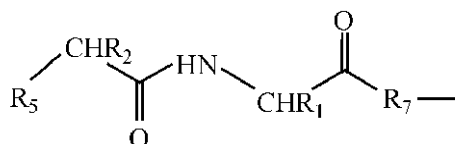
の側鎖を含む生体活性ペプチドのアミノ酸の N 末端側のアミノ酸配列であり、そして R₄ は、生体活性ペプチドのアミノ酸の C 末端側のアミノ酸配列である。

10

【0080】

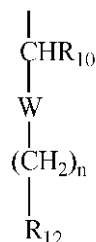
幾つかの実施態様において、R₃ が下記：

【化 3 1】



であり、R₇ が O-アミノ酸である場合、R₇ は、下記構造：

【化 3 2】



20

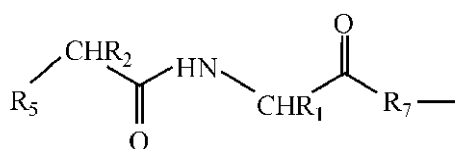
の側鎖を含む生体活性ペプチドのアミノ酸の N 末端側のアミノ酸配列であり、そして R₄ は、生体活性ペプチドのアミノ酸の C 末端側のアミノ酸配列である。

【0081】

一つの実施態様において、R₃ は、下記：

30

【化 3 3】



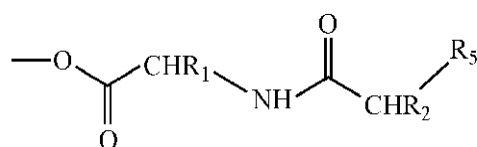
であり、そして R₇ 及び R₄ は、グルカゴン、GLP-1 又はインスリンペプチドのアミノ酸配列を表す。

【0082】

代替的な実施態様において、R₃ は、グルカゴン、GLP-1 又はインスリンペプチドのいずれかから選択される N 末端配列であり、R₄ は、グルカゴン、GLP-1 又はインスリンペプチドのいずれかから選択されるカルボキシ末端配列であり、そして R₁₂ は、下記：

40

【化 3 4】

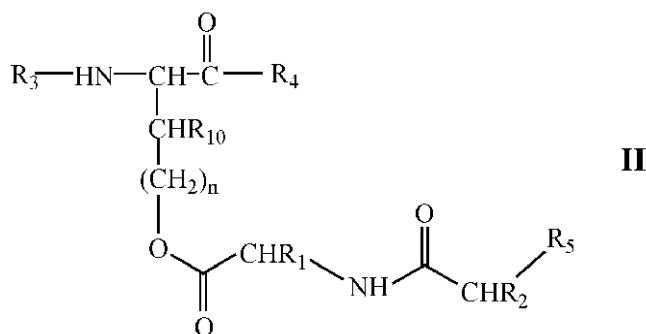


である。

【0083】

50

一つの実施態様によると、式 I I :
【化 3 5】



10

の一般構造を含む生体活性タンパク質のプロドラッグ誘導体が提供され、

式中、 R_3 は、H 又は生体活性タンパク質（例えば、グルカゴン、GLP-1 若しくはインスリンペプチド）の N 末端アミノ酸であり、 R_4 は、OH 又は生体活性タンパク質（例えば、グルカゴン、GLP-1 若しくはインスリンペプチド）の C 末端アミノ酸を表し、 R_{10} は、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル及び $(\text{CH}_2)_n$ ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) からなる群より選択され、 n は、0～3 の整数であり、

R_1 及び R_2 は、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル) OH、($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル) SH、($\text{C}_2 \sim \text{C}_3$ アルキル) SCH₃、($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル) CONH₂、($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル) COOH、($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル) NH₂、($\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル) NHC(NH₂ +) NH₂、($\text{C}_4 \sim \text{C}_6$) シクロアルキル、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) R_9 及び CH_2 ($\text{C}_5 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、 R_5 は、OH 又は NH₂ であり、そして R_9 は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、NH₂ 又は OH である。

20

【0084】

一つの実施態様において、 R_1 は、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、($\text{C}_4 \sim \text{C}_5$) シクロアルキル、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) (C_6 アリール) 及び ($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) ($\text{C}_5 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、($\text{C}_4 \sim \text{C}_5$) シクロアルキル、($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) (C_6 アリール) 及び ($\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) ($\text{C}_5 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH₂ である。

30

【0085】

一つの実施態様において、ジペプチドは、セリン又はトレオニン残基のヒドロキシル基を介して生体活性ポリペプチドに結合している（すなわち、式 I I I の化合物において、 n は 0 であり、 R_{10} は H であるか、又は n は 0 であり、 R_{10} は CH_3 である）。より詳細には、修飾されたセリン又はトレオニン残基は、ジペプチドの結合が、天然受容体又は基質と相互作用する生体活性ポリペプチドの能力を妨げるように、タンパク質結合ドメイン又は活性部位に配置されている。

【0086】

式 I I の一般構造のプロドラッグに関して、 R_3 又は R_4 の少なくとも一方は、生体活性ペプチドのアミノ酸を表す。幾つかの実施態様において、 R_3 及び R_4 は、生体活性ペプチドのアミノ酸を表す。

40

【0087】

一つの実施態様によると、式 I I の一般構造を有するポリペプチドが提供され、式中、 R_3 は、H 及びアミノ酸配列からなる群より選択され、

R_4 は、—OH 又はアミノ酸配列であり、

R_{10} は、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル及び $(\text{CH}_2)_n$ ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) からなる群より選択され、 n は、0～3 の整数であり、

R_1 は、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$

50

)、(C₄～C₅)シクロアルキル、(C₀～C₄アルキル)(C₆アリール)及び(C₀～C₄アルキル)(C₅～C₆ヘテロアリール)からなる群より選択され、

R₂は、(C₀～C₄アルキル)C₁～C₄アルキル、(C₄～C₅)シクロアルキル、(C₀～C₄アルキル)(C₆アリール)及び(C₀～C₄アルキル)(C₅～C₆ヘテロアリール)からなる群より選択され、そしてR₅は、OH又はNH₂である。

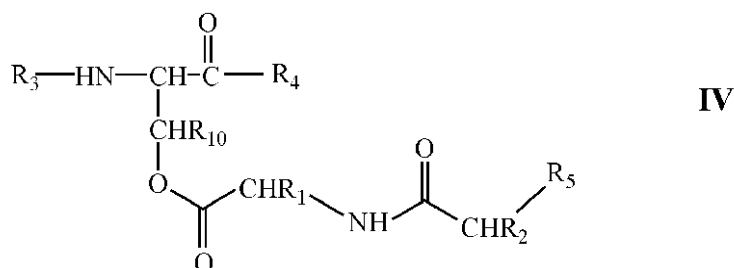
【0088】

更なる実施態様において、R₁₀はHであり、そしてnは0である。

【0089】

一つの実施態様によると、式IV：

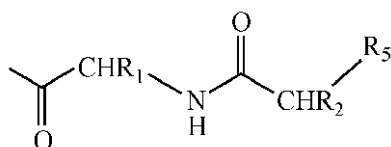
【化36】



の一般構造を有するプロドラッグが提供され、

式中、R₃は、Hか又は生体活性ポリペプチドに存在するセリン／トレオニン残基（天然のものか又はアミノ酸置換として）の上流に配置されている生体活性タンパク質のN末端アミノ酸であり、R₄は、OHか又は生体活性ポリペプチド（酸又はアミド）に存在するセリン／トレオニン残基（天然のものか又はアミノ酸置換として）の下流に配置されている生体活性タンパク質のC末端アミノ酸であり、R₁₀は、H又はCH₃であり、前記生体活性タンパク質内に配置されているセリン／トレオニン部分は、下記の基：

【化37】



の共有結合により修飾されており、

R₁及びR₂は、H、C₁～C₄アルキル、(C₁～C₄アルキル)OH、(C₁～C₄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、(C₄～C₆)シクロアルキル、(C₀～C₄アルキル)(C₆～C₁₀アリール)R₉及びCH₂(C₅～C₉ヘテロアリール)からなる群より独立して選択され、

R₅は、OH又はNH₂であり、

R₉は、C₁～C₄アルキル、NH₂又はOHである。

【0090】

一つの実施態様において、R₁は、CH(CH₃)₂、CH₂CH(CH₃)₂、CH(CH₃)(CH₂CH₃)、(C₄～C₅)シクロアルキル、(C₀～C₄アルキル)(C₆～C₁₀アリール)及び(C₀～C₄アルキル)(C₅～C₉ヘテロアリール)からなる群より選択され、R₂は、(C₀～C₄アルキル)C₁～C₄アルキル、(C₄～C₅)シクロアルキル、(C₀～C₄アルキル)(C₆～C₁₀アリール)及び(C₀～C₄アルキル)(C₅～C₉ヘテロアリール)からなる群より選択され、そしてR₅は、OH又はNH₂である。一つの実施態様において、修飾のために選択されたセリン又はトレオニン残基は、ジペプチドの結合が、天然受容体又は基質と相互作用する生体活性ポリペプチドの能力を妨げるように、タンパク質結合ドメイン又は活性部位に配置されている

10

20

30

40

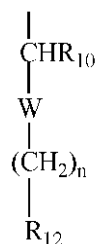
50

。

【0091】

式 I I 又は式 I V の一般構造を含むプロドラッグに関して、 R_3 又は R_4 の少なくとも一方は、生体活性ペプチドのアミノ酸を表す。幾つかの実施態様において、 R_3 及び R_4 は、両方とも生体活性ペプチドのアミノ酸を表す。幾つかの実施態様において、 R_3 は、下記構造：

【化38】



10

の側鎖を含む生体活性ペプチドのアミノ酸の N 末端側のアミノ酸配列であり、そして R_4 は、生体活性ペプチドのアミノ酸の C 末端側のアミノ酸配列である。

【0092】

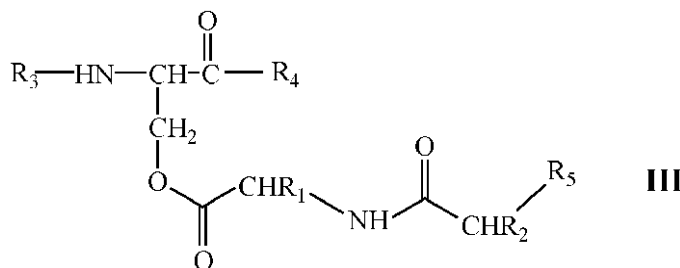
一つの実施態様によると、生体活性ポリペプチドは、インスリン、グルカゴン、GLP-1 及びこれらのポリペプチドの誘導体から選択され、ここで誘導体は、天然配列に対して 1、2、3、4、5 又は 6 個のアミノ酸が異なっている。一つの実施態様において、インスリン、グルカゴン、GLP-1 誘導体は、天然の配列と、1、2、3、4、5 又は 6 個の保守的アミノ酸置換によって異なっている。

20

【0093】

一つの実施態様において、プロドラッグは、式 I I I :

【化39】



30

〔式中、 R_3 は、生体活性タンパク質の天然の N 末端アミノ酸を含み、 R_4 は、生体活性タンパク質の天然の C 末端アミノ酸を含み、 R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、($C_4 \sim C_5$) シクロアルキル、 $\text{CH}_2(C_6 \sim C_{10})$ アリール) 及び $\text{CH}_2(C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である〕で示される一般構造を含み、ここで非酵素活性化 $t_{1/2}$ は、1～100 時間である。一つの実施態様において、プロドラッグの $t_{1/2}$ は、20～70 時間である。

40

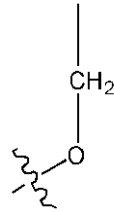
【0094】

一つの実施態様において、 R_1 は、 $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$ 、($C_4 \sim C_5$) シクロアルキル、 $\text{CH}_2(C_6)$ アリール) 及び $\text{CH}_2(C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、($C_4 \sim C_5$) シクロアルキル、 $\text{CH}_2(C_6)$ アリール) 及び $\text{CH}_2(C_5 \sim C_6)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

【0095】

プロドラッグが式 I I I の一般構造を含む幾つかの実施態様において、 R_3 は、下記構造：

【化 40】



の側鎖を含む生体活性タンパク質のアミノ酸のN末端側のN末端アミノ酸を含み、そしてR₄は、生体活性タンパク質のアミノ酸のC末端側のC末端アミノ酸を含む。

【0096】

10

一つの実施態様によると、生体活性ポリペプチドは、インスリン、グルカゴン、GLP-1、並びにインスリン、グルカゴン及びGLP-1の誘導体から選択され、ここでポリペプチドの誘導体は、天然配列に対して1～6個のアミノ酸置換を含む。置換するアミノ酸は、天然アミノ酸又は合成アミノ酸のいずれかであることができ、一つの実施態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換を表す。

【0097】

生体活性ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質

エステル結合を介してプロドラッグのジペプチド部分に結合している生体活性ペプチド、生体活性ポリペプチド又は生体活性タンパク質は、グルカゴンスーパーファミリーペプチド（例えば、グルカゴンスーパーファミリーのメンバー（Sherwood et al., 2000, supraに記載されたもの）、グルカゴン関連類縁体ペプチド）、オステオカルシン、インスリン又はその類縁体、誘導体若しくは結合体であることができる。

20

【0098】

オステオカルシン

幾つかの実施態様において、生体活性ペプチドは、オステオカルシンであるか、又は、天然ペプチドの長さにわたって天然オステオカルシンと少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の同一性があるアミノ酸配列を含む、オステオカルシンの類縁体若しくは誘導体である。関連する実施態様において、生体活性ペプチドは、天然オステオカルシンに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個までのアミノ酸修飾を有するオステオカルシンの類縁体を含むことができる。

30

【0099】

インスリン

他の実施態様において、生体活性ペプチドは、インスリンであるか、又は、それぞれ天然ペプチドの長さにわたってインスリンの天然A又はB鎖と少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の同一性があるアミノ酸配列を含むA鎖及びB鎖を含む、インスリンの類縁体若しくは誘導体である。関連する実施態様において、インスリン類縁体又は誘導体は、天然A又はBインスリン鎖に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個までのアミノ酸修飾を有するインスリンA又はB鎖の類縁体を含むことができる。特定の実施態様において、インスリンのA鎖は、配列番号613若しくは配列番号626又はその類縁体若しくは誘導体（例えば、配列番号613若しくは626に少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%若しくは95%の同一性を有するか又は配列番号613若しくは626に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10個までのアミノ酸修飾を有する）のアミノ酸配列を含む。加えて、幾つかの実施態様において、インスリンのB鎖は、配列番号614、配列番号627若しくは配列番号628又はその誘導体若しくは類縁体（例えば、配列番号614、配列番号627若しくは配列番号628に少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%若しくは95%の同一性を有するか又は配列番号614、配列番号627若しくは配列番号628に対して1、2、3、

40

50

4、5、6、7、8、9若しくは10個までのアミノ酸修飾を有する)のアミノ酸配列を含むことができる。

【0100】

グルカゴンスーパーファミリーペプチド

更に他の実施態様において、生体活性ペプチドは、例えば、GHRH(配列番号657)、VIP(配列番号658)、PACAP-27(配列番号659)、PHM(配列番号660)、セクレチン(配列番号661)、グルカゴン(配列番号612)、エキセディン-4(配列番号662)、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)(例えば、配列番号601により提示されるアミノ酸7~37)、グルカゴン様-2(GLP-2)(配列番号663)、GIP(配列番号664)及びオキシントモジュリン(配列番号665)が含まれる、当該技術において既知のグルカゴンスーパーファミリーペプチドのいずれかである。

10

【0101】

グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、N末端アミノ酸内の相同性及び/又はC末端部分内のアルファヘリックス構造が含まれるが、これらに限定されない共通の構造特徴を有することができる。C末端は一般に受容体結合において機能し、N末端は一般に受容体シグナル伝達において機能すると考えられる。N末端及びC末端部分の幾つかのアミノ酸、例えば、His1、Gly4、Phe6、Phe22、Val23、Trp25及びLeu26(グルカゴンのアミノ酸番号付けによる)は、対応する位置のグルカゴンスーパーファミリーのメンバーのアミノ酸が同一性を示すか、保存的に置換されているか、そうでなければアミノ酸側鎖に類似性を示すように、グルカゴンスーパーファミリーのメンバーのうちで高度に保存されている。

20

【0102】

グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個までのアミノ酸修飾を有する天然アミノ酸配列を含む、GHRH(配列番号657)、VIP(配列番号658)、PACAP-27(配列番号659)、PHM(配列番号660)、セクレチン(配列番号661)、グルカゴン(配列番号612)、エキセディン-4(配列番号662)、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)(例えば、配列番号601として提示されるアミノ酸7~37)、グルカゴン様-2(GLP-2)(配列番号663)、GIP(配列番号664)及びオキシントモジュリン(配列番号665)の類縁体又は誘導体であることができる。

30

【0103】

例えば、グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、COOH、CONH₂、GPS SGAPPPS(配列番号624)、GPS SGAPPPS-CONH₂(配列番号723)、オキシントモジュリンカルボキシ末端延長、KRNRNNIA(配列番号625)又はKGKKNDWKHNITQ(配列番号666)が含まれるが、これらに限定されない、C末端又はC末端アミノ酸配列を含むことができる。グルカゴンスーパーファミリーペプチドの追加のC末端アミノ酸配列が、下記において更に詳述されている。

【0104】

また、例えば、グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、天然ペプチドの長さにわたって、天然GHRHと少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の同一性があるアミノ酸配列を含む、GHRHの類縁体(配列番号657)であることができる。グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、GHRHに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個までのアミノ酸修飾を有するGHRHの類縁体を含むことができる。

40

【0105】

さらに更なる実施態様において、生体活性ペプチドは、類縁体ペプチド配列に対して2つ以上の天然グルカゴンのキメラであるアミノ酸配列を含むことができる。幾つかの実施態様において、生体活性ペプチドは、天然グルカゴン(配列番号612)に対して少なくとも約50%の同一性がある及び配列番号612のアミノ酸12~29に対応するアミノ

50

酸のアルファヘリカル立体配座を保持する、アミノ酸を含む。

【0106】

生体活性ペプチドは、グルカゴンスーパーファミリーペプチドの結合体であることができる。結合体は、グルカゴン関連類縁体ペプチドに関して本明細書において更に記載される。この文脈における結合体の教示は、一般に、グルカゴン関連類縁体ペプチドではない生体活性ペプチドに当てはまる。

【0107】

幾つかの実施態様において、グルカゴンスーパーファミリーペプチドは、グルカゴン関連類縁体ペプチド、例えば、グルカゴン（配列番号612）、オキシントモジュリン（配列番号665）、エキセンディン-4（配列番号662）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）（配列番号601として提示されるアミノ酸7~37）、グルカゴン様ペプチド-2（GLP-2）（配列番号663）、GIP（配列番号664）、又はこれらの類縁体、誘導体及び結合体である。幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個までのアミノ酸修飾を有する、天然グルカゴン、天然エキセンディン-4、天然（7-37）GLP-1、天然GLP-2、天然GHRH、天然VIP、天然PACAP-27、天然PHM、天然オキシントモジュリン、天然セクレチン又は天然GIPのアミノ酸配列を含む。そのようなペプチドは当該技術において知られている。例えば、WO2008/023050、WO2007/030519、WO2005/058954、WO2003/011892、WO2007/046834、WO2006/134340、WO2006/124529、WO2004/022004、WO2003/018516及びWO2007/124461（それぞれその全体が参照として本明細書に組み込まれる）を参照すること。

【0108】

関連する実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然ペプチドの長さにわたって（又はグルカゴンに対応する位置にわたって、例えば図18を参照すること）、天然グルカゴン、天然オキシントモジュリン、天然エキセンディン-4、天然（7-37）GLP-1、天然GLP-2又は天然GIPの対応する配列と少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の同一性があるアミノ酸配列を含む。

【0109】

特定の実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、本明細書において詳述される、クラス1、2、3、4又は5グルカゴン関連類縁体ペプチドである。

【0110】

グルカゴン関連類縁体ペプチド

特定の態様において、本開示は、グルカゴン関連類縁体ペプチドに関する。グルカゴン関連類縁体ペプチドという用語は、グルカゴン、オキシントモジュリン、エキセンディン-4、GLP-1、GLP-2及びGIP受容体の1つ以上のいずれかにおいて生物学的活性（アゴニスト又はアンタゴニストとして）を有し、天然グルカゴン、天然オキシントモジュリン、天然エキセンディン-4、天然GLP-1、天然GLP-2又は天然GIPのうちの少なくとも1つと、少なくとも40%の配列同一性（例えば、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%）を共有するアミノ酸を含む、ペプチドを意味する。グルカゴン関連類縁体ペプチドの全ての可能な活性のサブセットが考慮され、例えば、グルカゴン又はGLP-1若しくはGIP受容体のいずれかの1つ以上と生物学的活性（アゴニスト又はアンタゴニストとして）を、それぞれ提示される天然ペプチドに対する配列同一性の全ての可能なサブセットと一緒に有する、例えば天然グルカゴンの長さにわたって、天然グルカゴンと少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を含む、ペプチドが考慮されることが理解される。

【0111】

本発明の一つの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体アゴニスト活性、G I P受容体アゴニスト活性、グルカゴン受容体／G L P－1受容体コアゴニスト活性、グルカゴン受容体アンタゴニスト活性又はグルカゴン受容体アンタゴニスト及びG L P－1受容体アゴニスト活性を有するペプチドである。幾つかの実施態様において、ペプチドは、分子のC末端の半分においてアルファヘリカル立体配座を保持する。幾つかの実施態様において、ペプチドは、受容体相互作用又はシグナル伝達に関わる位置、例えば、グルカゴンの3位又は(1-37) G L P－1の7、10、12、13、15若しくは17位を保持する。したがって、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、クラス1、クラス2、クラス3、クラス4及び／又はクラス5のペプチドであることができ、それぞれ本明細書において更に記載される。

10

【0112】

修飾

グルカゴン関連類縁体ペプチドは、修飾を有する天然グルカゴンアミノ酸配列(配列番号612)を含むことができる。例示的な実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然グルカゴン配列に対して合計1個、2個まで、3個まで、4個まで、5個まで、6個まで、7個まで、8個まで、9個まで又は10個までのアミノ酸修飾、例えば保存的又は非保存的置換を含むことができる。本明細書に記載される修飾及び置換は、特定の態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチド内の特定の位置において実施され、ここで位置の番号付けはグルカゴン(配列番号612)の番号付けに対応する。幾つかの実施態様において、1、2、3、4又は5個の非保存的置換は、2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28又は29のいずれかの位置において実施され、5個までの更なる保存的置換が、これらの位置のいずれかにおいて実施される。幾つかの実施態様において、1、2又は3個のアミノ酸修飾が1～16の位置の範囲内のアミノ酸で実施され、1、2又は3個のアミノ酸修飾が17～26の位置の範囲内のアミノ酸で実施される。幾つかの実施態様において、そのようなグルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然グルカゴンの対応する位置に少なくとも22、23、24、25、26、27又は28個の天然に生じるアミノ酸を保持する(例えば、天然に生じるグルカゴンに対して1～7、1～5又は1～3個の修飾を有する)。

20

【0113】

D P P－I V耐性

幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、ジペプチジルペプチダーゼI Vによる切断に対する感受性を低減するために、1又は2位に修飾を含む。より詳細には、幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチド(例えば、図10に記載のものから選択されたもの)の1位は、D－ヒスチジン、アルファ、アルファージメチルイミダゾール酢酸(D M I A)、N－メチルヒスチジン、アルファ－メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモ－ヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。より詳細には、幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドの2位は、D－セリン、D－アラニン、バリン、グリシン、N－メチルセリン及びアミノイソ酪酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。

30

40

【0114】

親水性部分

一つの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチド(例えば、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス4グルカゴン関連類縁体ペプチド又はクラス5グルカゴン関連類縁体ペプチド)は、親水性部分に結合(共有結合)している。親水性部分を、タンパク質と活性化ポリマー分子との反応に使用される任意の適切な条件下でグルカゴン関連ペプチドに結合することができる。アシル化、還元的アルキル化、マイケル付加、チオールアルキル化又はP E G部分に対する反応性基(例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α －ハロアセチル、マレイミド又はヒドラジノ基)と標的化合物に対する反応性

50

基（例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミド又はヒドラジノ基）との他の化学選択的結合／連結方法を含む、当該技術において既知のあらゆる方法を使用することができる。水溶性ポリマーを1つ以上のタンパク質に結合するのに使用できる活性化基には、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、アジリジン、オキシラン及び5-ピリジルが、限定されることなく含まれる。還元的アルキル化によりペプチドに結合する場合、選択されるポリマーは、重合の程度が制御されるように単一の反応性アルデヒドを有するべきである。例えば、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)を参照すること。

10

【0115】

適切な親水性部分には、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレン化ポリオール（例えば、POG）、ポリオキシエチレン化ソルビトール、ポリオキシエチレン化グルコース、ポリオキシエチレン化グリセロール（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ンアルデヒド、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、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-又はアリーロキシ-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（ベーターアミノ酸）（ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか）、ポリ（ n -ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー（PPG）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ポリマー、フィコール又はデキストラン、並びにこれらの混合物が含まれる。デキストランは、主に α 1-6結合により結合しているグルコースサブユニットの多糖ポリマーである。デキストランは、多くの分子量範囲、例えば1kD～約100kD又は約5、10、15若しくは20kD～約20、40、50、60、70、80若しくは90kDで入手することができる。

20

【0116】

一つの実施態様において、親水性部分は、C末端延長内又はC末端アミノ酸において、前記グルカゴン関連類縁体ペプチドの16、17、21、24、29、40位の1つ以上のアミノ酸残基の側鎖に共有結合している、ポリエチレングリコール（PEG）鎖又は他の水溶性ポリマーである。幾つかの実施態様において、その位置の天然アミノ酸は、ペプチドへの親水性部分の結合を促進するために、親水性部分との架橋に適した側鎖を有するアミノ酸で置換されている。例示的なアミノ酸には、Cys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はアセチルフェニルアラニン（Ac-Phen）が含まれる。他の実施態様において、親水性基を含むように修飾されているアミノ酸が、ペプチドのC末端に付加される。

30

【0117】

親水性部分、例えばポリエチレングリコール鎖は、幾つかの実施態様によると、約500～約4,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。一つの実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約500～約5,000ダルトン又は約1,000～約5,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。別の実施態様において、親水性部分、例えばポリエチレングリコール鎖は、約10,000～約20,000ダルトンの分子量を有する。更に他の例示的な実施態様において、親水性部分、例えばポリエチレングリコール鎖は、約20,000～約40,000ダルトンの分子量を有する。

40

【0118】

直鎖又は分岐鎖ポリマーが考慮される。得られる結合体の調製は、実質的に単分散又は多分散であることができ、ペプチド1つあたり約0.5、0.7、1、1.2、1.5又は2つのポリマー部分を有することができる。

【0119】

アシル化

50

一つの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチド（例えば、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス4グルカゴン関連類縁体ペプチド又はクラス5グルカゴン関連類縁体ペプチド）は、修飾されてアシル基を含む。アシル化は、非アシル化グルカゴン関連類縁体ペプチドにより示される活性がアシル化によって保持される限り、1～29位、C末端延長内の位置、又はC末端アミノ酸のいずれかを含む、グルカゴン関連類縁体ペプチド内の任意の位置で実施することができる。例えば、非アシル化ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する場合、アシル化ペプチドは、グルカゴンアゴニスト活性を保持する。また、例えば、非アシル化ペプチドがグルカゴンアンタゴニスト活性を有する場合、アシル化ペプチドは、グルカゴンアンタゴニスト活性を保持する。例えば、非アシル化ペプチドがGLP-1アゴニスト活性を有する場合、アシル化ペプチドは、GLP-1アゴニスト活性を保持する。非限定例には、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）でのアシル化が挙げられる。アシル基を、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ基に直接的に又はグルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ基にスペーサーを介して間接的に共有結合することができ、ここでスペーサーは、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ基とアシル基との間に位置している。グルカゴン関連類縁体ペプチドを、親水性部分が結合している同じアミノ酸の位置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。非限定例には、10位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）でのアシル化、及びグルカゴンペプチドのC末端部分における1つ以上の位置、例えば24、28若しくは29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）、C末端延長内、又はC末端（例えば、C末端Cysの付加を介する）でのペグ化が挙げられる。

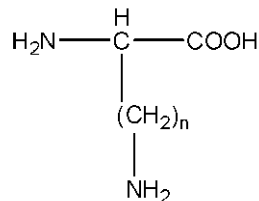
【0120】

本発明の特定の態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシル又はチオール直接的なアシル化により修飾されて、アシル基を含む。幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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アシル化される。幾つかの実施態様において、アシル化は、10、20、24又は29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）においてである。この点において、アシル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号612のアミノ酸配列を含むこともできるし、又は10、20、24及び29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のアミノ酸の少なくとも1個が修飾されて側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオールを含む任意のアミノ酸となる、本明細書に記載されている1つ以上のアミノ酸修飾を含む配列番号612の修飾アミノ酸配列を含むこともできる。本発明の幾つかの特定の態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドの直接アシル化は、10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。

【0121】

幾つかの実施態様において、側鎖アミンを含むアミノ酸は、式VII I：

【化41】



式中、 $n = 1 \sim 4$

【式VII I】

で示されるアミノ酸である。

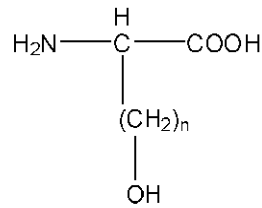
【0122】

幾つかの例示的な実施態様において、式 V I I I のアミノ酸は、 n が 4 (L y s) であるか又は n が 3 (O r n) であるアミノ酸である。

【0123】

他の実施態様において、側鎖ヒドロキシルを含むアミノ酸は、式 I X :

【化42】



式中、 $n = 1 \sim 4$

[式 I X]

で示されるアミノ酸である。

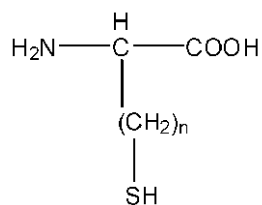
【0124】

幾つかの例示的な実施態様において、式 I X のアミノ酸は、 n が 1 (S e r) であるアミノ酸である。

【0125】

更に他の実施態様において、側鎖チオールを含むアミノ酸は、式 X :

【化43】



式中、 $n = 1 \sim 4$

[式 X]

で示されるアミノ酸である。

【0126】

幾つかの例示的な実施態様において、式 X のアミノ酸は、 n が 1 (C y s) であるアミノ酸である。

【0127】

本発明の一つの実施態様において、アシル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、ペプチドとアシル基との間にスペーサーを含む。幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、アシル基に共有結合しているスペーサーと共有結合する。幾つかの例示的な実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、スペーサーのアミン、ヒドロキシル又はチオールのアシル化により修飾されてアシル基を含み、ここでスペーサーは、グルカゴン関連類縁体ペプチドの 10、20、24 若しくは 29 位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のアミノ酸の側鎖又は C 末端アミノ酸に結合している。スペーサーが結合しているアミノ酸は、スペーサーへの結合を可能にする部分を含む任意のアミノ酸であることができる。例えば、側鎖 NH_2 、 $-\text{OH}$ 又は $-\text{COOH}$ を含むアミノ酸（例えば、L y s、O r n、S e r、A s p 又は G l u）が適している。この点において、アシル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 612 のアミノ酸配列を含むこともできるし、又は 10、20、24 及び 29 位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のアミノ酸の少なくとも 1 個が修飾されて側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはカルボキシレートを含む任意のアミノ酸となる、本明細書に記載されている 1 つ以上のアミノ酸修飾を含む配列番号 612 の修飾アミノ酸配列を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0128】

幾つかの実施態様において、スパーサーは、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であるか又は側鎖アミン、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若しくはトリペプチドである。

【0129】

アシル化がスパーサーのアミン基を介して生じる場合、アシル化は、アミノ酸のアルファアミン又は側鎖アミンを介して生じることができる。アルファアミンがアシル化される場合、スパーサーアミノ酸は、任意のアミノ酸であることができる。例えば、スパーサーアミノ酸は、疎水性アミノ酸、例えばGly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyrであることができる。あるいは、スパーサーアミノ酸は、酸性残基、例えばAsp及びGluであることができる。スパーサーアミノ酸の側鎖アミンがアシル化される場合、スパーサーアミノ酸は、側鎖アミンを含むアミノ酸、例えば式V I I Iのアミノ酸（例えば、Lys又はOrn）である。この場合、スパーサーアミノ酸のアルファアミンと側鎖アミンの両方ともアシル化されることが可能であり、それによりグルカゴンペプチドがジアシル化される。本発明の実施態様はそのようなジアシル化分子を含む。

10

【0130】

アシル化がスパーサーのヒドロキシル基を介して生じる場合、アミノ酸又はジペプチド若しくはトリペプチドのアミノ酸のうちの1個は、式I Xのアミノ酸であることができる。特定の例示的な実施態様において、アミノ酸はSerである。

20

【0131】

アシル化がスパーサーのチオール基を介して生じる場合、アミノ酸又はジペプチド若しくはトリペプチドのアミノ酸のうちの1個は、式Xのアミノ酸であることができる。特定の例示的な実施態様において、アミノ酸はCysである。

【0132】

一つの実施態様において、スパーサーは、親水性二官能スパーサーを含む。特定の実施態様において、スパーサーは、アミノポリ（アルキルオキシ）カルボキシレートを含む。この点において、スパーサーは、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、ここでmは、1～6の任意の整数であり、そしてnは、2～12の任意の整数であり、例えば、Peptides International, Inc. (Louisville, KY)により販売されている8-アミノ-3, 6-ジオキサオクタン酸である。

30

【0133】

アミン、ヒドロキシル及びチオールを介したペプチドアシル化に適した方法は、当該技術において知られている。例えば、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., Biochim Biophys Acta 263: 7-13 (1972)（ヒドロキシルを介したアシル化の方法）；並びにSan and Silvius, J Pept Res 66: 169-180 (2005)（チオールを介したアシル化の方法）；Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 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)を参照すること。

40

【0134】

アシル化グルカゴン関連類縁体ペプチドのアシル基は、任意の大きさ、例えば任意の長さの炭素鎖であることができ、直鎖でも分岐鎖でもよい。本発明の幾つかの特定の実施態様において、アシル基は、C4～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ることができる。幾つかの実施態様において、アシル基は、C8～C20脂肪酸、例えばC14脂肪酸又はC16脂肪酸である。

【0135】

50

代替的な実施態様において、アシル基は胆汁酸である。胆汁酸は、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、タウロコール酸、グリココール酸及びコレステロール酸が含まれるが、これらに限定されない任意の適切な胆汁酸であることができる。

【0136】

本明細書に記載されているアシル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは更に修飾されて、親水性部分を含むことができる。幾つかの特定の実施態様において、親水性部分は、ポリエチレングリコール（PEG）鎖を含むことができる。親水性部分の組み込みは、本明細書に記載されたいずれかの方法のような任意の適切な手段によって達成することができる。この点において、アシル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、本明細書に記載されている修飾のいずれかを含む配列番号612を含むことができ、ここで、10、20、24及び29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）の少なくとも1個のアミノ酸はアシル基を含み、16、17、21、24若しくは29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）、C末端延長内の位置、又はC末端アミノ酸の少なくとも1個のアミノ酸は修飾されて、Cys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheとなり、アミノ酸の側鎖は、親水性部分（例えば、PEG）に共有結合している。幾つかの実施態様において、アシル基は、場合によりCys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheを含むスペーサーを介して10位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）に結合しており、親水性部分は、24位のCys残基に組み込まれている。

【0137】

あるいは、アシル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、スペーサーを含むことができ、ここでスペーサーは、アシル化も修飾もされて、親水性部分を含む。適切なスペーサーの非限定例には、Cys、Lys、Orn、ホモ-Cys及びAc-Pheからなる群より選択される1個以上のアミノ酸を含むスペーサーが挙げられる。

【0138】

アルキル化

一つの実施態様によると、グルカゴン関連類縁体ペプチド、例えば、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス4グルカゴン関連類縁体ペプチド又はクラス5グルカゴン関連類縁体ペプチドは、修飾されて、循環半減期を延長する及び／又は作用の開始を遅延する及び／若しくは作用の持続時間を延長する及び／又はDPP-IVのようなプロテアーゼに対する耐性を改善する目的で、エーテル、チオエーテル又はアミノ結合を介してグルカゴン関連類縁体ペプチドに結合しているアルキル基を含む。

【0139】

アルキル化は、グルカゴン、GLP-1又は他のグルカゴン関連類縁体ペプチド受容体に関してグルカゴン関連類縁体ペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト活性が保持される限り、1～29位、C末端延長内の位置、又はC末端アミノ酸のいずれかを含む、グルカゴン関連類縁体内の任意の位置において実施することができる。幾つかの実施態様において、非アルキル化ペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する場合、アルキル化ペプチドはグルカゴンアゴニスト活性を保持する。他の実施態様において、非アルキル化ペプチドがグルカゴンアンタゴニスト活性を有する場合、アルキル化ペプチドはグルカゴンアンタゴニスト活性を保持する。幾つかの実施態様において、非アルキル化ペプチドがGLP-1アゴニスト活性を有する場合、アルキル化ペプチドは、GLP-1アゴニスト活性を保持する。非限定例には、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）でのアルキル化が挙げられる。アルキル基を、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ基に直接的に又はグルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ基にスペーサーを介して間接的に共有結合することができ、ここでスペーサーは、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ基とアルキル基との間に位置している。グルカゴン関連類縁体ペプチドを、親水性部分が結合している同じアミノ酸の位置又は異なるアミノ酸の位置でアルキル化する

ことができる。非限定例には、10位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）でのアルキル化、及びグルカゴン関連類縁体ペプチドのC末端部分における1つ以上の位置、例えば24、28若しくは29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）、C末端延長内、又はC末端（例えば、C末端Cysの付加を介する）でのペグ化が挙げられる。

【0140】

本発明の特定の態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシル又はチオール直接的なアルキル化により修飾されて、アルキル基を含む。幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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アルキル化される。幾つかの実施態様において、アルキル化は、10、20、24又は29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）においてである。この点において、アルキル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号612のアミノ酸配列を含むことができるし、又は10、20、24及び29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のアミノ酸の少なくとも1個が修飾されて側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオールを含む任意のアミノ酸となる、本明細書に記載されている1つ以上のアミノ酸修飾を含む配列番号612の修飾アミノ酸配列を含むこともできる。本発明の幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドの直接アルキル化は、10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。

【0141】

幾つかの実施態様において、側鎖アミンを含むアミノ酸は、式VIIIのアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式VIIIのアミノ酸は、nが4（Lys）であるか又はnが3（Orn）であるアミノ酸である。

【0142】

他の実施態様において、側鎖ヒドロキシルを含むアミノ酸は、式IXのアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式IXのアミノ酸は、nが1（Ser）であるアミノ酸である。

【0143】

更に他の実施態様において、側鎖チオールを含むアミノ酸は、式Xのアミノ酸である。幾つかの例示的な実施態様において、式Xのアミノ酸は、nが1（Cys）であるアミノ酸である。

【0144】

本発明の一つの実施態様において、アルキル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、ペプチドとアルキル基との間にスペーサーを含む。幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、アルキル基に共有結合しているスペーサーと共有結合する。幾つかの例示的な実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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り修飾されてアルキル基を含み、ここでスペーサーは、グルカゴン関連類縁体ペプチドの10、20、24又は29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のアミノ酸の側鎖に結合している。スペーサーが結合しているアミノ酸は、スペーサーへの結合を可能にする部分を含む任意のアミノ酸であることができる。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）が適している。この点に関して、アルキル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号612のアミノ酸配列を含もことができるし、又は10、20、24及び29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のアミノ酸の少なくとも1個が修飾されて側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはカルボキシレートを含む任意のアミノ酸となる、本明細書に記載されている1つ以上のアミノ酸修飾を含む配列番号612の修飾アミノ酸配列を含むこともできる。

【0145】

幾つかの実施態様において、スペーサーは、側鎖アミン、ヒドロキシル若しくはチオー

ルを含むアミノ酸であるか又は側鎖アミン、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若しくはトリペプチドである。

【0146】

アルキル化がスパーサーのアミン基を介して生じる場合、アルキル化は、アミノ酸のアルファアミン又は側鎖アミンを介して生じることができる。アルファアミンがアルキル化される場合、スパーサーアミノ酸は、任意のアミノ酸であることができる。例えば、スパーサーアミノ酸は、疎水性アミノ酸、例えばGly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyrであることができる。あるいは、スパーサーアミノ酸は、酸性残基、例えばAsp及びGluであることができる。スパーサーアミノ酸の側鎖アミンがアルキル化される場合、スパーサーアミノ酸は、側鎖アミンを含むアミノ酸、例えば式VIIIのアミノ酸（例えば、Lys又はOrn）である。この場合、スパーサーアミノ酸のアルファアミンと側鎖アミンの両方ともアルキル化されることが可能であり、それによりグルカゴンペプチドがジアルキル化される。本発明の実施態様はそのようなジアルキル化分子を含む。

10

【0147】

アルキル化がスパーサーのヒドロキシル基を介して生じる場合、アミノ酸又はスパーサーのアミノ酸のうちの1個は、式IXのアミノ酸であることができる。特定の例示的な実施態様において、アミノ酸はSerである。

【0148】

アルキル化がスパーサーのチオール基を介して生じる場合、アミノ酸又はスパーサーのアミノ酸のうちの1個は、式Xのアミノ酸であることができる。特定の例示的な実施態様において、アミノ酸はCysである。

20

【0149】

一つの実施態様において、スパーサーは、親水性二官能スパーサーを含む。特定の実施態様において、スパーサーは、アミノポリ（アルキルオキシ）カルボキシレートを含む。この点において、スパーサーは、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、ここでmは、1～6の任意の整数であり、そしてnは、2～12の任意の整数であり、例えば、Peptides International, Inc. (Louisville, KY)により販売されている8-アミノ-3, 6-ジオキサオクタン酸である。

【0150】

アミン、ヒドロキシル及びチオールを介したペプチドアルキル化に適した方法は、当該技術において知られている。例えば、ウィリアムソンエーテル合成を使用して、グルカゴン関連類縁体ペプチドとアルキル基との間にエーテル結合を形成することができる。また、ハロゲン化アルキルによるペプチドの求核置換反応は、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すことができる。

30

【0151】

アルキル化グルカゴン関連類縁体ペプチドのアルキル基は、任意の大きさ、例えば任意の長さの炭素鎖であることができ、直鎖でも分岐鎖でもよい。本発明の幾つかの実施態様において、アルキル基は、C4～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、C14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ることができる。幾つかの実施態様において、アルキル基は、C8～C20アルキル、例えばC14アルキル又はC16アルキルである。

40

【0152】

幾つかの実施態様において、アルキル基は、胆汁酸のステロイド部分、例えば、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、タウロコール酸、グリココール酸及びコレステロール酸を含む。

【0153】

本明細書に記載されているアルキル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは更に修飾されて

50

、親水性部分を含むことができる。幾つかの特定の実施態様において、親水性部分は、ポリエチレングリコール（PEG）鎖を含むことができる。親水性部分の組み込みは、本明細書に記載されたいずれかの方法のような任意の適切な手段によって達成することができる。この点において、アルキル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号612又は本明細書に記載されているアミノ酸修飾の1つ以上を含む配列番号2のアミノ酸配列を含むことができ、ここで、10、20、24及び29位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）の少なくとも1個のアミノ酸はアルキル基を含み、16、17、21、24若しくは29位、C末端延長内の位置、又はC末端アミノ酸の少なくとも1個のアミノ酸は修飾されて、Cys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheとなり、アミノ酸の側鎖は、親水性部分（例えば、PEG）に共有結合している。幾つかの実施態様において、アルキル基は、場合によりCys、Lys、Orn、ホモ-Cys又はAc-Pheを含むスペーサーを介して10位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）に結合しており、親水性部分は、24位のCys残基に組み込まれている。

10

【0154】

あるいは、アルキル化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、スペーサーを含むことができ、ここでスペーサーは、アルキル化も修飾もされて、親水性部分を含む。適切なスペーサーの非限定例には、Cys、Lys、Orn、ホモ-Cys及びAc-Pheからなる群より選択される1個以上のアミノ酸を含むスペーサーが挙げられる。

【0155】

アルファヘリックス構造の安定化

20

幾つかの実施態様において、分子内架橋が2つのアミノ酸側鎖の間に形成されて、グルカゴン関連類縁体ペプチドのカルボキシ末端部分（例えば、アミノ酸12～29（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる））の三次元構造を安定する。2つのアミノ酸側鎖は、水素結合、塩架橋の形成のようなイオン相互作用又は共有結合を介して互いに結合することができる。

【0156】

幾つかの実施態様において、分子内架橋は、3個のアミノ酸で離れている2個のアミノ酸、例えば*i*と*i*+4の位置のアミノ酸の間に形成され、ここで*i*は、野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる12～25の間（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24及び25）の任意の整数である。より詳細には、野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによるアミノ酸対12と16、16と20、20と24又は24と28（*i*=12、16、20又は24であるアミノ酸対）の側鎖が、互いに結合し、それによりグルカゴンアルファヘリックスを安定化する。代替的には、*i*は17であることができる。

30

【0157】

幾つかの特定の実施態様において、*i*と*i*+4の位置のアミノ酸が分子内架橋で結合している場合、リンカーの大きさは、約8原子又は約7～9原子である。

【0158】

別の実施態様において、分子内架橋は、2個のアミノ酸で離れている2個のアミノ酸、例えば*j*と*j*+3の位置のアミノ酸の間に形成され、ここで*j*は、野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる12～26の間（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25及び26）の任意の整数である。幾つかの特定の実施態様において、*j*は17である。

40

【0159】

幾つかの特定の実施態様において、*j*と*j*+3位のアミノ酸が分子内架橋で結合している場合、リンカーの大きさは、約6原子又は約5～7原子である。

【0160】

更に他の実施態様において、分子内架橋は、6個のアミノ酸で離れている2個のアミノ酸、例えば*k*と*k*+7の位置のアミノ酸の間に形成され、ここで*k*は、野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる12～22の間（例えば、12、13、14、15、16、1

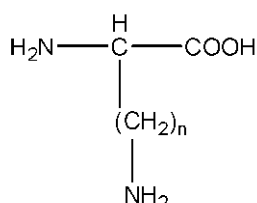
50

7、18、19、20、21及び22)の任意の整数である。幾つかの特定の実施態様において、kは、12、13又は17である。例示的な実施態様において、kは17である。

【0161】

共有結合して6原子結合架橋を形成することができるアミノ酸対形成の例には、OrnとAsp、Gluと式V I I I (式中、nは2である)のアミノ酸及びホモグルタミン酸と式V I I I (式中、nは1である)のアミノ酸が挙げられ、ここで式V I I Iは、下記：

【化44】



式中、n = 1 ~ 4

[式V I I I]

10

である。

【0162】

20

共有結合して7原子結合架橋を形成することができるアミノ酸対形成の例には、Orn-Glu (ラクタム環)、Lys-Asp (ラクタム) 又はホモSer-ホモGlu (ラクトン) が挙げられる。8原子リンカーを形成することができるアミノ酸対形成の例には、Lys-Glu (ラクタム)、ホモLys-Asp (ラクタム)、Orn-ホモGlu (ラクタム)、4-アミノPhe-Asp (ラクタム) 又はTyr-Asp (ラクトン) が挙げられる。9原子リンカーを形成することができるアミノ酸対形成の例には、ホモLys-Glu (ラクタム)、Lys-ホモGlu (ラクタム)、4-アミノPhe-Glu (ラクタム) 又はTyr-Glu (ラクトン) が挙げられる。これらのアミノ酸の側鎖のいずれかを、アルファヘリックスの三次元構造が妨げられない限り、追加的な化学基で追加的に置換することができる。当業者は、同様の大きさ及び所望の効果の構造の安定化を作り出す、代替的な対形成又は化学的に修飾された誘導体を含む代替的なアミノ酸類縁体を想像することができる。例えば、ホモシステイン-ホモシステインジスルフィド架橋は、長さが6個の原子であり、更に修飾して所望の効果をもたらすことができる。共有結合がなくても、上記に記載されたアミノ酸対形成又は当業者が想像できる同様の対形成も、非共有結合を介して、例えば塩架橋又は水素結合相互作用の形成を介してアルファヘリックスに追加的な安定性をもたらすことができる。

30

【0163】

ラクタム環の大きさは、アミノ酸の側鎖の長さに応じて変わることができ、一つの実施態様において、ラクタムは、リシンアミノ酸の側鎖とグルタミン酸の側鎖に結合することによって形成される。更なる例示的な実施態様 (野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる) は、場合によりラクタム架橋による以下の対形成を含む：12位のGluと16位のLys；12位の天然Lysと16位のGlu；16位のGluと20位のLys；16位のLysと20位のGlu；20位のGluと24位のLys；20位のLysと24位のGlu；24位のGluと28位のLys；24位のLysと28位のGlu。あるいは、ラクタム環におけるアミド結合の順番を逆転することができる (例えば、ラクタム環を、Lys12とGlu16の側鎖、あるいはGlu12とLys16の側鎖の間に形成することができる)。

40

【0164】

ラクタム架橋以外の分子内架橋を使用して、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアルファヘリックスを安定化することができる。一つの実施態様において、分子内架橋は疎水性

50

架橋である。この場合、分子内架橋は、場合により、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアルファヘリックスの疎水性面の部分である2個のアミノ酸の側鎖の間にある。例えば、疎水性架橋により結合しているアミノ酸のうちの1個は、10、14及び18位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のアミノ酸であることができる。

【0165】

一つの特定の態様において、オレフィンメタセシスを、全炭化水素架橋系を使用してグルカゴン関連類縁体ペプチドのアルファヘリックスの1又は2巻きを架橋するために使用する。この場合、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、多様な長さのオレフィン性側鎖を有する及び*i*と*i*+4又は*i*+7の位置でR又はS立体化学のいずれかに配置されている、 α -メチル化アミノ酸を含むことができる。例えば、オレフィン性側鎖は $(CH_2)_n$ を含むことができ、ここで*n*は、1~6の任意の整数である。一つの実施態様において、架橋長さが8原子では、*n*は3である。そのような分子内架橋を形成する適切な方法は、当該技術において記載されている。例えば、Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000)及びWalensky et al., Science 305: 1466-1470 (2004)を参照すること。あるいは、グルカゴンペプチドは、隣接するヘリックスの巻きに配置されているオーアシルSer残基を含むことができ、これらはルテニウム触媒閉環メタセシスを介して一緒に架橋されている。そのような架橋の手順は、例えばBlackwell et al., Angew. Chem., Int. Ed. 37: 3281-3284 (1998)に記載されている。

【0166】

別の特定の態様において、システインのペプチド模倣体として広く採用されている、非天然チオジアラニンアミノ酸であるランチオニンの使用を、アルファヘリックスの1巻きを架橋するために使用する。ランチオニンに基づく環化の適切な方法は、当該技術において知られている。例えば、Matteucci et al., Tetrahedron Letters 45: 1399-1401 (2004); Mayer et al., J. Peptide Res. 51: 432-436 (1998); Polinsky et al., J. Med. Chem. 35: 4185-4194 (1992); Osapay et al., J. Med. Chem. 40: 2241-2251 (1997); Fukase et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 65: 2227-2240 (1992); Harpp et al., J. Org. Chem. 36: 73-80 (1971); Goodman and Shao, Pure Appl. Chem. 68: 1303-1308 (1996);及びOsapay and Goodman, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1599-1600 (1993)を参照すること。

【0167】

幾つかの実施態様において、*i*と*i*+7位の2つのGlu残基の間の α , ω -ジアミノアルカン鎖、例えば1, 4-ジアミノプロパンと1, 5-ジアミノペンタンを使用して、グルカゴンペプチドのアルファヘリックスを安定化する。そのような鎖は、ジアミノアルカン鎖の長さに応じて、9原子又はそれ以上の長さの架橋の形成をもたらす。そのような鎖で架橋されたペプチドを産生する適切な方法は、当該技術において記載されている。例えば、Phelan et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 455-460 (1997)を参照すること。

【0168】

本発明の更に別の実施態様において、ジスルフィド架橋を使用して、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアルファヘリックスの1又は2巻きを架橋する。あるいは、1個又は両方の硫黄原子がメチレン基で置換されて等配電子マクロ環化をもたらす、修飾ジスルフィド結合を使用して、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアルファヘリックスを安定化する。ジスルフィド架橋又は硫黄に基づく環化により修飾する適切な方法は、例えば、Jackson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 9391-9392 (1991)及びRudinger and Jost, Experientia 20: 570-571 (1964)に記載されている。

【0169】

更に別の実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアルファヘリックスは、*i*と*i*+4に位置する2つのHis残基又はHisとCys対による金属原子の結合を介して安定化される。金属原子は、例えば、Ru(III)、Cu(II)、Zn(II)又はCd(II)であることができる。そのような金属結合に基づいたアルファヘリックス安定化の方法は、当該技術において知られている。例えば、Andrews and Tabor, T

etrahedron 55: 11711-11743 (1999); Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 112: 1630-1632 (1990);及びGhadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 9063-9064 (1997)を参照すること。

【0170】

グルカゴン関連類縁体ペプチドのアルファヘリックスは、代替的には他のペプチド環化の方法により安定化することができ、それらの方法は、Davies, J. Peptide. Sci. 9: 471-501 (2003)により検討されている。アルファヘリックスは、アミド化架橋、チオエーテル架橋、チオエステル架橋、尿素架橋、カルバメート架橋、スルホンアミド架橋などの形成を介して安定化することができる。例えば、チオエステル架橋を、C末端とCys残基の側鎖との間に形成することができる。あるいは、チオエステルを、チオール(Cys)及びカルボン酸(例えば、Asp、Glu)を有するアミノ酸の側鎖を介して形成することができる。別の方法において、ジカルボン酸、例えばスベリン酸(オクタン二酸)などのような架橋剤は、遊離アミン、ヒドロキシル、チオール基及びこれらの組み合わせのような、アミノ酸側鎖の2つの官能基の間に結合を導入することができる。

10

【0171】

一つの実施態様によると、グルカゴン関連類縁体ペプチドのアルファヘリックスは、 i と $i+4$ の位置への疎水性アミノ酸の組み込みを介して安定化される。例えば、 i はTyrであることができ、そして $i+4$ はVal又はLeuであることができる； i はPheであることができ、そして $i+4$ はCys又はMetであることができる； i はCysであることができ、そして $i+4$ はMetであることができる；或いは i はPheであることができ、そして $i+4$ はIleであることができる。本明細書の目的のために、上記のアミノ酸対形成を逆転することができ、これにより i 位置の示されたアミノ酸を代替的に $i+4$ の位置に配置することができ、一方、 $i+4$ のアミノ酸を i 位置に配置することができることが理解されるべきである。

20

【0172】

グルカゴン関連類縁体ペプチドが、グルカゴンアゴニスト活性、GIPアゴニスト活性、グルカゴンアンタゴニスト活性及びGLP-1活性を有するペプチドである、本発明の他の実施態様によると、アルファヘリックスは、グルカゴン関連類縁体ペプチドのC末端部分(野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによるアミノ酸12~29の付近)に1個以上のアルファヘリックス安定化アミノ酸を(アミノ酸置換又は挿入にいずれかにより)組み込むことを介して安定化される。特定の実施態様において、アルファヘリックス安定化アミノ酸は、メチル、エチル、プロピル及び n -ブチルから選択される同一若しくは異なる基により二置換されているアミノ酸である又はシクロオクタン若しくはシクロヘプタン(例えば、1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸)により二置換されているアミノ酸である任意のアミノイソ酪酸(AIB)が含まれるが、これに限定されない α 、 α -二置換アミノ酸である。幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドの16、17、18、19、20、21、24又は29位の1、2、3、4つ又はそれ以上は、 α 、 α -二置換アミノ酸で置換されている。特定の実施態様において、16、20、21及び24位の1、2、3つ又は全てがAIBで置換されている。

30

【0173】

結合体

本開示は、また、グルカゴン関連類縁体ペプチド(例えば、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス4グルカゴン関連類縁体ペプチド又はクラス5グルカゴン関連類縁体ペプチド)が、場合により共有結合を介し、そして場合によりリンカーを介して、結合体部分に結合している結合体を包含する。結合は、共有化学結合、静電気、水素、イオン、ファンデルワールスのような物理的な力又は疎水的若しくは親水的相互作用により達成することができる。ビオチン-アビジン、リガンド/受容体、酵素/基質、核酸/核酸結合タンパク質、脂質/脂質結合タンパク質、細胞付着分子パートナー又は互いに親和性を有する任意の結合パートナー若しくはそのフラグメントを含む、多様な非共有結合系を使用す

40

50

ることができる。

【0174】

グルカゴン関連類縁体ペプチドを、ペプチドの標的アミノ酸残基と、これらの標的アミノ酸の選択された側鎖又はN若しくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤との反応により、直接的な共有結合を介して結合体部分に結合することができる。ペプチド又は結合体部分の反応性基には、例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミド又はヒドラジノ基が含まれる。誘導体化剤には、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介して結合）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を介して結合）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸又は当該技術に既知の他の作用物質が含まれる。あるいは、結合体部分を、多糖又はポリペプチド担体のような中間体担体を介してペプチドに間接的に結合することができる。多糖担体の例にはアミノデキストランが挙げられる。適切なポリペプチド担体の例には、ポリリシン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、それらのコポリマー及びこれらのアミノ酸の混合ポリマー、並びに得られる装填担体に望ましい溶解性の特性を付与する他のもの、例えばセリンが挙げられる。

10

【0175】

システイニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸又はクロロアセトアミドのような α -ハロアセテート（及び対応するアミン）と反応して、カルボキシメチル又はカルボキシアミドメチル誘導体を与える。システイニル残基は、プロモトリフルオロアセトン、アルファ-ブロモ- β -(5-イミドゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロ水銀ベンゾエート、2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール又はクロロ-7-ニトロベンゾ-オキサ-1, 3-ジアゾールと反応させることによって誘導体化される。

20

【0176】

ヒスチジル残基は、ジエチルピロカーボネートとpH 5.5～7.0で反応させることによって誘導体化され、それはこの作用物質がヒスチジル側鎖に比較的特異性があるからである。パラ-プロモフェナシルプロミドも有用であり、反応は、好ましくは0.1Mカコジル酸ナトリウムによりpH 6.0で実施される。

【0177】

リシニル及びアミノ末端残基は、無水コハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応する。これらの作用物質による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転する効果を有する。アルファ-アミノ含有残基を誘導体化するのに適した他の試薬には、メチルピコリンイミデート、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2, 4-ペンタンジオンのようなイミドエステル及びグリオキシレートとのトランスアミダーゼ触媒反応が含まれる。

30

【0178】

アルギニル残基は、1つ又は幾つかの従来試薬、なかでもフェニルグリオキサール、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサンジオン及びニンヒドリンによる反応で修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高 pK_a のために、反応がアルカリ条件下で実施される必要がある。更に、これらの試薬は、リシンの基、またアルギニン-イプシロン-アミノ基と反応することができる。

40

【0179】

チロシル残基の特定の修飾は、スペクトル標識をチロシル残基に導入するのに特に興味深く、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンによる反応によって行うことができる。最も一般的には、N-アセチルイミダゾール及びテトラニトロメタンを使用して、O-アセチルチロシル種及び3-ニトロ誘導体がそれぞれ形成される。

【0180】

カルボキシル側基（アスパルチル又はグルタミル）は、R及びR'が異なるアルキル基であるカルボジイミド（ $R-N=C=N-R'$ ）、例えば1-シクロヘキシル-3-(2

50

ーモルホリニルー４ーエチル）カルボジイミド又は１ーエチルー３ー（４ーアゾニアー４，４ージメチルペンチル）カルボジイミドとの反応により選択的に修飾される。更に、アスパルチル又はグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換される。

【０１８１】

他の修飾には、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のアルファアミノ基のメチル化（T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)）、アスパラギン又はグルタミンの脱アミド化、N末端アミンのアセチル化、及び／又はC末端カルボン酸基のアミド化若しくはエステル化が含まれる。

10

【０１８２】

別の種類の共有的修飾には、ペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的結合が含まれる。糖を、（a）アルギニン及びヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）システインのような遊離スルフヒドリル基、（d）セリン、トレオニン若しくはヒドロキシプロリンのような遊離ヒドロキシル基、（e）チロシン若しくはトリプトファンのような芳香族残基、又は（f）グルタミンのアミド基、に結合することができる。これらの方法は、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330及びAplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【０１８３】

本明細書に記載されているグルカゴン関連類縁体ペプチドのいずれかに結合することができる例示的な結合体部分には、異種ペプチド又はポリペプチド（例えば、血漿タンパク質を含む）、標的作用物質、免疫グロブリン若しくはその一部（例えば、可変部領域、CDR若しくはFc領域）、放射性同位体、蛍光体若しくは酵素標識のような診断用標識、水溶性ポリマーを含むポリマー、又は他の治療若しくは診断剤が含まれるが、これらに限定されない。一つの実施態様において、本発明のグルカゴン関連類縁体ペプチド及び血漿タンパク質を含む結合体が提供され、ここで血漿タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、フィブリノゲン及びグロブリンからなる群より選択される。一つの実施態様において、結合体の血漿タンパク質部分は、アルブミン又はトランスフェリンである。幾つかの実施態様において、リンカーは、1～約60個、又は1～30個以上の原子長さ、2～5個の原子、2～10個の原子、5～10個の原子又は10～20個の原子長さの原子鎖を含む。幾つかの実施態様において、鎖原子は全て炭素原子である。幾つかの実施態様において、リンカーの主鎖の鎖原子は、C、O、N及びSからなる群より選択される。鎖原子及びリンカーは、より溶解性のある結合体をもたらすと予想される溶解性（親水性）に従って選択することができる。幾つかの実施態様において、リンカーは、酵素若しくは他の触媒による切断、又は標的組織若しくは臓器若しくは細胞において見出される加水分解的条件による切断の対象となる官能基を提供する。幾つかの実施態様において、リンカーの長さは、立体障害の潜在性を低減するのに十分な長さである。リンカーが共有結合又はペプチジル結合であり、結合体がポリペプチドである場合、結合体は全体が融合タンパク質であることができる。そのようなペプチジルリンカーは任意の長さであることができる。例示的なリンカーは、約1～50個のアミノ酸長さ、5～50個、3～5個、5～10個、5～15個又は10～30個のアミノ酸長さである。そのような融合タンパク質は、代替的には当業者に既知の組み換え遺伝子操作法により產生することができる。

20

30

40

【０１８４】

上記に記述したように、幾つかの実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、免疫グロブリン又はその一部（例えば、可変部領域、CDR又はFc領域）に結合、例えば融合している。既知の種類の免疫グロブリン（Ig）には、IgG、IgA、IgE、IgD又はIgMが含まれる。Fc領域はIg重鎖のC末端領域であり、これは、再循環（延長された半減期をもたらす）、抗体依存性細胞伸介細胞障害性（ADCC）及び補体依存性細胞障害性（CDC）のような活性を実施するFc受容体への結合に関与してい

50

る。

【0185】

例えば、幾つかの定義によると、ヒト I g G 重鎖 F c 領域は、重鎖の C y s 2 2 6 から C 末端まで伸びている。「ヒンジ領域」は、一般に、ヒト I g G 1 の G l u 2 1 6 から P r o 2 3 0 まで伸びている（他の I g G アイソタイプのヒンジ領域は、システイン結合に関わるシステインを整列することにより I g G 1 配列と整列させることができる）。I g G の F c 領域には 2 つの定常部ドメイン、C H 2 及び C H 3 が含まれる。ヒト I g G の F c 領域の C H 2 ドメインは、通常、アミノ酸 2 3 1 からアミノ酸 3 4 1 まで伸びている。ヒト I g G の F c 領域の C H 3 ドメインは、通常、アミノ酸 3 4 2 から酸 4 4 7 まで伸びている。免疫グロブリン又は免疫グロブリンのフラグメント若しくは領域のアミノ酸番号付けに関する参照は、全て、Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.に基づいている。関連する実施態様において、F c 領域は、1 つ以上の、C H 1 以外の免疫グロブリン重鎖の天然又は修飾定常部領域、例えば I g G 及び I g A の C H 2 及び C H 3 領域又は I g E の C H 3 及び C H 4 領域を含むことができる。

10

【0186】

適切な結合体部分は、F c R n 結合部位を含む免疫グロブリン配列の一部を含む。サルベージ受容体である F c R n は、免疫グロブリンを再循環して、血液循環に戻すことに参与する。F c R n 受容体に結合する I g G の F c 部分の領域は、X 線結晶構造解析に基づいて記載されている (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379)。F c R n への F c の主な接触領域は、C H 2 及び C H 3 ドメインの接合部に近接している。F c - F c R n 接触点は、全て単一 I g 重鎖の範囲内である。主な接触部位には、C H 2 ドメインのアミノ酸残基 2 4 8、2 5 0 ~ 2 5 7、2 7 2、2 8 5、2 8 8、2 9 0 ~ 2 9 1、3 0 8 ~ 3 1 1 及び 3 1 4、並びに C H 3 ドメインのアミノ酸残基 3 8 5 ~ 3 8 7、4 2 8 及び 4 3 3 ~ 4 3 6 が含まれる。

20

【0187】

幾つかの結合体部分は、F c γ R 結合部位（1 つ又は複数）を含んでも含まなくてもよい。F c γ R は、A D C C 及び C D C に参与する。F c γ R と直接接触する F c 領域内の位置の例は、アミノ酸 2 3 4 ~ 2 3 9（低ヒンジ領域）、アミノ酸 2 6 5 ~ 2 6 9（B / C ループ）、アミノ酸 2 9 7 ~ 2 9 9（C' / E ループ）及びアミノ酸 3 2 7 ~ 3 3 2（F / G）ループである (Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000)。I g E の低ヒンジ領域は、F c R I 結合にも関わっている (Henry, et al., Biochemistry 36, 15568-15578, 1997)。I g A 受容体結合に関わる残基は、Lewisらにより記載されている (J Immunol. 175:6694-701, 2005)。I g E 受容体結合に関わるアミノ酸残基は、Sayers らにより記載されている (J Biol Chem. 279(34):35320-5, 2004)。

30

【0188】

アミノ酸修飾を免疫グロブリンの F c 領域に行うことができる。そのような可変部 F c 領域は、F c 領域の C H 3 ドメイン（残基 3 4 2 ~ 4 4 7）に少なくとも 1 つのアミノ酸修飾、及び／又は F c 領域の C H 2 ドメイン（残基 2 3 1 ~ 3 4 1）に少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含む。F c R n に親和性の増加を付与すると考えられる突然変異には、T 2 5 6 A、T 3 0 7 A、E 3 8 0 A 及び N 4 3 4 A が含まれる (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591)。他の突然変異は、F c R n の親和性を有意に低減することなく、F c γ R I、F c γ R I I A、F c γ R I I B 及び／又は F c γ R I I I A への F c 領域の結合を低減することができる。例えば、A l a 又は他のアミノ酸による F c 領域の 2 9 7 位の A s n の置換は、高度に保存された N-グリコシル化部位を除去し、F c 領域の延長された半減期を伴って免疫原性の低減、また、F c γ R への結合の低減をもたらすことができる (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591)。F c γ R への結合を低減する、I g G 1 の 2 3 3 ~ 2 3 6 位でのアミノ酸の修飾が行われた (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 and Armour et al. 1999, Eur. J.

40

50

Immunol. 29:2613)。幾つかの例示的なアミノ酸置換は、米国特許第7, 355, 008号及び同第7, 381, 408号に記載されており、それぞれその全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0189】

融合ペプチドーC末端延長

特定の実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドペプチドは、COOH、CONH₂、GPSSGAPPPS（配列番号624）、GPSSGAPPPS-CONH₂（配列番号723）、オキシントモジュリンカルボキシ末端延長、KRNRNNIA（配列番号625）又はKGKKNDWKHNITQ（配列番号662）が含まれるが、これらに限定されない、C末端又はC末端アミノ酸配列を含むことができる。例えば、エキセ

ンディン-4の末端の10個のアミノ酸（すなわち、配列番号624の配列（GPSSGAPPPS））は、本開示のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチド、クラス4グルカゴン関連類縁体ペプチド又はクラス5グルカゴン関連類縁体ペプチドのカルボキシ末端に結合している。

10

【0190】

減量を誘導する別の化合物は、オキシントモジュリンであり、これは小腸において見出された天然に生じる消化ホルモンである（Diabetes 2005; 54:2390-2395を参照すること）。オキシントモジュリンは、グルカゴンの29アミノ酸配列、その後に続く配列番号625（KRNRNNIA）の8アミノ酸カルボキシ末端延長を含有する、37アミノ酸ペ

プチド（配列番号661）である。したがって、一つの実施態様において、配列番号625の配列のカルボキシ末端延長又は配列KRNRを有する4アミノ酸延長を更に含む、グルカゴン関連類縁体ペプチドのプロドラッグ誘導体が提供される。

20

【0191】

グルカゴン関連類縁体ペプチドの作製方法

本明細書に開示されているこのグルカゴン関連類縁体ペプチド（及びプロドラッグ）を、標準的な合成方法、組み換えDNA技術又はペプチド及び融合タンパク質を調製する他の任意の方法により調製することができる。特定の非天然アミノ酸を標準的な組み換えDNA技術により発現することはできないが、それらを調製する技術は当該技術において知られている。非ペプチド部分を包含する本発明の化合物を、適用可能であれば、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り合成することができる。

30

【0192】

グルカゴン関連類縁体ペプチドのクラスは、以下において詳細に記載される。クラス1、2、3、4及び5グルカゴン関連類縁体ペプチドに関する開示のそれぞれのセクションに関して、修飾は、上記に詳述されたプロドラッグ化合物のグルカゴン関連類縁体ペプチド部分に関して記載される。したがって、グルカゴン関連類縁体ペプチドのクラスに関して記載される構造要素は、更に修飾されて上記に記載されたプロドラッグ化合物を生じる生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の構造要素である。

【0193】

クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチド

特定の実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドはクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドであり、本明細書、並びに国際特許出願公報第2008/086086号（2008年7月17日公開）及び米国仮出願第61/090, 415号に記載されており、その内容は全体が参照として本明細書に組み込まれる。

40

【0194】

活性

クラス1グルカゴンペプチドは、天然グルカゴンペプチド（配列番号701）に対してグルカゴン受容体活性を保持する。例えば、グルカゴンペプチドは、天然グルカゴンの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%の活性、80%の活性、85%の活性又は90%の活性を保持することができる（例えば実施例2に

50

一般的に記載されているアッセイを使用する c A M P 産生により測定した、グルカゴンペプチド対グルカゴンの E C 5 0 の逆比として計算)。一つの実施態様において、クラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンと同じ又はそれを超える活性（本明細書において、用語「効力」と同義的に使用される）を有する。

【0195】

本明細書に記載されている任意のクラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、例えば実施例 2 のアッセイを使用して、グルカゴン受容体を過剰発現している H E K 2 9 3 細胞における c A M P 誘導について試験したとき、約 1 0 0 nM、7 5 nM、5 0 nM、4 0 nM、3 0 nM、2 0 nM、1 0 nM、5 nM、1 nM 又はそれ以下の E C 5 0 をヒトグルカゴン受容体において示すことができる。典型的なペグ化ペプチドは、非ペグ化ペプチドと比較するとより高い E C 5 0 を示す。

10

【0196】

幾つかの実施態様において、クラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、G L P - 1 受容体において天然 G L P - 1 の約 5 %、4 %、3 %、2 % 若しくは 1 % 未満の活性を示す及び／又は G L P - 1 受容体と比較してグルカゴン受容体に約 5 倍、1 0 倍若しくは 1 5 倍を超える選択性を示す。例えば、幾つかの実施態様において、クラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、G L P - 1 受容体において天然 G L P - 1 の 5 % 未満の活性を示し、G L P - 1 受容体と比較してグルカゴン受容体に 5 倍を超える選択性を示す。

【0197】

改善された溶解性

20

天然グルカゴンは、特に生理学的 p H で水溶液に不十分な溶解性しか示さず、経時的に凝集及び沈殿する傾向がある。対照的に、クラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、一つの実施態様において、2 5 °C で 2 4 時間後の 6 ~ 8 又は 6 ~ 9 の p H、例えば p H 7 で天然グルカゴンと比較して少なくとも 2 倍、5 倍又はそれよりもさらに高い溶解性を示す。

【0198】

したがって、一つの実施態様において、クラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - S e r - A r g - A r g - A l a - G l n - A s p - P h e - V a l - G l n - T r p - L e u - M e t - A s n - T h r（配列番号 7 0 1）の野生型ペプチドに対して修飾されて、特に約 5 . 5 ~ 約 8 . 0 の p H 範囲で水溶液におけるペプチドの溶解性改善し、同時に、天然ペプチドの生物学的活性を保持する。

30

【0199】

例えば、本明細書に記載されている任意のクラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、親水性部分をペプチドに結合することによって更に改善することができる。そのような基の導入も、例えば延長された循環半減期により測定すると、作用の持続時間を増加する。親水性部分は本明細書において更に記載される。

【0200】

荷電残基による修飾

40

一つの実施態様において、溶解性は、リシン、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なる群より選択される荷電アミノ酸での天然非荷電アミノ酸の置換によりクラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドに電荷を付加する又は荷電アミノ酸をペプチドのアミノ若しくはカルボキシ末端に付加することによって改善される。

【0201】

一つの実施態様によると、クラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、ペプチドが、荷電アミノ酸をペプチドの C 末端部分に、一つの実施態様では、配列番号 7 0 1 の 2 7 位の C 末端側の位置に導入する、アミノ酸置換及び／又は付加により修飾されるという事実によって、改善された溶解性を有する。場合により、1、2 又は 3 個の荷電アミノ酸を、C 末端部分の範囲内に、一つの実施態様では C 末端から 2 7 位に導入することができる。一つの実施態様によると、2 8 位及び／又は 2 9 位の天然アミノ酸が荷電アミノ酸で置換さ

50

れている、並びに／或いは1～3個の荷電アミノ酸がペプチドのC末端、例えば27、28又は29位の後ろに付加されている。例示的な実施態様において、1、2、3個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。他の実施態様において、1、2、3個又は全ての荷電アミノ酸は、正に荷電されている。

【0202】

特定の例示的な実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、以下の修飾の任意の1又は2つを含むことができる：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位の後ろへのEの挿入；27、28又は29位の後ろへのDの挿入。例えば、D28E29、E28E29、E29E30、E28E30、D28E30である。

10

【0203】

一つの例示的な実施態様によると、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号711のアミノ酸配列、又は天然グルカゴン若しくはそのグルカゴンアゴニスト類縁体に対して1～3個の更なるアミノ酸修飾（グルカゴンアゴニストについて本明細書において記載されている）を含有するその類縁体を含む。配列番号711は、天然タンパク質の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いる修飾されたクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドを表す。別の例示的な実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然タンパク質の28位のアスパラギン残基がグルタミン酸で置換されている配列番号738のアミノ酸配列を含む。他の例示的な実施態様は、配列番号724、725、726、733、735、736及び737のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドを含む。

20

【0204】

28及び／若しくは29位において通常に生じるアミノ酸を荷電アミノ酸で置換すること並びに／又はクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドのカルボキシ末端に1～2個の荷電アミノ酸を付加することは、生理学的なpH（すなわち、約6.5～約7.5のpH）の水溶液におけるグルカゴンペプチドの溶解性及び安定性を、少なくとも5倍増強し、30倍まで増強する。したがって、一つの実施態様のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン活性を保持し、25℃で24時間後に測定したとき、約55～8の所定のpH、例えばpH7で天然グルカゴンに対して少なくとも2倍、5倍、10倍、15倍、25倍、30倍又はそれ以上の溶解性を示す。

30

【0205】

グルカゴン活性を依然として保持することが可能であるような追加的な修飾、例えば保存的置換（この修飾は本明細書において更に記載される）をクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドに行うことができる。

【0206】

改善された安定性

任意のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、追加的に、例えば25℃で24時間後に元のペプチドの少なくとも95%を保持する、改善された安定性及び／又は低減された分解を示してもよい。本明細書に開示される任意のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、追加的に、例えば25℃で24時間後に元のペプチドの少なくとも75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%を保持する、5.5～8の範囲内のpHにおいて改善された安定性を示すことができる。クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、その薬学的特性を変える追加的な修飾、例えば、効力の増加、循環半減期の延長、保存寿命の増加、沈殿若しくは凝集の低減及び／又は分解の低減、例えば保存後の切断若しくは化学修飾の発生の低減を含むことができる。

40

【0207】

更なる例示的な実施態様において、前記のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドのいずれかを、配列番号701の15位のアミノ酸を修飾して特に酸性又はアルカリ性の緩衝剤におけるペプチドの経時的な分解を低減することによって、更に修飾して安定性を改善することができる。例示的な実施態様において、15位のAspは、Glu、ホモ-Gl

50

u、システイン酸又はホモシステイン酸で置換されている。

【0208】

あるいは、本明細書に記載されているクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドのいずれかを、配列番号701の16位のアミノ酸を修飾することより更に修飾して、安定性を改善することができる。例示的な実施態様において、16位のSerは、Thr若しくはAlaにより又はグルカゴン受容体における抗力を増強する、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドに関して本明細書に記載されているアミノ酸置換のいずれかにより置換されている。そのような修飾は、Asp15-Ser16のペプチド結合の切断を低減する。

【0209】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載されているクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドのいずれかを、20、21、24又は27の位置のうちの1、2、3つのいずれか又は4つを全て修飾することより更に修飾して、多様なアミノ酸位置での分解を低減することができる。例示的な実施態様には、Ala又はAlaによる20位のGlnの置換、Gluによる21位のAspの置換、Ala又はAlaによる24位のGlnの置換、Leu又はLeuによる27位のMetの置換が含まれる。メチオニンの除去又は置換は、メチオニンの酸化に起因して分解を低減する。Gln又はAsnの除去又は置換は、Gln又はAsnの脱アミド化に起因して分解を低減する。Aspの除去又は置換は、Aspの脱水により環状スクシニミド中間体を形成し、続く異性化によりイソアスパラギン酸塩を形成することにより生じる分解を低減する。

【0210】

増強された効力

別の実施態様によると、ペプチドが天然グルカゴン（配列番号701）の16位にアミノ酸修飾を含む、グルカゴン受容体において増強された効力を有するクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。非限定例によると、そのような増強された効力は、16位の天然に生じるセリンを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負荷電アミノ酸により、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれかにより、又は少なくとも1個のヘテロ原子（例えば、N、O、S、P）を含有する側鎖であり、約4（若しくは3～5）原子長さの側鎖を有する荷電アミノにより置換することによってもたらすことができる。グルタミン酸による16位のセリンの置換は、グルカゴン活性を、グルカゴン受容体において少なくとも2倍、4倍、5倍及び10倍を超えるまで増強する。幾つかの実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、GLP-1受容体に対してよりもグルカゴン受容体に対して選択性を保持し、例えば少なくとも5倍、10倍又は15倍の選択性である。

【0211】

DPP-IV耐性

幾つかの実施態様において、本明細書に開示されているクラス1グルカゴンペプチドは、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低減するために、1又は2位において更に修飾されている。より詳細には、幾つかの実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドの1及び／又は2位は、本明細書に記載されるDPP-IV耐性アミノ酸で置換されている。一つの実施態様において、類縁体ペプチドの2位は、アミノイソ酪酸で置換されている。一つの実施態様において、類縁体ペプチドの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ε-アミノ酪酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。別の実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドの2位は、D-セリン、グリシン及びアミノイソ酪酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。

【0212】

グルカゴンペプチドの1位及び／又は2位のアミノ酸の修飾によるグルカゴン活性の低減は、グルカゴンペプチドのC末端部分（アミノ酸12～29付近）のアルファヘリックス構造の安定化により回復することができる。アルファヘリックス構造は、例えば、共有又は非共有分子内架橋（例えば、位置「i」と「i+4」（ここでiは、12～25

の整数である)のアミノ酸の側鎖の間のラクタム架橋)の形成、アルファヘリックス安定化アミノ酸(例えば、 α 、 α -二置換アミノ酸)による12~29位付近のアミノ酸の置換及び/又は挿入により安定化することができ、本明細書において更に記載される。

【0213】

3位の修飾によるグルカゴン活性の低減

グルカゴン受容体活性は、3位のアミノ酸修飾により、例えば任意のアミノ酸による3位の天然に生じるグルタミンの置換により、低減することができる。酸性、塩基性又は疎水性アミノ酸(グルタミン酸、オルチニン、ノルロイシン)によるこの位置での置換は、グルカゴン受容体活性を実質的に低減又は破壊する。

【0214】

C末端アミド及びエステルによるGLP-1活性の増強

GLP-1受容体における増強された活性は、C末端アミノ酸のカルボン酸を、アミド又はエステルのような電荷中性基で置換することによってもたらされる。逆に、ペプチドのC末端の天然カルボン酸の保持は、GLP-1受容体よりもグルカゴン受容体に対するクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドの比較的大きな選択性(例えば、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20倍を超える)を維持する。

【0215】

更なる修飾及び組み合わせ

溶解度及び/又は安定性及び/又はグルカゴン活性を更に増加することができるような追加的な修飾をクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドに行うことができ溶解性を。クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、代替的に、溶解性又は安定性に実質的に影響を与えない及びグルカゴン活性を実質的に減少しない他の修飾を含むことができる。例示的な実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然グルカゴン配列に対して、合計で11個まで又は12個まで又は13個まで又は14個までのアミノ酸修飾を含むことができる。例えば、保存的又は非保存的置換、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位のいずれかにおいて実施することができる。

【0216】

クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドの例示的な修飾には、下記が含まれるが、これらに限定されない：

(a) 少なくとも部分的なグルカゴンアゴニスト活性を保持しながらの非保存的置換、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つ以上での保存的置換、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、Alaによるこれらの位置の1つ以上での置換；

(b) 少なくとも部分的なグルカゴンアゴニスト活性を保持しながらの、29及び/又は28位、並びに場合により27位のアミノ酸の欠失；

(c) 分解を低減しうる、例えばグルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸若しくはホモシステイン酸での置換による、15位のアスパラギン酸の修飾；又は、Asp15-Ser16結合の切断による分解を同様に低減しうる、例えばトレオニン、Alb、グルタミン酸での置換、若しくは4原子の長さの側鎖を有する別の負荷電アミノ酸での置換、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれかでの置換による、16位のセリンの修飾；

(d) 溶解性及び/又は半減期を増加しうる、例えば16、17、20、21、24、29、40位又はC末端アミノ酸への、本明細書に記載されている水溶性ポリマーのポリエチレングリコールのような親水性部分の付加；

(e) 酸化分解を低減するための、例えばロイシン又はノルロイシンでの置換による27位のメチオニンの修飾；

(f) Gluの脱アミド化を介して生じる分解を低減するための、例えばAla又はA

10

20

30

40

50

I Bでの置換による20又は24位のGlnの修飾；

(g) Aspの脱水により環状スクシンイミド中間体を形成し、続いて異性化によりイソアスパラギン酸塩を形成することにより生じる分解を低減するための、例えばGluでの置換による21位のAspの修飾；

(h) 場合により「i」と「i+4」（ここでiは、12～25、例えば12、16、20、24の整数である）の位置の間のラクタム架橋のような分子内架橋と組み合わせてもよい、DPP-IV切断への耐性を改善する、本明細書に記載されている1又は2位での修飾；

(i) 場合により親水性部分の付加と組み合わせてもよい、循環半減期を増加しうる及び／又は作用持続時間を延長しうる及び／又は作用の開始を遅延しうる、本明細書に記載されているグルカゴンペプチドのアシル化；

(j) 本明細書に記載されているC末端延長；

(k) 本明細書に記載されているホモ二量体化又はヘテロ二量体化；並びに

(a)～(k)の組み合わせ。

【0217】

一つの実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドの例示的な修飾には、A群から選択される少なくとも1個のアミノ酸修飾、並びにB群及び／又はC群から選択される1個以上のアミノ酸修飾が含まれ、

A群は、

荷電アミノ酸による28位のAsnの置換；

Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択される荷電アミノ酸による28位のAsnの置換；

Asn、Asp又はGluによる28位での置換；

Aspによる28位での置換；

Gluによる28位での置換；

荷電アミノ酸による29位のThrの置換；

Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択される荷電アミノ酸による29位のThrの置換；

Asn、Glu又はLysによる29位での置換；

Gluによる29位での置換；

29位の後への1～3個の荷電アミノ酸の挿入；

29位の後へのGlu又はLysの挿入；

29位の後へのGlu-Lys又はLys-Lysの挿入；或いは

これらの組み合わせであり、

B群は、

Gluによる15位のAspの置換；

Thr又はAIBによる16位のSerの置換であり、

C群は、

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ペプチドの感受性を低減する、非天然アミノ酸による1位のHisの置換；

ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) により切断に対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する、非天然アミノ酸による2位のSerの置換；

Argによる12位のLysの置換；

Ala又はAIBによる20位のGlnの置換；

Gluによる21位のAspの置換；

Ala又はAIBによる24位のGlnの置換；

Leu又はNleによる27位のMetの置換；

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；或いは

これらの組み合わせである。

【0218】

例示的な実施態様において、12位のLysはArgで置換されている。別の例示的な実施態様において、29及び／又は28位、並びに場合により27位のアミノ酸は、欠失している。

【0219】

幾つかの特定の実施態様において、グルカゴンペプチドは、(a) DPP-IV耐性を付与する1及び／又は2位でのアミノ酸修飾、例えば1位でのDMI Aによる又は2位でのAIBによる置換、(b) 12～29位の範囲内、例えば16及び20位の分子内架橋又はα, α二置換アミノ酸による16, 20, 21及び24位のアミノ酸の1個以上の置換、場合により(c) 例えば24, 29位又はC末端アミノ酸のCysを介したPEGのような親水性部分への結合、場合により(d) 例えばNleでMetを置換する27位でのアミノ酸修飾、場合により(e) 分解を低減する20, 21, 及び24位でのアミノ酸修飾、並びに場合により(f) 配列番号720への結合を含む。別の特定の実施態様において、グルカゴンペプチドは、(a) Asp28Glu29又はGlu28Glu29又はGlu29Glu30又はGlu28Glu30又はAsp28Glu30、場合により(b) 例えばThr又はAIBでSerを置換する16位でのアミノ酸修飾、場合により(c) 例えばNleでMetを置換する27位でのアミノ酸修飾、並びに場合により分解を低減する20, 21及び24位でのアミノ酸修飾を含む。特定の実施態様において、グルカゴンペプチドは、T16、A20、E21、A24、Nle27、D28、E29

10

20

【0220】

一つの実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、1～3個のアミノ酸修飾を有する、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739) を含み、

ここで、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ペプチドの感受性を低減する (又は耐性を増加する)、非天然アミノ酸であり、

30

Zは、-COOH (天然に生じるC-末端カルボキシレート)、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH及びY-COOHからなる群より選択され、Yは1～2個のアミノ酸であり、

分子内架橋、好ましくは共有結合は、iの位置のアミノ酸の側鎖と、i+4の位置のアミノ酸の側鎖を連結し、iは、12、16、20又は24である。

【0221】

幾つかの実施態様において、分子内架橋はラクタム架橋である。幾つかの実施態様において、配列番号739のi及びi+4の位置のアミノ酸は、Lys及びGlu、例えばGlu16及びLys20である。幾つかの実施態様において、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、ヒドロキシル-His、アセチル-His、ホモ-His及びアルファ、アルファ-ジメチルイミダゾール酢酸 (DMI A) からなる群より選択される。他の実施態様において、X2は、D-Ser、D-Ala、Gly、N-メチル-Ser、Val及びアルファ、アルファイソ酪酸 (AIB) からなる群より選択される。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、C末端延長の範囲内のアミノ酸位置16、17、20、21、24、29、40のいずれか又はC末端アミノ酸で親水性部分と共有結合している。例示的な実施態様において、この親水性部分は、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、これらの位置のいずれかにおいて共有結合している。例示的な親水性部分には、例えば1, 000ダルトンから約40, 000ダルトン又は約

40

50

20,000ダルトンから約40,000ダルトンの分子量のポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。

【0222】

別の実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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739）を含み、

ここで、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ペプチドの感受性を低減する（又は耐性を増加する）、非天然アミノ酸であり、

グルカゴンペプチドの16、20、21及び24位の1、2、3、4つ又はそれ以上は、α, α-二置換アミノ酸で置換されており、

Zは、-COOH（天然に生じるC-末端カルボキシレート）、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH及びY-COOHからなる群より選択され、Yは1～2個のアミノ酸である。

【0223】

前記のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチド又は類縁体への例示的な更なるアミノ酸修飾には、Argによる12位のLysの置換；Gluによる15位のAspの置換；Thr若しくはAIBによる16位のSerの置換；Ala若しくはAIBによる20位のGlnの置換；Gluによる21位のAspの置換；Ala若しくはAIBによる24位のLeu若しくはNleによる27位のMetの置換；荷電アミノ酸による28位のAsnの置換；Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択される荷電アミノ酸による28位のAsnの置換；Asn、Asp若しくはGluによる28位での置換；Aspによる28位での置換；Gluによる28位での置換；荷電アミノ酸による29位のThrの置換；Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択される荷電アミノ酸による29位のThrの置換；Asp、Glu若しくはLysによる29位での置換；Gluによる29位での置換；29位の後への1～3個の荷電アミノ酸のよる挿入；Glu若しくはLysの30位（すなわち、29位の後）への挿入；場合によりLysの31位への挿入；C末端への配列番号720の付加；或いはこれらの組み合わせが含まれる。

【0224】

グルカゴン受容体活性を増加する、部分的なグルカゴン受容体活性を保持する、溶解性を改善する、安定性を増加する、又は分解を低減するような、クラス1グルカゴンアゴニストについて上記に記載された修飾のいずれも、クラス1グルカゴンペプチドに個別に又は組み合わせて適用することができる。したがって、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの少なくとも20%の活性を保持し、6～8又は6～9のpH（例えば、pH7）で少なくとも1mg/mLの濃度で溶解性であり、場合により25℃で24時間後、元のペプチドの少なくとも95%を保持する（例えば、元のペプチドの5%以下が分解又は切断される）、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドを調製することができる。あるいは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの少なくとも約100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%又は10倍以上の活性を示し、場合により6～8又は6～9のpH（例えば、pH7）で少なくとも1mg/mLの濃度で溶解性であり、場合により25℃で24時間後、元のペプチドの少なくとも95%を保持する（例えば、元のペプチドの5%以下が分解又は切断される）、高い効力のクラス1グルカゴンペプチドを調製することができる。

【0225】

クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドの実施態様の例

10

20

30

40

50

一つの実施態様によると、配列番号701の天然グルカゴンペプチドは、負荷電アミノ酸（例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸）による28及び／又は29位の天然アミノ酸の置換及び場合によりペプチドのカルボキシ末端への負荷電アミノ酸（例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸）の付加によって修飾される。代替的な実施態様において、配列番号701の天然グルカゴンペプチドは、正電荷アミノ酸（例えば、リシン、アルギニン又はヒスチジン）による29位の天然アミノ酸の置換及び場合によりペプチドのカルボキシ末端への1～2個の正電荷アミノ酸（例えば、リシン、アルギニン又はヒスチジン）の付加により修飾される。一つの実施態様によると、ペプチドが配列番号734のアミノ酸配列を含むが、但し、28又は29位の少なくとも1個のアミノ酸が酸性アミノ酸で置換されている及び／又は追加の酸性アミノ酸が配列番号734カルボキシ末端に付加されている、改善された溶解性及び安定性を有するクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチド提供される。一つの実施態様において、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なる群より独立して選択される。

10

【0226】

一つの実施態様によると、配列番号733アミノ酸配列を含むアゴニストであって、27、28又は29位の少なくとも1個のアミノ酸が非天然アミノ酸残基で置換されている（すなわち、類縁体の27、28又は29位に存在する少なくとも1個のアミノ酸が配列番号701の対応する位置に存在するアミノ酸と異なる酸性アミノ酸である）、改善された溶解性及び安定性を有するクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。一つの実施態様によると、配列番号733の配列を含むが、但し、28位のアミノ酸がアスパラギンであり、29位のアミノ酸がトレオニンである場合、ペプチドが、グルカゴンペプチドのカルボキシ末端に付加されるLys、Arg、His、Asp又はGluからなる群より独立して選択される1～2個のアミノ酸を更に含む、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。

20

【0227】

天然グルカゴンペプチドの特定の位置を修飾し、同時に母体ペプチドの活性の少なくとも一部分を保持できることが報告されている。したがって、出願人たちは、配列番号711のペプチドの2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位の位置に配置されている1個以上のアミノ酸を、天然グルカゴンペプチドに存在するものと異なるアミノ酸で置換し、依然として増強された抗力、生理学的pHでの安定性及び母体グルカゴンペプチドの生物学的活性を保持できると予測する。例えば、一つの実施態様によると、天然ペプチドの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又はノルロイシンに変えて、ペプチドの酸化分解を防止する。

30

【0228】

一つの実施態様において、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1～6個のアミノ酸が配列番号701の対応するアミノ酸と異なる、配列番号733のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。別の実施態様によると、ペプチドの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1～3個のアミノ酸が配列番号701の対応するアミノ酸と異なる、配列番号733のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。別の実施態様において、ペプチドの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1～2個のアミノ酸が配列番号701の対応するアミノ酸と異なる、配列番号707、配列番号708又は配列番号734のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供され、更なる実施態様において、1～2個の異なるアミノ酸は、天然配列（配列番号701）に存在するアミノ酸に対して保存的アミノ酸置換を表す。一つの実施態様において、グルカゴンペプチドが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で1、2又は3個のアミノ酸置換を更に含む、配列番号711又は配列番号713のクラス1グルカゴ

40

50

ン関連類縁体ペプチドが提供される。一つの実施態様において、2、5、7、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、27又は29位での置換は、保存的アミノ酸置換である。

【0229】

一つの実施態様において、配列番号701の類縁体ペプチドを含むクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドであって、2位にセリン以外のアミノ酸を有すること及び28若しくは29位の天然アミノ酸の酸性アミノ酸置換を有することによって又は配列番号701のペプチドのカルボキシ末端に付加された酸性アミノ酸によって配列番号701と異なるペプチドが提供される。一つの実施態様において、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。一つの実施態様において、ペプチドが2位での置換により母体分子と異なっている、配列番号709、配列番号712、配列番号713又は配列番号732のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。より詳細には、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なる群より選択されるアミノ酸で置換されている。

【0230】

別の実施態様において、配列番号701の類縁体ペプチドを含むクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドであって、1位にヒスチジン以外のアミノ酸を有すること及び28若しくは29位の天然アミノ酸の酸性アミノ酸置換を有することによって又は配列番号701のペプチドのカルボキシ末端に付加された酸性アミノ酸によって配列番号701と異なるペプチドが提供される。一つの実施態様において、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。一つの実施態様において、ペプチドが1位での置換により母体分子と異なっている、配列番号709、配列番号712、配列番号713又は配列番号732のクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。より詳細には、ペプチドの1位は、DMI A、D-ヒスチジン、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモ-ヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。

【0231】

一つの実施態様によると、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号709、配列番号712、配列番号713及び配列番号732からなる群より選択される配列を含む。更なる実施態様において、配列番号709、配列番号712、配列番号713又は配列番号732の配列を含み、配列番号709、配列番号712、配列番号713又は配列番号732のC末端に付加された1~2個のアミノ酸を更に含み、追加のアミノ酸がLys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸又はホモシステイン酸からなる群より独立して選択される、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。一つの実施態様において、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からなる群より選択されるか、或いは更なる実施態様において、追加のアミノ酸は、Asp又はGluである。

【0232】

別の実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号707又はそのグルカゴンアゴニスト類縁体の配列を含む。一つの実施態様において、ペプチドは、配列番号708、配列番号710、配列番号711、配列番号712及び配列番号713からなる群より選択される配列を含む。別の実施態様において、ペプチドは、配列番号708、配列番号710及び配列番号711からなる群より選択される配列を含む。一つの実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンペプチドのC末端に付加される、Asp及びGluからなる群より選択される追加のアミノ酸を更に含んで、配列番号708、配列番号710及び配列番号711の配列を含む。一つの実施態様において、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号711又は配列番号713の配列を含み、更なる実施態様において、グルカゴンペプチドは、配列番号711の配列を含む。

【0233】

一つの実施態様によると、下記：

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734）、

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711）、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713）

からなる群より選択される修飾グルカゴンペプチドを含むクラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供され、

ここで、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、但し、酸性酸残基は、28、29又は30位のうちの1つに存在する。一つの実施態様において、RはCOOHであり、別の実施態様において、RはCONH₂である。

【0234】

より詳細には、クラス1グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンペプチド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734）を含むグルカゴンアゴニスト類縁体を含む融合グルカゴンペプチドであることができ、ここでRは、酸性アミノ酸又は結合及びグルカゴンペプチド配列のカルボキシ末端アミノ酸に結合している配列番号713配列720（GPS SGAPPPS）、配列番号721（KRNRNNIA）又は配列番号722（KRNR）のアミノ酸配列である。一つの実施態様において、グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチド配列のカルボキシ末端アミノ酸に結合している配列番号配列720（GPS SGAPPPS）、配列番号721（KRNRNNIA）又は配列番号722（KRNR）のアミノ酸配列を更に含む、配列番号733、配列番号707又は及び配列番号708からなる群より選択される。一つの実施態様において、グルカゴン融合ペプチドは、グルカゴン融合ペプチド配列のアミノ酸29に結合している配列番号720（GPS SGAPPPS）、配列番号721（KRNRNNIA）又は配列番号722（KRNR）のアミノ酸配列を更に含んでいる、配列番号702、配列番号703、配列番号704、配列番号705及び配列番号706又はそのグルカゴンアゴニスト類縁体を含む。一つの実施態様によると、融合ペプチドは、16、17、21、24、29位若しくはC末端延長内のアミノ酸、又はC末端アミノ酸に結合しているPEG鎖を更に含み、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。一つの実施態様において、配列番号720（GPS SGAPPPS）、配列番号721（KRNRNNIA）又は配列番号722（KRNR）のアミノ酸配列は、ペプチド結合を介してグルカゴンペプチドのアミノ酸29に結合している。一つの実施態様において、グルカゴン融合ペプチドのグルカゴンペプチド部分は、配列番号710、配列番号711及び配列番号713からなる群より選択される配列を含む。一つの実施態様において、グルカゴン融合ペプチドのグルカゴンペプチド部分は、配列番号711又は配列番号713の配列を含み、ここでPEG鎖は、21、24、29位、C末端延長内、又はC末端アミノ酸にそれぞれ結合している。

【0235】

別の実施態様において、融合ペプチドのグルカゴンペプチド配列は、アミノ酸 29 に結合している配列番号 720 (GPS SGAPP S)、配列番号 721 (KRN RNN I A) 又は配列番号 722 (KRN R) のアミノ酸配列を更に含む、配列番号 711 の配列を含む。一つの実施態様において、グルカゴン融合ペプチドは、配列番号 724、配列番号 725 及び配列番号 726 からなる群より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有する C 末端アミノ酸を有する。しかし、C 末端アミノ酸がカルボン酸に対してアミド置換を有するこれらの配列の類縁体も、実施態様として包含される。一つの実施態様によると、融合グルカゴンペプチドは、アミノ酸 29 に結合している配列番号 723 (GPS SGAPP S-CONH₂) のアミノ酸配列を更に含んでいる、配列番号 710、配列番号 711 及び配列番号 713 からなる群より選択されるグルカゴンアゴニスト類縁体を含む。

10

【0236】

例示的なグルカゴンペプチドは、配列番号 702、配列番号 703、配列番号 704、配列番号 705、配列番号 706、配列番号 707、配列番号 708、配列番号 709、配列番号 710、配列番号 711 及び配列番号 733 からなる群より選択され、ここで、グルカゴンペプチドのアミノ酸 29 は、ペプチド結合を介して第 2 ペプチドに結合し、前記第 2 ペプチドは、配列番号 720、配列番号 721 又は配列番号 722 の配列を含む。一つの実施態様において、グルカゴンペプチドはペグ化されている。

【0237】

本明細書に記載されているクラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドを更に修飾して、水溶液中のペプチドの溶解性及び安定性を改善しながら、同時にグルカゴンペプチドの生物学的活性を保持することができる。一つの実施態様によると、配列番号 711 のペプチド又はそのグルカゴンアゴニスト類縁体の 16、17、20、21、24 及び 29 位から選択される 1 つ以上の位置への親水性基の導入は、溶解性及び安定性を改善すると予測される。より詳細には、一つの実施態様において、配列番号 710、配列番号 711、配列番号 713 又は配列番号 732 のクラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは修飾されて、21 及び 24 位に存在するアミノ酸の側鎖に共有結合している 1 つ以上の親水性基を含む。

20

【0238】

一つの実施態様によると、配列番号 711 のクラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは修飾されて、16、17、20、21、24 及び／又は 29 位に 1 個以上のアミノ酸置換を含有し、ここで天然アミノ酸は、例えば PEG を含む親水性部分との架橋に適した側鎖を有するアミノ酸で置換されている。天然ペプチドを、天然に生じるアミノ酸又は合成（非天然の）アミノ酸で置換することができる。合成又は非天然のアミノ酸とは、インビボで天然に生じないが、それでも、本明細書に記載されるペプチド構造に組み込むことができるアミノ酸を意味する。

30

【0239】

一つの実施態様において、配列番号 710、配列番号 711 又は配列番号 713 のクラス 1 グルカゴン関連類縁体ペプチドであって、天然グルカゴンペプチド配列が修飾されて、天然に生じる又は合成のアミノ酸を天然配列の 16、17、21、24、29 位、C 末端延長内、又は C 末端アミノ酸の少なくとも 1 つに含有するペプチドが提供され、ここで、アミノ酸置換は親水性部分を更に含む。一つの実施態様において、置換は 21 又は 24 位においてであり、更なる実施態様において、親水性部分は PEG 鎖である。一つの実施態様において、配列番号 711 のクラス 1 グルカゴン関連類縁体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ており、ここでシステイン残基の側鎖は、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チオール反応性試薬により更に修飾される。これらのチオール反応試薬は、カルボキシ、ケト、ヒドロキシ及び他のエーテル基、並びにポリエチレングリコール単位のような他の親水性部分を含有することができる。代替的な実施態様において、天然グルカゴンペプチドはリシンで置換されており、置換リシン残基の側鎖は、カルボン酸の活性エステル（スクシンイミド、無水物など）又はポリエチレングリコールのような親水性部分のアルデヒドのような

40

50

アミン反応性試薬を使用して更に修飾される。一つの実施態様において、クラス1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号714、配列番号715、配列番号716、配列番号717 配列番号718 及び配列番号719 からなる群より選択される。

【0240】

一つの実施態様によると、ペグ化クラス1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンペプチドに共有結合している2つ以上のポリエチレン鎖を含み、ここでグルカゴン鎖の総分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。一つの実施態様において、ペグ化クラス1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号706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しており、2つのPEG鎖の合計した分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。別の実施態様において、ペグ化クラス1 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号706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しており、2つのPEG鎖の合計した分子量は、約5,000～約20,000ダルトンである。

10

【0241】

ポリエチレングリコール鎖は、直鎖の形態であってもよいし、分岐鎖であってもよい。一つの実施態様によると、ポリエチレングリコール鎖は、約500～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。一つの実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約500～約5,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。別の実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約20,000～約40,000ダルトンの分子量を有する。

20

【0242】

グルカゴンアゴニストは、グルカゴンアゴニスト活性を保持する1、2、3、4又は5個までの更なる修飾を場合により有する、配列番号701～758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ることができる。

【0243】

クラス2 グルカゴン関連類縁体ペプチド

特定の実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドはクラス2 グルカゴン関連類縁体ペプチドであり、これは本明細書及び米国仮出願第61/090,448号に記載されており、その内容は全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0244】

活性

30

天然グルカゴンは、GIP受容体を活性化せず、通常、GLP-1受容体に対する天然GLP-1の活性の約1%の活性しか有さない。本明細書に記載されている天然グルカゴン配列に対する修飾は、天然グルカゴン（配列番号801）の活性と同等な若しくはよりも良好な強力なグルカゴン活性、天然GIP（配列番号804）の活性と同等な若しくはよりも良好な強力なGIP活性、及び／又は、天然GLP-1の活性と同等な若しくはよりも良好な強力なGLP-1活性を示すことができる、クラス2 グルカゴン関連類縁体ペプチドを産生する。この点において、クラス2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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ペプチドのうちの1つであってもよく、本明細書において更に記載される。

40

【0245】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載されているクラス2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、GIP受容体活性化活性において約100nM以下又は約75、50、25、10、8、6、5、4、3、2若しくは1nM以下のEC50を示す。幾つかの実施態様において、クラス2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体活性化において約100nM以下又は約75、50、25、10、8、6、5、4、3、2若しくは1nM以下のEC50を示す。幾つかの実施態様において、クラス2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、GLP-1受容体活性化において約100nM以下又は約75、50、25、10、8、6、5、4、3、2若しくは1nM以下のEC50を示す。受容体活性化は、受容体を過

50

剰発現している H E K 2 9 3 細胞における c A M P 誘導を測定するインビトロアッセイにより、例えば、実施例 2 に記載されているように、受容体をコードする D N A と、c A M P 応答配列に結合したルシフェラーゼ遺伝子とを同時形質移入された H E K 2 9 3 細胞をアッセイすることにより、測定することができる。

【0246】

幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然 G I P (G I P 効力) を基準として、G I P 受容体において少なくとも約 0. 1 %、0. 2 %、0. 3 %、0. 4 %、0. 5 %、0. 6 %、0. 7 %、0. 8 %、0. 9 %、1 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、75 %、100 %、125 %、150 %、175 % 若しくは 200 % 又はそれ以上の活性を示す。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンを基準 (グルカゴン効力) として、グルカゴン受容体において少なくとも約 1 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、75 %、100 %、125 %、150 %、175 %、200 %、250 %、300 %、350 %、400 %、450 % 若しくは 500 % 又はそれ以上の活性を示す。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然 G L P - 1 を基準 (G L P - 1 効力) として、G L P - 1 受容体において少なくとも約 0. 1 %、0. 2 %、0. 3 %、0. 4 %、0. 5 %、0. 6 %、0. 7 %、0. 8 %、0. 9 %、1 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、75 %、100 %、125 %、150 %、175 % 若しくは 200 % 又はそれ以上の活性を示す。受容体の天然リガンドを基準とする、受容体でのクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの活性は、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチド対天然リガンドの E C 5 0 の逆比として計算される。

【0247】

一つの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体及び G I P 受容体の両方に対して活性を示す (「グルカゴン / G I P コアゴニスト」)。これらのクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、G I P 受容体と比べてグルカゴン受容体への天然グルカゴンの選択性を失っている。幾つかの実施態様において、G I P 受容体におけるクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの E C 5 0 は、グルカゴン受容体における E C 5 0 と比べて約 50 倍、40 倍、30 倍又は 20 倍未満の差がある (より高い又はより低い)。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの G I P 効力は、そのグルカゴン効力と比べて、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 倍未満の差 (より高い又はより低い) がある。幾つかの実施態様において、グルカゴン受容体におけるクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの E C 5 0 で割った G I P 受容体におけるクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの E C 5 0 の比は、約 100、75、60、50、40、30、20、15、10 又は 5 未満である。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドのグルカゴン効力と比較したクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの G I P 効力の比は、約 500、450、400、350、300、250、200、150、100、75、60、50、40、30、20、15、10 又は 5 未満である。幾つかの実施態様において、G L P - 1 活性は、例えば 7 位でのアミノ酸修飾により有意に低減又は破壊される。

【0248】

別の実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン、G I P 及び G L P - 1 受容体において活性を示す (「グルカゴン / G I P / G L P - 1 トリアゴニスト」)。これらのクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、G L P - 1 と G I P の両方の受容体と比べてグルカゴン受容体への天然グルカゴンの選択性を失っている。幾つかの実施態様において、G I P 受容体におけるクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの E C 5 0 は、グルカゴン及び G L P - 1 の受容体におけるそれぞれの E C 5 0 と比べて約 50 倍、40 倍、30 倍又は 20 倍未満の差 (より高いかより低い) がある。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの G I P 効力は、グルカゴン

及び G L P-1 の効力と比べて約 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 倍未満の差（より高い又はより低い）がある。幾つかの実施態様において、G L P-1 受容体におけるトリアゴニストの E C 50 で割った G I P 受容体におけるトリアゴニストの E C 50 の比は、約 100、75、60、50、40、30、20、15、10 又は 5 未満である。幾つかの実施態様において、トリアゴニストの G L P-1 効力と比較したトリアゴニストの G I P 効力の比は、約 100、75、60、50、40、30、20、15、10 又は 5 未満である。関連する実施態様において、グルカゴン受容体におけるトリアゴニストの E C 50 で割った G I P 受容体におけるトリアゴニストの E C 50 の比は、約 100、75、60、50、40、30、20、15、10 又は 5 未満である。幾つかの実施態様において、トリアゴニストのグルカゴン効力と比較したトリアゴニストの G I P 効力の比は、約 500、450、400、350、300、250、200、150、100、75、60、50、40、30、20、15、10 又は 5 未満である。

10

【0249】

更に別の態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、G L P-1 及び G I P の受容体において活性を示すが、グルカゴン活性は、例えば 3 位でのアミノ酸修飾により有意に低減又は破壊される（「G I P / G L P-1 コアゴニスト」）。例えば、酸性、塩基性又は疎水性アミノ酸（グルタミン酸、オルチニン、ノルロイシン）によるこの位置での置換は、グルカゴン活性を低減する。幾つかの実施態様において、G I P 受容体におけるグルカゴンペプチドの E C 50 は、G L P-1 受容体における E C 50 と比べて約 50 倍、40 倍、30 倍又は 20 倍未満の差（より高い又はより低い）がある。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの G I P 効力は、G L P-1 効力と比べて約 25 倍、20 倍、15 倍、10 倍又は 5 倍未満の差（より高い又はより低い）がある。幾つかの実施態様において、これらのクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの約 10 % 以下の活性を有し、例えば、約 1 ~ 10 % 又は約 0.1 ~ 10 % 又は約 0.1 超であるが約 10 % 未満である。幾つかの実施態様において、G L P-1 受容体におけるクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの E C 50 で割った G I P 受容体におけるクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの E C 50 の比は、約 100、75、60、50、40、30、20、15、10 又は 5 未満である。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの G L P-1 効力と比較したクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの G I P 効力の比は、約 100、75、60、50、40、30、20、15、10 又は 5 未満である。

20

30

【0250】

更なる態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、G I P 受容体において活性を示すが、グルカゴン及び G L P-1 活性は、例えば 3 及び 7 位でのアミノ酸修飾により有意に低減又は破壊される（「G I P アゴニストグルカゴンペプチド」）。幾つかの実施態様において、これらのクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの約 10 % 以下の活性しか有さず、例えば、約 1 ~ 10 % 又は約 0.1 ~ 10 % 又は約 0.1、0.5 % 又は 1 % 超であるが約 1 %、5 % 又は 10 % 未満である。幾つかの実施態様において、これらのクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、また、G L P-1 受容体において天然 G L P-1 の約 10 % 以下の活性しか有さず、例えば、約 1 ~ 10 % 又は約 0.1 ~ 10 % 又は約 0.1、0.5 % 又は 1 % 超であるが約 1 %、5 % 又は 10 % 未満である。

40

【0251】

幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドがペグ化されていない場合、G I P 受容体活性化におけるクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの E C 50 は、約 4、2、1 nM 以下であるか又は類縁体は、G I P 受容体において天然 G I P の少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 % 若しくは 5 % の活性を有する。関連する実施態様において、G L P-1 受容体活性化における非ペグ化クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチド

50

の EC 50 は、約 4、2、1 nM 以下であるか又は GLP-1 受容体における天然 GLP-1 の少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 % 若しくは 5 % の活性を有する。更に他の関連する実施態様において、グルカゴン受容体活性化における非ペグ化クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの EC 50 は、約 4、2、1 nM 以下であるか又はグルカゴン受容体における天然グルカゴンの少なくとも約 5 %、10 %、15 % 若しくは 20 % の活性である。幾つかの実施態様において、非ペグ化クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体における天然グルカゴンの約 1 % 未満の活性を有する。幾つかの実施態様において、非ペグ化クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、GLP-1 受容体における天然 GLP-1 の約 10 %、5 % 又は 1 % 未満の活性を有する。

【0252】

クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドが PGE のような親水性部分に結合している実施態様において、1 つ以上の受容体における関連する EC 50 は、より高い場合がある。例えば、GIP 受容体活性化におけるペグ化類縁体の EC 50 は、約 10 nM 以下であるか、又はクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、GIP 受容体における天然 GIP の少なくとも約 0.1 %、0.2 %、0.3 %、0.4 % 又は 0.5 % の活性を有する。関連する実施態様において、GLP-1 受容体活性化におけるペグ化クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの EC 50 は、約 10 nM 以下であるか、又は GLP-1 受容体における天然 GLP-1 の少なくとも約 0.1 %、0.2 %、0.3 %、0.4 % 若しくは 0.5 % の活性を有する。更に他の関連する実施態様において、グルカゴン受容体活性化におけるペグ化クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドの EC 50 は、約 10 nM 以下であるか又はグルカゴン受容体における天然グルカゴンの少なくとも約 0.5 %、1 %、1.5 % 若しくは 2 % の活性である。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体における天然グルカゴンの約 1 % 未満の活性を有する。幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、GLP-1 受容体における天然 GLP-1 の約 10 %、5 % 又は 1 % 未満の活性を有する。

【0253】

修飾

クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドについて本明細書に開示されている修飾は、グルカゴン（配列番号 801）を操作して、増加した GIP 活性、グルカゴン活性及び／又は GLP-1 活性を示すグルカゴンペプチドを作り出すことを可能にする。クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドについて本明細書に開示されている他の修飾は、得られるペプチドの半減期を延長する、溶解性を増加する、又は安定性を増加する。クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドについて本明細書に開示されている更に他の修飾は、活性に対して何も効果がないか、又は所望の活性を破壊することなく行うことができる。同じ目的（例えば、GIP 活性を増加する）に役立つクラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドについて本明細書に開示されている修飾のいずれかも、個別に又は組み合わせて適用することができる。増強された特性を付与する、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドを参照する単一又は一連の組み合わせのいずれかを、個別に又は組み合わせて適用することができ、例えば GIP 及び GLP-1 活性の増加を半減期の増加と組み合わせることができる。関連する実施態様において、1、2、3、4、5、6 個又はそれ以上のアミノ酸修飾は、非保存的置換、付加又は欠失であってもよい。幾つかの実施態様において、1、2、3、4、5、6 個又はそれ以上のアミノ酸修飾は、保存的置換であってもよい。

【0254】

GIP 活性に影響を与える修飾

GIP 受容体における増強された活性は、1 位でのアミノ酸修飾によりもたらされる。例えば、1 位の His は、大型の芳香族アミノ酸、場合により 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 で置換されている。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、並びに GLP-1 受容体及びグルカゴン受容体を活性化するクラス 2 グルカゴ

ン関連類縁体ペプチドを提供する。アルファヘリックス構造は、例えば共有若しくは非共有分子内架橋の形成によって、又はアルファヘリックス安定化アミノ酸（例えば、 α 、 α -二置換アミノ酸）による12～29位付近のアミノ酸の置換及び／若しくは挿入によって、安定化することができる。

【0255】

GIP受容体における増強された活性は、また、27及び／又は28位、並びに場合により29位でのアミノ酸修飾によってもたらされる。例えば、27位のMetは、大型の脂肪族アミノ酸、場合によりLeuで置換され、28位のAsnは、小型の脂肪族アミノ酸、場合によりAlaで置換され、29位のThrは、小型の脂肪族アミノ酸、場合によりGlyで置換されている。LAGによる27～29位での置換は、これらの位置において天然MNT配列に対して増加したGIP活性をもたらす。

10

【0256】

GIP受容体における増強された活性は、また、12位でのアミノ酸修飾によりもたらされる。例えば、12位は、大型の脂肪族で非極性のアミノ酸、場合によりIleで置換されている。

【0257】

GIP受容体における増強された活性は、また、17及び／又は18位でのアミノ酸修飾によりもたらされる。例えば、17位は、極性残基、場合によりGlnで置換され、18位は、小型の脂肪族アミノ酸、場合によりAlaで置換されている。QAによる17及び18位での置換は、これらの位置において天然RR配列に対して増加したGIP活性をもたらす。

20

【0258】

GIP受容体における増加された活性は、12～29位のアミノ酸側鎖の間に分子内架橋の形成を可能にする修飾によってもたらされる。例えば、分子内架橋を、 i 及び $i+4$ の位置又は j 及び $j+3$ の位置又は k 及び $k+7$ の位置の2つのアミノ酸の側鎖の間の共有結合により形成することができる。例示的な実施態様において、架橋は、12と16位、16と20位、20と24位、24と28位又は17と20位の間にある。他の実施態様において、塩架橋のような非共有相互作用を、これらの位置の正と負の荷電アミノ酸の間で形成することができる。

【0259】

GIP受容体活性を増加する上記に記載された修飾のいずれも、個別に又は組み合わせて適用することができる。GIP受容体活性を増加する修飾の組み合わせは、一般に、単独で実施されるそのような修飾のいずれのものよりも高いGIP活性をもたらす。

30

【0260】

グルカゴン活性に影響を与える修飾

一つの実施態様において、増強されたグルカゴン効力は、天然グルカゴン（配列番号801）の16位でのアミノ酸修飾によりもたらされる。非限定例によると、そのような増強された効力は、16位の天然に生じるセリンを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負荷電アミノ酸により、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれかにより又は少なくとも1個のヘテロ原子（例えば、N、O、S、P）を含有する側鎖であり、約4（若しくは3～5）原子長さの側鎖を有する荷電アミノにより置換することによってもたらすことができる。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、GLP-1受容体よりもグルカゴン受容体に対して元の選択性を保持する。

40

【0261】

グルカゴン受容体活性は、3位のアミノ酸修飾により、例えば任意のアミノ酸による3位の天然に生じるグルタミンの置換により低減することができる。酸性、塩基性又は疎水性アミノ酸（グルタミン酸、オルチニン、ノルロイシン）によるこの位置での置換は、グルカゴン受容体活性を実質的に低減又は破壊することを示している。そのような場合では、3位に置換を含むそのようなペプチドのペグ化は、グルカゴン受容体活性を増加した。

50

【0262】

1 及び 2 位でのアミノ酸修飾により低減されたグルカゴン活性の回復は、12～29 位のアミノ酸側鎖の間に分子内架橋の形成を可能にする修飾によってもたらされる。例えば、分子内架橋を、 i 及び $i+4$ の位置又は j 及び $j+3$ の位置又は k 及び $k+7$ の位置の 2 つのアミノ酸の側鎖の間の共有結合により形成することができる。他の実施態様において、塩架橋のような非共有相互作用を、これらの位置の正と負の荷電アミノ酸の間に形成することができる。

【0263】

GLP-1 活性に影響を与える修飾

GLP-1 受容体における増強された活性は、C 末端アミノ酸のカルボン酸を、アミド又はエステルのような電荷中性基で置換することによってもたらされる。

10

【0264】

GLP-1 受容体における増強された活性は、また、例えば 2 個のアミノ酸の側鎖の間の分子内架橋の形成を介して又は本明細書において更に記載される、アルファヘリックス安定化アミノ酸（例えば、 α ， α -二置換アミノ酸）によるグルカゴンの C 末端部分（12～29 位付近）のアミノ酸置換及び／若しくは挿入を介して、アミノ酸 12～29 付近のアルファヘリックス構造を安定化することによってもたらされる。例示的な実施態様において、アミノ酸対 12 と 16、13 と 17、16 と 20、17 と 21、20 と 24 又は 24 と 28（ $i=12$ 、16、20 又は 24 のアミノ酸対）の側鎖は、互いに結合しており、したがってグルカゴンアルファヘリックスを安定化する。幾つかの実施態様において、架橋又はリンカーは、特に架橋が i 及び $i+4$ の位置の間にある場合、約 8（又は 7～9）原子長である。幾つかの実施態様において、架橋又はリンカーは、特に架橋が j 及び $j+3$ の位置の間にある場合、約 6（又は 5～7）原子長である。

20

【0265】

幾つかの実施態様において、分子内架橋は、（a）グルタミン酸による又は 4 原子長の側鎖を有する別の負荷電アミノ酸による、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のうちの 1 つによる又は少なくとも 1 つのヘテロ原子（例えば、N、O、S、P）を含有する側鎖を有し、約 4（若しくは 3～5）原子長の側鎖の荷電アミノ酸による、16 位の天然に生じるセリンの置換によって、並びに（b）荷電されている又は水素結合の能力を有するのいずれかであり、少なくとも約 5（又は 4～6）原子長の側鎖を有する別の親水性アミノ酸、例えば、リシン、シトルリン、アルギニン又はオルニチンによる、20 位の天然に生じるグルタミンの置換によって、形成される。16 及び 20 位のそのようなアミノ酸の側鎖は、塩架橋を形成することができるし共有結合することもできる。一つの実施態様において、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。

30

【0266】

幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドの C 末端部分における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架橋の形成によって達成される。例えば、適切な共有結合方法には、オレフィンメタセシス、ランチオニンに基づいた環化、ジスルフィド架橋又は改質硫黄含有架橋形成、 α ， ω -ジアミノアルカン鎖の使用、金属原子架橋の形成、ペプチド環化の他の方法、のいずれかの 1 つ以上が含まれ、これらがアルファヘリックスの安定化のために使用される。

40

【0267】

更に他の実施態様において、1 つ以上の α ， α -二置換アミノ酸が、所望の活性を保持する位置でこの C 末端部分（アミノ酸 12～29）において挿入又は置換される。例えば、16、20、21 又は 24 位のうちの 1、2、3 つ又は全てが、 α ， α -二置換アミノ酸、例えば AIB で置換されている。

【0268】

GLP-1 受容体における増加された活性は、本明細書において記載されているように、20 位でのアミノ酸修飾によりもたらされる。

50

【0269】

G L P-1 受容体における増加された活性は、G P S S G A P P P S（配列番号895）又はX G P S S G A P P P S（配列番号896）をC末端に付加することによりもたらされる。そのような類縁体におけるG L P-1 活性を、本明細書に記載されているように、18、28若しくは29位のアミノ酸又は18及び29位のアミノ酸を修飾することにより、更に増加することができる。

【0270】

G L P-1 効力の更なる中程度の増加は、10位のアミノ酸を修飾して、大型の芳香族アミノ酸残基、場合によりT r pにすることによりもたらされる。

【0271】

G L P-1 受容体における低減された活性は、本明細書において記載されているように、例えば7位でのアミノ酸修飾によりもたらされる。

【0272】

G L P-1 受容体における効力を、18位の天然アルギニンのアラニン置換により更に増強することができる。

【0273】

G L P-1 受容体活性を増加する、クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチドについて上記に記載された修飾のいずれも、単独又は組み合わせて適用することができる。G L P-1 受容体活性を増加する修飾の組み合わせは、一般に、単独で実施されるそのような修飾のいずれのものよりも高いG L P-1 活性をもたらし。例えば、本発明は、場合により16位と20位のアミノ酸の間に共有結合を有する、16位、20位及びC末端カルボン酸基に修飾を含むグルカゴンペプチド；16位及びC末端カルボン酸基に修飾を含むグルカゴンペプチド；場合により16位と20位のアミノ酸の間に共有結合を有する、16位及び20位に修飾を含むグルカゴンペプチド；並びに20位及びC末端カルボン酸基に修飾を含むグルカゴンペプチドを提供する。

【0274】

D P P-I V耐性を改善する修飾

1及び／又は2位での修飾は、ジペプチジルペプチダーゼI V（D P P-I V）切断に対するペプチドの耐性を増加することができる。例えば、本明細書において記載されているように、1位及び／又は2位をD P P-I V耐性アミノ酸で置換することができる。一つの実施態様において、2位のアミノ酸をN-メチルアラニンで置換する。

【0275】

2位での修飾（例えば、2位でのA I B）、及び幾つかの場合においては1位での修飾（例えば、1位でのD M I A）は、グルカゴン活性を時々有意に低減しうるが、驚くべきことに、本明細書に記載されているように、このグルカゴン活性の低減は、グルカゴンのC末端部分（アミノ酸12～29付近）におけるアルファヘリックス構造を、例えば2個のアミノ酸の側鎖の間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できることが観察された。幾つかの実施態様において、共有結合は、「i」と「i+4」の位置又は「j」と「j+3」の位置のアミノ酸の間、例えば12と16位、16と20位、20と24位、24と28位又は17と20位の間にある。例示的な実施態様において、この共有結合は、16位のグルタミン酸と20位のリシンの間のラクタム架橋である。幾つかの実施態様において、この共有結合は、本明細書に記載されているように、ラクタム架橋以外の分子内架橋である。

【0276】

分解を低減する修飾

更なる例示的な実施態様において、クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチドのいずれかを、配列番号801の15及び／又は16位のアミノ酸を修飾して特に酸性又はアルカリ性の緩衝剤におけるペプチドの経時的な分解を低減することによって、更に修飾して安定性を改善することができる。そのような修飾は、A s p 15-S e r 16のペプチド結合の切断を低減する。例示的な実施態様において、15位でのアミノ酸修飾は、グルタミン

10

20

30

40

50

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A s pの欠失又は置換である。他の例示的な実施態様において、16位でのアミノ酸修飾は、T h r又はA I BによるS e rの欠失又は置換である。他の例示的な実施態様において、16のS e rは、グルタミン酸により又は4原子長の側鎖を有する別に負荷電アミノ酸により、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれかにより置換されている。

【0277】

幾つかの実施態様において、天然ペプチドの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り修飾される。そのような修飾は、ペプチドの酸化分解を防止することができる。幾つかの実施態様において、27位のM e tは、ロイシン、イソロイシン又はノルロイシンで置換されている。幾つかの特定の実施態様において、27位のM e tは、ロイシン又はノルロイシンで置換されている。

10

【0278】

幾つかの実施態様において、20及び／又は24位のG l nは、例えば欠失又は置換により修飾される。そのような修飾は、G l nの脱アミド化を介して生じる分解を低減することができる。幾つかの実施態様において、20及び／又は24位のG l nは、A l a又はA I Bで置換されている。幾つかの実施態様において、20及び／又は24位のG l nは、L y s、A r g、O r n又はシトルリンで置換されている。

【0279】

幾つかの実施態様において、21位のA s pは、例えば欠失又は置換により修飾される。そのような修飾は、A s pの脱水により環状スクシンイミド中間体を形成し、続く異性化によりイソアスパラギン酸塩を形成することにより生じる分解を低減することができる。幾つかの実施態様において、21位は、G l u、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸で置換されている。幾つかの実施態様において、21位はG l uで置換されている。

20

【0280】

アルファヘリックス構造の安定化

クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチドのC末端部分（アミノ酸12～29位付近）におけるアルファヘリックス構造の安定化は、G L P-1及び／又はG I P活性の増強、並びに1及び／又は2位でのアミノ酸修飾により低減されたグルカゴン活性の回復をもたらす。アルファヘリックス構造は、例えば共有若しくは非共有分子内架橋の形成によって又はアルファヘリックス安定化アミノ酸（例えば、 α ， α -二置換アミノ酸）による12～29位付近のアミノ酸の置換及び／若しくは挿入によって安定化することができる。G I Pアゴニストのアルファヘリックス構造の安定化は、本明細書に記載されているように達成することができる。

30

【0281】

アシル化及びアルキル化

幾つかの実施態様によると、本明細書に開示されているグルカゴンペプチドは修飾されて、本明細書に記載されているように、アシル基又はアルキル基を含む。アシル化又はアルキル化は、循環しているグルカゴンペプチドの半減期を増加することができる。アシル化又はアルキル化は、有利なことに、グルカゴン及び／若しくはG L P-1受容体において作用の開始を遅延する、及び／若しくは作用の持続時間を延長する、並びに／又はD P P-I Vのようなプロテアーゼに対する耐性を改善する、並びに／又は溶解性を改善することができる。グルカゴンペプチドのグルカゴン及び／又はG L P-1及び／又はG I P受容体における活性を、アシル化の後で維持することができる。幾つかの実施態様において、アシル化グルカゴンペプチドの効力は、非アシル化型のグルカゴンペプチドに匹敵する。クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチドを、本明細書に記載されているように、親水性部分が結合している同じアミノ酸の位置又は異なるアミノ酸の位置でアシル化又はアルキル化することができる。

40

【0282】

幾つかの実施態様において、本発明は、グルカゴンペプチドの10位のアミノ酸に共有

50

結合しているアシル基又はアルキル基を含むように修飾されているグルカゴンペプチドを提供する。グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドの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更に含むことができる。幾つかの実施態様において、アシル基は、脂肪酸若しくは胆汁酸又はこれらの塩であり、例えばC40～C30脂肪酸、C8～C24脂肪酸、コール酸、C4～C30アルキル、C8～C24アルキル又は胆汁酸のステロイド部分を含むアルキルである。スペーサーは、アシル又はアルキル基を結合するのに適した反応性基を有する任意の部分である。例示的な実施態様において、スペーサーは、アミノ酸、ジペプチド若しくはトリペプチド、又は親水性二官能スペーサーを含む。幾つかの実施態様において、スペーサーは、Trp、Glu、Asp、Cys及びNH₂(CH₂CH₂O)_n(CH₂)_mCOOHを含むスペーサーからなる群より選択され、ここでmは、1～6の任意の整数であり、そしてnは、2～12の任意の整数である。そのようなアシル化又はアルキル化グルカゴンペプチドは、親水性部分、場合によりポリエチレングリコールを更に含むこともできる。前述のグルカゴンペプチドのいずれも、2つのアシル基若しくは2つのアルキル基又はそれらの組み合わせを含むことができる。

10

【0283】

結合体及び融合体

GIPアゴニストは、本明細書に記載されているように、複合体部分に結合することができ、この結合は場合により共有結合を介してでもよいし、リンカーを介してでもよい。

【0284】

他の実施態様において、第2ペプチドはXGPS SGAPPS（配列番号896）であり、ここでXは、20個の通常のアミノ酸、例えばグルタミン酸、アスパラギン酸又はグリシンのうちの1つから選択される。一つの実施態様において、Xは、アミノ酸の側鎖に共有結合している親水性部分を更に含むアミノ酸、例えばCysを表す。そのようなC末端延長は溶解性を改善し、GIP又はGLP-1活性も改善することができる。グルカゴンペプチドがカルボキシ末端延長を更に含む幾つかの実施態様において、延長のカルボキシ末端アミノ酸は、カルボン酸ではなくアミド基又はエステル基で終わる。

20

【0285】

幾つかの実施態様において、例えばC末端延長を含むグルカゴンペプチドにおいて、野生型グルカゴンの29位のトレオニンはグリシンで置換されている。例えば、29位のトレオニンにグリシン置換を有し、GPS SGAPPS（配列番号895）のC末端延長を含むグルカゴンペプチドは、同じC末端延長を含むように修飾された天然グルカゴンよりも、GLP-1受容体において、4倍効力がある。このT29G置換を、本明細書に開示されている他の修飾と一緒に使用して、GLP-1受容体に対するグルカゴンペプチドの親和性を増強することができる。例えば、T29G置換を、S16E及びN20Kアミノ酸置換と、場合によりアミノ酸16と20の間のラクタム架橋と、場合により本明細書に記載されているPEG鎖の付加と、組み合わせることができる。

30

【0286】

幾つかの実施態様において、アミノ酸がC末端に付加されており、付加アミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸及びグリシンからなる群より選択される。

40

【0287】

溶解性を増強する修飾

別の実施態様において、グルカゴンペプチドのいずれかの溶解性を、ペプチドのC末端部分における、好ましくは配列番号801の27位のC末端側の位置に荷電アミノ酸を導入する、アミノ酸置換及び／又は付加によって改善することができる。場合により、1、2又は3個の荷電アミノ酸を、C末端部分の範囲内に、好ましくは27位のC末端側に導入することができる。幾つかの実施態様において、28及び／又は29位の天然アミノ酸が1又は2個の荷電アミノ酸で置換されている、並びに／或いは更なる実施態様において、1～3個の荷電アミノ酸もまたペプチドのC末端に付加されている。例示的な実施態様において、1、2個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。幾つかの実施態様

50

において、負荷電アミノ酸（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。

【0288】

G I P 活性（並びに場合により G L P - 1 活性及び／又はグルカゴン活性）を依然として保持することが可能であるような更なる修飾、例えば保存的置換をグルカゴンペプチドに行うことができる。

【0289】

他の修飾

G I P 活性を増加又は減少する、グルカゴン受容体活性を増加又は減少する、及び G L P - 1 受容体活性を増加するような、クラス 2 ペプチドについて上記に記載された修飾のいずれも、個別に又は組み合わせて適用することができる。クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドについて上記に記載された修飾のいずれかを、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドに関して本明細書に記載されている、溶解性及び／又は安定性及び／又は作用持続時間の増加のような、他の所望の特性を付与する他の修飾と組み合わせることもできる。あるいは、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドについて上記に記載された修飾のいずれかを、溶解性又は安定性又は活性に実質的に影響を与えない、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドに関して本明細書に記載されている他の修飾と組み合わせることができる。例示的な修飾には以下が含まれるが、これらに限定されない：

(A) 例えば、天然グルカゴンの C 末端部分、好ましくは 27 位の C 末端側の位置への 1、2、3 個又はそれ以上の荷電アミノ酸の導入により溶解性を改善すること。そのような荷電アミノ酸は、例えば 28 又は 29 位で天然アミノ酸を荷電アミノ酸により置換する、あるいは 27、28 又は 29 位の後に荷電アミノ酸を付加することによって導入することができる。例示的な実施態様において、1、2、3 個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。他の実施態様において、1、2、3 個又は全ての荷電アミノ酸は、正に荷電されている。そのような修飾は溶解性を増加し、例えば、25℃で 24 時間後に測定したとき、約 5.5～8 の所定の pH、例えば pH 7 で、天然グルカゴンを基準として少なくとも 2 倍、5 倍、10 倍、15 倍、25 倍、30 倍又はそれ以上の溶解性をもたらす。

(B) 例えばペプチドの 16、17、20、21、24 若しくは 29 位、C 末端延長内、又は C 末端アミノ酸への、本明細書に記載されているポリエチレングリコール鎖のような親水性部分の付加により、溶解性及び作用持続時間又は循環半減期を増加すること。

(C) 本明細書に記載されているグルカゴンペプチドのアシル化又はアルキル化により、溶解性及び／若しくは作用持続時間若しくは循環半減期を増加すること、並びに／又は作用開始を遅延すること。

(D) 本明細書に記載されている 1 又は 2 位のアミノ酸の修飾により、ジペプチジルペプチダーゼ I V (D P P - I V) への耐性を導入することを介して、作用持続時間又は循環半減期を増加すること。

(E) 15 位の A s p の修飾により、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欠失又は置換により、溶解性を増加すること。そのような修飾は、5.5～8 の範囲内の pH において分解又は切断を低減することができ、例えば 25℃で 24 時間後に元のペプチドの少なくとも 75%、80%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% を保持することができる。そのような修飾は、A s p 15 - S e r 16 のペプチド結合の切断を低減する。

(F) 16 位の S e r の修飾により、例えば T h r 又は A I B での置換により、安定性を増加すること。そのような修飾も、A s p 15 - S e r 16 のペプチド結合の切断を低減する。

(G) 27 位のメチオニンの修飾により、例えばロイシン又はノルロイシンでの置換により、安定性を増加すること。そのような修飾は酸化分解を低減することができる。安定性は、20 又は 24 位の G l n の修飾により、例えば、A l a 又は A I B での置換により増強することもできる。そのような修飾は、G l n の脱アミド化を介して生じる分解を低

減することができる。安定性は、21位のA s pの修飾により、例えばG l uでの置換により増強することができる。そのような修飾は、A s pの脱水により環状スクシンイミド中間体を形成し、続く異性化によりイソアスパラギン酸塩を形成することによって生じる分解を低減することができる。

(H) 実質的に活性に影響を与えない非保存的若しくは保存的置換、付加又は欠失、例えば、2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、24、27、28若しくは29位の1つ以上での保存的置換；A l aによるこれらの位置の1つ以上での置換；27、28若しくは29位の1つ以上でのアミノ酸の欠失；又は場合によりC末端カルボン酸基の代わりにC末端アミド若しくはエステルと組み合わせ、アミノ酸29の欠失；A r gによる12位のL y sの置換；V a l若しくはP h eによる10位のT y rの置換。

10

【0290】

ペグ化後の活性の保存は、C末端へのG P S S G A P P P S（配列番号895）の付加によりもたらされる。

【0291】

天然グルカゴンペプチドの幾つかの位置を修飾し、同時に母体ペプチドの活性の少なくとも一部分を保持することができる。したがって、出願人たちは、2、5、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位に配置された1個以上のアミノ酸を、天然グルカゴンペプチドに存在するものと異なるアミノ酸で置換することができ、依然としてグルカゴン受容体において活性を保持することができると予測する。

20

【0292】

幾つかの実施態様において、18位は、A l a、S e r又はT h rからなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。幾つかの実施態様において、20位のアミノ酸は、L y s、A r g、O r n、シトルリン又はA I Bで置換されている。幾つかの実施態様において、21位は、G l u、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸で置換されている。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドは、16、17、18、20、21、23、24、27、28及び29位から選択される1～10個のアミノ酸修飾を含む。例示的な実施態様において、修飾は、G l n 17、A l a 18、G l u 21、I l e 23、A l a 24、V a l 27及びG l y 29からなる群より選択される1個以上のアミノ酸置換である。幾つかの実施態様において、17～26位から選択される1～2個のアミノ酸は、母体ペプチドと異なる。他の実施態様において、17～22位から選択される1～2個のアミノ酸は、母体ペプチドと異なる。更に他の実施態様において、修飾は、G l n 17、A l a 18、G l u 21、I l e 23及びA l a 24である。

30

【0293】

幾つかの実施態様において、1個以上のアミノ酸がグルカゴンペプチドのカルボキシ末端に付加されている。アミノ酸は、典型的には、20個の通常のアミノ酸の1つから選択され、幾つかの実施態様において、アミノ酸は、天然アミノ酸のカルボン酸の代わりにアミド基を有する。例示的な実施態様において、付加アミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸及びグリシンからなる群より選択される。

40

【0294】

活性を破壊しない他の修飾は、W 10又はR 20を含む。

【0295】

幾つかの実施態様において、本明細書に開示されているクラス2グルカゴン関連類縁体ペプチドは、1又は2個のアミノ酸残基によるC末端の切断により修飾され、それでも、グルカゴン、G L P-1及び／又はG I P受容体において同様の活性及び効力を保持する。この点において、29及び／又は28位のアミノ酸を欠失することができる。

【0296】

例示的な実施態様

幾つかの実施態様において、クラス2グルカゴン関連類縁体ペプチドは、以下の修飾：

50

(a) 1 位でのアミノ酸修飾、

(b) (i) i 及び i + 4 の位置のアミノ酸の側鎖の間又は j 及び j + 3 の位置のアミノ酸の側鎖の間のラクタム架橋（ここで、i は、1 2、1 3、1 6、1 7、2 0 又は 2 4 であり、j は 1 7 である）、或いは (i i) 1 6、2 0、2 1 又は 2 4 位の 1、2、3 つ又は全てにおける α 、 α -二置換によるアミノ酸置換、

(c) 2 7、2 8 及び 2 9 の 1、2 つ又は全てにおけるアミノ酸修飾、並びに

(d) 1、2、3、4、5、6 又は 8 個の更なるアミノ酸修飾
を有する、G I P アゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号 8 0 1）の類縁体であり、

ここで、G I P 受容体活性化における類縁体の E C 5 0 は、約 1 0 0 nM 以下である。

10

【0 2 9 7】

例示的な実施態様において、

(a) 1 位でのアミノ酸修飾は、大型の芳香族アミノ酸、場合により T y r、P h e、T r p、アミノ-P h e、ニトロ-P h e、クロロ-P h e、スルホ-P h e、4-ピリジル-Al a、メチル-T y r 又は 3-アミノ T y r による 1 位の H i s の置換である、

(b) (i) ラクタム架橋は、1 6 及び 2 0 位のアミノ酸の間にあり、1 6 及び 2 0 位のアミノ酸の一方は G l u で置換され、1 6 及び 2 0 位のアミノ酸の他方は L y s で置換されている、又は (i i) α 、 α -二置換アミノ酸は A I B であり、

(c) 2 7 位の M e t は、大型の脂肪族アミノ酸、場合により L e u で置換されており、

20

(d) 2 8 位の A s n は、小型の脂肪族アミノ酸、場合により A l a で置換されており、そして、

(e) 2 9 位の T h r は、小型の脂肪族アミノ酸、場合により G l y で置換されている。

【0 2 9 8】

類縁体は、下記のものを含むがこれらに限定されない、更なる修飾を含むことができる：

(a) 1 2 位でのアミノ酸修飾、場合により I l e による置換、

(b) 1 7 及び 1 8 位でのアミノ酸修飾、場合により 1 7 位での Q による及び 1 8 位での A による置換、

30

(c) C 末端への G P S S G A P P P S（配列番号 8 9 5）の付加、又はこれらの任意の組み合わせ。

【0 2 9 9】

類縁体は、下記のものを含むがこれらに限定されない、更なる修飾を、代替的に又は追加的に含むこともできる：

(a) D-S e r、A l a、D-A l a、G l y、N-メチル-S e r、A I B、V a l 又はアミノ-イソ酪酸で置換されている 2 位の S e r；

(b) T r p、L y s、O r n、G l u、P h e 又は V a l で置換されている 1 0 位の T y r；

(c) 1 0 位の L y s へのアシル基の結合；

40

(d) A r g で置換されている 1 2 位の L y s；

(e) G l u、G l n、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、T h r、G l y 又は A I B で置換されている 1 6 位の S e r；

(f) G l n、L y s 又は G l u で置換されている 1 7 位の A r g；

(g) A l a、S e r、T h r 又は G l y で置換されている 1 8 位の A r g；

(h) A l a、L y s、シトルリン、A r g、O r n 又は A I B で置換されている 2 0 位の G l n；

(i) G l u、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換されている 2 1 位の A s p；

(j) I l e で置換されている 2 3 位の V a l；

50

(k) A s n、A l a、G l u、L y s 又は A I B で置換されている 2 4 位の G l n ;
並びに

(1) 2、5、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、
20、21、24、27、28 及び 29 位のいずれかでの保存置換；或いは
これらの任意の組み合わせ。

【0300】

幾つかの実施態様において、クラス 2 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、16、17、
20、21、24 又は 29 位のアミノ酸、29 位の後の C 末端延長内（例えば、30 位）
の付加アミノ酸、又は C 末端アミノ酸のいずれかにおいて、親水性部分に共有結合してい
る。例示的な実施態様において、この親水性部分は、L y s、C y s、O r n、ホモシス
테인又はアセチルフェニルアラニン残基に、これらの位置のいずれかにおいて共有結
合している。例示的な親水性部分には、例えば 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ポリエチレン
グリコール（PEG）が含まれる。

10

【0301】

G I P アゴニストは、G I P アゴニスト活性を保持する 1、2、3、4 又は 5 個までの
更なる修飾を場合により有する、例えば配列番号 805～894 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ることができる。

【0302】

クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチド

20

特定の実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドはクラス 3 グルカゴン関連類
縁体ペプチドであり、本明細書、並びに国際特許出願公報第 2008/101017 号（
2008 年 8 月 21 日公開）及び米国仮出願第 61/090,412 号に記載されており
、その内容は全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0303】

活性

クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において増加した活性を
示すペプチドであることができ、更なる実施態様において、増強された生物物理学的安定
性及び／又は水溶性を示す。加えて、一つの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連
類縁体ペプチドは、天然グルカゴンの G L P－1 受容体対グルカゴン受容体の選択性を失
っており、したがってこれらの 2 つの受容体のコアゴニストを表す。クラス 3 グルカゴン
関連類縁体ペプチド内の選択されたアミノ酸修飾は、G L P－1 受容体対グルカゴン受容
体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 グルカゴン関連類縁体ペ
プチドは、G L P－1 受容体よりもグルカゴン受容体において高い活性を有するグルカゴ
ン／G L P－1 コアゴニスト、両方の受容体にほぼ同等の活性を有するグルカゴン／G L
P－1 コアゴニスト、又はグルカゴン受容体よりも G L P－1 受容体において高い活性を
有するグルカゴン／G L P－1 コアゴニストであることができる。後者の分類のコアゴニ
ストを操作して、グルカゴン受容体においてほとんど又は全く活性を示さないようにする
ことができ、それでも、天然 G L P－1 と同じ又はそれより良好な効力で G L P－1 受容
体を活性化する能力を保持することができる。これらのコアゴニストのいずれかは、増強
された生物物理学的安定性及び／又は水溶性を付与する修飾を含むこともできる。

30

40

【0304】

クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドの修飾は、天然 G L P－1 を基準として、G L
P－1 受容体において少なくとも約 10%（少なくとも約 20%、30%、40%、50
%、60%、75%、100%、125、150%、175%を含む）から約 200%の
いずれか又はそれ以上の活性を有し、天然グルカゴンを基準として、グルカゴン受容体
において少なくとも約 10%（約 20%、30%、40%、50%、60%、75%、10
0%、125、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400
%、450%を含む）から約 500%のいずれか又はそれ以上の活性を有するグルカゴン
ペプチドを産生するために、実施することができる。天然グルカゴンのアミノ酸配列は、

50

配列番号 1 であり、G L P-1 (7-36) アミドのアミノ酸配列は、配列番号 52 であり、G L P-1 (7-37) 酸のアミノ酸配列は、配列番号 50 である。例示的な実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの少なくとも 10 % の活性及び G L P-1 受容体において天然 G L P-1 の少なくとも 50 % の活性、又はグルカゴン受容体において天然グルカゴンの少なくとも 40 % の活性及び G L P-1 受容体において天然 G L P-1 の少なくとも 40 % の活性、又はグルカゴン受容体において天然グルカゴンの少なくとも 60 % の活性及び G L P-1 受容体において天然 G L P-1 の少なくとも 60 % の活性を示す。

【0305】

クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドのグルカゴン受容体対 G L P-1 受容体の選択性は、グルカゴン／G L P-1 活性の相対比（天然グルカゴンに対するグルカゴン受容体でのペプチドの活性を、天然 G L P-1 に対する G L P-1 受容体におけるペプチドの活性で割ったもの）として記載することができる。例えば、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの 60 % の活性を示し、G L P-1 受容体において天然 G L P-1 の 60 % の活性を示すクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン／G L P-1 活性の 1 : 1 比を有する。グルカゴン／G L P-1 活性の例示的な比には、約 1 : 1、1.5 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1 若しくは 10 : 1、又は約 1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2 若しくは 1 : 1.5 が含まれる。例としては、グルカゴン／G L P-1 活性比の 10 : 1 は、G L P-1 受容体と比べてグルカゴン受容体への 10 倍の選択性を示す。同様に、G L P-1 / グルカゴン活性比の 10 : 1 は、グルカゴン受容体と比べて G L P-1 受容体への 10 倍の選択性を示す。

【0306】

幾つかの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの約 10 % 以下の活性を有し、例えば、約 1 ~ 10 % 又は約 0.1 ~ 10 % 又は約 0.1 % 超であるが約 10 % 未満であり、一方、G L P-1 受容体における G L P-1 の少なくとも 20 % の活性を示す。例えば、本明細書に記載されている例示的なクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然グルカゴンの約 0.5 %、約 1 % 又は約 7 % の活性を有し、一方、G L P-1 受容体における G L P-1 の少なくとも 20 % の活性を示す。

【0307】

クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体若しくは G L P-1 受容体又は両方において増加又は減少した活性を有するグルカゴンペプチドであることができる。クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体対 G L P-1 受容体における変化した選択性を有するグルカゴンペプチドであることができる。

【0308】

したがって、本明細書に開示されているように、改善された溶解性及び／又は安定性も示す、高い効力のクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。例示的な高効力クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの少なくとも約 200 % の活性を有し、25 °C で 24 時間後、場合により、6 ~ 8 又は 6 ~ 9 又は 7 ~ 9 の pH（例えば pH 7）で少なくとも 1 mg/mL の濃度で溶解性であってもよく、場合により、元のペプチドの少なくとも 95 % を保持してもよい（例えば、元のペプチド 5 % 以下が分解又は切断される）。別の例として、例示的なクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンと D L P-1 の両方の受容体において（約 1 : 3 ~ 3 : 1 又は約 1 : 2 ~ 2 : 1 の比で）約 40 % を超える又は約 60 % を超える活性を示し、25 °C で 24 時間後、場合により、6 ~ 8 又は 6 ~ 9 又は 7 ~ 9 の pH（例えば pH 7）で少なくとも 1 mg/mL の濃度で溶解性であってもよく、場合により、元のペプチドの少なくとも 95 % を保持してもよい。別の例示的なクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの約 175 % 以上の活性及び D L P-1 受容体において天然 G L P-1 の約 20 % 以下の活性を示し、25 °C で 24 時間後、場合により、

6～8又は6～9又は7～9のpH（例えばpH7）で少なくとも1mg/mLの濃度で溶解性であってもよく、場合により、元のペプチドの少なくとも95%を保持してもよい。更に別の例示的なクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの約10%以下の活性及びDLP-1受容体において天然GLP-1の少なくとも約20%の活性を示し、25℃で24時間後、場合により、6～8又は6～9又は7～9のpH（例えばpH7）で少なくとも1mg/mLの濃度で溶解性であってもよく、場合により、元のペプチドの少なくとも95%を保持してもよい。更に別の例示的なクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの約10%以下であるが0.1%、0.5%又は1%を超える活性及びDLP-1受容体において天然GLP-1の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%若しくは100%又はそれ以上の活性を示し、25℃で24時間後、場合により、6～8又は6～9又は7～9のpH（例えばpH7）で少なくとも1mg/mLの濃度で溶解性であってもよく、場合により、元のペプチドの少なくとも95%を保持してもよい。幾つかの実施態様において、そのようなクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然グルカゴンの対応する位置に少なくとも22、23、24、25、26、27又は28個の天然に生じるアミノ酸を保持する（例えば、天然に生じるグルカゴンに対して1～7、1～5又は1～3個の修飾を有する）。

【0309】

グルカゴン活性に影響を与える修飾

グルカゴン受容体において増加された活性は、天然グルカゴン（配列番号1）の16位でのアミノ酸修飾によりもたらされる。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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1）の野生型ペプチドに対して修飾されて、グルカゴン受容体におけるペプチドの抗力が増強されたグルカゴンアゴニストである。天然グルカゴン（配列番号1）の16位に通常生じるセリンを、選択された酸性アミノ酸で置換して、検証済インビトロモデルアッセイ（実施例2を参照すること）におけるcAMP合成を刺激する能力に関して、グルカゴンの抗力を増強することができる。より詳細には、この置換は、この類縁体の抗力を、グルカゴン受容体において少なくとも2倍、4倍、5倍及び10倍を超えるまで増強する。この置換は、また、天然グルカゴンを基準として、GLP-1受容体における類縁体の活性を少なくとも5倍、10倍又は15倍増強するが、選択性は、GLP-1受容体に対しての場合よりもグルカゴン受容体に対して維持されている。

【0310】

非限定例によると、そのような増強された効力は、16位の天然に生じるセリンを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負荷電アミノ酸により、あるいはグルタミン、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸のいずれかにより又は少なくとも1個のヘテロ原子（例えば、N、O、S、P）を含有する側鎖であり、約4（若しくは3～5）原子長さの側鎖を有する荷電アミノにより置換することによってもたらすことができる。一つの実施態様によると、天然グルカゴンの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、ホモシステイン酸、トレオニン又はグリシンからなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。一つの実施態様によると、天然グルカゴンの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なる群より選択されるアミノ酸で置換されており、一つの実施態様では、セリン残基はグルタミン酸で置換されている。

【0311】

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7のペプチド又は配列番号5のグルカゴンアゴニスト類縁体を含む。一つの実施態様によると、ペプチドが配列番号7、配列番号8、配列番号9又は配列番号10の配列を含み、グルカゴンペプチドがGLP

ー1受容体よりもグルカゴン受容体に選択性を保持する、野生型グルカゴンに対してグルカゴン受容体において増強された効力を有するクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。一つの実施態様において、グルカゴン受容体に増強された選択性を有するクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号8、配列番号9、配列番号10のペプチド又はそのグルカゴンアゴニスト類縁体を含み、カルボキシ末端アミノ酸は、天然カルボン酸基を保持する。一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、NH₂-H i s-S e r-G l n-G l y-T h r-P h e-T h r-S e r-A s p-T y r-S e r-L y s-T y r-L e u-A s p-G l u-A r g-A r g-A l a-G l n-A s p-P h e-V a l-G l n-T r p-L e u-M e t-A s n-T h r-C O O H (配列番号10)を含み、ここでペプチドは、実施例2のインビトロ c A M Pアッセイにより測定すると、天然グルカゴンを基準として、グルカゴン受容体においておよそ5倍増強された抗力を示す。

【0312】

グルカゴンセプターにおける低減された活性は、例えば3位でのアミノ酸修飾によりもたらされる。酸性、塩基性又は疎水性アミノ酸（グルタミン酸、オルチニン、ノルロイシン）によるこの位置での置換は、グルカゴン受容体活性を実質的に低減又は破壊することを示している。特に、本明細書に記載されているグルカゴン類縁体、グルカゴンアゴニスト類縁体、グルカゴンコアゴニスト及びグルカゴン／G L P-1コアゴニスト分子を含むクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドのいずれかを修飾して、3位に修飾を、例えばG l uで置換されたG l nを含有させて、グルカゴン受容体に対する選択性と比較して、G L P-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産生することができる。

【0313】

2位での修飾（例えば、2位でのA I B）及び幾つかの場合では1位での修飾が、グルカゴン活性を低減しうることが観察された。グルカゴン活性のこの低減は、例えば本明細書に記載されている方法を介して、例えば「i」と「i+4」の位置、例えば12と16位、16と20位又は20と24位のアミノ酸の間の共有結合を介して、グルカゴンのC末端部分のアルファヘリックスを安定化することによって、回復することができる。幾つかの実施態様において、この共有結合は、16位のグルタミン酸と20位のリシンの間のラクタム架橋である。幾つかの実施態様において、この共有結合は、ラクタム架橋以外の分子内架橋である。例えば、適切な共有結合方法には、オレフィンメタセシス、ランチオニンに基づいた環化、ジスルフィド架橋又は改質硫黄含有架橋形成、 α , ω -ジアミノアルカン鎖の使用、金属原子架橋の形成、及びペプチド環化の他の方法、のいずれかの1つ以上が含まれる。

【0314】

G L P-1活性に影響を与える修飾

G L P-1受容体における増強された活性は、C末端アミノ酸のカルボン酸を、アミド又はエステルのような電荷中性基で置換することによってもたらされる。一つの実施態様において、これらのクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号20の配列を含み、ここでカルボキシ末端アミノ酸は、天然アミノ酸に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グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンとD L P-1の両方の受容体において強力な活性を有し、したがって、両方の受容体においてコアゴニストとして作用する。一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴン及びG L P-1受容体のコアゴニストであり、ここで、ペプチドは、配列番号20の配列を含み、28位のアミノ酸は、A s n又はL y sであり、29位のアミノ酸はT h r-アミドである。

【0315】

G L P-1受容体における増加された活性は、グルカゴンのC末端部分（例えば、残基12～29付近）のアルファヘリックスを安定化する修飾によりもたらされる。

【0316】

10

20

30

40

50

幾つかの実施態様において、そのような修飾は、3個の介在アミノ酸により離れている2個のアミノ酸（すなわち、「i」の位置のアミノ酸と「i+4」の位置のアミノ酸（ここでiは、12～25の任意の整数である））により離れている2個のアミノ酸、2個の介在アミノ酸により離れている2個のアミノ酸、すなわち、「j」の位置のアミノ酸と「j+3」の位置のアミノ酸（ここでjは、12～27の任意の整数である）、又は6個の介在アミノ酸により離れている2個のアミノ酸、すなわち、「k」の位置のアミノ酸と「k+7」の位置のアミノ酸（ここでkは、12～22の任意の整数である）、のそれぞれの側鎖の間での分子内架橋の形成を可能にする。例示的な実施態様において、架橋又はリンカーは、約8（又は約7～9）原子長であり、12と16位又は16と20位又は20と24位又は24と28位のアミノ酸の側鎖の間に形成される。2つのアミノ酸側鎖は、水素結合、塩架橋の形成のようなイオン相互作用又は共有結合を介して互いに結合することができる。

10

【0317】

一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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11、47、48及び49からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。一つの実施態様において、側鎖は互いに共有結合しており、一つの実施態様において、2個のアミノ酸が互いに結合してラクタム環を形成する。

【0318】

一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号45を含み、ここで少なくとも1つのラクタム環が、アミノ酸対12と16、16と20、20と24及び24と28からなる群より選択されるアミノ酸対の側鎖の間に形成される。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号20のグルカゴンペプチド類縁体を含み、ここでペプチドは、12と16位のアミノ酸の間又は16と20位のアミノ酸の間に形成された分子内ラクタム架橋を含む。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、アミノ酸配列20の配列を含み、ここで、分子内ラクタム架橋は、12と16位のアミノ酸の間、16と20位のアミノ酸の間又は20と24位のアミノ酸の間に形成され、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20のC末端アミノ酸と結合している。更なる実施態様において、28位のアミノ酸はアスパラギン酸である。

20

30

【0319】

幾つかの特定の実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドのC末端部分における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架橋の形成によって達成される。例えば、適切な共有結合方法には、オレフィンメタセシス、ランチオニンに基づいた環化、ジスルフィド架橋又は改質硫黄含有架橋形成、 α 、 ω -ジアミノアルカン鎖の使用、金属原子架橋の形成、ペプチド環化の他の方法、のいずれかの1つ以上が含まれ、これらがアルファヘリックスの安定化のために使用される。

【0320】

更に、GLP-1受容体における増強された活性は、所望の活性を保持する位置への1個以上の α 、 α -二置換アミノ酸の導入を介して、グルカゴンペプチドのC末端部分（アミノ酸12～29付近）のアルファヘリックス構造を安定化することによって達成することができる。幾つかの態様において、アルファヘリックスの安定化は、この方法により、塩架橋又は共有結合のような分子内架橋を導入することなく達成される。幾つかの実施態様において、グルカゴンペプチドの16、17、18、19、20、21、24又は29位の1、2、3、4つ又はそれ以上は、 α 、 α -二置換アミノ酸で置換されている。例えば、アミノイソ酪酸(AIB)によるクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの16位の置換は、塩架橋又はラクタムの不在下で、GLP-1活性を増強する。幾つかの実施態様において、16、20、21又は24位の1つ以上は、AIBで置換されている。

40

【0321】

GIP-1受容体における増強された活性は、20位でのアミノ酸修飾により達成する

50

ことができる。一つの実施態様において、20位のグルタミンは、荷電されている又は水素結合の能力を有するのいずれかであり、少なくとも5（又は約4～6）原子長である側鎖を有する別の親水性アミノ酸に、例えばリシン、シトルリン、アルギニン又はオルチニンで置換されている。

【0322】

GLP-1受容体において増加された活性は、配列番号26のC末端延長を含むクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドにおいて示されている。配列番号26を含むそのようなクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドにおけるGLP-1活性を、本明細書に記載されているように、18、28若しくは29位のアミノ酸又は18及び29位のアミノ酸を修飾することにより、更に増加することができる。

10

【0323】

GLP-1効力の更なる中程度の増加は、10位のアミノ酸を修飾してTrpにすることによって達成することができる。

【0324】

GLP-1受容体活性を増加する修飾の組み合わせは、一般に、単独で実施されるそのような修飾のいずれのものよりも高いGLP-1活性をもたらす。例えば、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、場合により16と20位のアミノ酸の間に共有結合を有して、16位、20位及びC末端カルボン酸基に修飾を含むことができる；16位及びC末端カルボン酸基に修飾を含むことができる；場合により16と20位のアミノ酸の間に共有結合を有して、16及び20位に修飾を含むことができる；又は20位及びC末端カルボン酸基に修飾を含むことができるが、場合により12位のアミノ酸はArgではなく、若しくは場合により9位のアミノ酸はGluではない。

20

【0325】

溶解性に影響を与える修飾

親水性部分の付加

クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドを更に修飾して、生理学的pHでの水溶液中のペプチドの溶解性及び安定性を改善しながら、同時に天然グルカゴンに対して高い生物学的活性を保持することができる。本明細書において考察される親水性部分を、本明細書において更に考察されるように、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドに結合することができる。

30

【0326】

一つの実施態様によると、配列番号9又は配列番号10を含むクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの17、21及び24位への親水性部分の導入は、生理学的pHを有する溶液における高効力グルカゴン類縁体の溶解性及び安定性を改善すると予測される。そのような基の導入も、例えば延長された循環半減期により測定すると、作用の持続時間を増加する。

【0327】

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18及び配列番号19からなる群より選択される配列を含み、ここで前記クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの16、17、21又は24位のうちの1つのアミノ酸残基の側鎖は、約500～約40,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有するポリエチレングリコール鎖を更に含む。一つの実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約500～約5,000ダルトンの範囲から選択される分子量を有する。別の実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約10,000～約20,000ダルトンの分子量を有する。更に他の例示的な実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約20,000～約40,000ダルトンの分子量を有する。

40

【0328】

適切な親水性部分には、本明細書に記載されている親水性部分、PEGのホモ又はコポリマー、及びPEGのモノメチル置換ポリマー（mPEG）を含む、当該技術において

50

既知の任意の水溶性ポリマーが含まれる。一つの実施態様によると、親水性基は、ポリエチレングリコール（PEG）鎖を含む。より詳細には、一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号6又は配列番号7の配列を含み、ここで、PEG鎖は、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの21及び24位の存在するアミノ酸の側鎖に共有結合し、クラス3グルカゴン関連類縁体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。一つの実施態様によると、ポリエチレングリコール鎖は、約500～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。

【0329】

一つの実施態様によると、ペグ化クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドに共有結合している2つ以上のポリエチレン鎖を含み、ここでグルカゴン鎖の総分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。一つの実施態様において、ペグ化グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号5から構成されるペプチド又は配列番号5のグルカゴンアゴニスト類縁体を含み、ここで、PEG鎖は21位及び24位のアミノ酸残基に共有結合しており、2つのPEG鎖の合計した分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。

【0330】

荷電C末端

配列番号20を含むクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの溶解性を、例えば、配列番号20のグルカゴンペプチドのC末端部分、好ましくは27位のC末端側の位置に、1、2、3個又はそれ以上の荷電アミノ酸を導入することにより、更に改善することができる。そのような荷電アミノ酸は、例えば28又は29位で天然アミノ酸を荷電アミノ酸で置換する、あるいは27、28又は29位の後に荷電アミノ酸を付加することによって導入することができる。例示的な実施態様において、1、2、3個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。グルカゴン活性を依然として保持することが可能であるような追加的な修飾、例えば保存的置換をクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドに行うことができる。一つの実施態様において、17～26位での1又は2個のアミノ酸置換により配列番号20と異なる類縁体、一つの実施態様において、20位でのアミノ酸置換により配列番号20のペプチドと異なる類縁体である、配列番号20のクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの類縁体が提供される。

【0331】

アシル化／アルキル化

一つの実施態様によると、グルカゴンペプチドは修飾されて、アシル基を含み、循環半減期を延長する及び／又は作用の開始を遅延する及び／又は作用の持続時間を延長する及び／又はDPP-IVのようなプロテアーゼに対する耐性を改善する。クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドのグルカゴン受容体及びGLP-1受容体における活性は、アシル化の後で維持される。更に、アシル化類縁体の効力は、非アシル化型のクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドに匹敵していた。

【0332】

幾つかの実施態様において、本発明は、グルカゴンペプチドの10位のアミノ酸に共有結合しているアシル基又はアルキル基を含むように修飾されているクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドを提供する。グルカゴンペプチドは、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの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更に含むことができる。前述のクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドのいずれも、2つのアシル基若しくは2つのアルキル基又はそれらの組み合わせを含むことができる。

【0333】

本発明の特定の態様において、アシル化クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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。

【0334】

C末端切断

幾つかの実施態様において、本明細書に記載されているクラス3グルカゴン関連類縁体

ペプチドは、グルカゴン及びGLP-1受容体における活性及び／又は効力に影響を与えることなく、グルカゴンペプチドのC末端の1又は2個のアミノ酸（すなわち、29及び／又は28位）の切断又は欠失により更に修飾される。この点において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然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を含むことができ、更に、本明細書に記載されている1個以上の修飾を有してもよい。

【0335】

一つの実施態様において、切断クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号550又は配列番号551を含む。別の実施態様において、切断グルカゴンアゴニストペプチドは、配列番号552及び配列番号553を含む。

【0336】

C末端延長

一つの実施態様によると、本明細書に開示されているクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンペプチドのカルボキシ末端、例えば配列番号26、配列番号27又は配列番号28への第2ペプチドの付加により修飾される。一つの実施態様において、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号66、配列番号67、配列番号68及び配列番号69からなる群より選択される配列を有するクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、ペプチド結合を介して第2ペプチドに共有結合しており、ここで第2ペプチドは、配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群より選択される配列を含む。更なる実施態様において、C末端延長を含むクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドにおいて、野生型グルカゴンの29位のトレオニンはグリシンで置換されている。29位のトレオニンにグリシン置換を有し、配列番号26のカルボキシ末端延長を含むクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号26のカルボキシ末端延長を含むように修飾された天然グルカゴンよりも、GLP-1受容体において、4倍効力がある。GLP-1受容体における効力を、18位の天然アルギニンのアラニン置換により更に増強することができる。

【0337】

したがって、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号27（KRNRRNNIA）又は配列番号28のカルボキシ末端延長を有することができる。一つの実施態様によると、配列番号33又は配列番号20を含むクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンペプチドのアミノ酸29に結合している配列番号27（KRNRRNNIA）又は配列番号28のアミノ酸配列を更に含む。より詳細には、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号10、配列番号12、配列番号13、配列番号14及び配列番号15からなる群より選択される配列を含み、更に、グルカゴンペプチドのアミノ酸29に結合している配列番号27（KRNRRNNIA）又は配列番号28のアミノ酸配列を含む。より詳細には、グルカゴンペプチドは、配列番号10、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号55及び配列番号56からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、更に、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ酸29に結合している配列番号26（GPS SGAPP S）又は配列番号29のアミノ酸配列を含む。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号64の配列を含む。

【0338】

他の修飾

グルカゴン受容体活性を増加又は減少し、GLP-1受容体活性を増加するクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドに関して上記に記載された修飾のいずれも、個別に又は組み合わせ合わせて適用することができる。GLP-1受容体活性を増加する修飾の組み合わせは、一般に、単独で実施されるそのような修飾のいずれのものよりも高いGLP-1活性をもたらす。上記に記載された修飾のいずれかを、増加した溶解性及び／又は安定性及び／又

は作用持続時間のような他の所望の特性を付与するクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドを参照した本明細書に記載されている他の修飾と組み合わせることもできる。あるいは、上記に記載された修飾のいずれかを、溶解性又は安定性又は活性に実質的に影響を与えない、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドについて本明細書に記載されている他の修飾と組み合わせることができる。例示的な修飾には以下が含まれるが、これらに限定されない：

(A) 例えば、天然グルカゴンのC末端部分、好ましくは27位のC末端側の位置への1、2、3個又はそれ以上の荷電アミノ酸の導入により溶解性を改善すること。そのような荷電アミノ酸は、例えば28又は29位で天然アミノ酸を荷電アミノ酸で置換する、あるいは27、28又は29位の後に荷電アミノ酸を付加することによって導入することができる。例示的な実施態様において、1、2、3個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。他の実施態様において、1、2、3個又は全ての荷電アミノ酸は、正に荷電されている。そのような修飾は溶解性を増加し、例えば、25℃で24時間後に測定したとき、約5.5～8の所定のpH、例えばpH7で、天然グルカゴンを基準として少なくとも2倍、5倍、10倍、15倍、25倍、30倍又はそれ以上の溶解性をもたらす。

(B) 例えばペプチドの16、17、20、21、24若しくは29位又はC末端アミノ酸への、本明細書に記載されているポリエチレングリコール鎖のような親水性部分の付加により、溶解性及び作用持続時間又は循環半減期を増加すること。

(C) 15位のアスパラギン酸の修飾により、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欠失又は置換により、溶解性を増加すること。そのような修飾は、5.5～8の範囲内のpHにおいて、特に酸性又はアルカリ性緩衝液において分解又は切断を低減することができ、例えば25℃で24時間後に元のペプチドの少なくとも75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%を保持することができる。

(D) 27位のメチオニンの修飾により、例えばロイシン又はノルロイシンでの置換により、安定性を増加すること。そのような修飾は酸化分解を低減することができる。安定性は、20又は24位のGlnの修飾により、例えば、Ala又はAIBでの置換により増強することもできる。そのような修飾は、Glnの脱アミド化を介して生じる分解を低減することができる。安定性は、21位のAspの修飾により、例えばGluでの置換により増強することができる。そのような修飾は、Aspの脱水により環状スクシニミド中間体を形成し、続く異性化によりイソアスパラギン酸塩を形成することによって生じる分解を低減することができる。

(E) 本明細書に記載されているDPP-IV耐性アミノ酸による1又は2位のアミノ酸の修飾により及びN-メチルアラニンによる2位のアミノ酸の修飾を含むことにより、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)に対する耐性を増加すること。

(F) 活性に影響を与え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若しくは29位の1つ以上での保存的置換；27、28若しくは29位の1つ以上での欠失；又はC末端カルボン酸基の代わりにC末端アミド若しくはエステルと場合により組み合わせたアミノ酸29の欠失。

(G) 本明細書に記載されているC末端延長を付加すること；

(H) 本明細書に記載されているグルカゴンペプチドの例えばアシル化又はアルキル化により、循環半減期を増加する及び／又は作用持続時間を延長する及び／又は作用開始を遅延すること。

(I) 本明細書に記載されているホモ二量体化又はヘテロ二量体化。

【0339】

他の修飾には、大型の芳香族アミノ酸（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Try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の置換が含まれる。

【0340】

大型の芳香族アミノ酸（例えば、Tyr）による1位のHisの非保存的置換を含有するGLP-1活性を有するクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、アルファヘリックスが例えば本明細書に記載されているもののいずれかのような分子内架橋を介して安定化している限り、GLP-1活性を保持することができる。

【0341】

結合体及び融合体

クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドを結合体部分に結合することができ、この結合は、共有結合を介してでもよいし、リンカーを介してでもよい。

【0342】

クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、また、第2ペプチド又はポリペプチドがクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの末端、例えばカルボキシ末端に融合している融合ペプチド又はタンパク質の一部であってもよい。

【0343】

より詳細には、融合クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、アミノ酸29に結合している配列番号26（GPS SGAPP S）、配列番号27（KRNRNNIA）又は配列番号28（KRNR）のアミノ酸配列を更に含んでいるグルカゴンペプチドであって、配列番号55、配列番号9又は配列番号10であるグルカゴンアゴニストを含むことができる。一つの実施態様において、配列番号26（GPS SGAPP S）、配列番号27（KRNRNNIA）又は配列番号28（KRNR）のアミノ酸配列は、ペプチド結合を介してクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドのアミノ酸29に結合している。出願人たちは、エキセンディン-4のC末端延長ペプチド（例えば、配列番号26又は配列番号29）を含むクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチド融合ペプチドにおいて、グリシンによる29位の天然トレオニン残基の置換が、GLP-1活性を顕著に増加することを発見した。このアミノ酸置換を、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドに関して本明細書に開示されている他の修飾と一緒に使用して、GLP-1受容体に対するグルカゴン類縁体の親和性を増強することができる。例えば、T29G置換を、S16E及びN20Kアミノ酸置換と、場合によりアミノ酸16と20の間のラクタム架橋と、場合により本明細書に記載されているPEG鎖の付加と、組み合わせることができる。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号64の配列を含む。一つの実施態様において、グルカゴン融合ペプチドのクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチド部分は、配列番号55、配列番号2、配列番号3、配列番号4及び配列番号5からなる群より選択され、ここでPEG鎖は、17、21、24位若しくはC末端アミノ酸又は21及び24位の両方に存在する場合、500～40,000ダルトンの範囲から選択される。より詳細には、一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドセグメントは、配列番号7、配列番号8及び配列番号63からなる群より選択され、ここでPEG鎖は、500～5,000範囲から選択される。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号55及び配列番号65の配列を含む融合ペプチドであり、ここで配列番号65のペプチドは、配列番号55のカルボキシ末端に結合している。

【0344】

一つの実施態様によると、配列番号10のクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの追加的な化学修飾は、グルカゴン受容体及びGLP-1受容体における相対的活性が実質的に同等である点まで増加したGLP-1受容体抗力を付与する。したがって、一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然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。グルカゴン受容体及びGLP-1受容体それぞれにおけるクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの相対的活性を、グルカゴン受容体において天然グルカゴンの約40%～約500%以上の活性及びGLP-1受容体における天然GLP-1の約20～約200%以上の活性、例えば、GLP-1受容体におけるグルカゴンの通常の活性に対して50倍又は100倍以上を示す類縁体を産

10

20

30

40

50

生するように更に修飾することによって、調整することができる。

【0345】

例示的な実施態様

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号55の類縁体であり、前記類縁体は、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1～3個のアミノ酸によって配列番号55と異なっており、前記クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、GLP-1受容体における天然GLP-1の少なくとも20%の活性を示す。

【0346】

一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列：

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33)を含み、ここで、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なるアミノ酸の群より選択され、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なるアミノ酸の群より選択され、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、そしてRはCOOH又はCONH₂であるが、但し、16位がセリンである場合、20位はLysであるか、あるいは16位がセリンであり、24位がGluである場合、20位又は28位のいずれかはLysである。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号33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。別の実施態様において、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29又は配列番号65のアミノ酸配列は、配列番号33のカルボキシ末端に共有結合している。

【0347】

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、追加的な酸性アミノ酸がペプチドのカルボキシ末端に付加されている配列番号33の配列を含む。更なる実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸は、天然アミノ酸のカルボン酸基の代わりにアミドを有する。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43及び配列番号44からなる群より選択される配列を含む。

【0348】

一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号33を含む類縁体であり、前記類縁体は、1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21及び27位から選択される1～3個のアミノ酸により配列番号33と異なるが、但し、16位のアミノ酸がセリンである場合、20位はリシンであるか、又はラクタム架橋が、24位のアミノ酸と、20位又は28位のアミノ酸との間に形成される。一つの実施態様によると、類縁体は、1、2、3、21及び27位から選択される1～3個のアミノ酸により配列番号33と異なっている。一つの実施態様において、配列番号33のグルカゴンペプチドの類縁体は、1若しくは2個のアミノ酸、又は一つの実施態様では1、2、3、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21及び27位から選択される単一のアミノ酸によって配列番号33の配列とは異なっているが、但し、16位のアミノ酸がセリンである場合、20位はリシンであるか、又はラクタム架橋が、24位のアミノ酸と、20位又は28位のアミノ酸との間に形成される。

【0349】

別の実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、NH₂-His-Ser-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-

P h e - V a l - X a a - T r p - L e u - M e t - X a a - X a a - R (配列番号 53) の配列を含む相対的に選択性の G L P - 1 受容体アゴニストであり、ここで、3 位の X a a は、G l u、O r n 又は N l e からなるアミノ酸の群より選択され、15 位の X a a は、A s p、G l u、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なるアミノ酸の群より選択され、16 位の X a a は、S e r、G l u、G l n、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸からなるアミノ酸の群より選択され、20 位の X a a は、G l n 又は L y s であり、24 位の X a a は、G l n 又は G l u であり、28 位の X a a は、A s n、L y s 又は酸性アミノ酸であり、29 位の X a a は、T h r、G l y 又は酸性アミノ酸であり、そして R は、C O O H、C O N H₂、配列番号 26 又は配列番号 29 であるが、但し、16 位がセリンである場合、20 位は L y s であるか、あるいは 16 がセリンであり、24 位が G l u である場合、20 位又は 28 位のいずれかは L y s である。一つの実施態様において、3 位のアミノ酸はグルタミン酸である。一つの実施態様において、28 及び／又は 29 位で置換されている酸性アミノ酸は、アスパラギン酸又はグルタミン酸である。一つの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、ペプチドのカルボキシ末端に付加されている追加的な酸性アミノ酸を更に含む、配列番号 33 の配列を含む。更なる実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸は、天然アミノ酸のカルボン酸基の代わりにアミドを有する。

【0350】

一つの実施態様によると、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、下記：

N H₂ - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - X a a - X a a - A r g - A r g - A l a
- X a a - A s p - P h e - V a l - X a a - T r p - L e u - M e t - X a a - X a a
- R (配列番号 34) からなる群より選択される修飾グルカゴンペプチドを含み、ここで、15 位の X a a は、A s p、G l u、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なるアミノ酸の群より選択され、16 位の X a a は、S e r、G l u、G l n、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸からなるアミノ酸の群より選択され、20 位の X a a は、G l n 又は L y s であり、24 位の X a a は、G l n 又は G l u であり、28 位の X a a は、A s n、A s p 又は L y s であり、R は、C O O H 又は C O N H₂ であり、29 位の X a a は、T h r 又は G l y であり、そして R は C O O H、C O N H₂、配列番号 26 又は配列番号 29 であるが、但し、16 位がセリンである場合、20 位は L y s であるか、あるいは 16 位がセリンであり、24 位が G l u である場合、20 位又は 28 位のいずれかは L y s である。一つの実施態様において、R は C O N H₂ であり、15 位の X a a は A s p であり、16 位の X a a は、G l u、G l n、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸からなるアミノ酸の群より選択され、20 及び 24 位の X a a は、それぞれ G l n であり、28 位の X a a は、A s n 又は A s p であり、そして 29 位の X a a は、T h r である。一つの実施態様において、15 及び 16 位の X a a は、それぞれ G l u であり、20 及び 24 位の X a a は、それぞれ G l n であり、28 位の X a a は、A s n 又は A s p であり、29 位の X a a は T h r であり、そして R は C O N H₂ である。

【0351】

一つの実施態様によると、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、増強された G L P - 1 活性を有し、(a) 大型の芳香族アミノ酸による 1 位の H i s のアミノ酸置換及び (b) 分子の C 末端部分 (例えば、12 ~ 29 位付近) のアルファヘリックスを安定化する分子内架橋を含む。特定の実施態様において、1 位のアミノ酸は、T y r、P h e、T r p、アミノ-P h e、ニトロ-P h e、クロロ-P h e、スルホ-P h e、4-ピリジル-A l a、メチル-T y r 又は 3-アミノ T y r である。特定の態様において、分子内架橋は、3 個の介在アミノ酸により離れている 2 個のアミノ酸の側鎖の間、すなわち、アミノ酸 i と i + 4 の側鎖の間にある。幾つかの実施態様において、分子内架橋はラクタム架橋である。本発明のより特定の実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、ペプチドの 1 位に大型の芳香族アミノ酸及び 16 と 20 位のアミノ酸の間にラクタム架橋を含む。そのようなクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、1 個以上 (例

えば、2、3、4、5個又はそれ以上)の本明細書に記載されている他の修飾を更に含むことができる。例えば、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、C末端カルボキシレートの代わりにアミドを含むことができる。したがって、一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号555のアミノ酸配列を含む。

【0352】

本発明の更に別の実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、増強されたGLP-1活性を有し、(a)アミノ酸位置12~29内に α 、 α -二置換アミノ酸による1個以上の置換及び場合により(b)C末端アミドを含む。幾つかの態様において、そのようなクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、特に、グルカゴンのC末端部分(12~29位付近)のアルファヘリックスを安定化する分子内架橋を欠いていること
10
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0353】

天然グルカゴンペプチドの特定の位置を修飾し、同時に母体ペプチドの活性の少なくとも一部分を保持できることが報告されている。したがって、出願人たちは、配列番号11のクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの2、5、7、10、11、12、13、14、17、18、19、20、21、24、27、28又は29位に配置された1個以上のアミノ酸を、天然グルカゴンペプチドに存在するものと異なるアミノ酸で置換することができ、依然としてグルカゴン受容体において活性を保持できると予測する。一つの実施態様において、天然ペプチドの27位に存在するメチオニン残基をロイシン又は

ノルロイシンに変えて、ペプチドの酸化分解を防止する。別の実施態様において、20位のアミノ酸は、Lys、Arg、Orn若しくはシトルリンで置換されている、及び／又は21位は、Glu、ホモグルタミン酸若しくはホモシステイン酸で置換されている。

【0354】

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、21、27、28又は29位から選択される追加的な1～6個のアミノ酸の変化によって配列番号1の対応するアミノ酸と異なる配列番号20を含むが、但し、16位のアミノ酸がセリンである場合、20位はLysであるか、あるいは16位がセリンであり、24位がGluである場合、20位又は28位のいずれかは、Lysである。別の実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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1～3個のアミノ酸が配列番号1の対応するアミノ酸と異なる、配列番号20を含む。別の実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、1、2、5、7、10、11、13、14、17、18、19、20又は21位から選択される1～2個のアミノ酸が配列番号1の対応するアミノ酸と異なる、配列番号8、配列番号9又は配列番号11を含み、更なる実施態様において、1～2個の異なるアミノ酸は、天然グルカゴン配列（配列番号1）に存在するアミノ酸に対して保存的アミノ酸置換を表す。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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で1、2又は3個のアミノ酸置換を更に含む、配列番号12、配列番号13、配列番号14又は配列番号15を含む。一つの実施態様において、2、5、7、10、11、13、14、16、17、18、19、20、21、27又は29位での置換は、保存的アミノ酸置換である。

【0355】

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、16、17、18、20、21、23、24、27、28及び29位それぞれから選択される1～10個のアミノ酸が配列番号1の対応するアミノ酸と異なっている配列番号33の変異配列を含む。一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、Gln17、Ala18、Glu21、Ile23、Ala24、Val27及びGly29からなる群より選択される1個以上のアミノ酸置換により配列番号33と異なっている。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、17～26位から選択される1～2個のアミノ酸が配列番号1の対応するアミノ酸と異なっている配列番号33の変異配列を含む。一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、Gln17、Ala18、Glu21、Ile23及びAla24からなる群より選択されるアミノ酸置換により配列番号33と異なっている、配列番号33の変異配列を含む。一つの実施態様によると、配列番号33の変異配列は、18位のアミノ酸置換により配列番号33と異なっており、ここで置換アミノ酸は、Ala、Ser、Thr及びGlyからなる群より選択される。一つの実施態様によると、配列番号33の変異配列は、18位のAlaのアミノ酸置換により配列番号33と異なっている。そのような変異は、配列番号55に包含される。別の実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、17～22位から選択される1～2個のアミノ酸が配列番号1の対応するアミノ酸と異なっている配列番号33の変異配列を含み、更なる実施態様において、配列番号33の変異体の変異配列は、20及び20位の1～2個のアミノ酸置換により配列番号33と異なっている。一つの実施態様によると、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列：

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15）を含み、ここで、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、そしてRは、COOH又はCONH₂である。一つの実施態様において、RはCONH₂である。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号47、配列番号48又は配列番号49の変異配列を含み、これは20位のアミノ酸置換により前記配列と異なっている。一つの実施態様において、アミノ酸置換は、20位のLys、Arg、Orn又はシトルリンからなる群より選択される。

【0356】

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、2位にセリン以外のアミノ酸を有することにより配列番号34と異なる、配列番号34の類縁体ペプチド配列を含む。一つの実施態様において、セリン残基は、アミノイソ酪酸、D-アラニンで置換されており、一つの実施態様において、セリン残基は、アミノイソ酪酸で置換されている。そのような修飾は、ジペプチジルペプチダーゼIVにより切断を抑制しながら、同時に母体化合物の固有の効力を保持する（例えば、母体化合物の効力の少なくとも75、80、85、95%又はそれ以上）。一つの実施態様において、類縁体の溶解性は、例えば、天然グルカゴンのC末端部分、好ましくは27位のC末端側の位置への1、2、3個又はそれ以上の荷電アミノ酸の導入により増加される。例示的な実施態様において、1、2、3個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。別の実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、天然アミノ酸の28若しくは29位に酸性アミノ酸置換、又は配列番号34のペプチドのカルボキシ末端に付加された酸性アミノ酸を更に含む。

【0357】

一つの実施態様において、本明細書に開示されているクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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低減するために、1又は2位において更に修飾されている。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、2位での置換により母体分子と異なり、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対して低減された感受性（すなわち、耐性）を示す、配列番号9、配列番号11、配列番号12、配列番号13配列番号14又は配列番号15の配列を含む。より詳細には、一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの2位は、D-セリン、D-アラニン、バリン、α-アミノイソ酪酸、グリシン、N-メチルセリン及びε-アミノ酪酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの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α-アミノ酪酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。別の実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの2位は、D-セリン、グリシン、N-メチルセリン及びα-アミノ酪酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号21又は配列番号22の配列を含む。

【0358】

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、1位での置換により母体分子と異なり、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対して低減された感受性（すなわち、耐性）を示す、配列番号9、配列番号11、配列番号12、配列番号13配列番号14又は配列番号15の変異配列を含む。より詳細には、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドの1位は、D-ヒスチジン、アルファ、アルファージメチルイミダゾール酢酸（DMI A）、N-メチルヒスチジン、アルファ-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモ-ヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸である。別の実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、類縁体が、1位にヒスチジン以外のアミノ酸を有することにより配列番号34と異なる、配列番号34の類縁体ペプチドを含む。一つ

の実施態様において、類縁体の溶解性は、例えば、天然グルカゴンのC末端部分、好ましくは27位のC末端側の位置への1、2、3個又はそれ以上の荷電アミノ酸の導入により増加される。例示的な実施態様において、1、2、3個又は全ての荷電アミノ酸は、負に荷電されている。別の実施態様において、類縁体は、天然アミノ酸の28若しくは29位に酸性アミノ酸置換又は配列番号34のペプチドのカルボキシ末端に付加された酸性アミノ酸を更に含む。一つの実施態様において、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。

【0359】

一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、1個のアミノ酸の追加的なカルボキシ末端延長又は配列番号26、配列番号27及び配列番号28からなる群より選択されるペプチドを更に含む、配列番号20の配列を含む。実施態様において、単一のアミノ酸が配列番号20のカルボキシ末端に付加される場合、アミノ酸は典型的には20個の通常のアミノ酸のうちの1個から選択され、一つの実施態様において、追加的なカルボキシ末端アミノ酸は、天然アミノ酸のカルボン酸の代わりにアミド基を有する。一つの実施態様において、追加的なアミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸及びグリシンからなる群より選択される。

10

【0360】

代替的な実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルタミン酸残基とリシン残基の側鎖の間に形成された少なくとも1つのラクタム架橋を含み、グルタミン酸残基及びリシン残基は、3個のアミノ酸により離れている。一つの実施態様において、ラクタムを有するクラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸は、天然アミノ酸のカルボン酸基の代わりにアミド基を有する。より詳細には、一つの実施態様において、クラス3グルカゴン関連類縁体ペプチドは、下記：

20

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67)、

30

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68)、

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69)、

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16)、

40

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17)、

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

50

ー R (配列番号 18)、

からなる群より選択される修飾グルカゴンペプチドを含み、

ここで、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 26、配列番号 27 及び配列番号 28 からなる群より選択され、ラクタム架橋は、配列番号 66 では 12 位の Lys と 16 位の Glu の間、配列番号 67 では 16 位の Glu と 20 位の Lys の間、配列番号 68 では 20 位の Lys と 24 位の Glu の間、配列番号 69 では 24 位の Glu と 28 位の Lys の間、配列番号 16 では 12 位の Lys と 16 位の Glu の間及び 20 位の Lys と 24 位の Glu の間、配列番号 17 では 12 位の Lys と 16 位の Glu の間及び 24 位の Glu と 28 位の Lys の間、並びに配列番号 18 では 16 位の Glu と 20 位の Lys の間及び 24 位の Glu と 28 位の Lys の間に形成される。一つの実施態様において、R は、COOH、CONH₂、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンからなる群より選択され、28位のアミノ酸は Asn であり、29位のアミノ酸はトレオニンである。一つの実施態様において、R は CONH₂ であり、28位のアミノ酸は Asn であり、29位のアミノ酸はトレオニンである。別の実施態様において、R は、配列番号 26、配列番号 29 及び配列番号 65 からなる群より選択され、29位のアミノ酸はグリシンである。

【0361】

更なる実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 及び配列番号 18 からなる群より選択され、ここでペプチドは、配列番号 26、配列番号 27 及び配列番号 28 からなる群より選択される 1 個アミノ酸又はペプチドの追加的なカルボキシ末端延長を更に含む。一つの実施態様において、末端延長は、配列番号 26、配列番号 29 又は配列番号 65 の配列を含み、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 55 の配列を含む。一つの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 33 の配列を含み、ここで、16 位のアミノ酸はグルタミン酸であり、20 位のアミノ酸はリシンであり、28 位のアミノ酸はアスパラギンであり、配列番号 26 又は配列番号 29 のアミノ酸配列は、配列番号 33 のカルボキシ末端に結合している。

【0362】

実施態様において、単一のアミノ酸が配列番号 20 のカルボキシ末端に付加される場合、アミノ酸は典型的には 20 個の通常のアミノ酸のうちの 1 個から選択され、一つの実施態様において、アミノ酸は、天然アミノ酸のカルボン酸の代わりにアミド基を有する。一つの実施態様において、追加的なアミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸及びグリシンからなる群より選択される。一つの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドがカルボキシ末端延長を更に含む場合、延長のカルボキシ末端アミノ酸は、一つの実施態様において、カルボン酸ではなくアミド基又はエステル基で終わる。

【0363】

別の実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、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-Xaa-Xaa-CONH₂ (配列番号 19) の配列を含み、ここで 30 位の Xaa は、任意のアミノ酸を表す。一つの実施態様において、Xaa は、20 個の通常のアミノ酸のうちの 1 個から選択され、一つの実施態様において、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、配列番号 19 の 17、21、24 又は 30 位のアミノ酸の側鎖に PEG 鎖を共有結合することによって、更に改善することができる。更なる実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 26、配列番号 27 及び配列番号 28 からなる群より選択されるペプチドの追加的なカルボキシ末端延長を含む。一つの実施態様によると、グルカゴン/GLP-1 受容体コアゴニストは、配列番号 30、配列

番号 3 1 及び配列番号 3 2 の配列を含む。

【0364】

配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 6 4 のグルカゴン配列への追加的な部位特異的内部修飾を行って、多様な程度の G L P-1 アゴニスト作用を有する一連のクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドを生じることができる。したがって、それぞれの受容体において実質的に同一のインビトロ効力を有するペプチドが調製され、特徴決定される。同様に、2 つの受容体それぞれにおいて選択性が 10 倍増強されたペプチドが同定され、特徴決定されている。上記に示したように、グルタミン酸による 16 位のセリン残基の置換は、グルカゴンと G L P-1 の両方の受容体において天然グルカゴンの効力を増強するが、グルカゴン受容体に対しておよそ 10 倍の選択性を維持する。加えて、グルタミン酸で 3 位の天然グルタミンを置換することによって（配列番号 2 2）、G L P-1 受容体におよそ 10 倍の選択性を示すグルカゴン類縁体を生成する。

10

【0365】

クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドの溶解性は、ペプチドの 16、17、21 及び 24 位に親水性基を導入することにより又はクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドのカルボキシ末端への単一修飾アミノ酸（すなわち、親水性基を含むように修飾されたアミノ酸）の付加により、生理学的 pH の水溶液において更に増強されると同時に、天然グルカゴンに対して高い生物学的活性も保持することができる。一つの実施態様によると、親水性基は、ポリエチレングリコール（PEG）鎖を含む。より詳細には、一つの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 又は配列番号 18 の配列を含み、ここで、PEG 鎖は、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドの 16、17、21、24 位のアミノ酸又は C 末端アミノ酸の側鎖に共有結合しているが、但し、ペプチドが配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 又は配列番号 13 を含む場合、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しており、ペプチドが配列番号 14 又は配列番号 15 を含む場合、ポリエチレングリコール鎖は、16、17 又は 21 位のアミノ酸残基に共有結合しており、ペプチドが配列番号 16、配列番号 17 又は配列番号 18 を含む場合、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している。

20

30

【0366】

一つの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 11、配列番号 12 又は配列番号 13 の配列を含み、ここで、PEG 鎖は、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドの 17、21、24 位のアミノ酸又は C 末端アミノ酸の側鎖に共有結合しており、ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸は、天然アミノ酸のカルボン酸基の代わりにアミド基を有する。一つの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 及び配列番号 19 からなる群より選択される配列を含み、ここで、PEG 鎖は、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドの配列番号 12、配列番号 13 及び配列番号 19 の 17、21 若しくは 24 位又は配列番号 14 及び配列番号 15 の 16、17 若しくは 21 位又は配列番号 16、配列番号 17 及び配列番号 18 の 17 若しくは 21 位のアミノ酸の側鎖に共有結合している。別の実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 11 又は配列番号 19 の配列を含み、ここで PEG 鎖は、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドの 17、21 若しくは 24 位のアミノ酸又は C 末端アミノ酸の側鎖に共有結合している。

40

【0367】

一つの実施態様によると、先行段落において但し書きで限定されているように、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは修飾されて、16、17、21、24 若しくは 29 位又は C 末端アミノ酸に 1 個以上のアミノ酸置換を含有し、ここで天然アミノ酸は、例えば PEG を含む親水性部分との架橋に適している側鎖を有するアミノ酸で置換されている。

50

天然ペプチドを、天然に生じるアミノ酸又は合成（非天然）アミノ酸で置換することができる。合成又は非天然アミノ酸とは、インビボで天然に生じないが、それでも、本明細書に記載されるペプチド構造に組み込むことができるアミノ酸を意味する。あるいは、例えば PEG を含む親水性部分との架橋に適している側鎖を有するアミノ酸を、本明細書に開示されているクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドのいずれかのカルボキシ末端に付加することができる。一つの実施態様によると、16、17、21、24 又は 29 からなる群より選択される位置で、天然アミノ酸を、リシン、システイン、オルチニン、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸に代えるアミノ酸置換を、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドにおいて行い、ここで置換アミノ酸は、アミノ酸の側鎖に共有結合している PEG 鎖を更に含む。一つの実施態様において、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 及び配列番号 19 からなる群より選択されるクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、更に修飾されて、グルカゴンペプチドの 17 又は 21 のアミノ酸の側鎖に共有結合している PEG 鎖を含む。一つの実施態様において、ペグ化クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 26、配列番号 27 又は配列番号 29 の配列を更に含む。

10

【0368】

別の実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 55 又は配列番号 56 の C 末端アミノ酸に結合している配列番号 26、配列番号 29 又は配列番号 65 の C 末端延長を更に含み、場合により、ペプチドの 17、18、21、24 若しくは 29 位のアミノ酸又は C 末端アミノ酸の側鎖に共有結合している PEG 鎖を更に含んで、配列番号 55 又は配列番号 56 の配列を含む。別の実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 55 又は配列番号 56 を含み、ここで、PEG 鎖は、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドの 21 又は 24 位のアミノ酸の側鎖に共有結合しており、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 26 又は配列番号 29 の C 末端延長を更に含む。

20

【0369】

別の実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 55 又は配列番号 33 又は配列番号 34 を含み、ここで、追加的なアミノ酸は、配列番号 33 又は配列番号 34 のカルボキシ末端に付加され、PEG 鎖は、付加アミノ酸の側鎖に共有結合している。更なる実施態様において、ペグ化クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 33 又は配列番号 34 の C 末端アミノ酸に結合している配列番号 26 又は配列番号 29 の C 末端延長を更に含む。別の実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 19 の配列を含み、ここで、PEG 鎖は、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドの 30 位のアミノ酸の側鎖に共有結合しており、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 19 の C 末端アミノ酸に結合している配列番号 26 又は配列番号 29 の C 末端延長を更に含む。

30

【0370】

一つの実施態様によると、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、ラクタム環が、12、20 又は 28 位に配置されているリシン残基と 16 又は 24 位に配置されているグルタミン酸残基の側鎖の間に形成されている配列番号 20 の配列を含み、ここで側鎖がラクタム環の形成に参加しているグルカゴンペプチドの 2 つのアミノ酸は、3 個の介在アミノ酸により互いに離れている。一つの実施態様によると、ラクタムを有するクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 及び配列番号 18 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。一つの実施態様において、ラクタムを有するペプチドのカルボキシ末端アミノ酸は、末端カルボン酸の代わりにアミド基又はエステル基を含む。一つの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 又は配列番号 18 のカルボキシ末端に共有結合している追加的なアミノ酸を更に含んで、配列番

40

50

号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 及び配列番号 18 を含む。更なる実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 66、配列番号 67、配列番号 68 及び配列番号 69 のカルボキシ末端に共有結合している追加的なアミノ酸を更に含んで、配列番号 66、配列番号 67、配列番号 68 及び配列番号 69 からなる群より選択される配列を含む。一つの実施態様において、28 位のアミノ酸は、アスパラギン又はリシンであり、29 位のアミノ酸はトレオニンである。

【0371】

一つの実施態様によると、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、以下の修飾：2 位の A l B、3 位の G l u、10 位の L y s、16 位の G l u、17 位の G l n、18 位の A l a、20 位の L y s、21 位の G l u、23 位の I l e、24 位の A l a、を含んで天然グルカゴン（配列番号 1）のアミノ酸配列を含み、ここで、10 位の L y s は C 14 ~ C 16 脂肪酸でアシル化されており、C 末端カルボキシレートはアミドで置換されている。特定の実施態様において、このクラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、その N 末端アミノ酸を介してジペプチジド D - L y s - サルコシンに結合している。

【0372】

幾つかの実施態様において、クラス 3 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号 70 ~ 514、517 ~ 534 又は 554 のいずれかのアミノ酸配列から（実質的に）構成され、G L P - 1 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 個までの更なる修飾を有してもよい。

【0373】

クラス 4 グルカゴン関連類縁体ペプチド

特定の実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、クラス 4 グルカゴン関連類縁体ペプチドである（例えば、その全体が本明細書に組み込まれる国際（P C T）特許出願番号 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 8 0 9 7 3 を参照すること）。

【0374】

活性

一つの実施態様によると、クラス 4 グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される（以下では「クラス 4 ペプチド」と呼ぶ）。特定の態様において、グルカゴンアンタゴニスト活性を有するクラス 4 ペプチドが提供される。グルカゴンアンタゴニストを、グルカゴンアゴニスト作用の抑制が望ましいあらゆる状況に使用することができる。最も直接的で明白な使用は糖尿病の治療におけるものであり、高血糖症の前臨床モデルで血中グルコースの低下をもたらすグルカゴンアンタゴニスト作用が実証されている。グルカゴンアンタゴニストを更に修飾して、化合物の生物物理学的安定性及び／又は水溶性を改善しながら、同時に母体化合物のアンタゴニスト活性を維持することができる。特定の態様において、クラス 4 ペプチドは、純粋なグルカゴンアンタゴニストとして定義される。

【0375】

用語「グルカゴンアンタゴニスト」は、グルカゴン活性に反作用するか又はグルカゴン機能を妨げる化合物を意味する。例えば、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体においてグルカゴンにより達成される最大反応の少なくとも 60 % の阻害（例えば、少なくとも 70 % の阻害）、好ましくは少なくとも 80 % の阻害を示す。一つの実施態様において、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体においてグルカゴンにより達成される最大反応の少なくとも 90 % の阻害を示す。特定の実施態様において、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体においてグルカゴンにより達成される最大反応の 100 % の阻害を示す。加えて、約 1 μ M の濃度のグルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体においてグルカゴンにより達成される最大アゴニスト活性の約 20 % 未満を示す。一つの実施態様において、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体においてグルカゴンにより達成される最大アゴニスト活性の約 10 % 未満を示す。特定の実施態様において、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体においてグルカゴンにより達成される最大アゴニスト活性の約 5 % 未満を示す。更に別の特定の実施態様において、グル

カゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体においてグルカゴンにより達成される最大アゴニスト活性の 0 %を示す。

【0376】

「純粋なグルカゴンアンタゴニスト」とは、検証済インビトロモデルアッセイを使用して cAMP 産生により測定されるグルカゴン又は GLP-1 受容体活性の検出刺激を生じない、グルカゴンアンタゴニストのことである（例えば、PCT/US2008/080973 を参照すること）。例えば、純粋なグルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体においてグルカゴンにより達成される最大アゴニスト活性の約 5 %未満（例えば、約 4 %未満、約 3 %未満、約 2 %未満、約 1 %未満、約 0 %）を示し、GLP-1 受容体において GLP-1 により達成される最大アゴニスト活性の約 5 %未満（例えば、約 4 %未満、約 3 %未満、約 2 %未満、約 1 %未満、約 0 %）を示す。

10

【0377】

したがって、幾つかの態様において、純粋なグルカゴンアンタゴニスト活性を示すクラス 4 ペプチドが提供される。一つの実施態様によると、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体が 0.8 nM のグルカゴンとグルカゴンアンタゴニストに同時に接触したとき、インビトロアッセイで cAMP 産生により測定すると、グルカゴン受容体のグルカゴン誘導 cAMP 産生を最大で少なくとも 50 %低減する活性を示す。一つの実施態様において、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体のグルカゴン誘導 cAMP 産生を最大量で少なくとも 80 %低減する。

【0378】

クラス 4 ペプチドは、グルカゴンアンタゴニストについて既に記載されているあらゆる使用に適していると考えられる。したがって、本明細書に記載されているクラス 4 ペプチドを、高血糖症の治療又はグルカゴンの高血中レベル若しくは高血中グルコースレベルをもたらす他の代謝疾患の治療に使用することができる。一つの実施態様によると、本明細書に開示されているクラス 4 ペプチドを使用して治療される患者は、家畜化された動物であり、別の実施態様では、治療される患者はヒトである。糖尿病患者におけるグルカゴン抑制の欠如が、部分的には糖原症の促進を介した食後高血糖に寄与することが研究によって示唆されている。経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）の際の、及びソマトスタチン誘導グルカゴン抑制の存在又は不在下での血中グルコースの分析は、高グルカゴンレベルの被験者においてグルコースの有意な増加を示した。したがって、本発明のクラス 4 ペプチドは、高血糖症の治療に使用することができるし、インスリン依存性又はインスリン非依存性のいずれかの I 型真性糖尿病、II 型真性糖尿病又は妊娠糖尿病を含む多様な種類の糖尿病を治療すること及び腎障害、網膜症及び血管疾患を含む糖尿病の合併症を低減することに有用であることが予想される。

20

30

【0379】

一つの実施態様において、エキセディン-4 の末端アミノ酸 10 個（すなわち配列番号 919（GPS SGAPPS）の配列）は、クラス 4 ペプチドのカルボキシ末端に結合している。これらの融合タンパク質は、食欲を抑制し、減量／体重維持を誘導する薬理的活性を有すると予測される。一つの実施態様によると、本明細書に開示されているクラス 4 ペプチドは更に修飾されて、配列番号 942 のクラス 4 ペプチドのアミノ酸 24 に結合している配列番号 919（GPS SGAPPS）のアミノ酸配列を含むことができ、個体に投与して減量を誘導する又は体重維持を援助することができる。より詳細には、配列番号 902、配列番号 903、配列番号 904、配列番号 905、配列番号 906、配列番号 907、配列番号 908、配列番号 936、配列番号 939、配列番号 940、配列番号 941、配列番号 942、配列番号 943 及び配列番号 944 からなる群より選択される配列を含み、クラス 4 ペプチドのアミノ酸 24 に結合している配列番号 919（GPS SGAPPS）のアミノ酸配列を更に含むクラス 4 ペプチドを、食欲の抑制及び減量／体重維持の誘導に使用する。一つの実施態様において、投与されるクラス 4 ペプチドは、配列番号 946 又は配列番号 947 の配列を含む。

40

【0380】

50

そのような食欲を減退する又は体重の減少を促進する方法は、体重の低減、体重増加の防止又は薬剤誘導肥満を含む多様な原因の肥満の治療、並びに血管疾患（冠動脈疾患、発作、末梢血管疾患、虚血再灌流など）、高血圧、I I型糖尿病の発症、高脂血症及び筋骨格系疾患を含む肥満に関連する合併症の低減に有用であることが予想される。

【0381】

本発明のクラス4ペプチドを、単独で又は他の抗糖尿病又は抗肥満剤と組み合わせて投与することができる。当該技術において既知であるか又は調査中の抗糖尿病剤には、インスリン；トルブタミド（Orinase）、アセトヘキサミド（Dymelor）、トラザミド（Tolinas）、クロルプロバミド（Diabinese）、グリピジド（Glucotrol）、グリブリド（Diabet a, Micronase, Glynase）、グリメピリド（Amaryl）又はグリクラジド（Diamicron）のよ
10
うなスルホニル尿素；レパグリニド（Prandin）又はナテグリニド（Starlix）のようなメグリチニド；メトホルミン（Glucophage）又はフェンホルミンのようなビグアナイド；ロシグリタゾン（Avandia）、ピオグリタゾン（Actos）若しくはトログリタゾン（Rezulin）又は他のPPAR γ インヒビターのようなチアゾリジンジオン；ミグリトール（Glyset）、アルカボース（Precose/Glucobay）のような炭水化物の消化を阻害するアルファグルコシダーゼインヒビター；エクセナチド（Byetta）又はプラムリンチド；ビルダグリプチン又はシタグリプチンのようなジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）インヒビター；SGLT（ナトリウム依存性グルコーストランスポーター1）インヒビター；又はFBPase（フルクトース1, 6-ビスホスファターゼ）インヒビター、が含まれる。

【0382】

当該技術において既知であるか又は調査中の抗肥満剤には、フェネチルアミン型刺激薬、フェンテルミン、（場合により、フェンフルアミン又はデクスフェンフルアミンを伴う）、ジェチルプロピオン（Tenuate（登録商標））、フェンジメトラジン（Prelu-2（登録商標）、Bontril（登録商標））、ベンズフェタミン（Didrex（登録商標））、シブトラミン（Meridia（登録商標）、Reductil（登録商標））を含む食欲抑制薬；リモナバン（Acomplia（登録商標））、他のカンナビノイド受容体アンタゴニスト；オキシントモジュリン；塩酸フルオキセチン（Prozac）；Qnexa（トピラメート及びフェンテルミン）、Excalia（ブプロピオン及びゾニサミド）又はContrave（ブプロピオン及びナルトレキソン）；或いはゼニカル（Orlistat）若しくはCetilistat（ATL-962としても知られている）又はGT 389-255と類似しているリパーゼインヒビター、が含まれる。
20
30

【0383】

本発明のクラス4ペプチドを、代謝性いそを罹患している患者に投与することもできる。癌患者の過半数が、意図されない進行性の減量、衰弱、並びに低体脂肪及び筋肉により特徴付けられる代謝性いそを経験していると推定される。この症状は、AIDS患者において同様に一般的であり、細菌及び寄生虫疾患、リウマチ様関節炎、並びに腸、肝臓、肺及び心臓の慢性疾患においても存在しうる。通常、食欲不振に関連し、加齢の状態又は物理的外傷の結果として表れる可能性がある。代謝性いそは、生活の質を減少し、基礎状態を悪化させる症状であり、死亡の主な原因である。出願人たちは、本明細書に開示されているクラス4ペプチドを患者に投与して、代謝性いそを治療できると予測する。
40

【0384】

本明細書に開示されているクラス4ペプチドを含む医薬組成物を、標準的な薬学的に許容される担体及び当業者に既知の投与経路を使用して、配合及び投与することができる。したがって、本開示は、本明細書に開示されている1つ以上のクラス4ペプチドを薬学的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物も包含する。医薬組成物は、クラス4ペプチドを単独の薬学的に活性な成分として含むことができるし、クラス4ペプチドを1つ以上の追加的な活性剤と組み合わせることもできる。一つの実施態様によると、本発明のクラス4ペプチドと、GLP-1受容体（例えば、GLP-1、GLP-1類縁体、エキセンディン-4類縁体又はそれらの誘導体）を活性化する化合物とを含む組成物が提供される。一つの実施態様によると、本発明のクラス4ペプチドと、インスリン又はインスリ
50

ン類縁体とを含む組成物が提供される。あるいは、配列番号 942 の配列を含み、配列番号 942 のアミノ酸 24 に結合している配列番号 919 (GPSSGAPPSS) のアミノ酸配列及び抗肥満ペプチドを更に含む、減量の誘導又は体重増加の防止をもたらす組成物を提供することができる。適切な抗肥満ペプチドには、米国特許第 5,691,309 号、同第 6,436,435 号又は米国特許出願第 2005/0176643 号に開示されているものが含まれ、GLP-1、GIP (胃抑制ポリペプチド)、MP1、PYY、MC-4、レプチンが含まれるが、これらに限定されない。

【0385】

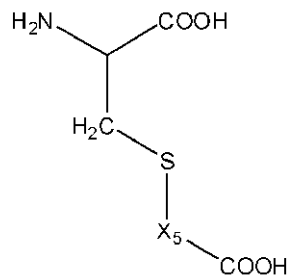
クラス 4 ペプチド構造

一つの実施態様において、通常は (グルカゴン、配列番号 901 の) 9 位に生じるアスパラギン酸がグルタミン酸又はシステイン酸の基づいた誘導体で置換されている、クラス 4 グルカゴン関連類縁体ペプチドが提供される。より詳細には、最初のアミノ酸の欠失 (des-His) 及び 9 位のアスパラギン酸のグルタミン酸による置換が、幾つかの態様において、クラス 4 ペプチドをもたらす。グルカゴンの 9 位のアミノ酸が置換されているスルホン酸置換基を有するクラス 4 グルカゴン関連類縁体ペプチドは、カルボン酸に基づくアミノ酸と同様に機能するが、溶解性のような物理的特性に関して幾つかの重要な差がある。従来の des-His, Glu9 クラス 4 ペプチドにおいて 9 位で等配電子グルタミン酸により置換されたとき、ホモシステイン酸 (hCysSO₃) は、部分的なアンタゴニスト及び弱いアゴニストを保持する。

【0386】

一つの実施態様において、最初の 2～5 個のアミノ酸が除去され、9 位 (配列番号 901 の番号付けによる) が hCys (SO₃)、ホモグルタミン酸、β-ホモグルタミン酸又は下記構造：

【化 45】

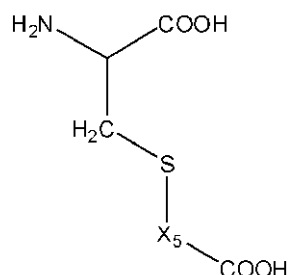


〔式中、X₅ は、C₁～C₄ アルキル、C₂～C₄ アルケニル若しくは C₂～C₄ アルキニルである〕を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体で置換されているクラス 4 ペプチドが、高度に特異的であり、強力であり、悪影響与えるアゴニスト特性を有さないホルモンアンタゴニストとして提供される。

【0387】

一つの実施態様によると、配列番号 901 の野生型配列と比べて、N 末端からの 2～5 個のアミノ酸残基の欠失、及び、天然グルカゴンの 9 位のグルタミン酸の、ホモグルタミン酸、β-ホモグルタミン酸、システインのスルホン酸誘導体又は下記構造：

【化 46】



〔式中、X₅ は、C₁～C₄ アルキル、C₂～C₄ アルケニル又は C₂～C₄ アルキニル

である]

を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体での置換、によって修飾されたグルカゴンペプチドを含む、クラス4ペプチドが提供される。

【0388】

特定の実施態様において、N末端からの2～5個のアミノ酸残基の欠失及び天然グルカゴンの9位のA s pの置換を含むクラス4ペプチドは、3個までのアミノ酸修飾により更に修飾される。例えば、クラス4ペプチドは、1、2又は3個の保存的アミノ酸修飾を含むことができる。代替的に又は追加的に、クラス4ペプチドは、下記からなる群より選択される1個以上のアミノ酸修飾を含むこともできる：

A. 10、20及び24位（配列番号901のアミノ酸番号付けによる）の1若しくは2個のアミノ酸の置換、又はエステル、エーテル、チオエーテル、アミド若しくはアルキルアミン結合を介してアシル基若しくはアルキル基に共有結合しているアミノ酸によるクラス4ペプチドのN若しくはC末端アミノ酸の置換；

B. 16、17、20、21及び24位（配列番号901のアミノ酸番号付けによる）の1若しくは2個のアミノ酸の置換、又はC y s、L y s、オルチニン、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニン（A c - P h e）からなる群より選択されるアミノ酸によるクラス4ペプチドのN若しくはC末端アミノ酸の置換（ここでアミノ酸の群は親水性部分に共有結合している）；

C. クラス4ペプチドのN又はC末端の親水性部分に共有結合するアミノ酸の付加；

D. システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による15位（配列番号901の番号付けによる）のA s pの置換；

E. システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による16位（配列番号901の番号付けによる）のS e rの置換；

F. 配列番号901のアミノ酸番号付けによる16、20、21及び24位の1つ以上の位置でのA I Bによる置換；

G. 配列番号901の番号付けによる29位のアミノ酸又は28及び29位のアミノ酸の欠失；

H. 荷電アミノ酸による28位のA s n及び29位のT h r（配列番号901のアミノ酸番号付けによる）のそれぞれ又は両方の置換及び／又は配列番号901のC末端の1～2個の荷電アミノ酸の付加；

I. L e u又はノルロイシンによる27位（配列番号901のアミノ酸番号付けによる）のM e tの置換；

J. 配列番号901のC末端への配列番号919～921及び953のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドの付加（ここで29位（配列番号901の番号付けによる）のT h rはT h r又はG l yである）；並びに

K. アミド又はエステルによるC末端カルボキシレートの交換。

【0389】

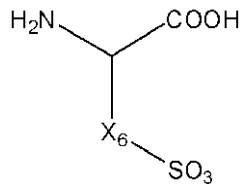
特定の実施態様において、クラス4ペプチドは、上記に記載されたアミノ酸修飾のA、B若しくはC、又はそれらの組み合わせを含む。更に別の特定の実施態様において、クラス4ペプチドは、アミノ酸修飾のA、B及び／又はCに加えて、上記に記載されたアミノ酸修飾のD～K又はそれらの組み合わせを更に含む。

【0390】

一つの実施態様において、クラス4ペプチドは、最初の5個のアミノ酸がN末端から除去され、残りのN末端アミノ基がヒドロキシル基で置換されて（「P L A 6類縁体」）、配列番号939のペプチドを産生する、グルカゴンペプチドを含む。出願人たちは、最初の5個のアミノ酸の欠失及び9位（天然のグルカゴンにおいて）のグルタミン酸の置換を有するクラス4ペプチド類縁体において、フェニル乳酸によりフェニルアラニンを置換すると、これらのグルカゴンアンタゴニスト類縁体の潜在能力を更に増強することを見出した。

【0391】

一つの実施態様において、配列番号 939 のクラス 4 ペプチドは、一般構造：
【化 47】

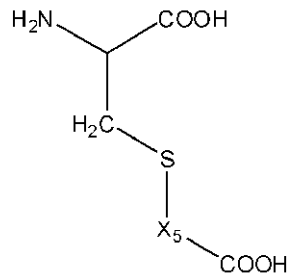


〔式中、 X_6 は、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_2 \sim C_3$ アルケン又は $C_2 \sim C_3$ アルキニルであり、一つの実施態様では、 X_6 は $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、別の実施態様では、 X_6 は C_2 アルキルである〕で示されるアミノ酸で 4 位（天然グルカゴンの 9 位）のアスパラギン酸残基を置換することにより更に修飾される。一つの実施態様において、クラス 4 ペプチドは、最初の 5 個のアミノ酸が N 末端から除去されており、かつ 4 位（天然グルカゴンの 9 位）のアスパラギン酸残基がシステイン酸又はホモシステイン酸で置換されているグルカゴンペプチドを含む。一つの実施態様において、クラス 4 ペプチドは、配列番号 939、配列番号 907 及び配列番号 908 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むグルカゴンペプチドを含む。一つの実施態様において、クラス 4 ペプチドは、配列番号 908 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、ここで 4 位のアミノ酸はホモシステイン酸である。

【0392】

別の実施態様において、配列番号 939 のクラス 4 ペプチドは、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、 β -ホモグルタミン酸又は一般構造：

【化 48】



〔式中、 X_5 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_2 \sim C_4$ アルケニル又は $C_2 \sim C_4$ アルキニルである〕を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体で 4 位（天然グルカゴンの 9 位）のアスパラギン酸残基を置換することにより更に修飾される。特定の実施態様において、 X_5 は、 C_1 又は C_2 アルキルである。

【0393】

しかし、出願人たちは、des 1-5 グルカゴン類縁体（すなわち、最初の 5 個のアミノ酸が欠失しているグルカゴン類縁体）における PLA による N 末端フェニルアラニンの置換によって、4 位（天然グルカゴンの 9 位）の天然アスパラギン酸残基の更なる置換が、純粋なアンタゴニスト作用を示す類縁体を産生するのに必要ではなくなることを発見した。この結果は、グルカゴン（2-29）類縁体の高度な親和性及び強力なアンタゴニストを産生するために 4 位の天然アスパラギン酸を置換しなければならないという従来技術の教示の観点からすると驚くべきことである。PLA 置換の使用は、Glu9 及び hCys (SO₃H)9 類縁体とポイント比較している Asp9 類縁体の相対的な潜在能力を改善する。

【0394】

3, 4-2F-フェニルアラニン (3, 4-2F-Ph e)、2-ナフチルアラニン (2-Na l)、N-アシル-フェニルアラニン (Ac-Ph e)、アルファ-メチルヒドロキシ酸 (MCA) 及びベンジルマロン酸 (BMA) を含む他のフェニルアラニン類縁体によるフェニルアラニン残基の置換は、PLA 置換と同等の効力では機能しなかった。

【0395】

4及び5位を含む6位以外（天然グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）の部位でのP L Aの置換は、P L A 6類縁体が、僅かに延長したN末端を有するグルカゴン類縁体よりかなり強力なアンタゴニストであること明らかにした。本発明は、N末端アミノ酸がアシル化及びアルキル化「O末端」ペプチドで置換されている類縁体も含む。

【0396】

更に、P L A 9置換は、アンタゴニストの効力を増大するのみならず、ペグ化において重要な役割も果たす。P L A 6類縁体を、グルカゴンアゴニスト作用を回復することなく選択的にペグ化することができる。P L A置換が不在であると、類縁体のペグ化は、驚くべきことにグルカゴンアゴニスト作用を誘発する。グルカゴンアゴニスト作用は、ペグ化されたP L A 6類縁体では見られない。3、6及び19位（天然グルカゴンの8、11及び19位）並びにN末端アミノ酸残基を含む幾つかの部位がペグ化のために調査された。一つの実施態様において、ペグ化は19位（天然グルカゴンの24位）で行われるが、その部位は最も強力で選択的なグルカゴンアンタゴニスト作用を示す。

【0397】

一つの実施態様において、クラス4ペプチド一般構造A-B-Cを含み、ここでAは、

(i) フェニル乳酸 (P L A) ;

(i i) P L Aのオキシ誘導体 ;

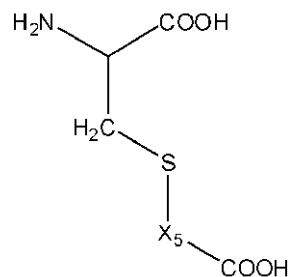
(i i i) 連続した2個のアミノ酸がエステル又はエーテル結合を介して結合しているアミノ酸2～6個のペプチド

からなる群より選択され ;

Bは、配列番号901のアミノ酸i～26を表し（ここでiは、3、4、5、6又は7であり）、更に、下記からなる群より選択される1個以上のアミノ酸置換を含んでもよく ;

(i v) G l u、C y sのスルホン酸誘導体、ホモグルタミン酸、β-ホモグルタミン酸又は下記構造 :

【化49】



〔式中、X₅は、C₁～C₄アルキル、C₂～C₄アルケニル又はC₂～C₄アルキニルである〕を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体による9位（配列番号901のアミノ酸番号付けによる）のA s pの置換 ;

(v) エステル、エーテル、チオエーテル、アミド又はアルキルアミン結合を介してアシル又はアルキル基に共有結合しているアミノ酸による10、20及び24位（配列番号901のアミノ酸番号付けによる）の1又は2個のアミノ酸の置換 ;

(v i) C y s、L y s、オルチニン、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニン (A c-P h e) からなる群より選択されるアミノ酸による16、17、20、21及び24位（配列番号901のアミノ酸番号付けによる）の1又は2個のアミノ酸の置換（ここでアミノ酸の群は親水性部分に共有結合している） ;

(v i i) システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による15位（配列番号901の番号付けによる）のA s pの置換 ;

(v i i i) システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による16位（配列番号901の番号付けによる）のS e rの置換 ;

(i x) 配列番号901のアミノ酸番号付けによる16、20、21及び24位の1

つ以上の位置での A I B による置換；
、そして

C は、下記：

(x) X；

(x i) X-Y；

(x i i) X-Y-Z；

(x i i i) X-Y-Z-R 1 0

(ここで、X は、M e t、L e u 又は N l e であり；Y は、A s n 又は荷電アミノ酸であり；Z は、T h r、G l y、C y s、L y s、オルニチン (O r n)、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン (A c-P h e) 又は荷電アミノ酸であり、R 1 0 は、
配列番号 9 1 9～9 2 1 及び 9 5 3 からなる群より選択される)；

(x i v) C 末端カルボキシレートがアミドで置換されている (x)～(x i i i) のいずれか
からなる群より選択される。

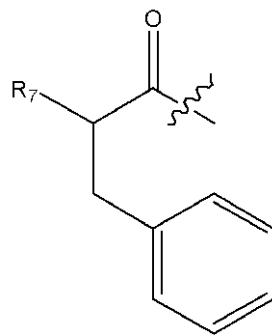
【0398】

特定の態様において、クラス 4 ペプチドは、P L A のオキシ誘導体を含む。本明細書で使用されるとき、「P L A のオキシ誘導体」とは、ヒドロキシ基が O-R₁₁ (式中、R₁₁ は化学的部分である) で置換されている P L A の修飾構造を含む化合物を意味する。この点において、P L A のオキシ誘導体は、例えば P L A のエステル又は P L A のエーテルであることができる。

【0399】

P L A のオキシ誘導体を作製する方法は、当該技術において既知である。例えば、オキシ誘導体が P L A のエステルである場合、エステルを、P L A のヒドロキシルと、求核剤を有するカルボニルとの反応により形成することができる。求核剤は、アミン又はヒドロキシルが含まれるが、これらに限定されない任意の適切な求核剤であることができる。したがって、P L A のエステルは、式 X I：

【化 50】



式 X I

〔式中、R₇ は、P L A のヒドロキシルと、求核剤を有するカルボニルとの反応により形成されるエステルである〕
で示される構造を含むことができる。

【0400】

求核剤を有するカルボニル (P L A のヒドロキシルと反応してエステルを形成する) は、例えば、カルボン酸、カルボン酸誘導体又はカルボン酸の活性化エステルであることができる。カルボン酸誘導体は、塩化アシル、酸無水物、アミド、エステル又はニトリルでありうるが、これらに限定されない。カルボン酸の活性化エステルは、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド (N H S)、トシレート (T o s)、カルボジイミド又はヘキサフルオロホスフェートであることができる。幾つかの実施態様において、カルボジイミドは、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C)、1, 1'-カルボニルジイミダゾール (C D I)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩

酸塩（EDC）又は1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド（CICD）である。幾つかの実施態様において、ヘキサフルオロホスフェートは、ヘキサフルオロホスフェート ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（BOP）、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノンホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、2-（1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU）、及びo-ベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU）からなる群より選択される。

【0401】

ヒドロキシル基（例えば、PLAのヒドロキシル）を用いる反応によりエーテルを作製する方法も当該技術において既知である。例えば、PLAのヒドロキシル基を、ハロゲン化アルキル又はトシル化アルキルアルコールと反応させて、エーテル結合を形成することができる。

【0402】

一般に、化学的部分である R_{11} は、クラス4ペプチドの活性を減少させないものである。幾つかの実施態様において、化学的部分は、クラス4ペプチドの活性、安定性及び／又は溶解性を増強する。

【0403】

特定の実施態様において、酸素含有結合を介して（例えば、エステル又はエーテル結合を介して）PLAに結合している化学的部分は、ポリマー（例えば、ポリアルキレングリコール）、炭水化物、アミノ酸、ペプチド又は脂質、例えば脂肪酸又はステロイドである。

【0404】

特定の実施態様において、化学的部分はアミノ酸であり、場合により、式XIがデプシペプチドであるようにペプチドの一部であってもよい。この点において、PLAは、クラス4ペプチドがPLA残基の1個以上（例えば、1、2、3、4、5、6個又はそれ以上）のアミノ酸N末端を含むように、クラス4ペプチドのN末端アミノ酸残基以外の位置にあることができる。例えば、クラス4ペプチドは、クラス4ペプチドのn位にPLAを含むことができ、ここでnは2、3、4、5又は6である。

【0405】

PLA残基のアミノ酸N末端は、合成でありうるか又は天然に生じうる。特定の実施態様において、N末端PLAであるアミノ酸は、天然に生じるアミノ酸である。一つの実施態様において、PLAのN末端であるアミノ酸は、天然グルカゴンのN末端アミノ酸である。例えば、クラス4ペプチドは、N末端に、配列番号954～958のいずれかのアミノ酸配列を含むことができ、ここでPLAは、エステル結合を介してトレオニンに結合している：

配列番号954 His-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

配列番号955 Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

配列番号956 Gln-Gly-Thr-PLA

配列番号957 Gly-Thr-PLA

配列番号958 Thr-PLA

【0406】

代替的な実施態様において、1個以上のN末端アミノ酸を天然グルカゴンのアミノ酸以外のアミノ酸で置換することができる。例えば、クラス4ペプチドが5又は6位のアミノ酸としてPLAを含む場合、1位及び／又は2位のアミノ酸は、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を低減するアミノ酸であることができる。より詳細には、幾つかの実施態様において、クラス4ペプチドの1位は、D-ヒスチジン、アルファ、アルファジメチルイミダゾール酢酸（DMIA）、N-メチルヒスチジン、アルファ-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、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-ヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸であ

10

20

30

40

50

る。より詳細には、幾つかの実施態様において、アンタゴニストペプチドの2位は、D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン及びアミノイソ酪酸（AIB）からなる群より選択されるアミノ酸である。また、例えば、クラス4ペプチドが4、5又は6位のアミノ酸としてPLAを含む場合、クラス4ペプチドの3位のアミノ酸は、天然グルカゴンの天然グルタミン残基とは対照的に、グルタミン酸であることができる。本発明の例示的な実施態様において、クラス4ペプチドは、N末端に、配列番号959～961のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0407】

式XIの化合物を含むクラス4ペプチドに関して、ポリマーは、PLAのヒドロキシル基と反応することができる限り、任意のポリマーであることができる。ポリマーは、当然のことながら又は通常は、求核剤を有するカルボニルを含むものであることができる。あるいは、ポリマーは、カルボニルを有するカルボニルを含むように誘導体化されているものであることができる。ポリマーは、以下のいずれかを誘導体化したポリマーであることができる：ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン及びポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレートを含むその誘導体、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）及びポリ（オクタデシルアクリレート）を含むアクリル酸エステル及びメタクリル酸エステルのポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハロゲン化物、ポリ（酢酸ビニル）及びポリビニルピロリドンを含むポリビニルポリマー、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン及びそのコポリマー、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース及びセルロース硫酸ナトリウム塩を含むセルロース、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）及びポリ（エチレンテレフタレート）を含むポリエチレン、並びにポリスチレン。

【0408】

ポリマーは、合成の生分解性ポリマー（例えば、乳酸とグリコール酸ポリマー、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）及びポリ（ラクチド-c o -カプロラクトン））及び天然の生分解性ポリマー（例えば、アルギン酸塩及びデキストランを含む他の多糖類、セルロース、コラーゲン、その化学誘導体（化学基、例えばアルキル、アルキレンの置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、及び当業者により日常的に行われる他の修飾）、アルブミン及び他の親水性タンパク質（例えば、ゼイン、他のプロタミン及び疎水性タンパク質））を含む生分解性ポリマー、並びにこれらの任意のコポリマー又は混合物であることができる。一般に、これらの物質は、インビボにおける酵素的加水分解又は水への暴露によって、表面又はバルク侵食により分解される。

【0409】

ポリマーは、H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587により記載される生体侵食性ヒドロゲル（この教示は本明細書に組み込まれる）、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸塩、キトサン、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）及びポリ（オクタデシルア

クリレート)のような生体付着性ポリマーであることができる。

【0410】

一つの実施態様において、ポリマーは水溶性ポリマーである。適切な水溶性ポリマーは、当該技術において既知であり、例えば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC; Klucel)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC; Methocel)、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシプロピルブチルセルロース、ヒドロキシプロピルペンチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース (Ethocel)、ヒドロキシエチルセルロース、多様なアルキルセルロース及びヒドロキシアルキルセルロース、多様なセルロースエーテル、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、酢酸ビニル/クロトン酸コポリマー、ポリーヒドロキシアルキルメタクリレート、ヒドロキシメチルメタクリレート、メタクリル酸コポリマー、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、無水マレイン酸/メチルビニルエーテルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム及びカルシウム、ポリアクリル酸、酸性カルボキシポリマー、カルボキシポリメチレン、カルボキシビニルポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポリメチルビニルエーテル-c o -無水マレイン酸、カルボキシメチルアミド、カリウムメタクリレートジビニルベンゼンコポリマー、ポリオキシエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、並びにこれらの誘導体、塩及び組み合わせが含まれる。

10

【0411】

特定の実施態様において、ポリマーは、例えばポリエチレングリコール (PEG) を含む、ポリアルキレングリコールである。

20

【0412】

炭水化物は、アルファ離脱基を有するカルボニルを含むか、又は含むように作成される限り、任意の炭水化物であることができる。炭水化物は、例えば、アルファ離脱基を有するカルボニルを含むように誘導体化されているものであることができる。この点において、炭水化物を、単糖 (例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース)、二糖 (例えば、スクロース、ラクトース、マルトース)、オリゴ多糖 (例えば、ラフィノース、スタキオース)、多糖 (デンプン、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナン) から誘導体化

30

【0413】

式XIの化合物を含むクラス4ペプチドに関して、脂質は、アルファ離脱基を有するカルボニルを含む任意の脂質であることができる。脂質は、例えば、カルボニルを含むように誘導体化されたものであることができる。この点において、脂質は、脂肪酸 (例えば、C4~C30脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミン)、グリセロ脂質 (例えば、一置換、二置換、三置換グリセロール)、グリセロリン脂質 (例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン)、スフィンゴ脂質 (例えば、スフィンゴシン、セラミド)、ステロール脂質 (例えば、ステロイド、コレステロール)、プレノール脂質、サッカロ脂質又はポリケチド、油、ロウ、コレステロール、ステロール、脂溶性のビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質の誘導体であることができる。

40

【0414】

一つの実施態様において、R7は、約100kDa以下、例えば90kDa以下、約80kDa以下、約70kDa以下、約60kDa以下、約50kDa以下、約40kDa以下の分子量を有する。したがって、R7は、約35kDa以下、30kDa以下、約25kDa以下、約20kDa以下、約15kDa以下、約10kDa以下、約5kDa以下又は1kDaの分子量を有することができる。

【0415】

代替的な実施態様において、クラス4ペプチドは、Aとして、連続した2個のアミノ酸

50

がエステル又はエーテル結合を介して結合しているアミノ酸 2～6 個のペプチドを含む。エステル又はエーテル結合は、例えば、アミノ酸 2 と 3、3 と 4、4 と 5 又は 5 と 6 の間にあることができる。場合により、ペプチドを、ポリマー（例えば、親水性ポリマー）への結合を含む他の化学的部分への共有結合、アルキル化又はアシル化により更に修飾することができる。

【0416】

一般構造 A-B-C を含むクラス 4 ペプチドに関して、B は、天然グルカゴンの、例えば配列番号 901 のアミノ酸 i～26 を表し、ここで i は、3、4、5、6 又は 7 であり、場合により 1 個以上のアミノ酸修飾を含む。特定の実施態様において、B は、配列番号 901 のアミノ酸 7～26 を表し、更に修飾されていてもよい。

10

【0417】

一つの実施態様において、B は、3 個までのアミノ酸修飾により修飾されている。例えば、配列番号 901 の天然アミノ酸配列を表す B は、1 個以上の保存的アミノ酸修飾で修飾されている。

【0418】

別の実施態様において、B は、本明細書に記載された (i v)～(i x) からなる群より選択される 1 個以上のアミノ酸修飾を含む。特定の実施態様において、B は、アミノ酸修飾 (v) 及び (v i) のうちの一方又は両方を含む。更なる特定の実施態様において、B は、(v) 及び (v i) に加えて、(i v)、(v i i)、(v i i i) 及び (i x) からなる群より選択されるアミノ酸修飾の 1 個又は組み合わせを含む。

20

【0419】

別の特定の実施態様において、クラス 4 ペプチドは、C 末端に 1 個以上の荷電アミノ酸を含む。例えば、Y 及び／又は Z は、荷電アミノ酸、例えば L y s、A r g、H i s、A s p 及び G l u であることができる。更に別の実施態様において、クラス 4 ペプチドは、Z に 1～2 個の荷電アミノ酸（例えば、L y s、A r g、H i s、A s p 及び G l u）C 末端を含む。特定の態様において、1～2 個の荷電アミノ酸に続く Z は、R 1 0 を含まない。

【0420】

一つの実施態様において、クラス 4 ペプチドは、本明細書に記載されているクラス 4 ペプチドのアミノ酸残基に共有結合している親水性部分を含む。例えば、クラス 4 ペプチドは、配列番号 901 の番号付けによる 1、16、20、21 又は 24 位のアミノ酸に共有結合している親水性部分を含むことができる。別の実施態様において、親水性部分は、クラス 4 ペプチドの C 末端アミノ酸に結合しており、これは幾つかの場合では、Z の C 末端側の 1～11 個のアミノ酸である。更に別の実施態様において、親水性部分は P L A に結合しており、A が P L A である場合は、P L A-P h e 又は P L A-T h r-P h e に結合しており、ここで P L A は修飾されて、親水性部分を含む。別の実施態様において、親水性部分を含むアミノ酸は、クラス 4 ペプチドの N 又は C 末端に付加されている。別の実施態様において、クラス 4 ペプチドは、本明細書に記載されているアシル基又はアルキル基を含む。例えば、アシル化又はアルキル化は、配列番号 901 の番号付けによる 10、20 又は 24 位のアミノ酸の側鎖の外で生じることができる。代替的な実施態様において、アシル化又はアルキル化は、幾つかの場合では、Z へのアミノ酸 1～11 個の C 末端である、クラス 4 ペプチドの C 末端アミノ酸の側鎖の外で生じる。更に別の実施態様において、A が P L A、P L A-P h e 又は P L A-T h r-P h e である場合、P L A は修飾されて、アシル又はアルキル基を含む。

30

40

【0421】

例示的な実施態様

クラス 4 ペプチドは、ペプチドの連続した少なくとも 2 個のアミノ酸がエステル又はエーテル結合を介して結合している限り、合成又は天然の任意のアミノ酸を含むことができる。特定の実施態様において、ペプチドは天然グルカゴンのアミノ酸を含む。例えば、ペプチドは j から 6 個の天然グルカゴン（配列番号 901）を含むことができ、ここで j は

50

1、2、3、4又は5である。あるいは、ペプチドは、1個以上のアミノ酸修飾を有する、配列番号901のN末端に基づいたアミノ酸配列を含むことができる。1位及び／又は2位のアミノ酸は、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を低減させるアミノ酸であることができる。例えば、ペプチドは、D-ヒスチジン、アルファ、アルファージメチルイミダゾール酢酸(DMIA)、N-メチルヒスチジン、アルファ-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモ-ヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸を、クラス4ペプチドの1位に含むことができる。より詳細には、幾つかの実施態様において、アンタゴニストペプチドの2位は、D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン及びアミノイソ酪酸(AIB)からなる群より選択されるアミノ酸である。また、例えば、クラス4ペプチドの3位のアミノ酸は、天然グルカゴンの天然グルタミン残基とは対照的に、グルタミン酸であることができる。したがって、クラス4ペプチドは、

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (配列番号968) ;

Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (配列番号969) ; 又は

Xaa₃-Thr-Gly-Phe (配列番号970)

のアミノ酸配列を含むことができ、

ここで、Xaa₁は、His、D-ヒスチジン、アルファ、アルファージメチルイミダゾール酢酸(DMIA)、N-メチルヒスチジン、アルファ-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモ-ヒスチジンからなる群より選択され；Xaa₂は、Ser、D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン及びアミノイソ酪酸(AIB)からなる群より選択され；そしてXaa₃は、Gln又はGluである。

【0422】

本発明は、クラス4ペプチドのC末端アミノ酸が、天然アミノ酸に存在するカルボン酸基を置換しているアミド基を有する実施態様も包含する。

【0423】

幾つかの実施態様において、クラス4ペプチドがペグ化されている場合、クラス4ペプチドは、特に「N末端」アミノ酸がPLA(フェニルー乳酸)である6~29個の短縮されたグルカゴンペプチドを含む。そのようなグルカゴン誘導体は特有の効能を示す。これらは、天然N末端フェニルアラニンを有するものよりも強力なペプチドであり、ペグ化の結果、あらゆるグルカゴンアゴニスト作用を抑制し、このことは天然フェニルアラニンにおいて見られない。最後に、現在の文献は、9位の天然アスパラギン酸の置換がアンタゴニスト活性にとって必要であることを確立しているが、出願人たちは、そのような置換はPLA₆-(6-29)グルカゴン類縁体においてはもはや必要ではないという驚くべき結果を発見した。

【0424】

一つの実施態様において、クラス4ペプチドのアミノ酸は少なくとも1つのシステイン残基で置換されており、ここでシステイン残基の側鎖は、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チオール反応性試薬により更に修飾される。これらのチオール反応試薬は、カルボキシ、ケト、ヒドロキシ及び他のエーテル基、並びにポリエチレングリコール単位のような他の親水性部分を含有することができる。代替的な実施態様において、クラス4ペプチドのアミノ酸は、リシンで置換され、置換リシン残基の側鎖は、カルボン酸の活性エステル(スクシンイミド、無水物など)又はポリエチレングリコールのような親水性部分のアルデヒドのようなアミン反応性試薬を使用して更に修飾される。一つの実施態様によると、天然ペプチドの12位に対応するリシン残基は、アルギニンで置換され、単一のリシン置換は、天然ペプチドの1、16、17、20、21、24若しくは29位に対応するアミノ酸の1つに挿入されるか又はリシンは、クラス4ペプチドのN若しくはC末端に付加される。

【0425】

別の実施態様において、天然ペプチドの27位に対応するメチオニン残基をロイシン又はノルロイシンに変えて、ペプチドの酸化分解を防止する。

【0426】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載されているクラス4ペプチドは、グルカゴン受容体における活性又は効力に影響を与えることなく、グルカゴンペプチドのC末端の1又は2個のアミノ酸の切断又は欠失（すなわち、天然グルカゴンの29位又は28及び29位のアミノ酸の切断）により更に修飾される。この点において、本明細書に記載されているクラス4ペプチドは、例えば、天然グルカゴンペプチド（配列番号901）のアミノ酸1～27、1～28、2～27、2～28、3～27、3～28、4～27、4～28、5～27、5～28、6～27又は6～28から実質的に構成されるか又は構成されることができ、本明細書に記載されているクラス4ペプチド活性をもたらす1個以上の修飾を有する。

【0427】

本開示のクラス4ペプチドは、グルカゴンペプチドの機能にとって重要ではないことが知られている位置にもアミノ酸置換を包含する。一つの実施態様において、置換は、配列番号939の2、5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、19、22、23又は24からなる群より選択される1、2又は3つの位置での保存的アミノ酸置換である。一つの実施態様において、クラス4ペプチドは、配列番号942のペプチド誘導体を含み、ここでグルカゴンペプチドは、2、5、6、7、8、9、12、13及び14位から選択される1～3つのアミノ酸位置で配列番号942に対して更なるアミノ酸置換を含む。一つの実施態様において、配列番号942の2、5、6、8、9、12、13及び14位での置換は、保存的アミノ酸置換である。一つの実施態様において、天然ペプチドの16、17、20、21、24又は29位、とりわけ21及び／又は24位に対応するアミノ酸はシステイン又はリシンで置換されており、ここでPEG鎖は、置換システイン又はリシン残基と共有結合している。

【0428】

一つの実施態様によると、修飾クラス4ペプチドは、ペプチドに共有結合している2つ以上のポリエチレン鎖を含み、ここでグルカゴン鎖の総分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。一つの実施態様において、ペグ化クラス4ペプチドは、配列番号912及び配列番号922からなる群より選択されるペプチドを含み、ここで前記ペプチドは、11及び19位のアミノ酸に結合しているポリエチレングリコール鎖を含み、2つのPEG鎖の合計した分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。

【0429】

一つの実施態様によると、下記：

R_1 - Phe - Thr - Ser - Xaa - Tyr - Ser - Xaa - Tyr - Leu - Xaa - Xaa - Arg - Arg - Ala - Gln - Asp - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Xaa - Asn - Thr - R_2 （配列番号909）、

R_1 - Phe - Thr - Ser - Xaa - Tyr - Ser - Xaa - Tyr - Leu - Asp - Ser - Arg - Arg - Ala - Gln - Xaa - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Xaa - Asn - Thr - R_2 （配列番号910）、

R_1 - Phe - Thr - Ser - Xaa - Tyr - Ser - Xaa - Tyr - Leu - Asp - Ser - Arg - Arg - Ala - Gln - Asp - Phe - Val - Xaa - Trp - Leu - Xaa - Asn - Thr - R_2 （配列番号911）及び

R_1 - Phe - Thr - Ser - Xaa - Tyr - Ser - Xaa - Tyr - Leu - Asp - Ser - Arg - Arg - Ala - Gln - Xaa - Phe - Val - Xaa - Trp - Leu - Xaa - Asn - Thr - R_2 （配列番号912）

からなる群より選択される修飾グルカゴンペプチドを含むクラス4ペプチドが提供され、

ここで、4位のXaaは、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸又はホモシステイン酸であり、7位のXaaは、Lys又はArgであり、10位のXaaは、アスパラギン酸、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸であり

、11位のXaaは、Ser、Lys、Cys、Orn、ホモシステイン又はアセチルフェニルアラニンであり、16位のXaaは、Asp、Lys、Cys、Orn、ホモシステイン又はアセチルフェニルアラニンであり、19位のXaaは、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であり、22位のXaaは、Met、Leu又はNleであり、R₁は、OH又はNH₂であり、そしてR₂は、COOH又はCONH₂であり、ペプチドは、配列番号909の11位、配列番号910の16位、配列番号911の19位、配列番号912の16及び19位でペグ化されているが、但し、4位のXaaがアスパラギン酸である場合は、R₁はOHである。一つの実施態様によると、ペプチドは、配列番号909、配列番号910又は配列番号911の配列を含み、ここでR₁はOHであり、そしてR₂はCONH₂である。一つの実施態様において、ペプチドは、配列番号909、配列番号910又は配列番号911の配列を含み、ここでR₁はOHであり、R₂はCONH₂であり、そして4位のアミノ酸はアスパラギン酸であり、更なる実施態様において、そのようなペプチドは、配列番号919の配列を含むカルボキシ末端延長を含む。

10

【0430】

一つの実施態様によると、本ペプチドは、配列番号909、配列番号910、配列番号913、配列番号914及び配列番号916からなる群より選択される配列を含み、ここで本ペプチドは、配列番号909及び配列番号913の11位でペグ化されており、配列番号910の16位でペグ化されており、そして配列番号910及び配列番号914の19位でペグ化されている。一つの実施態様において、グルカゴンアゴニストは、配列番号913及び配列番号914のペプチドを含む。一つの実施態様において、本明細書に開示されているクラス4ペプチドのC末端アミノ酸は、天然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有する。一つの実施態様によると、クラス4ペプチドは、配列番号918の配列を含む。

20

【0431】

一つの実施態様において、血漿タンパク質がペプチドのアミノ酸側鎖に共有結合してグルカゴンペプチドの溶解性、安定性及び／又は薬物動態を改善しているクラス4ペプチドが提供される。例えば、血清アルブミンを本明細書に提示されているクラス4ペプチドに共有結合することができる。一つの実施態様において、血漿タンパク質が、天然グルカゴンペプチドの16、17、20、21、24又は29位に対応するアミノ酸に共有結合している。より詳細には、一つの実施態様において、血漿タンパク質は、天然グルカゴンペプチドの16又は24位に対応するアミノ酸に結合しており、クラス4ペプチドは、配列番号903、配列番号4、配列番号905、配列番号906、配列番号907、配列番号908、配列番号909、配列番号911、配列番号912、配列番号922、配列番号923、配列番号924、配列番号925、配列番号926、配列番号927、配列番号928、配列番号936及び配列番号939の配列を含む。一つの実施態様において、クラス4ペプチドは、配列番号909、配列番号910、配列番号911及び配列番号912からなる群より選択されるペプチドを含む。

30

【0432】

一つの実施態様によると、免疫グロブリン分子のFc部分を表す直鎖アミノ酸配列が、本明細書に開示されているクラス4ペプチドのアミノ酸側鎖に共有結合してグルカゴンペプチドの溶解性、安定性及び／又は薬物動態を改善している、クラス4ペプチドが提供される。例えば、免疫グロブリン分子のFc部分を表すアミノ酸配列は、配列番号907、配列番号939のグルカゴンペプチド又はそのグルカゴン類縁体の11、12、15、16、19、21又は24位に共有結合することができる。一つの実施態様において、Fcペプチドは、配列番号906、配列番号907、配列番号908又は配列番号936のクラス4ペプチドの11又は19位に共有結合している。Fc部分は、通常、IgGから単離されるが、任意の免疫グロブリンからのFcペプチドフラグメントも同等に機能するはずである。一つの実施態様において、グルカゴンペプチドは、配列番号903、配列番号904、配列番号905、配列番号907、配列番号908及び配列番号939からなる群よ

40

50

り選択され、ここでFc部分は、天然グルカゴンペプチドの16、17、20、21、24又は29位に対応する位置に結合している。一つの実施態様において、クラス4ペプチドは、配列番号909、配列番号910、配列番号911及び配列番号912からなる群より選択されるグルカゴンペプチドを含み、ここでFcペプチドは、配列番号909、配列番号910、配列番号911のそれぞれ11、16又は19位及び配列番号912の11と19の両方の位置に配置されているアミノ酸の側鎖に結合している。

【0433】

本発明の特定の実施態様において、クラス4ペプチドは、配列番号962、964～967及び971のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0434】

溶解性を改善する修飾

クラス4ペプチドを更に修飾して、生理学的pHの水溶液におけるペプチドの溶解性を改善しながら、同時に、幾つかの態様において、グルカゴンアンタゴニスト活性を保持することができる。天然ペプチドの1、16、17、20、21、24及び29位に対応した位置又はC末端への親水性基の導入は、得られたクラス4ペプチドの生理学的pHを有する溶液における溶解性を改善しながら、同時に母体化合物のアンタゴニスト活性を保持することができる。したがって、一つの実施態様において、本開示のクラス4ペプチドは、更に修飾されて、天然グルカゴンペプチドの1、16、17、20、21、24及び29位のアミノ酸又はN若しくはC末端アミノ酸に対応したアミノ酸の側鎖に共有結合している1つ以上の親水性基を含む。更なる実施態様において、天然グルカゴンペプチドの16及び24位のアミノ酸に対応したアミノ酸の側鎖は、親水性基に共有結合しており、一つの実施態様において、親水性基はポリエチレングリコール(PEG)である。

【0435】

出願人たちは、天然グルカゴンが、電荷をカルボキシ末端に導入してペプチドの溶解性を増強しながら、同時にペプチドのアゴニスト特性を保持するように修飾されうることも発見した。増強された溶解性は、ほぼ中性のpHでのグルカゴン溶液の調製及び保存を可能にする。比較的中性のpH(例えば、約6.0～約8.0のpH)でのグルカゴン溶液の配合は、クラス4ペプチドの長期安定性を改善する。

【0436】

ここでも、出願人たちは、本明細書に開示されているクラス4ペプチドを同様に修飾して、比較的中性のpH(例えば、約6.0～約8.0のpH)の水溶液における溶解性を増強しながら、同時に母体タンパク質のアンタゴニスト特性を保持できることを予測する。したがって、本発明の一つの実施態様は、野生型グルカゴン(配列番号901)の6～29位に存在する天然アミノ酸に対して、荷電アミノ酸による天然非荷電アミノ酸の置換により又はカルボキシ末端への荷電アミノ酸の付加により、ペプチドに電荷を付加するように更に修飾されている、配列番号939のクラス4ペプチドを対象とする。一つの実施態様によると、配列番号939のクラス4ペプチドの1～3個の非荷電天然アミノ酸は、荷電アミノ酸で置換されている。一つの実施態様において、荷電アミノ酸は、リシン、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なる群より選択される。より詳細には、出願人たちは、荷電アミノ酸による天然グルカゴンの28及び/又は29位に対応する位置で通常生じるアミノ酸の置換、及び/又はクラス4ペプチドのカルボキシ末端への1～2個の荷電アミノ酸の付加が、生理学的なpH(すなわち、約6.5～約7.5のpH)の水溶液におけるクラス4ペプチドの溶解性及び安定性を増強することを発見した。したがって、本明細書に開示されているクラス4ペプチドのそのような修飾は、特に約5.5～約8.0の範囲のpHの水溶液における溶解性に同様の効果を有すると同時に、母体ペプチドの生物学的活性を保持することが予測される。

【0437】

一つの実施態様によると、配列番号939のクラス4ペプチドは、負荷電アミノ酸(例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸)による天然グルカゴンの28位及び/又は29位に対応する天然アミノ酸の置換及び場合によりペプチドのカルボキシ末端への負荷電ア

10

20

30

40

50

ミノ酸（例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸）の付加によって修飾される。代替的な実施態様において、配列番号 939 のクラス 4 ペプチドは、正電荷アミノ酸（例えば、リシン、アルギニン又はヒスチジン）による天然グルカゴンの 29 位に対応する天然アミノ酸の置換及び場合によりペプチドのカルボキシ末端への 1～2 個の正電荷アミノ酸（例えば、リシン、アルギニン又はヒスチジン）の付加により修飾される。一つの実施態様によると、改善された溶解性及び安定性を有するクラス 4 ペプチドが提供され、ここでペプチドは、配列番号 941 のアミノ酸配列を含むが、但し、配列番号 941 の 23 又は 24 位の少なくとも 1 個のアミノ酸は酸性アミノ酸で置換されている及び／又は追加の酸性アミノ酸は配列番号 941 のカルボキシ末端に付加されている。一つの実施態様において、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なる群より独立して選択される。

10

【0438】

一つの実施態様によると、改善された溶解性及び安定性を有するクラス 4 ペプチドが提供され、ここでアンタゴニストは配列番号 941、配列番号 942、配列番号 943 又は配列番号 944 のアミノ酸配列を含み、23 位又は 24 位の少なくとも 1 個のアミノ酸は、非天然アミノ酸残基で置換されている（すなわち、類縁体の 23 又は 24 位に存在する少なくとも 1 個のアミノ酸は、配列番号 907 の対応する位置に存在するアミノ酸と異なる酸性アミノ酸である）。一つの実施態様によると、配列番号 941 又は 942 の配列を含むクラス 4 ペプチドが提供されるが、但し、23 位のアミノ酸がアスパラギンであり、24 位のアミノ酸がトレオニンである場合、ペプチドは、グルカゴンアンタゴニストのカルボキシ末端に付加される、Lys、Arg、His、Asp 又は Glu からなる群より独立して選択される 1～2 個のアミノ酸を更に含む。

20

【0439】

別の実施態様において、配列番号 942 のクラス 4 ペプチドの溶解性は、親水性部分を 11、12、15、16、19 又は 24 位のアミノ酸残基に共有結合して改善することができ、一つの実施態様において、親水性部分は、11、16 又は 19 位のアミノ酸に結合しており、更なる実施態様において、親水性部分は、アミノ酸 19 に結合している。一つの実施態様において、親水性部分は、血漿タンパク質であるか又は免疫グロブリンの Fc 部分であり、代替的な実施態様において、親水性部分は、親水性炭化水素鎖である。一つの実施態様において、親水性部分は、約 1,000～約 5,000 ダルトンの範囲から選択される分子量を有するポリエチレングリコールである。別の実施態様では、親水性部分は、少なくとも約 20,000 ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコールである。一つの実施態様において、ポリエチレン修飾クラス 4 ペプチドは、配列番号 909、配列番号 910、配列番号 911、配列番号 912、配列番号 943、配列番号 944 又は配列番号 945 のアミノ酸配列を含む。

30

【0440】

安定性を改善する修飾

天然グルカゴンの 15～16 位の Asp-Ser 配列は、水性緩衝剤において天然ホルモンの早期化学切断をもたらす特有の不安定ジペプチドとして同定されている。例えば、0.01N の HCl に 37℃ で 2 週間維持されたとき、50% を超える天然グルカゴンがフラグメントに切断されうる。2 つの遊離切断ペプチド 1-15 及び 16-29 は、グルカゴン様生物学的活性を欠いており、したがって、グルカゴン及び関連する類縁体の水性予備処方に対して制限となる。Glu による天然グルカゴンペプチドの 15 位の Asp の選択的化学置換は、15-16 ペプチド結合の化学切断を実質的に排除することが観察されている。

40

【0441】

したがって、本発明のクラス 4 ペプチドを同様に修飾して、水性緩衝剤における早期化学切断に対する感受性を減少できることが予想される。一つの実施態様によると、本明細書に記載されているクラス 4 ペプチドを更に修飾して、天然グルカゴンペプチドの 15 位に配置されている天然アスパラギン酸アミノ酸を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグ

50

ルタミン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換することによって、水溶液中の安定性を増強することができる。一つの実施態様によると、配列番号 939 のクラス 4 ペプチドの 10 位のアスパラギン酸残基を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換することができ、一つの実施態様において、配列番号 939 の 10 位の天然アスパラギン酸はグルタミン酸で置換される。一つの実施態様によると、アンタゴニストが配列番号 936、配列番号 940 及び配列番号 942 からなる群より選択される配列を含む、水溶液において改善された溶解性を有するクラス 4 ペプチドが提供される。更なる実施態様において、クラス 4 ペプチドはアミド化されている。

【0442】

一つの実施態様によると、本明細書に記載されているクラス 4 ペプチドの分解を低減することによる安定性の増加は、グルタミン酸、システイン酸、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸による 16 位（天然グルカゴンの番号付けによる）のセリンの置換によって達成することもできる。特定の実施態様において、16 位（天然グルカゴンの配列番号付けによる）のセリンは、グルタミン酸で置換されている。より特定の態様において、そのような修飾を含むクラス 4 ペプチドは、C 末端カルボキシレートを含み、アミド化されていない。

【0443】

一つの実施態様において、配列番号 907、配列番号 936、配列番号 939、配列番号 940、配列番号 941、配列番号 942、配列番号 943 及び配列番号 944 からなる群より選択されるグルカゴンペプチドを含み、天然グルカゴンペプチドの 11、12、15、16、19 及び／又は 24 位に対応する位置での 1 つ以上の追加的なアミノ酸置換により更に修飾されているクラス 4 ペプチドが提供され、ここでアミノ酸置換は、例えば PEG を含む親水性部分による架橋に適した側鎖を有するアミノ酸による置換を含む。ペプチドを、天然に生じるアミノ酸又は合成（非天然）アミノ酸で置換することができる。合成又は非天然アミノ酸とは、インビボで天然に生じないが、それでも、本明細書に記載されるペプチド構造に組み込むことができるアミノ酸を意味する。一つの実施態様において、ペプチドが配列番号 907、配列番号 936、配列番号 939、配列番号 940、配列番号 941、配列番号 942、配列番号 943 及び配列番号 944 の配列を含み、天然グルカゴンペプチドの 21 又は 24 位に対応する位置に結合しているポリエチレン鎖を更に含む、クラス 4 ペプチドが提供される。更なる実施態様において、クラス 4 ペプチドの C 末端は修飾されて、カルボン酸基がアミド基で置換されている。

【0444】

融合ペプチド及び結合体

本開示は、第 2 ペプチドがクラス 4 ペプチドの C 末端に融合しているクラス 4 ペプチド融合ペプチドも包含する。より詳細には、融合タンパク質は、クラス 4 ペプチドの C 末端アミノ酸に結合している配列番号 919 (GPS SGAPPPS)、配列番号 920 (Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala) 又は配列番号 921 (Lys Arg Asn Arg) のアミノ酸配列を更に含む、配列番号 944 のクラス 4 ペプチドを含むことができる。一つの実施態様において、配列番号 919 (GPS SGAPPPS) のアミノ酸配列は、ペプチド結合を介して配列番号 942 のクラス 4 ペプチドのアミノ酸 24 に結合している。別の実施態様において、融合タンパク質は、クラス 4 ペプチドのアミノ酸 24 に結合している配列番号 919 (GPS SGAPPPS) のアミノ酸配列を更に含む、配列番号 907、配列番号 936、配列番号 939、配列番号 940、配列番号 941 又は配列番号 943 のクラス 4 ペプチドを含む。別の実施態様において、融合ペプチドは、クラス 4 ペプチドのアミノ酸 24 に結合している配列番号 920、配列番号 921 又は配列番号 953 のアミノ酸配列を更に含む、配列番号 907、配列番号 936、配列番号 937、配列番号 938、配列番号 939、配列番号 941 又は配列番号 943 のクラス 4 ペプチドを含む。一つの実施態様において、クラス 4 ペプチドは、配列番号 946 及び配列番号 947 からなる群より選択される配列を含む。更なる実施

態様において、融合ペプチドのC末端は修飾されて、カルボン酸基がアミド基で置換されている。

【0445】

一つの実施態様において、クラス4ペプチド融合ペプチドが提供され、ここで、融合ペプチドのクラス4ペプチド部分が、配列番号903、配列番号904、配列番号905、配列番号906、配列番号907、配列番号908、配列番号909、配列番号911、配列番号912、配列番号913、配列番号914、配列番号915、配列番号910、配列番号916、配列番号917、配列番号918及び配列番号939からなる群より選択され、配列番号919の配列がグルカゴンアンタゴニスト部分のカルボキシ末端に融合しており、PGE鎖が、存在する場合は、500～4,000ダルトンの範囲から選択される。より詳細には、一つの実施態様において、クラス4ペプチドセグメントは、配列番号913、配列番号914、配列番号915、配列番号916、配列番号946及び配列番号947からなる群より選択され、PGE鎖は、500～5,000ダルトンの範囲から選択され、より好ましくは、一つの実施態様において、PEG鎖は約1,000ダルトンである。更なる実施態様において、C末端は修飾されて、カルボン酸基がアミド基で置換されている。

10

【0446】

クラス4ペプチドは、カルボキシ末端へ付加された1～2個の荷電アミノ酸を更に含むことができる。一つの実施態様において、1～2個の荷電アミノ酸が配列番号944のカルボキシ末端に付加される場合、アミノ酸は、例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸を含む負荷電アミノ酸である。一つの実施態様において、クラス4ペプチドは配列番号942の配列を含み、天然グルカゴンペプチドの対応する27及び28位の少なくとも1つは、アスパラギン酸及びグルタミン酸からなる群より選択されるアミノ酸を含み、配列番号942は、場合により修飾されて、カルボキシ末端に付加された1～2個の負荷電アミノ酸の付加を含む。一つの実施態様において、負荷電アミノ酸は、グルタミン酸又はアスパラギン酸である。

20

【0447】

本明細書に開示されているクラス4ペプチドを、例えばインスリンを含む他の活性剤と組み合わせて、過剰グルカゴン活性により特徴付けられている疾患又は状態を治療することができる。一つの実施態様において、10,000ダルトンを超える分子量を有するPEG鎖に共有結合するように修飾されたクラス4ペプチドを、インスリンと一緒に投与して、糖尿病患者の安定した血中グルコースレベルの維持を助けることができる。本開示のクラス4ペプチドを単一組成物としてインスリンと同時投与すること、別々の液剤として同時に投与することができるか、あるいは、インスリンとクラス4ペプチドを互いに異なる時間で投与することができる。一つの実施態様において、インスリンを含む組成物及びクラス4ペプチドを含む組成物を、互いに12時間以内に投与する。クラス4ペプチドと投与されたインスリンの正確な比率は、部分的には患者のグルカゴンレベルを決定することによって決まり、慣用的な実験により決定することができる。

30

【0448】

二量体ペプチド

本開示は、本明細書に開示されている修飾クラス4ペプチドの多量体も包含する。2つ以上の修飾クラス4ペプチドを、標準的な結合剤及び当業者に既知の手順を使用して一緒に結合することができる。例えば、二量体は、2つの修飾クラス4ペプチドから、特にシステイン、リシン、オルチニン、ホモシステイン又はアセチルフェニルアラニン残基（例えば、配列番号909、配列番号910、配列番号911及び配列番号912）により（例えば、11、16又は19位で）置換されているクラス4ペプチドの場合では、二官能チオール架橋剤及び二官能アミン架橋剤の使用を介して、形成することができる。二量体は、ホモ二量体であってもよいし、ヘテロ二量体であってもよい。一つの実施態様において、二量体は、配列番号908、配列番号909、配列番号910、配列番号911、配列番号912、配列番号945、配列番号946又は配列番号947からなる群より独立

40

50

して選択される2つのクラス4ペプチドから形成され、ここで2つのペプチドは、それぞれのペプチドの11位、それぞれのペプチドの16位若しくはそれぞれのペプチド19位又はこれらの任意の組み合わせに結合しているリンカーを介して互いに結合している。一つの実施態様において、結合は、それぞれのクラス4ペプチドのペプチドのCys11とCys11又はCys19とCys19又はCys11とCys19残基の間のジスルフィド結合である。

【0449】

同様に、二量体は、配列番号903、配列番号4、配列番号905、配列番号906、配列番号907、配列番号908、配列番号909、配列番号910、配列番号911、配列番号912、配列番号936、配列番号937、配列番号938、配列番号939及び配列番号942からなる群より独立して選択される2つのクラス4ペプチドから形成することができ、ここで結合は、天然グルカゴンペプチドに対応した16、21及び24位から独立して選択されるアミノ酸位置の間で形成される。

10

【0450】

一つの実施態様によると、それぞれ配列番号946の配列を含む2つのクラス4ペプチドを含むクラス4ペプチド二量体が提供され、ここで2つのアンタゴニストは、アミノ酸の25位を介してジスルフィド結合により互いに結合している。別の実施態様において、それぞれ配列番号947の配列を含む2つのクラス4ペプチドを含むクラス4ペプチド二量体が提供され、ここで2つのアンタゴニストは、アミノ酸の35位を介してジスルフィド結合により互いに結合している。一つの実施態様において、二量体は、配列番号946と配列番号947のクラス4ペプチドから形成され、10位のアミノ酸はグルタミン酸である。

20

【0451】

一つの実施態様において、二量体は、配列番号907、配列番号908、配列番号936、配列番号937、配列番号940、配列番号939、配列番号940、配列番号941、配列番号942からなる群及び前記クラス4ペプチドの薬学的に許容される塩より選択されるクラス4ペプチド融合ペプチドのホモ二量体を含む。一つの実施態様によると、リンカーを介して第2クラス4ペプチドに結合している第1クラス4ペプチドとを含む二量体が提供され、ここで、二量体の第1及び第2グルカゴンペプチドは、配列番号907、配列番号908、配列番号936、配列番号937、配列番号939、配列番号940、配列番号941及び配列番号942からなる群と、前記グルカゴンポリペプチドの薬学的に許容される塩より独立して選択される。別の実施態様において、二量体の第1及び第2クラス4ペプチドは、配列番号907、配列番号908、配列番号936及び配列番号939からなる群より独立して選択される。

30

【0452】

別の実施態様において、二量体は、配列番号923、配列番号924、配列番号925、配列番号926、配列番号927、配列番号928、配列番号929、配列番号930、配列番号931からなる群より選択されるクラス4ペプチドのホモ二量体を含む。別の実施態様において、二量体の第1及び第2ペプチドが、配列番号923、配列番号924、配列番号925、配列番号926、配列番号927及び配列番号928からなる群より独立して選択されるアミノ酸配列を含むクラス4ペプチド量体が提供される。別の実施態様において、二量体は、配列番号909、配列番号911及び配列番号912からなる群より選択されるクラス4ペプチドのホモ二量体を含み、ここでペプチドは、グルカゴンペプチドの11又は19位に共有結合しているポリエチレングリコール鎖を更に含む。

40

【0453】

クラス4グルカゴン関連類縁体ペプチドは、グルカゴンアンタゴニスト活性を保持する1、2、3、4又は5個までの更なる修飾を場合により有する、配列番号901～971のアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含むことができる。

【0454】

クラス5グルカゴン関連類縁体ペプチド

50

特定の実施態様において、グルカゴン関連類縁体ペプチドは、クラス 5 グルカゴン関連類縁体ペプチドである（例えば、その全体が本明細書に組み込まれる国際（PCT）特許出願番号 PCT/US 2008/081333 を参照すること）。

【0455】

活性

特定の態様において、クラス 5 グルカゴン関連類縁体ペプチド（以下では「クラス 5 ペプチド」と呼ぶ）は、グルカゴンアゴニスト作用の抑制が望ましく、そして GLP-1 活性の同時の刺激も望ましいあらゆる状況に利用される、グルカゴンアンタゴニスト/GLP-1 アゴニストであることができる。例えば、GLP-1 刺激と一緒にしたグルカゴンアンタゴニスト活性を糖尿病の治療に使用することができ、ここでは、高血糖症の前臨床モデルで血中グルコースの低下をもたらすグルカゴンアンタゴニスト作用が実証され、GLP-1 活性がインスリン産生と関連している。GLP-1 活性を示す化合物も、肥満の治療及び体重増加の防止に有用であることが知られている。

【0456】

特定の態様において、クラス 5 ペプチドは、他のグルカゴンアンタゴニスト/GLP-1 アゴニストについて既に記載されているあらゆる使用に適していると考えられる。これらの 2 つの活性は、代謝症候群、特に糖尿病及び肥満の治療に極めて望ましい特性を個別に示してきた。グルカゴンアンタゴニスト活性は、グルカゴンアゴニスト作用の抑制が望ましいあらゆる状況に有用である。GLP-1 アゴニスト作用の存在は、更に、膵臓からのグルカゴンの内因性分泌を抑制する一方で、インスリン合成及び分泌を刺激する。2 つの薬理学的作用は、相乗様式で働いて代謝異常を正常化する。したがって、クラス 5 ペプチドを、高血糖症の治療又はグルカゴンの高血中レベル若しくは高血中グルコースレベルをもたらす他の代謝疾患の治療に使用することができる。一つの実施態様によると、本明細書に開示されているクラス 5 ペプチドのようなグルカゴンアンタゴニスト/GLP-1 アゴニストを使用して治療される患者は、家畜化された動物であり、別の実施態様では、治療される患者はヒトである。糖尿病患者におけるグルカゴン抑制の欠如が、部分的には糖原症の促進を介した食後高血糖に寄与することが研究によって示唆されている。経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）の際の血中グルコースの分析及びソマトスタチン誘導グルカゴン抑制の存在又は不在は、高グルカゴンレベルの被験者においてグルコースの有意な増加を示した。したがって、本明細書に記載されているグルカゴンアンタゴニスト/GLP-1 アゴニスト又はクラス 5 ペプチドは、高血糖症の治療に使用することができるし、インスリン依存性又はインスリン非依存性のいずれかの I 型真性糖尿病、II 型真性糖尿病又は妊娠糖尿病を含む多様な種類の糖尿病を治療すること及び腎障害、網膜症及び血管疾患を含む糖尿病の合併症を低減することに有用であることが予想される。

【0457】

そのような食欲を減退する又は体重の減少を促進する方法は、体重の低減、体重増加の防止又は薬剤誘導肥満を含む多様な原因の肥満の治療、並びに血管疾患（冠動脈疾患、発作、末梢血管疾患、虚血再灌流など）、高血圧、II 型糖尿病の発症、高脂血症及び筋骨格系疾患を含む肥満に関連する合併症の低減に有用であることが予想される。

【0458】

クラス 5 ペプチドを含む医薬組成物を、標準的な薬学的に許容される担体及び当業者に既知の投与経路を使用して、配合及び投与することができる。したがって、本開示は、本明細書に開示されている 1 つ以上のクラス 5 ペプチドを薬学的に許容される担体と組み合わせる含有医薬組成物も包含する。医薬組成物は、クラス 5 ペプチドを単独の薬学的に活性な成分として含むことができるし、クラス 5 ペプチドを 1 つ以上の追加的な活性剤と組み合わせることもできる。一つの実施態様によると、クラス 5 ペプチドと、インスリン又はインスリン類縁体とを含む組成物が提供される。あるいは、配列番号 1015 又は配列番号 1051 の配列を含み、配列番号 1015 又は配列番号 1051 のアミノ酸 24 に結合している配列番号 1021（GPS SGAPP S）又は配列番号 1050 のアミノ酸配列及び抗肥満ペプチドを更に含む、減量の誘導又は体重増加の防止をもたらすことがで

きる組成物を提供することができる。適切な抗肥満ペプチドには、米国特許第 5, 691, 309 号、同第 6, 436, 435 号又は米国特許出願第 2005/017664 3 号に開示されているものが含まれる。

【0459】

クラス 5 ペプチド構造

一つの実施態様によると、グルカゴンペプチドを含むクラス 5 ペプチドが提供され、このグルカゴンペプチドは、N 末端からの最初の 1～5 個のアミノ酸残基（例えば、最初のアミノ酸、最初の 2 個のアミノ酸、最初の 3 個のアミノ酸、最初の 4 個のアミノ酸、最初の 5 個のアミノ酸）の欠失と、例えば、水素結合、又は塩架橋の形成のようなイオン相互作用を介する、又は共有結合による、12 位と 16 位、16 位と 20 位、20 位と 24 位及び 24 位と 28 位（天然グルカゴンペプチド配列による）から選択されるアミノ酸対の側鎖の相互の結合による、化合物の C 末端部分（野生型グルカゴン、配列番号 1001 のアミノ酸番号付けにより 12～29 位のアミノ酸の付近）のアルファヘリックス構造の安定化とによって修飾される。あるいは、残基 12～19 付近のアルファヘリックス構造の安定化は、所望の活性を保持する位置での 1 個以上の α , α -二置換アミノ酸の導入によって達成される。幾つかの実施態様において、クラス 5 ペプチド又はその類縁体の 16、17、18、19、20、21、24 又は 29 位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）の 1、2、3、4 つ又はそれ以上の位置は、 α , α -二置換アミノ酸で置換されている。例えば、アミノイソ酪酸（AIB）によるクラス 5 ペプチド又はその類縁体の 16 位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）での置換は、塩架橋又はラクタムの不在下で安定化したアルファヘリックスをもたらす。幾つかの実施態様において、16、20、21 又は 24 位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）の 1、2、3 つ又はそれ以上の位置が AIB で置換されている。

【0460】

一つの実施態様によると、ペプチドが GLP-1 受容体において天然 GLP-1 により達成される最大アゴニスト作用の少なくとも 80% を示し、インビトロアッセイにおける cAMP 産生により測定して、グルカゴン受容体における最大グルカゴン誘導 cAMP 産生を少なくとも約 50% 低減するグルカゴンアンタゴニスト活性を示す、クラス 5 ペプチドが提供される。一つの実施態様において、クラス 5 ペプチドは、GLP-1 受容体における天然 GLP-1 の活性の少なくとも 90% を示し、グルカゴン受容体における最大グルカゴン誘導 cAMP 産生を少なくとも約 80% 低減するグルカゴンアンタゴニスト活性を示す。

【0461】

一つの実施態様によると、クラス 5 ペプチドは、配列番号 1002 のペプチド誘導体を含み、ここでグルカゴンペプチドは、1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、19、22 及び 24 位から選択される 1～3 つのアミノ酸位置で配列番号 1002 に対して更なるアミノ酸置換を含み、GLP-1 受容体における天然 GLP-1 の活性の少なくとも 90% を示し、グルカゴン受容体における最大グルカゴン誘導 cAMP 産生を少なくとも約 80% 低減するグルカゴンアンタゴニスト活性を示す。

【0462】

幾つかの実施態様において、クラス 5 ペプチドの C 末端部分（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによるアミノ酸 12～29 の付近）のアルファヘリックス構造は、例えば、共有若しくは非共有分子内架橋の形成により又はアルファヘリックス安定化アミノ酸（例えば、 α , α -二置換アミノ酸）での 12～29 位付近のアミノ酸の置換及び／若しくは挿入により安定化される。幾つかの実施態様において、クラス 5 ペプチド又はその類縁体の 16、17、18、19、20、21、24 又は 29 位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）の 1、2、3、4 つ又はそれ以上の位置は、 α , α -二置換アミノ酸、例えばアミノイソ酪酸（AIB）で置換されている。例えば、アミノイソ酪酸（AIB）によるクラス 5 ペプチド又はその類縁体の 16 位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号

付けによる)での置換は、塩架橋又はラクタムの不在下で安定化したアルファヘリックスをもたらす。

【0463】

一つの実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1015又は配列番号1051を含み、より詳細には、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007、配列番号1008、配列番号1009、配列番号1016、配列番号1017、配列番号1018、配列番号1019、配列番号1022、配列番号1023、配列番号1024及び配列番号1025からなる群より選択される配列を含む。更なる実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1015又は配列番号1051のペプチド誘導体を含み、ここでペプチドは、1、2、5、6、8、9、12、13及び14位から選択される1〜3つのアミノ酸位置で配列番号1015又は配列番号1051に対して更なるアミノ酸置換を含む。一つの実施態様において、1、2、5、6、8、9、12、13及び14位での置換は、保存的アミノ酸置換である。一つの実施態様において、配列番号1005又は配列番号1006の24位のトレオニンは、グリシンで置換されている。

10

【0464】

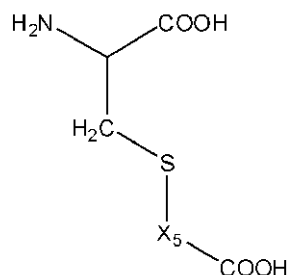
一つの実施態様によると、クラス5ペプチドは、ペプチドの更なる修飾を表し、ここでは、N末端欠失に加えて、天然グルカゴンペプチドの6位のフェニルアラニンが修飾されて、例えば、N末端アミノ基の代わりにヒドロキシル基を含む。更なる実施態様において、C末端アミノ酸の天然カルボン酸は、アミド又はエステルのような電荷中性基で置換されている。

20

【0465】

一つの実施態様によると、クラス5ペプチドが調製されるが、ここでは、天然グルカゴンの最初の3〜5個のアミノ酸を欠失し、天然グルカゴンペプチドに対して9位のアミノ酸を、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、β-ホモグルタミン酸、システインのスルホン酸又は下記構造：

【化51】



30

〔式中、 X_5 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_2 \sim C_4$ アルケニル若しくは $C_2 \sim C_4$ アルキニルである〕を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体からなる群より選択されるアミノ酸で置換し、グルカゴンのC末端部分(野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによるアミノ酸12〜29の付近)のアルファヘリックス構造を、例えば、ラクタム架橋を、天然グルカゴンペプチドに対して、アミノ酸12と16又はアミノ酸16と20の側鎖の間に形成することによって安定化する7原子結合架橋を形成する共有結合が可能なアミノ酸対形成の例は、本開示の全体をとおして詳述されている。一つの実施態様において、システインのスルホン酸誘導体は、システイン酸又はホモシステイン酸である。

40

【0466】

一つの実施態様において、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007又は配列番号1008からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むクラス5が提供され、ここで前記ペプチドは、配列番号1005のアミノ酸7及び11の側鎖の間、配列番号1006の11位と15位の間、配列番号1007の15位と19位の間、配列番号1008の19位と24位の間形成されるラクタム環を含み、前記配列は、それぞれ更に修飾されて、ペプチドに共有結合している親水性部分を含む。より詳細には、一つの実施態様において、ラクタムを有するクラス5ペプチドは、それぞれ、ポリエチレングリコール鎖

50

の共有結合により修飾されている。例えば、配列番号1005を含むクラス5ペプチドでは、ペプチドは、12、15、16、19及び24からなる群より選択される位置でペグ化されており、配列番号1006を含むクラス5ペプチドでは、ペプチドは、12、16、19及び24からなる群より選択される位置でペグ化されており、配列番号1007を含むクラス5ペプチドでは、ペプチドは、11、12、16及び24からなる群より選択される位置でペグ化されており、配列番号1008を含むクラス5ペプチドでは、ペプチドは、11、12、15及び16からなる群より選択される位置でペグ化されている。一つの実施態様によると、ペプチドが、配列番号1047又は配列番号1048の配列における12、16、19及び24からなる群より選択される位置でペグ化されている、配列番号1047又は配列番号1048を含むクラス5ペプチドが提供される。更なる実施態様において、配列番号1047又は配列番号1048のペプチドは、ペプチドのカルボキシ末端への配列番号1021の配列の付加により更に修飾される。

10

【0467】

特定の対応において更に上記に詳述されているように、クラス5ペプチドが提供されるが、ここでは、天然グルカゴンの最初の5個のアミノ酸を欠失し、N末端アミノ酸のアミノ基（フェニルアラニン）をヒドロキシル基で置換し（すなわち、最初のアミノ酸はフェニル乳酸である）、12位と16位、16位と20位、20位と24位及び24位と28位から選択される1つ以上のアミノ酸対の側鎖を互いに結合させて、それによりクラス5ペプチドのアルファヘリックスを安定化する。

20

【0468】

一つの実施態様において、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、トレオニン又はグリシンからなる群より選択されるアミノ酸による11位（天然グルカゴンのアミノ酸番号付けによる16位）のセリン残基の置換によって修飾されている、配列番号1002の配列を含むクラス5ペプチドが提供される。一つの実施態様によると、配列番号1002の11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なる群より選択されるアミノ酸で置換されており、一つの実施態様では、セリン残基はグルタミン酸で置換されている。一つの実施態様によると、クラス5ペプチドは、配列番号1038の配列を含む。

【0469】

一つの実施態様において、分子内架橋を2つのアミノ酸側鎖の間に形成して配列番号1002のペプチドのカルボキシ末端の三次元構造を安定化した、クラス5ペプチドが提供される。より詳細には、配列番号1002のアミノ酸対7と11、11と15、15と19又は19と23から選択される1つ以上のアミノ酸の側鎖を互いに結合して、C末端部分においてアルファヘリックスを安定化する。2つの側鎖は、水素結合、イオン相互作用（例えば、塩架橋の形成）又は共有結合を介して互いに結合することができる。一つの実施態様によると、リンカーの大きさは、7～9個の原子であり、一つの実施態様において、リンカーの大きさは、8個の原子である。一つの実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007及び配列番号1008からなる群より選択される。一つの実施態様において、クラス5ペプチドのC末端アミノ酸は、天然アミノ酸に存在するカルボン酸基を置換したアミド基を有する。

30

40

【0470】

一つの実施態様によると、類縁体が配列番号1009のアミノ酸配列を含むクラス5ペプチドが提供される。一つの実施態様において、配列番号1009のペプチドのカルボキシ末端の三次元構造は、ペプチドの側鎖の間の共有結合の形成により安定化される。一つの実施態様において、2つのアミノ酸側鎖が互いに結合してラクタム環を形成する。ラクタム環の大きさは、アミノ酸の側鎖の長さに応じて変わることができ、一つの実施態様において、ラクタムは、リシンアミノ酸の側鎖とグルタミン酸の側鎖に結合することによって形成される。一つの実施態様において、クラス5ペプチドのC末端アミノ酸は、天然アミノ酸に存在するカルボン酸基を置換したアミド基を有する。

【0471】

50

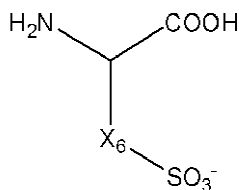
ラクタム環におけるアミド結合の順番を逆転することができる（例えば、ラクタム環を、L y s 1 2とG l u 1 6の側鎖、あるいはG l u 1 2とL y s 1 6の側鎖の間に形成することができる）。一つの実施態様によると、少なくとも1つのラクタム環が、配列番号1 0 0 9のアミノ酸対7と1 1、1 1と1 5、1 5と1 9及び1 9と2 3からなる群より選択されるアミノ酸対の側鎖の間に形成される、配列番号1 0 0 9のグルカゴン類縁体が提供される。一つの実施態様において、ペプチドが配列番号1 0 1 0の配列を含むクラス5ペプチドが提供され、前記配列は、配列番号1 0 1 0の7及び1 1位のアミノ酸の間又は1 1及び1 5位のアミノ酸の間又は1 5及び1 9位のアミノ酸の間に形成される分子内ラクタム架橋を更に含む。一つの実施態様において、ペプチドが配列番号1 0 1 1の配列を含むクラス5ペプチドが提供され、前記配列は、配列番号1 0 1 1の7及び1 1位のアミノ酸の間又は1 1及び1 5位のアミノ酸の間に形成される分子内ラクタム架橋を更に含む。一つの実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1 7の配列を含む。

10

【0 4 7 2】

配列番号1 0 0 5の誘導体を含む追加的なクラス5ペプチドが提供され、ここで配列番号1 0 0 5の1 0位（天然グルカゴンの1 5位）のアスパラギン酸は、一般構造：

【化 5 2】



20

〔式中、X₆は、C₁～C₃アルキル、C₂～C₃アルケン又はC₂～C₃アルキニルであり、一つの実施態様では、X₆はC₁～C₃アルキルであり、別の実施態様では、X₆はC₂アルキルである〕で示されるアミノ酸であるグルタミン酸で置換されている。一つの実施態様において、配列番号1 0 0 9の1 0位（天然グルカゴンの1 5位）が、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からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている、配列番号1 0 0 9のクラス5ペプチド誘導体が提供される。更なる実施態様において、配列番号1 0 0 9の1 0位は、システイン酸又はホモシステイン酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている。一つの実施態様において、配列番号1 0 0 6、配列番号1 0 0 7又は配列番号1 0 0 8の1 0位が、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からなる群より選択されるアミノ酸で置換されている、配列番号1 0 0 6、配列番号1 0 0 7又は配列番号1 0 0 8のクラス5ペプチド誘導体が提供される。一つの実施態様において、クラス5ペプチドのC末端アミノ酸は、天然アミノ酸に存在するカルボン酸基を置換したアミド基を有する。

30

【0 4 7 3】

一つの実施態様において、クラス5ペプチドのアミノ酸は少なくとも1つのシステイン残基で置換されており、ここでシステイン残基の側鎖は、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チオール反応性試薬により更に修飾される。これらのチオール反応性試薬は、カルボキシ、ケト、ヒドロキシ及び他のエーテル基、並びにポリエチレングリコール単位のような他の親水性部分を含有することができる。代替的な実施態様において、クラス5ペプチドのアミノ酸は、リシンで置換され、置換リシン残基の側鎖は、カルボン酸の活性エステル（スクシンイミド、無水物など）又はポリエチレングリコールのような親水性部分のアルデヒドのようなアミン反応性試薬を使用して更に修飾される。一つの実施態様によると、配列番号1 0 0 5のペプチドの7位に対応するリシン残基は、アルギニンで置換されており、単一のリシン置換が、配列番号1 0 0 5の1 2、1 5、1 6、1 9及び2 4位に対応する1個以上のアミノ酸に挿入されている。

40

【0 4 7 4】

別の実施態様において、本明細書に開示されているクラス5ペプチドの2 2位に対応す

50

るメチオニン残基をロイシン又はノルロイシンに変えて、ペプチドの酸化分解を防止する。

【0475】

更に、クラス5ペプチドは、幾つかの態様において、グルカゴン類縁体の機能にとって重要ではないことが知られている位置にもアミノ酸置換を包含する。一つの実施態様において、置換は、2、5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、19、22、23又は24からなる群より選択される1、2又は3つの位置での保存的アミノ酸置換である。一つの実施態様において、天然ペグルカゴンペプチドの16、17、20、21、24又は29位、とりわけ天然グルカゴンの21及び／又は24位に対応するアミノ酸はシステイン又はリシンで置換されており、ここでPEG鎖は、置換システイン又はリシン残基と共有結合している。

10

【0476】

一つの実施態様によると、ペプチドの11、12、15、16、19及び／又は24位に対応する位置での1つ以上の追加的なアミノ酸置換（例えばシステインによる置換を含む）により更に修飾されている、配列番号1009から構成される配列を含むクラス5ペプチドが提供され、ここでアミノ酸置換は、例えばPEGを含む親水性部分との架橋に適した側鎖を有するアミノ酸を含む。天然グルカゴンを、天然アミノ酸又は合成（非天然）アミノ酸で置換することができる。合成又は非天然アミノ酸とは、インビボで天然に生じないが、それでも、本明細書に記載されるペプチド構造に組み込むことができるアミノ酸を意味する。一つの実施態様において、ペプチドが配列番号1009を含み、ペプチドの16又は19位に結合しているポリエチレン鎖を更に含む、クラス5ペプチドが提供される。更なる実施態様において、グルカゴン類縁体のC末端は修飾されて、カルボン酸基がアミド基で置換されている。

20

【0477】

一つの実施態様によると、下記：

R_1 - Phe - Thr - Ser - Xaa - Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Xaa - Glu - Arg - Arg - Ala - Gln - Asp - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Xaa - Asn - Thr - R_2 (配列番号1039)、

R_1 - Phe - Thr - Ser - Xaa - Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - Glu - Arg - Arg - Ala - Gln - Xaa - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Xaa - Asn - Thr - R_2 (配列番号1013)、

30

R_1 - Phe - Thr - Ser - Xaa - Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - Glu - Arg - Arg - Ala - Gln - Asp - Phe - Val - Xaa - Trp - Leu - Xaa - Asn - Thr - R_2 (配列番号1014) 及び

R_1 - Phe - Thr - Ser - Xaa - Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - Glu - Arg - Arg - Ala - Gln - Xaa - Phe - Val - Xaa - Trp - Leu - Xaa - Asn - Thr - R_2 (配列番号1012)

からなる群より選択されるグルカゴン類縁体を含むクラス5ペプチドが提供され、

ここで、4位のXaaは、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸又はホモシステイン酸であり、10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であり、16位のXaaは、Asp、Cys、Orn、ホモシステイン又はアセチルフェニルアラニンであり、19位のXaaは、Gln、Cys、Orn、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニンであり、22位のXaaは、Met、Leu又はNleであり、 R_1 はOH又は NH_2 であり、そして R_2 は、Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser (配列番号1021)、Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa (配列番号1050；ここでXaaは、Cys、Orn、ホモシステイン又はアセチルフェニルアラニンである)、COOH又はCONH₂であり、ペプチドは、配列番号1013の16位、配列番号1014の19位及び配列番号12の16と19位で場合によりペグ化されている。一つの実施態様において、配列番号1012～1014及び

40

50

1039の24位のThrは、Glyで置換されている。一つの実施態様によると、ペプチドは、グルカゴンアンタゴニストは、配列番号1013又は配列番号1014の配列を含み、ここでR₁はOHである。一つの実施態様によると、ペプチドは、R₁がOHであり、R₂がCONH₂である、配列番号1013又は配列番号1014の配列を含む。一つの実施態様によると、ペプチドは、R₁がOHであり、R₂がCONH₂であり、24位のトレオニンがグリシンで置換されている、配列番号1013又は配列番号1014の配列を含む。

【0478】

一つの実施態様において、クラス5ペプチドは、対応するアミノ酸位置での天然グルカゴン残基の置換により更に修飾されて、天然GLP-1の1つ以上のアミノ酸を含む。例えば、クラス5ペプチドは、2、3、17、18、21、23及び24位（天然グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）のいずれかの位置に1つ以上のアミノ酸置換を含むことができる。特定の実施態様において、クラス5ペプチドは、以下のアミノ酸置換の1個以上により修飾される：Ser2のAlaでの置換、Gln3のGluでの置換、Arg17のGlnでの置換、18位のArgのAlaでの置換、21位のAspのGluでの置換、23位のValのIleでの置換、そして24位のGlnのAlaでの置換（アミノ酸の位置は、天然グルカゴン配列による）。特定の実施態様において、クラス5ペプチドは、Ser2のAlaでの置換及びGln3のGluでの置換（天然グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）により修飾される。別の実施態様において、クラス5ペプチドは、以下のアミノ酸置換の1つ以上により修飾される：Arg17のGlnでの置換、18位のArgのAlaでの置換、21位のAspのGluでの置換、23位のValのIleでの置換、そして24位のGlnのAlaでの置換（天然グルカゴンによるアミノ酸番号付け）。更に別の特定の実施態様において、クラス5ペプチドは修飾されて、21位（配列番号1001の番号付けによる）のGluのみを含む。したがって、クラス5ペプチドは、配列番号1060～1070、1073～1078、1080～1088、1090～1096、1103、1104、1106及び1114～1118のいずれかのアミノ酸配列を含むことができる。

【0479】

また、本明細書において提供されるクラス5ペプチド又その結合体は、（1）本明細書に記載された方法により（例えば、分子内架橋又は1個以上のアルファ、アルファ-二置換アミノ酸又若しくは16位（配列番号1001の番号付けによる）の酸性アミノ酸の組み込み又はそれらの組み合わせにより）安定化されたアルファヘリックス、（2）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、及び（3）一般構造A-B-C、を含み、

ここでAは、下記：

（i）フェニル乳酸（PLA）；

（ii）PLAのオキシ誘導体；及び

（iii）連続した2個のアミノ酸がエステル又はエーテル結合を介して結合しているアミノ酸2～6個のペプチドからなる群より選択され；

Bは、配列番号1001のアミノ酸p～26を表し（pは、3、4、5、6又は7である）、更に、例えばクラス5ペプチドについて記載された修飾のいずれかを含む、本明細書に記載されている1個以上のアミノ酸修飾を含んでもよい。例えば、前記1個以上の修飾は、下記：

（iv）Glu、Cysのスルホン酸誘導体、ホモグルタミン酸、β-ホモグルタミン酸又は下記構造：

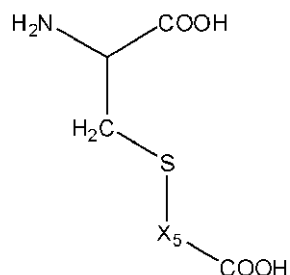
10

20

30

40

【化 5 3】



〔式中、 X_5 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_2 \sim C_4$ アルケニル若しくは $C_2 \sim C_4$ アルキニルである〕

を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体により 9 位（配列番号 1001 のアミノ酸番号付けによる）の Asp の置換；

（v）エステル、エーテル、チオエーテル、アミド又はアルキルアミン結合を介してアシル又はアルキル基に共有結合しているアミノ酸による 10、20 及び 24 位（配列番号 1001 のアミノ酸番号付けによる）の 1 又は 2 個のアミノ酸の置換；

（vi）Cys、Lys、オルチニン、ホモシステイン及びアセチルフェニルアラニン（Ac-Phe）からなる群より選択されるアミノ酸による 16、17、20、21 及び 24 位（配列番号 1001 のアミノ酸番号付けによる）の 1 又は 2 個のアミノ酸の置換（ここでアミノ酸の群は親水性部分に共有結合している）；

（vii）システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による 15 位（配列番号 1001 の番号付けによる）の Asp の置換；

（viii）システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による 16 位（配列番号 1001 の番号付けによる）の Ser の置換；

（ix）Gln による 17 位の Arg の交換、Ala による 18 位の Arg の交換、Glu による 21 位の Asp の交換、Ile による 23 位の Val の交換及び Ala による 24 位の Gln の交換（配列番号 1001 のアミノ酸番号付けによる）；

（x）Glu による 16 位の Ser の交換、Glu による 20 位の Gln の交換又は Glu による 24 位の Gln の交換（配列番号 1001 のアミノ酸番号付けによる）

からなる群より選択されることができ、

C（一般構造 A-B-C におけるもの）は、下記：

（vii）X；

（viii）X-Y；

（ix）X-Y-Z；

（x）X-Y-Z-R10

（ここで X は、Met、Leu 又は Nle であり；Y は、Asn 又は荷電アミノ酸であり；Z は、Thr、Gly、Cys、Lys、オルチニン（Orn）、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン（Ac-Phe）又は荷電アミノ酸であり、R10 は、配列番号 1021、1026、1027 及び 1050 からなる群より選択される）

からなる群より選択される。

【0480】

特定の態様において、ペプチドは、PLA のオキシ誘導体を含む。本明細書で使用されるとき、「PLA のオキシ誘導体」とは、ヒドロキシ基が $O-R_{11}$ （式中、 R_{11} は化学的部分である）で置換されている PLA の修飾構造を含む化合物を意味する。この点において、PLA のオキシ誘導体は、例えば PLA のエステル又は PLA のエーテルであることができる。

【0481】

PLA のオキシ誘導体を作製する方法は、当該技術において既知である。例えば、オキシ誘導体が PLA のエステルである場合、エステルを、PLA のヒドロキシルと、求核剤を有するカルボニルとの反応により形成することができる。求核剤は、アミン又はヒドロ

10

20

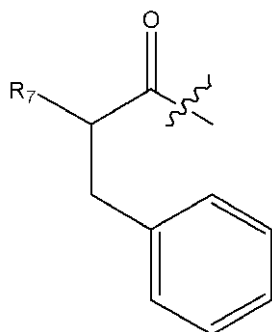
30

40

50

キシルが含まれるが、これらに限定されない任意の適切な求核剤であることができる。したがって、P L Aのエステルは、式X I：

【化54】



式X I

〔式中、R₇は、P L Aのヒドロキシルと、求核剤を有するカルボニルとの反応により形成されるエステルである〕

で示される構造を含む。

【0482】

求核剤（P L Aのヒドロキシルと反応してエステルを形成する）を有するカルボニルは、例えば、カルボン酸、カルボン酸誘導体又はカルボン酸の活性化エステルであることができる。カルボン酸誘導体は、塩化アシル、酸無水物、アミド、エステル又はニトリルでありうるが、これらに限定されない。カルボン酸の活性化エステルは、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、トシレート（Tos）、カルボジイミド又はヘキサフルオロホスフェートであることができる。幾つかの実施態様において、カルボジイミドは、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、1, 1'-カルボニルジイミダゾール（CDI）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（EDC）又は1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド（CI CD）である。幾つかの実施態様において、ヘキサフルオロホスフェートは、ヘキサフルオロホスフェートベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（BOP）、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノンホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU）及びo-ベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU）からなる群より選択される。

【0483】

ヒドロキシル基（例えば、P L Aのヒドロキシル）を用いる反応によりエーテルを作製する方法も当該技術において既知である。例えば、P L Aのヒドロキシル基を、ハロゲン化アルキル又はトシル化アルキルアルコールと反応させて、エーテル結合を形成することができる。

【0484】

特定の実施態様において、酸素含有結合を介して（例えば、エステル又はエーテル結合を介して）P L Aに結合している化学的部分は、ポリマー（例えば、ポリアルキレングリコール）、炭水化物、アミノ酸、ペプチド又は脂質、例えば脂肪酸又はステロイドである。

【0485】

特定の実施態様において、化学的部分はアミノ酸であり、場合により、式X Iがデプシペプチドであるようにペプチドの一部であってもよい。この点において、P L Aは、ペプチドがP L A残基の1個以上（例えば、1、2、3、4、5、6個又はそれ以上）のアミノ酸N末端を含むように、ペプチドのN末端アミノ酸残基以外の位置にあることができる。例えば、ペプチドは、ペプチドのn位にP L Aを含むことができ、ここでnは2、3、

10

20

30

40

50

4、5又は6である。

【0486】

P L A 残基のアミノ酸N末端は、合成されたものでもよいし天然のものでもよい。特定の実施態様において、N末端P L Aであるアミノ酸は、天然に生じるアミノ酸である。一つの実施態様において、P L AのN末端であるアミノ酸は、天然グルカゴンのN末端アミノ酸である。例えば、ペプチドは、N末端に、配列番号1052～1056のいずれかのアミノ酸配列を含むことができ、ここでP L Aは、エステル結合を介してトレオニンに結合している：

配列番号1052 H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P L A

配列番号1053 S e r - G l n - G l y - T h r - P L A

配列番号1054 G l n - G l y - T h r - P L A

配列番号1055 G l y - T h r - P L A

配列番号1056 T h r - P L A

【0487】

代替的な実施態様において、1個以上のN末端アミノ酸を天然グルカゴンのアミノ酸以外のアミノ酸で置換することができる。例えば、ペプチドが5又は6位のアミノ酸としてP L Aを含む場合、1位及び／又は2位のアミノ酸は、ジペプチジルペプチダーゼI Vによる切断に対して感受性を低減するアミノ酸であることができる。より詳細には、幾つかの実施態様において、ペプチドの1位は、D-ヒスチジン、アルファ、アルファージメチルイミダゾール酢酸（D M I A）、N-メチルヒスチジン、アルファ-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモ-ヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸である。より詳細には、幾つかの実施態様において、アンタゴニスト／アゴニストペプチドの2位は、D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン及びアミノイソ酪酸（A I B）からなる群より選択されるアミノ酸である。また、例えば、ペプチドが4、5又は6位のアミノ酸としてP L Aを含む場合、ペプチドの3位のアミノ酸は、天然グルカゴンの天然グルタミン残基とは対照的に、グルタミン酸であることができる。本発明の例示的な実施態様において、ペプチドは、N末端に、配列番号1057～1059のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【0488】

式X Iの化合物を含むペプチドに関して、ポリマーは、P L Aのヒドロキシル基と反応することができる限り、任意のポリマーであることができる。ポリマーは、当然のことながら又は通常は、求核剤を有するカルボニルを含むものであることができる。あるいは、ポリマーは、カルボニルを有するカルボニルを含むように誘導体化されているものであることができる。ポリマーは、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン及びポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレートを含むその誘導体、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）及びポリ（オクタデシルアクリレート）を含むアクリル酸エステル及びメタクリル酸エステルのポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハロゲン化物、ポリ（酢酸ビニル）及びポリビニルピロリドンを含むポリビニルポリマー、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン及びそのコポリマー、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース及びセルロース硫酸ナトリウム塩を含むセルロース、ポリプロピレン、ポリ（エチレ

10

20

30

40

50

ングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)及びポリ(エチレンテレフタレート)を含むポリエチレン、並びにポリスチレンのいずれかの誘導体化ポリマーであることができる。

【0489】

ポリマーは、合成の生分解性ポリマー(例えば、乳酸とグリコール酸ポリマー、ポリ無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)及びポリ(ラクチド- ϵ - κ -プロラクトン))及び天然の生分解性ポリマー(例えば、アルギン酸塩及びデキストランを含む他の多糖類、セルロース、コラーゲン、その化学誘導体(化学基、例えばアルキル、アルキレンの置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、及び当業者により日常的に行われる他の修飾)、アルブミン及び他の親水性タンパク質(例えば、ゼイン、他のプロタミン及び疎水性タンパク質))を含む生分解性ポリマー、並びにこれらの任意のコポリマー又は混合物であることができる。一般に、これらの物質は、インビボにおける酵素的加水分解又は水への暴露によって、表面又はバルク侵食により分解される。

【0490】

ポリマーは、H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587により記載される生体侵食性ヒドロゲル(この教示は本明細書に組み込まれる)、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸塩、キトサン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)及びポリ(オクタデシルアクリレート)のような生体付着性ポリマーであることができる。

【0491】

一つの実施態様において、ポリマーは水溶性ポリマーである。適切な水溶性ポリマーは、当該技術において既知であり、例えば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC; Klucel)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC; Methocel)、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシプロピルブチルセルロース、ヒドロキシプロピルペンチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース(Ethocel)、ヒドロキシエチルセルロース、多様なアルキルセルロース及びヒドロキシアルキルセルロース、多様なセルロースエーテル、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、酢酸ビニル/クロトン酸コポリマー、ポリ-ヒドロキシアルキルメタクリレート、ヒドロキシメチルメタクリレート、メタクリル酸コポリマー、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、無水マレイン酸/メチルビニルエーテルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム及びカルシウム、ポリアクリル酸、酸性カルボキシポリマー、カルボキシポリメチレン、カルボキシビニルポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポリメチルビニルエーテル- ϵ - κ -無水マレイン酸、カルボキシメチルアミド、カリウムメタクリレートジビニルベンゼンコポリマー、ポリオキシエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、並びにこれらの誘導体、塩及び組み合わせが含まれる。

【0492】

特定の実施態様において、ポリマーは、例えばポリエチレングリコール(PEG)を含む、ポリアルキレングリコールである。

【0493】

炭水化物は、アルファ離脱基を有するカルボニルを含むか、又は含むように作成される限り、任意の炭水化物であることができる。炭水化物は、例えば、アルファ離脱基を有するカルボニルを含むように誘導体化されているものであることができる。この点において、炭水化物を、単糖(例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース)、二糖(例えば、スクロース、ラクトース、マルトース)、オリゴ多糖(例えば、ラフィノース、スタキオース)、多糖(デンプン、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロ

10

20

30

40

50

ース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナン) から誘導体化することができる。

【0494】

脂質は、アルファ離脱基を有するカルボニルを含む任意の脂質であることができる。脂質は、例えば、カルボニルを含むように誘導体化されたものであることができる。この点において、脂質は、脂肪酸（例えば、C4～C30脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミン）、グリセロ脂質（例えば、一置換、二置換、三置換グリセロール）、グリセロリン脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン）、スフィンゴ脂質（例えば、スフィンゴシン、セラミド）、ステロール脂質（例えば、ステロイド、コレステロール）、プレノール脂質、サッカロ脂質又はポリケチド、油、ロウ、コレステロール、ステロール、脂溶性のビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質、の誘導体であることができる。

10

【0495】

一つの実施態様において、R7は、約100kDa以下、例えば90kDa以下、約80kDa以下、約70kDa以下、約60kDa以下、約50kDa以下、約40kDa以下の分子量を有する。したがって、R7は、約35kDa以下、30kDa以下、約25kDa以下、約20kDa以下、約15kDa以下、約10kDa以下、約5kDa以下又は1kDaの分子量を有することができる。

【0496】

代替的な実施態様において、一般構造A-B-Cを含むペプチドは、連続した2個のアミノ酸がエステル又はエーテル結合を介して結合しているアミノ酸2～6個のペプチドをAとして含む。エステル又はエーテル結合は、例えば、アミノ酸2と3、3と4、4と5又は5と6の間にあることができる。場合により、Aのペプチドを、ポリマー（例えば、親水性ポリマー）への結合を含む他の化学的部分への共有結合、アルキル化又はアシル化により更に修飾することができる。

20

【0497】

特定の実施態様において、PLAを含む上記に記載されたクラス5ペプチドは修飾されて、例えばPLAのエステル又はPLAのエーテルのようなPLAのオキシ誘導体を含む。例えば、クラス5ペプチドは、配列番号1002、1005～1020、1022～1025、1032～1036、1038、1039、1045、1046及び1051のいずれかのアミノ酸配列を含むことができ、PLAは、エステル又はエーテル結合を介して、アミノ酸、ペプチド、ポリマー、アシル基又はアルキル基に結合する。アミノ酸、ペプチド、ポリマー、アシル基又はアルキル基は、本明細書に記載されている任意のものであることができる。PLAがエステル結合を介してアミノ酸又はペプチドに結合している場合、クラス5ペプチドは、デブシペプチドと考慮することができる。

30

【0498】

また、別の特定の実施態様において、PLAを欠いている上記記載のクラス5ペプチドは修飾されて、7位（天然グルカゴンの番号付けによる）のアミノ酸へのN末端である連続した2個のアミノ酸の間に少なくとも1つのエステル結合又はエーテル結合を含む。特定の実施態様において、クラス5ペプチドは、連続した2個のアミノ酸の間に少なくとも1つのエステル又はエーテル結合を含む。さらに特定の実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1001のN末端の6個のアミノ酸を含み、N末端の6個のアミノ酸の連続した2個のアミノ酸は、エステル又はエーテル結合を介して結合している。

40

【0499】

Aのペプチドは、連続した少なくとも2個のアミノ酸がエステル又はエーテル結合を介して結合している限り、合成又は天然の任意のアミノ酸を含むことができる。特定の実施態様において、Aのペプチドは天然グルカゴンのアミノ酸を含む。1位及び／又は2位のアミノ酸は、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を低減させるアミノ酸であることができる。例えば、Aのペプチドは、D-ヒスチジン、アルファ、アルファージメチルイミダゾール酢酸(DMIA)、N-メチルヒスチジン、アルファ-メチル

50

ヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモヒスチジンからなる群より選択されるアミノ酸を1位に含むことができる。より詳細には、幾つかの実施態様において、Aのペプチドの2位は、D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン及びアミノイソ酪酸(AIB)からなる群より選択されるアミノ酸である。また、例えば、Aのペプチドの3位のアミノ酸は、天然グルカゴンの天然グルタミン残基とは対照的に、グルタミン酸であることができる。したがって、一般構造A-B-Cのペプチドは、下記

X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - T h r - G l y - P h e (配列番号1107) ;

X a a₂ - X a a₃ - T h r - G l y - P h e (配列番号1108) ; 又は

X a a₃ - T h r - G l y - P h e (配列番号1109)

10

のアミノ酸配列を含むことができ、

ここで、X a a₁は、H i s、D-ヒスチジン、アルファ、アルファージメチルイミダゾール酢酸(DMIA)、N-メチルヒスチジン、アルファ-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモヒスチジンからなる群より選択され；X a a₂は、S e r、D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン及びアミノイソ酪酸(AIB)からなる群より選択され；そしてX a a₃は、G l n又はG l uである。

【0500】

一つの実施態様において、Bは、3個までのアミノ酸修飾により修飾されている。例えば、配列番号1001の天然アミノ酸配列を表すBは、1個以上の保存的アミノ酸修飾で修飾されている。

20

【0501】

別の実施態様において、Bは、本明細書に記載された(i v) ~ (x)からなる群より選択される1個以上のアミノ酸修飾を含む。特定の実施態様において、Bは、アミノ酸修飾(v)及び(v i)のうちの一方又は両方を含む。更なる特定の実施態様において、Bは、(v)及び(v i)に加えて、(i v)、(v i i)、(v i i i)、(i x)及び(x)からなる群より選択されるアミノ酸修飾の1個又は組み合わせを含む。

【0502】

本明細書に記載されているように、一般構造A-B-Cを含むペプチドは、C末端に1個以上の荷電アミノ酸、例えば本明細書に記載されているY及び／又はZを含むことができる。代替的に又は追加的に、一般構造A-B-Cを含むペプチドは、CがX-Y-Zを含む場合、Zへの1~2個の荷電アミノ酸C末端を更に含むこともできる。荷電アミノ酸は、例えば、L y s、A r g、H i s、A s p及びG l uのうちの1つであることができる。特定の実施態様において、YはA s pである。

30

【0503】

一つの実施態様において、一般構造A-B-Cを含むペプチドは、1、16、20、21若しくは24位(配列番号1001のアミノ酸番号付けによる)のアミノ酸残基又は一般構造A-B-Cを含むペプチドのN若しくはC末端残基に共有結合している親水性部分を含む。特定の実施態様において、親水性部分は、一般構造A-B-Cを含むペプチドのC y s残基に結合している。この点において、天然グルカゴン(配列番号1001)の16、21、24又は29位のアミノ酸はC y s残基で置換されていることができる。あるいは、親水性部分を含むC y s残基を、例えば、一般構造A-B-Cを含むペプチドがC末端延長を含む場合、一般構造A-B-Cを含むペプチドのC末端に30又は40位として付加することができる(位置は配列番号1001のアミノ酸番号付けによる)。あるいは、親水性部分は、一般構造A-B-Cを含むペプチドのP L Aに、P L Aのヒドロキシル部分を介して結合することができる。親水性部分は、例えばポリエチレングリコールを含む、本明細書に記載されている任意のものでありうる。

40

【0504】

特定の態様において、一般構造A-B-Cを含むペプチドは、分子内架橋が組み込まれ

50

たために安定化したアルファヘリックスを含む。一つの実施態様において、分子内架橋はラクタム架橋である。ラクタム架橋は、9位と12位のアミノ酸、12位と16位のアミノ酸、16位と20位のアミノ酸、20位と24位のアミノ酸又は24位と28位のアミノ酸（配列番号1001のアミノ酸番号付けによる）の間にあることができる。特定の実施態様において、12位と16位のアミノ酸又は16位と20位のアミノ酸（配列番号1001のアミノ酸番号付けによる）は、ラクタム架橋を介して結合している。ラクタム架橋の他の位置も考慮される。

【0505】

追加的に又は代替的に、一般構造A-B-Cを含むペプチドは、例えば16、20、21又は24（配列番号1001のアミノ酸番号付けによる）の任意の位置にアルファ、アルファ二置換アミノ酸を含むこともできる。一つの実施態様において、アルファ、アルファ二置換アミノ酸はAIBである。特定の実施態様において、AIBは、16位（配列番号1001の番号付けによる）に配置されている。

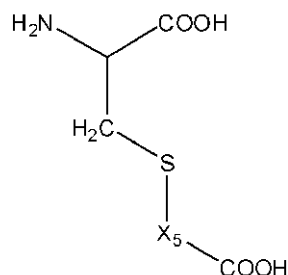
10

【0506】

代替的に又は追加的に、一般構造A-B-Cを含むペプチドは修飾されて、16位（配列番号1001の番号付けによる）に酸性アミノ酸を含むこともでき、この修飾はアルファヘリックスの安定性を増強する。一つの実施態様において、酸性アミノ酸は、側鎖スルホン酸又は側鎖カルボン酸を含むアミノ酸である。より特定の実施態様において、酸性アミノ酸は、Glu、Asp、ホモグルタミン酸、Cysのスルホン酸誘導体、システイン酸、ホモシステイン酸、Asp、及び下記構造：

20

【化55】



〔ここで、X₅は、C₁～C₄アルキル、C₂～C₄アルケニル又はC₂～C₄アルキニルである〕

30

を有するCysのアルキル化誘導体からなる群より選択される。

【0507】

特定の実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1060～1070、1073～1078、1080～1088、1090～1096、1103、1104、1106及び1114～1118のいずれかのアミノ酸配列を含むか、又は表9のペプチド2～6、表10のペプチド1～8及び表11のペプチド2～6、8及び9のいずれかのアミノ酸配列を含むことができる。

【0508】

【表 9】

表9

			GLP-1 EC ₅₀ (nM)	Glu IC ₅₀ (nM)	10
1	E9, K12,E16	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	1451	762	
2	E9, K12E16(ラクタム)	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	63	2008	
3	E9, E16K20(ラクタム)	FTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	36	42	
4	D9, K12E16(ラクタム)	FTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	118.7	828	
5	[PLA6, E9, K12E16(ラクタム)]	PLA-TSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	6	72	
6	[PLA6, E9, E16K20(ラクタム)]	PLA-TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	20	20	

【 0 5 0 9 】

【表 10】

表10

		GLP-1 EC50 (nM)	グルカゴン IC50 (nM)
	グルカゴン HSQGTFTSDYSKYIDSRRAQDFVQWLMNT		0.2~1.0*
	GLP-1 (aa 1-30) HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWIVKGR	0.02~0.1	
1	[PLA6, D9, E16K20(ラクタム), D28]G(6-29) PLA TSDYSKYIDERRAKDFVQWLMDT	5~25	10~30
2	[PLA6, D9, K12E16(ラクタム), D28]G(6-29) PLA TSDYSKYIDERRAQDFVQWLMDT	177	63
3	[PLA6, D9, E16, K20E24(ラクタム), D28]G(6-29) PLA TSDYSKYLDERRAEDFVKWLMDT	239	74
4	[PLA6, D9, E16, E24K28(ラクタム), D28]G(6~29) PLA TSDYSKYLDERRAQDFVEWIMKT	289	22
5	[E9, E16K20(ラクタム), D28]G(4~29) GTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	151	10~30
6	[E9, E16K20(ラクタム), D28]G(2~29) SQGTFTSEYSKYIDERRAKDFVQWLMDT	203	49 (PA)
7	[A2E3, E16K20(ラクタム), D28]G(2~29) AEGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	175	63
8	[A2E3, E16K20(ラクタム), D28]G(1~29) HAEGTFTSEYSKYIDERRAKDFVQWLMDT	0.2	130 (PA)
9	ANK2 (Bayer のペプチド) HSQGTFTSDY ARYLDARRAREFIKWL VRGRG	0.28	アゴニスト

【 0 5 1 0 】

10

20

30

【表 1 1】

表 11				
グルカゴン (6-CEX) 類縁体				
			GLP-1 EC ₅₀ (nM)	グルカゴン IC ₅₀
1	E9, K12,E16	FTSEYSKYIDERRAQDFVQWIMNTGPSSGAPPPS	1451	762
2	E9, K12E16(ラクタム)	FTSEYSKYIDERRAQDFVQWIMNTGPSSGAPPPS	63	2008
3	E9, E16K20(ラクタム)	FTSEYSKYIDERRAKDFVQWIMNTGPSSGAPPPS	36	42
4	D9, K12E20(ラクタム)	FTSDYSKYIDERRAQDFVQWIMNTGPSSGAPPPS	18	828
5	[PLA6, E9, K12E20(ラクタム)]	PLA-TSEYSKYIDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	6	72
6	[PLA6, E9, E16K20(ラクタム)]	PLA-TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	20	20
7	PLA 6, D9, D28	PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	~700	tbd
8	PLA6, D9, K12E20(ラクタム)	PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	21	13
9	PLA6, D9, E16K20(ラクタム)	PLA-TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	4	6

【 0 5 1 1】

一つの実施態様において、一般構造 A-B-C を含むペプチドは、クラス 5 ペプチドである。特定の実施態様において、ペプチドは、GLP-1 受容体において天然 GLP-1 により達成される最大アゴニスト作用の少なくとも約 50 % を示し、グルカゴン受容体において天然グルカゴンにより達成される最大反応の少なくとも約 50 % の阻害を示す。別の特の実施態様において、ペプチドは、GLP-1 受容体において天然 GLP-1 により達成される最大アゴニスト作用の少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 % 又は少なくとも約 100 % を示す。代替的に又は追加的に、ペプチドは、グルカゴン受容体において天然グルカゴンにより達成される最大反応の少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 % 又は少なくとも約 100 % の阻害を示す。

【 0 5 1 2】

幾つかの実施態様において、下記 (1) ~ (3) を含み、更に (4), (5) も含んでもよい、クラス 5 ペプチド又はその結合体が提供される：

(1) 以下のものが含まれるが、これらに限定されない、グルカゴンアンタゴニスト活性を付与する修飾：

(a) 場合により野生型グルカゴンの N 末端から 1 ~ 5 個のアミノ酸の欠失を伴ってもよい、PLA による 6 位 (野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる) の Phe の置換、又は

(b) 場合により、グルタミン酸、ホモグルタミン酸若しくはシステインのスルホン酸誘導体による野生型グルカゴンの 9 位 (野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる) の Asp の置換を伴ってもよい、野生型グルカゴンの N 末端からの 2 ~ 5 個のアミノ酸の欠失；

(2) 以下のものが含まれるが、これらに限定されない、GLP-1 アゴニスト活性を付与する修飾：

(a) 野生型グルカゴンのアミノ酸 12 ~ 29 の範囲内、例えば 16、17、18、19、20、21、24 若しくは 29 位 (野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる) の 1、2、3、4 つ若しくはそれ以上の位置での α , α -二置換アミノ酸の挿入若しくは

置換；又は

(b) 野生型グルカゴンのアミノ酸 12～29 の範囲内の分子内架橋、例えば、塩架橋若しくはラクタム架橋若しくは別の種類の共有結合の導入；又は

(c) GLP-1 の対応するアミノ酸による 2、3、17、18、21、23 若しくは 24 位（野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる）の 1 つ以上の位置でのアミノ酸の置換、例えば、Ser 2 の Ala での置換、Gln 3 の Glu での置換、Arg 17 の Gln での置換、18 位の Arg の Ala での置換、21 位の Asp の Glu での置換、23 位の Val の Ile での置換、及び／若しくは、24 位の Gln の Ala での置換；又は

(d) 野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによるアミノ酸 12～29 位の付近のアルファーヘリックス構造を安定化する他の修飾；そして；

(3) GLP-1 アゴニスト活性を強化する他の修飾、例えば、

(a) 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；

並びに、(4) 以下の修飾のうちの 1 つ以上；

(a) 例えば N 末端、若しくは 6、16、17、20、21、24、29、40 位、若しくは C 末端アミノ酸への、ポリエチレングリコールのような親水性部分の共有結合、及び／又は

(b) アシル化若しくはアルキル化；並びに／或いは

(5) 以下の追加的な修飾のうちの 1 つ以上；

(a) 場合により、本明細書に記載されているように、DPP-IV 切断への耐性を改善する 1 又は 2 位での修飾を伴ってもよく、場合により、6 位（野生型グルカゴンの番号付けによる）の PLA へのエステル結合を介してでもよい、N 末端へのアミノ酸の共有結合、例えば N 末端への 1～5 個のアミノ酸の共有結合；

(b) 29 位及び／又は 28 位（野生型グルカゴンの番号付けによる）における、及び場合により 27 位における、アミノ酸の欠失；

(c) C 末端へのアミノ酸の共有結合；

(d) 所望の活性を保持しながらの非保存的置換、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 つ以上の位置での保存的置換、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、Ala によるこれらの位置の 1 つ以上での置換；

(e) 分解を低減しうる、例えばグルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸若しくはホモシステイン酸での置換による 15 位のアスパラギン酸の修飾；又は Asp 15-Ser 16 結合の切断による分解を同様に低減しうる、例えばトレオニン、AIB、グルタミン酸での置換、若しくは 4 原子の長さの側鎖を有する別の負荷電アミノ酸での置換、代替的にはグルタミン、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での置換による 16 位のセリンの修飾；

(f) 酸化分解を低減するための、例えばロイシン又はノルロイシンでの置換による 27 位のメチオニンの修飾；

(g) Gln の脱アミド化を介して生じる分解を低減するための、例えば Ala 又は AIB での置換による 20 又は 24 位の Gln の修飾；

(h) Asp の脱水により環状スクシンイミド中間体を形成し、続いて異性化によりイソアスパラギン酸塩を形成することにより生じる分解を低減するための、Glu での置換による 21 位の Asp の修飾；

(j) 本明細書に記載されているホモ二量体化又はヘテロ二量体化；及び

(k) 上記の組み合わせ。

【0513】

同じ部類内の修飾のいずれかを一緒に組み合わせてもよいこと及び／又は異なる部類の修飾が組み合わせられることが理解される。例えば、前記修飾の (1) (a) を (2) (a) 及び (3) と組み合わせることができ；(1) (a) を、(2) (b) (例えば、ラク

10

20

30

40

50

タム架橋又は塩架橋)及び(3)と組み合わせることができ;(1)(a)を(2)(c)及び(3)と組み合わせることができ;(1)(b)を(2)(a)及び(3)と組み合わせることができ;(1)(b)を(2)(b)(例えば、ラクタム架橋又は塩架橋)及び(3)と組み合わせることができ;(1)(b)を(2)(c)及び(3)と組み合わせることができ;前述のいずれかを(4)(a)及び/又は(4)(b)と組み合わせることができ;そして前述のいずれかを(5)(a)~(5)(k)のいずれかと組み合わせることができる。

【0514】

例示的な実施態様において、 α 、 α -二置換アミノ酸AIBは、16、20、21又は24位(野生型グルカゴンのアミノ酸番号付けによる)の1、2、3つ又は全ての位置で置換される。

10

【0515】

例示的な実施態様において、分子内架橋は塩架橋である。

【0516】

別の例示的な実施態様において、分子内架橋は、共有結合、例えばラクタム架橋である。幾つかの実施態様において、ラクタム架橋は、9位と12位のアミノ酸、12位と16位のアミノ酸、16位と20位のアミノ酸、20位と24位のアミノ酸又は24位と28位のアミノ酸(配列番号1001のアミノ酸番号付けによる)の間にある。例示的な実施態様において、6、10、20又は24位、N末端、又はC末端(野生型グルカゴン(配列番号1001)のアミノ酸番号付けによる)にアシル化又はアルキル化が存在する。

20

【0517】

例示的な実施態様において、修飾には下記が含まれる:

(i) システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による15位(配列番号1001の番号付けによる)のAspの置換;

(ii) システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸による16位(配列番号1001の番号付けによる)のSerの置換;

(iii) 荷電アミノ酸による28位のAsnの置換;

(iv) Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択される荷電アミノ酸による28位のAsnの置換;

(v) Asn、Asp又はGluによる28位での置換;

30

(vi) Aspによる28位での置換;

(vii) Gluによる28位での置換;

(viii) 荷電アミノ酸による29位のThrの置換;

(ix) Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択される荷電アミノ酸による29位のThrの置換;

(x) Asn、Glu又はLysによる29位での置換;

(xi) Gluによる29位での置換;

(xii) 29位の後への1~3個の荷電アミノ酸の挿入;

(xiii) 29位の後へのGlu又はLysの挿入;

(xiv) 29位の後へのGlu-Lys又はLys-Lysの挿入;或いはこれらの組み合わせ。

40

【0518】

GLP-1受容体アゴニスト活性、グルカゴン受容体アンタゴニスト活性、ペプチド溶解性及び/又はペプチド安定性を増加するような、上記に記載された修飾のいずれかを、個別に又は組み合わせて適用することができる。

【0519】

安定性を増強する修飾

一つの実施態様によると、本明細書に開示されているクラス5ペプチドを更に修飾して、クラス5ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸(24位)に結合している配列番号1021(GPSSGAPPPS)又は配列番号1050のアミノ酸配列を含めることができ、こ

50

れを個体に投与して、減量を誘導するか又は体重維持を支援することができる。より詳細には、クラス5ペプチドは、配列番号1005、配列番号1006、配列番号7、配列番号1007、配列番号1008、配列番号1009、配列番号1012、配列番号1013、配列番号1014、配列番号1016、配列番号1017、配列番号1018、配列番号1019、配列番号1022、配列番号1023、配列番号1024及び配列番号1025からなる群より選択される配列を含み、ペプチド又はクラス5ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸（24位）に結合している配列番号1025（GPS SGAPP S）又は配列番号1050のアミノ酸配列を更に含み、食欲の抑制及び減量／体重維持の誘導に使用される。一つの実施態様において、投与されるペプチド又はクラス5ペプチドは、カルボキシ末端アミノ酸（24位）に結合している配列番号1021（GPS SGAPP S）のアミノ酸配列を更に含むクラス5ペプチドであって、配列番号1016、配列番号1017、配列番号1018及び配列番号1019からなる群より選択される配列を含む。一つの実施態様において、本方法は、配列番号1045又は配列番号1046の配列を含むクラス5ペプチドを投与することを含む。

【0520】

したがって、本明細書に開示されているクラス5ペプチドを同様に修飾して、水性緩衝剤における早期化学切断に対する感受性を減少できることが予想される。一つの実施態様によると、本明細書に記載されているクラス5ペプチドは、水溶液中の安定性を増強するために、天然グルカゴンの対応する15位に配置されている天然アスパラギン酸アミノ酸を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換することによって、更に修飾することができる。一つの実施態様によると、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007又は配列番号1008のクラス5ペプチドの10位のアスパラギン酸残基を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸及びホモシステイン酸からなる群より選択されるアミノ酸で置換することができる。一つの実施態様において、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007又は配列番号1008の10位の天然アスパラギン酸はグルタミン酸で置換される。一つの実施態様において、アンタゴニストが配列番号1009の修飾配列を含み、修飾がGluによる配列番号1009の10位のAspの置換を含む、水溶液において改善された安定性を有するクラス5ペプチドが提供される。一つの実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1022、配列番号1023、配列番号1024及び配列番号1025からなる群より選択される配列を含む。一つの実施態様において、クラス5ペプチドはアミド化されている。

【0521】

天然グルカゴンの15～16位のAsp-Ser配列は、水性緩衝剤において天然ホルモンの早過ぎる化学切断をもたらす特有の不安定ジペプチドとして同定されている。例えば、0.01NのHClに37℃で2週間維持されたとき、50%を超える天然グルカゴンがフラグメントに切断されうる。2つの遊離切断ペプチド1-15及び16-29は、グルカゴン様生物学的活性を欠いており、したがって、グルカゴン及び関連する類縁体の水性予備処方に対する制約となる。Gluによる天然グルカゴンの15位のAspの選択的化学置換は、15-16ペプチド結合の化学切断を実質的に排除することが観察されている。

【0522】

更なる例示的な実施態様において、前述の任意の化合物を、安定性を改善するために、天然グルカゴンの15又は16位に対応するアミノ酸を修飾して特に酸性又はアルカリ性の緩衝剤におけるペプチドの経時的な分解を低減することによって、更に修飾することができる。

【0523】

溶解性を増強する修飾

クラス5ペプチドを更に修飾して、生理学的pHの水溶液におけるペプチドの溶解性を改善しながら、特定の態様において、同時に、グルカゴンアンタゴニスト及びGLP-1

10

20

30

40

50

アゴニスト活性を保持することができる。配列番号1005のペプチドの12、15、16、19及び24位又は配列番号1006のペプチドの12、16、19若しくは24位に対応する位置への親水性基の導入は、生理学的pHを有する溶液における得られたペプチドの溶解性を改善しながら、同時に母体化合物のグルカゴンアンタゴニスト及びGLPアゴニスト活性を保持することができる。したがって、一つの実施態様において、本開示のクラス5ペプチドは更に修飾されて、配列番号1005又は配列番号1006のペプチドの12、15、16、19及び24位のアミノ酸に対応するアミノ酸の側鎖に共有結合している1つ以上の親水性基を含む。更なる実施態様において、配列番号1005又は配列番号1006の16及び19位のアミノ酸に対応するアミノ酸の側鎖は、親水性基に共有結合しており、一つの実施態様において、親水性基はポリエチレングリコール(PEG)である。

10

【0524】

クラス5グルカゴン関連類縁体ペプチドは、電荷をカルボキシ末端に導入してペプチドの溶解性を増強しながら、同時にペプチドのアゴニスト特性を保持するように修飾することができる。増強された溶解性は、ほぼ中性のpHでのグルカゴン溶液の調製及び保存を可能にする。比較的中性のpH(例えば、約6.0~約8.0のpH)でのグルカゴン溶液の配合は、クラス5ペプチドの長期安定性を改善する。

【0525】

出願人たちは、本明細書に開示されているクラス5ペプチドを同様に修飾して、比較的中性のpH(例えば、約6.0~約8.0のpH)の水溶液における溶解性を増強しながら、幾つかの態様において、同時にグルカゴンアンタゴニスト及びGLP-1活性を保持できることを予測する。したがって、一つの実施態様は、野生型グルカゴン(配列番号1001)の6~29位に存在する天然アミノ酸に対して、荷電アミノ酸による天然非荷電アミノ酸の置換により又はカルボキシ末端への荷電アミノ酸の付加により、ペプチドに電荷を付加するように更に修飾されている、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007又は配列番号1008のグルカゴンアンタゴニスト/GLP-1を対象とする。一つの実施態様によると、本明細書に開示されているクラス5ペプチドの1~3個の非荷電天然アミノ酸は、荷電アミノ酸で置換されている。一つの実施態様において、荷電アミノ酸は、リシン、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なる群より選択される。より詳細には、出願人たちは、荷電アミノ酸による(天然グルカゴンの)28及び/若しくは29位に対応する位置で通常生じるアミノ酸の置換、並びに/又はペプチドのカルボキシ末端への1~2個の荷電アミノ酸の付加が、な生理学的なpH(すなわち、約6.5~約7.5のpH)の水溶液におけるクラス5ペプチドの溶解性及び安定性を増強することを発見した。したがって、クラス5ペプチドのそのような修飾は、特に約5.5~約8.0の範囲のpHの水溶液における溶解性に同様の効果を有すると同時に、母体ペプチドの生物学的活性を保持することが予測される。

20

30

【0526】

一つの実施態様によると、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007又は配列番号1008のクラス5ペプチドは、負荷電アミノ酸(例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸)によるこれらの配列の23位及び/又は24位の天然アミノ酸の置換、並びに場合によりペプチドのカルボキシ末端への負荷電アミノ酸(例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸)の付加によって修飾される。代替的な実施態様において、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007又は配列番号1008のクラス5ペプチドは、正荷電アミノ酸(例えば、リシン、アルギニン又はヒスチジン)による配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007又は配列番号1008の24位の天然アミノ酸の置換、及び場合によりペプチドのカルボキシ末端への1又は2つの正荷電アミノ酸(例えば、リシン、アルギニン又はヒスチジン)の付加によって修飾される。一つの実施態様によると、配列番号1015又は配列番号1051のアミノ酸配列を含む類縁体であって、配列番号1015又は配列番号1051の23又は24位の少なくとも1個のアミノ酸が、酸性アミノ酸及び/又は配列番号1015若しくは配列番号1051のカルボキ

40

50

シ末端に付加されている追加の酸性アミノ酸で置換されている、改善された溶解性及び安定性を有するクラス5ペプチドが提供される。一つの実施態様において、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なる群より独立して選択される。

【0527】

一つの実施態様によると、配列番号1016、配列番号1017、配列番号1018又は配列番号1019のアミノ酸配列を含むアンタゴニストであって、改善された溶解性及び安定性を有するクラス5ペプチドが提供される。一つの実施態様によると、配列番号1016又は配列番号1017の配列を含むグルカゴンアゴニストが提供される。一つの実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1020の配列を含む。

10

【0528】

一つの実施態様において、配列番号1015又は配列番号1051の配列を含むクラス5ペプチドが提供される。一つの実施態様において、配列番号1015又は配列番号1051の4位は、アスパラギン酸、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であり、一つの実施態様において、4位は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸又はホモシステイン酸であり、更なる実施態様において、配列番号1015又は配列番号1051の4位は、アスパラギン酸又はグルタミン酸であり、一つの実施態様において、配列番号1015又は配列番号1051の4位は、アスパラギン酸である。一つの実施態様において、配列番号1015の4位がアスパラギン酸であり、配列番号1015の10位がグルタミン酸である、配列番号1015又は配列番号1051の配列を含むクラス5ペプチドが提供される。更なる実施態様において、配列番号1015又は配列番号1051のC末端アミノ酸は、天然カルボン酸基を、アミド又はエステルのような電荷中性基で置換するように修飾されている。

20

【0529】

クラス5ペプチド融合体

一つの実施態様において、本明細書に記載されているクラス5ペプチドのカルボキシ末端アミノ酸は、配列番号1021、1026、1027及び1050からなる群より選択される配列を含む第2ペプチドに共有結合している。例えば、一つの実施態様において、配列番号1015、配列番号1051、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007、配列番号1008、配列番号1012、配列番号1013、配列番号1014、配列番号1016、配列番号1017、配列番号1018、配列番号1019、配列番号1022、配列番号1023、配列番号1024及び配列番号1025のそれぞれのクラス5ペプチドは、配列番号1021 (GPS SGAPPS)、配列番号1026 (KRNRNNIA)、配列番号1027 (KRNR) 及び配列番号1050 (GPS SGAPPSX) からなる群より選択される配列を含む第2ペプチドに共有結合している。

30

【0530】

一つの実施態様において、カルボキシ末端アミノ酸に結合している配列番号1021 (GPS SGAPPS) のアミノ酸配列を更に含む、配列番号1005、配列番号1006、配列番号1007、配列番号1008、配列番号1009、配列番号1022、配列番号1023、配列番号1024及び配列番号1025からなる群より独立して選択される2つの配列を含むクラス5ペプチド二量体が提供される。

40

【0531】

幾つかの態様において、クラス5ペプチドは、C末端の1又は2個のアミノ酸の切断又は欠失（すなわち、天然グルカゴンの29位又は28及び29位のアミノ酸の切断）により更に修飾される。好ましくは、切断は、クラス5ペプチドの活性（例えば、グルカゴンアンタゴニスト作用／GLP-1アゴニスト作用）に影響を与えない。

【0532】

クラス5ペプチド結合体

グルカゴンペプチドが結合体部分に結合している、クラス5ペプチドの結合体も提供され、この結合は共有結合を介してでもよいし、リンカーを介してでもよい。

50

【0533】

クラス5ペプチドがポリエチレングリコール鎖を含むこれらの実施態様において、ポリエチレン鎖は、直鎖の形態であってもよいし、分岐鎖であってもよい。一つの実施態様によると、ポリエチレングリコール鎖は、約500～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。一つの実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約1,000～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。一つの実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約1,000～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。一つの実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約1,000～約2,000ダルトンから選択される平均分子量を有する。一つの実施態様において、ポリエチレングリコール鎖は、約1,000ダルトンの平均分子量を有する。

10

【0534】

一つの実施態様において、ペグ化クラス5ペプチドは、配列番号1015又は配列番号1051の配列から構成されるペプチドを含み、ここでポリエチレングリコール鎖は、配列番号1015又は配列番号1051の11、12、15、16、19及び24位からなる群より選択されるアミノ酸に結合しており、PEG鎖の分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。一つの実施態様において、ペグ化クラス5ペプチドは、配列番号1015又は配列番号1051の配列から構成されるペプチドを含み、ここでポリエチレングリコール鎖は、配列番号1015又は配列番号1051の16又は19位のアミノ酸に結合しており、PEG鎖の分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。更なる実施態様において、修飾クラス5ペプチドは、ペプチドに共有結合している2つ以上のポリエチレン鎖を含み、ここでグルカゴン鎖の総分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。一つの実施態様において、クラス5ペプチドは、配列番号1015又は配列番号1051の配列を含み、ここでポリエチレングリコール鎖は、配列番号1015又は配列番号1051の16及び19位のアミノ酸に結合しており、2つのPEG鎖の合計した分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。

20

【0535】

クラス5グルカゴン関連類縁体ペプチドは、配列番号1001～1118のアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含むことができ、更に、グルカゴンアンタゴニスト及びGLP-1アゴニスト活性を保持するような、1、2、3、4又は5個までの更なる修飾を有してもよい。

30

【0536】

生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に対するジペプチドの位置

プロドラッグジペプチドは、エステル結合を介して、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の任意のアミノ酸に共有結合している。幾つかの実施態様において、ジペプチドは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の活性部位の一部であるアミノ酸又はヒドロキシル酸に結合している。

【0537】

幾つかの実施態様において、ジペプチドは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の第1アミノ酸との間のエステル結合を介して、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に結合している。幾つかの態様において、ジペプチドは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の第1アミノ酸の側鎖に結合している一方、他の態様では、ジペプチドは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の第1アミノ酸のアルファ炭素にエステル結合を介して結合している。後者の場合において、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の第1アミノ酸は、HO-アミノ酸である。より特定の態様において、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の第1アミノ酸は、HO-His、HO-Tyr、HO-Phe又はHO-Pheの誘導体である。

40

【0538】

他の実施態様において、ジペプチドは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の最終アミノ酸との間のエステル結合を介して、生体活性ペプチド、ポリペプチド又は

50

タンパク質に結合している。幾つかの態様において、ジペプチドは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の最終アミノ酸の側鎖に結合している一方、他の態様では、ジペプチドは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の最終アミノ酸のアルファ炭素にエステル結合を介して結合している。後者の場合において、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の最終アミノ酸は、天然のアルファカルボキシレート基がアルコール基で置換されているアミノアルコールである。

【0539】

代替的な実施態様において、ジペプチドは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の内部アミノ酸残基に結合している。幾つかの実施態様において、内部アミノ酸は、側鎖ヒドロキシル基を含むアミノ酸、例えば S e r、T h r である。

10

【0540】

幾つかの実施態様において、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質がグルカゴンである場合、ジペプチドは、グルカゴン（配列番号 6 1 2）の 2、5、7、8 又は 1 1 位に結合している。他の実施態様において、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質がグルカゴンスーパーファミリーペプチド（例えば、グルカゴン関連類縁体ペプチド）である場合、ジペプチドは、グルカゴン（配列番号 6 1 2）の 2、5、7、8 又は 1 1 位に対応するグルカゴンスーパーファミリーペプチドの位置に結合している。グルカゴンの 2、5、7、8 又は 1 1 位に対応するグルカゴンスーパーファミリーペプチドの位置は、グルカゴンスーパーファミリーペプチドのアミノ酸配列を天然グルカゴンのアミノ酸配列と整列させることによって決定することができる。例えば、図 1 8 において、多数のグルカゴンスーパーファミリーペプチド配列がグルカゴン配列（配列番号 6 1 2）と整列している。

20

【0541】

幾つかの実施態様において、生体活性ペプチドがインスリンである場合、ジペプチドは、インスリンの A 鎖の 4 若しくは 2 1 位又はインスリンの B 鎖の 5 若しくは 9 位に結合している。別の実施態様において、生体活性ペプチドがインスリンである場合、ジペプチドは、インスリンの A 又は B 鎖の N 又は C 末端アミノ酸に結合している。より特定の実施態様において、インスリンが配列番号 6 2 6 及び／又は配列番号 6 2 8 を含む場合、ジペプチドは、配列番号 6 2 6 の 1、4 若しくは 2 1 位のアミノ酸又は配列番号 6 2 8 の 1、5、1 2 若しくは 2 1 位のアミノ酸に結合している。

30

【0542】

他の生体活性ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質に関しては、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の天然アミノ酸配列に存在する S e r 又は T h r 残基にエステル結合を介して結合しているジペプチドを含むような、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のプロドラッグ形態の活性レベルを試験することによって、ジペプチドが結合すべき位置を決定することができる。修飾された生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の活性レベルが、ジペプチドを含まない対応する生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の活性レベルの約 1 0 % 未満（例えば、約 5 % 未満、約 1 % 未満）である場合、ジペプチドが結合する S e r 又は T h r は、ジペプチドの結合には良好な位置であると確認される。

40

【0543】

あるいは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を修飾して、天然アミノ酸を S e r 又は T h r で置換することができ、修飾された生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を活性について試験することができる。修飾された生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質が、未修飾の生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の活性と同様である、同一である又はそれ以上である場合、修飾された生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を、天然アミノ酸と置き換わった S e r 又は T h r に結合しているジペプチド部分を含むプロドラッグとして、活性について試験することができる。修飾された生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のプロドラッグの活性レベルが、ジペプチドを含まない未修飾の生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の

50

活性レベルの約10%未満（例えば、約5%未満、約1%未満）である場合、ジペプチドが結合するSer又はThrは、ジペプチドの結合には良好な位置であると確認される。

【0544】

プロドラッグジペプチド部分

本明細書に記載されているプロドラッグのジペプチドは、生理学的条件下（例えば、酵素又は追加の化学薬品の不在下）でPBS中でジケトピペリジン（DKP）又はジケトモルホリン（DMP）を形成することができる、2個の共有結合したアミノ酸同士、又は共有結合したヒドロキシル酸とアミノ酸の任意の組み合わせである。DKP又はDMPの形成は、ジペプチドと生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質との間のエステル結合の切断をもたらす。ジペプチドの構造は、DKP又はDMP形成の傾向を決定し、したがって生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質からのジペプチドの切断速度を決定する。幾つかの態様において、ジペプチドは構造A-Bを含み、ここで、Aは、Bに共有結合しているヒドロキシル酸又はアミノ酸であり、Bは、エステル結合を介して生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に結合しているアミノ酸である。

10

【0545】

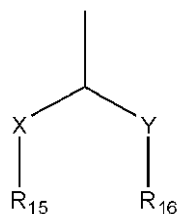
幾つかの実施態様において、A及びBは、それぞれアミノ酸又はヒドロキシル酸のL立体異性体であり、この場合、DKP又はDMPの形成は、ジペプチジルがL立体異性体及びD立体異性体を含む場合よりも遅くなる。

【0546】

幾つかの態様において、A及びBは、それぞれ立体障害又は嵩高の側鎖を含み、それらの例として、(i)式VII:

20

【化56】



式VII

30

〔式中、X及びYは、それぞれ、C、O、S又はNからなる群より独立して選択され、そしてR₁₅及びR₁₆は、H、C₁~C₁₈アルキル、(C₂~C₁₈アルキル)OH、(C₂~C₁₈アルキル)SH、(C₂~C₃アルキル)SCH₃、(C₁~C₄アルキル)CONH₂、(C₂~C₄アルキル)COOH、(C₂~C₄アルキル)NH₂、(C₂~C₄アルキル)NHC(NH₂+)NH₂(C₄~C₆)シクロアルキル、(C₀~C₄アルキル)(C₆~C₁₀アリール)R₁₇及びCH₂(C₅~C₉ヘテロアリール)からなる群より独立して選択され、ここでR₁₇は、H、C₁~C₄アルキル、NH₂又はOHである〕で示される構造を含む分岐側鎖；並びに

(ii)芳香族アミノ酸の側鎖（例えば、Ty r、Ph e、Tr p）、が挙げられる。そのような側鎖の存在は、生体活性ペプチドからの切断速度、及びDKP又はDMP形成速度を低減する。

40

【0547】

他の実施態様において、AもBも、立体障害又は嵩高の側鎖を含まない。そのような側鎖の不在は、生体活性ペプチドからの切断速度及びDKP又はDMP形成速度を低減する。

【0548】

更に他の実施態様において、A又はBの一方は、切断の中間的な速度、及びDKP又はDMP形成の中間的な速度をもたらすような立体障害又は嵩高の側鎖を含む。本明細書に記載されているプロドラッグの具体的なジペプチド部分としては、表4及び5、並びに下記の例示的なプロドラッグ実施態様で本明細書において示されている任意のジペプチドが

50

挙げられるが、これらに限定されない。

【0549】

例示的なプロドラッグ実施態様

幾つかの実施態様において、プロドラッグは、一般構造 $A-B-Q$ を含み、ここで、 A は、 B に共有結合しているヒドロキシル酸又はアミノ酸であり、 B は、エステル結合を介して Q に共有結合しているアミノ酸であり、そして Q は、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質、例えばグルカゴンスーパーファミリーペプチド（例えば、グルカゴン関連類縁体ペプチド）であり、 Q からの $A-B$ の化学切断半減期 ($t_{1/2}$) は、生理学的条件下、 PBS 中で約 1 週間以下である。

【0550】

$A-B$ は、あらゆる酵素と無関係な方法により Q から切断される。したがって、生理学的条件下での PBS における Q からの $A-B$ の $t_{1/2}$ は、生理学的条件下での $DPP-IV$ プロテアーゼを含む溶液における Q からの $A-B$ の $t_{1/2}$ と有意に異なっていない。 $DPP-IV$ プロテアーゼを含む溶液は、例えば血清であることができる。幾つかの態様において、生理学的条件下での PBS における Q からの $A-B$ の $t_{1/2}$ は、生理学的条件下での $DPP-IV$ プロテアーゼを含む溶液における Q からの $A-B$ の $t_{1/2}$ の 2 倍以下である。

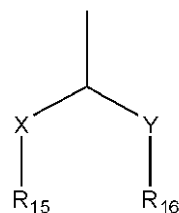
【0551】

生理学的条件下での PBS における Q からの $A-B$ の $t_{1/2}$ は、幾つかの態様において、約 24 時間以下であり、例えば、約 1～約 2 時間、約 5 時間以下、約 8 時間以下、約 12 時間以下、約 16 時間以下、約 20 時間以下である。

【0552】

幾つかの態様において、生理学的条件下での PBS における Q からの $A-B$ の $t_{1/2}$ は、約 1.5 時間未満である。これらの場合において、 A の側鎖も B の側鎖も、式 VII :

【化 57】



式 VII

〔式中、 X 及び Y は、それぞれ、 C 、 O 、 S 又は N からなる群より独立して選択され、そして R_{15} 及び R_{16} は、 H 、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_2 \sim C_{18}$ アルキル) OH 、 $(C_2 \sim C_{18}$ アルキル) SH 、 $(C_2 \sim C_3$ アルキル) SCH_3 、 $(C_1 \sim C_4$ アルキル) $CONH_2$ 、 $(C_2 \sim C_4$ アルキル) $COOH$ 、 $(C_2 \sim C_4$ アルキル) NH_2 、 $(C_2 \sim C_4$ アルキル) $NHC(NH_2)_2$ 、 $(C_4 \sim C_6)$ シクロアルキル、 $(C_0 \sim C_4$ アルキル) $(C_6 \sim C_{10}$ アリール) R_{17} 及び $CH_2(C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、ここで R_{17} は、 H 、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 NH_2 又は OH である〕で示される構造を含まず、

B は、場合により、芳香族アミノ酸であってもよく、

A 又は B は、場合により、二置換アミノ酸、例えば AIB であってもよい。

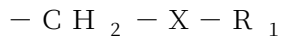
【0553】

幾つかの態様において、生理学的条件下での PBS における Q からの $A-B$ の $t_{1/2}$ が約 1.5 時間未満である場合、 A は、 Gly 、 Ala 、 Ser 、 Thr 、 Glu 、 Asp 、 Gln 、 Asn 、 Met 、 His 、 Cys 、 Lys 、 Pro 、 Arg 、二置換アミノ酸（例えば、 AIB ）若しくはヒドロキシル酸又は前記のいずれかの D 立体異性体からなる群より選択され、

Bは、Gly、Ala、Ser、Thr、Glu、Asp、Gln、Asn、Met、His、Cys、Lys、Pro、Arg、二置換アミノ酸（例えば、AlB）、Trp、Tyr、Phe又は前記のいずれかのD立体異性体からなる群より選択される。

【0554】

幾つかの実施態様において、A及びBは、それぞれ下記構造：



〔式中、Xは、C、O、S又はNであり、 R_1 は、H、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_2 \sim C_{18}$ アルキル)OH、($C_2 \sim C_{18}$ アルキル)SH、($C_2 \sim C_3$ アルキル)SCH₃、($C_1 \sim C_4$ アルキル)CONH₂、($C_2 \sim C_4$ アルキル)COOH、($C_2 \sim C_4$ アルキル)NH₂、($C_2 \sim C_4$ アルキル)NHC(NH₂+)NH₂($C_4 \sim C_6$)シクロアルキル、($C_0 \sim C_4$ アルキル)($C_6 \sim C_{10}$ アリール) R_9 及びCH₂($C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール)であり、ここで R_9 は、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、NH₂又はOHである〕で示される側鎖を含む。

10

【0555】

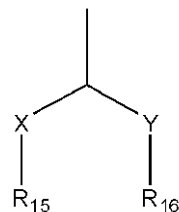
更に他の実施態様において、A及びBの一方又は両方は、側鎖（例えば、上記に記載されている）及び $C_1 \sim C_{18}$ アルキルによる第2置換を含む二置換アミノ酸である。

【0556】

他の実施態様において、QからのA-Bの $t_{1/2}$ は、約1.5時間から約24時間である。そのような場合、(i) A及びBの一方のみが、式VII：

【化58】

20



式VII

〔式中、X及びYは、それぞれ、C、O、S又はNからなる群より独立して選択され、そして R_{15} 及び R_{16} は、H、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_2 \sim C_{18}$ アルキル)OH、($C_2 \sim C_{18}$ アルキル)SH、($C_2 \sim C_3$ アルキル)SCH₃、($C_1 \sim C_4$ アルキル)CONH₂、($C_2 \sim C_4$ アルキル)COOH、($C_2 \sim C_4$ アルキル)NH₂、($C_2 \sim C_4$ アルキル)NHC(NH₂+)NH₂($C_4 \sim C_6$)シクロアルキル、($C_0 \sim C_4$ アルキル)($C_6 \sim C_{10}$ アリール) R_{17} 及びCH₂($C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール)からなる群より独立して選択され、ここで R_{17} は、H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、NH₂又はOHである〕で示される分岐側鎖を含み、A及びBの他方は、芳香族アミノ酸ではないか、(ii) Aのみが芳香族アミノ酸であるか、或いは、(iii) A及びBは、それぞれ芳香族アミノ酸であり、一方はDアミノ酸であり、他方はLアミノ酸である。特定の実施態様において、Bは、分岐側鎖を含む。

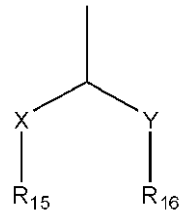
30

【0557】

更に他の実施態様において、生理学的条件下でのPBSにおけるQからのA-Bの $t_{1/2}$ は、1週間未満であるが約24時間を超え、例えば、約36時間を超える、約48時間を超える、約72時間を超える、約96時間を超える、約120時間を超える、約150時間を超える。そのような場合、A及びBは、それぞれ独立して、芳香族アミノ酸であるか、又は、式VII：

40

【化 5 9】



式V I I

〔式中、Xは、C、O、S又はNであり、 R_{15} 及び R_{16} は、H、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_2 \sim C_{18}$ アルキル)OH、($C_2 \sim C_{18}$ アルキル)SH、($C_2 \sim C_3$ アルキル)SCH₃、($C_1 \sim C_4$ アルキル)CONH₂、($C_2 \sim C_4$ アルキル)COOH、($C_2 \sim C_4$ アルキル)NH₂、($C_2 \sim C_4$ アルキル)NHC(NH₂+)NH₂($C_4 \sim C_6$)シクロアルキル、($C_0 \sim C_4$ アルキル)($C_6 \sim C_{10}$ アリール) R_{17} 及びCH₂($C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール)であり、ここで R_{17} は、H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、NH₂又はOHである〕で示される分岐側鎖を含み、A及びBが両方とも芳香族アミノ酸である場合、両方ともLアミノ酸である。

【0558】

幾つかの態様において、A-Bは、BとQの第1アミノ酸との間のエステル結合を介してQに結合している。幾つかの態様において、A-Bは、Qの第1アミノ酸の側鎖に結合しており、他の態様においてA-Bは、Qの1アミノ酸のアルファ炭素にエステル結合を介して結合している。後者の場合では、Qの第1アミノ酸はHO-アミノ酸である。より特定の態様において、Qの第1アミノ酸は、HO-His、HO-Tyr、HO-Phe又はHO-Pheの誘導体である。

【0559】

他の実施態様において、A-Bは、BとQの最終アミノ酸との間のエステル結合を介してQに結合している。幾つかの態様において、A-Bは、Qの最終アミノ酸の側鎖に結合しており、他の態様において、A-Bは、Qの最終アミノ酸のアルファ炭素にエステル結合を介して結合している。後者の場合において、Qの最終アミノ酸は、天然のアルファカルボキシレート基がアルコール基で置換されているアミノアルコールである。

【0560】

更に他の実施態様において、A-Bは、BとQの内部アミノ酸との間のエステル結合を介してQに結合している。より特定の態様において、Qの内部アミノ酸は、2、5、7、8又は11位(天然グルカゴン(配列番号612)のアミノ酸番号付けによる)に配置されている。幾つかの態様において、Qの内部アミノ酸は、ヒドロキシル基(例えばSer、Thr)を含む側鎖を含むアミノ酸である。

【0561】

一つの実施態様において、一般構造A-B-Qを有する複合体を含む注射用デポ組成物が提供され、ここで、

Aは、アミノ酸又はヒドロキシル酸であり、

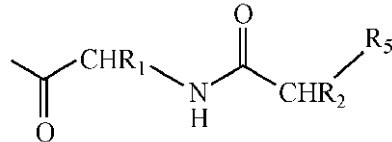
Bは、エステル結合を介してQに共有結合しているアミノ酸であり、そしてQは、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質であって、例えばグルカゴン関連類縁体ペプチドのようなグルカゴンスーパーファミリーペプチドであり、ジペプチドA-Bは、更に、A又はBに結合しているデポ・ポリマーを含む。ジペプチドA-Bは、Qからの所望の非酵素的自己切断半減期をもたらす、本出願において既に記載されている任意の構造を含むことができ、ここでジペプチド構造は、デポ・ポリマーへの結合により更に修飾される。デポ・ポリマーとしては、複合体A-B-Qが注射部位において有効に捕捉されるのに十分な大きさであるか、そうでなければその標的(例えば、受容体)と相互作用することができないようなものが選択される。一つの実施態様において、デポ・ポリマーは、A及び/又はBの側鎖に結合している。この実施例における使用に適したデポ・ポリマーには

、例えば、本明細書の164～166頁（英文）に提供されている式X Iの化合物について開示されている任意のポリマー、並びに当業者に既知の他の生体適合性ポリマーが含まれる。

【0562】

QからのA-Bの化学切断は、ジケトピペラジン又はジケトモルホリンを産生し、活性な生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を、投与後に所定の持続時間にわたって制御された方法で患者に放出する。一つの実施態様によると、例えばヒドロキシルを有するセリン若しくはトレオニン残基の側鎖又はN末端ヒドロキシル化アミノ酸（HO-アミノ酸）のヒドロキシル基を含む、生体活性ペプチド又はタンパク質（Q）の脂肪族ヒドロキシル基は、下記：

【化60】



で示されるジペプチド（A-B）の、エステル結合を介した生体活性ポリペプチドへの共有結合により修飾されており、式中、 R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、（ $C_1 \sim C_4$ アルキル）OH、（ $C_1 \sim C_4$ アルキル）SH、（ $C_2 \sim C_3$ アルキル）SCH₃、（ $C_1 \sim C_4$ アルキル）CONH₂、（ $C_1 \sim C_4$ アルキル）COOH、（ $C_1 \sim C_4$ アルキル）NH₂、（ $C_1 \sim C_4$ アルキル）NHC（NH₂+）NH₂、（ $C_4 \sim C_6$ ）シクロアルキル、（ $C_0 \sim C_4$ アルキル）（ $C_6 \sim C_{10}$ アリール） R_{17} 及びCH₂（ $C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール）からなる群より独立して選択され、 R_{17} は、H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、OH又はNH₂であり、そして R_5 は、OH又はNH₂であり、ジペプチド（A-B）は更に修飾されて、ジペプチドに共有結合しているデポ・ポリマーを含む。ジペプチドを含むデポ・ポリマーは、生体活性ペプチド又はタンパク質の任意の脂肪族ヒドロキシル基、例えば、ヒドロキシルを有するセリン若しくはトレオニン残基の側鎖又はペプチドの末端に配置されているヒドロキシル酸のヒドロキシル基などを介して、生体活性ペプチド又はタンパク質に結合することができる。一つの実施態様において、 R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、（ $C_2 \sim C_{18}$ アルキル）OH、（ $C_2 \sim C_{18}$ アルキル）SH、（ $C_2 \sim C_3$ アルキル）SCH₃、（ $C_1 \sim C_4$ アルキル）CONH₂、（ $C_2 \sim C_4$ アルキル）COOH、（ $C_2 \sim C_4$ アルキル）NH₂、（ $C_2 \sim C_4$ アルキル）NHC（NH₂+）NH₂（ $C_4 \sim C_6$ ）シクロアルキル、（ $C_0 \sim C_4$ アルキル）（ $C_6 \sim C_{10}$ アリール） R_{17} 及びCH₂（ $C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール）からなる群より独立して選択され、ここで R_{17} は、H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、NH₂又はOHであり、デポ・ポリマーは、 R_1 及び／又は R_2 置換基の一方を介して共有結合している。一つの実施態様において、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、グルカゴンスーパーファミリーペプチド又はグルカゴン関連類縁体ペプチドである。一つの実施態様において、2つ以上のデポ・ポリマーが、単一のジペプチド要素に結合している。

【0563】

デポ・ポリマーとしては、生体適合性であって、ジペプチド／デポ・ポリマー複合体の共有結合により修飾されている生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質が注射部位において捕捉されたままであるのに十分な大きさであるような、及び／又は患者に投与されたときに対応する受容体と相互作用することができないようなものが選択される。続くジペプチドの切断は、意図される標的と相互作用する生体活性ペプチドを放出する。ジペプチド要素に対する異なる組み合わせの置換を選択することは、所望の時間の間にわたって生体活性ペプチドを個別に放出するジペプチド／生体活性ペプチド複合体の混合物を含む、注射用組成物の調製を可能にする。一つの実施態様において、1つ以上のデポ・ポリマーが、直接的に、又はリンカーを介して間接的に、A及び／又はBに共有結合している。一つの実施態様において、1つ以上のデポ・ポリマーは、A又はBと、高親和性結合

によって（A若しくはBとの直接的な相互作用を介して又はA若しくはBに共有結合している結合部分を介して）非共有結合的に結合している。例えば、一つの実施態様において、デポ・ポリマーは、共有結合C16又はC18アシル又はアルキル基への結合を介してA又はBの側鎖に間接的に結合している。QからのA-Bの化学切断は、ジケトピペラジン又はジケトモルホリンを産生し、活性な生体活性ペプチドを、投与後に所定の持続時間にわたって制御された方法で放出して患者の全身に分布し（これらの実施態様では、最初の複合体は最初に捕捉されている）、活性な生体活性ペプチドがその標的リガンドと相互作用することを可能にする。

【0564】

一つの実施態様において、複数の異なるジペプチド／生体活性ペプチド複合体を含み、ジペプチド／生体活性ペプチド複合体がジペプチド部分の構造に基づいて互いに異なっている、注射用組成物が提供される。一つの実施態様によると、ジペプチド／生体活性ペプチド複合体は、A又はBに結合しているデポ・ポリマーを有する一般構造A-B-Q（直ぐ上に定義されている）の化合物を含み、ここでジペプチド／生体活性ペプチド複合体は、A及び／又はBの置換基に基づいて互いに異なっている。この方法では、生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質（Q）が個別の異なる複合体の切断速度に基づいて長時間にわたって制御された方法で放出される、注射用組成物を提供することができる。一つの実施態様によると、遊離形態の生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質（Q）と、ジペプチド要素に共有結合している生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質（Q）との混合物を含む、組成物が提供される。この方法では、投与された組成物には、遊離形態の活性な生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質が存在するために、即座の治療効果を有する。加えて、ジペプチドがA-B-Q複合体から切断され、活性な追加的生体活性ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質（Q）を、組成物の最初の投与後の所定の時間間隔で放出するので、延長された又は遅延された生物学的効果も生じる。

【0565】

一つの実施態様によると、デポ・ポリマーは、当業者に既知の生体適合性ポリマーから選択される。デポ・ポリマーは、典型的には、約20,000～120,000ダルトンの範囲から選択される大きさを有する。一つの実施態様において、デポ・ポリマーは、約40,000～100,000又は約40,000～80,000ダルトンの範囲から選択される大きさを有する。一つの実施態様において、デポ・ポリマーは、約40,000、50,000、60,000、70,000又は80,000ダルトンの大きさを有する。適切なデポ・ポリマーには、デキストラン、ポリラクチド、ポリグリコリド、カプロラクトンに基づいたポリマー、ポリ（カプロラクトン）、ポリ無水物、ポリアミン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリジオキサノン、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、スクシネート、ポリ（リンゴ酸）、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、ヒアルロン酸及びコポリマー、ターポリマー及びそれらの混合物、並びにカプロラクトンに基づいたポリマーを含む、生分解性ポリマー及びそれらのコポリマー、プロブチレンテレフタレートを含む、ポリカプロラクトン及びそのコポリマーが含まれるが、これらに限定されない。一つの実施態様において、デポ・ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸及び乳酸とグリコール酸のコポリマーからなる群より選択され、一つの特実態様において、デポ・ポリマーはポリエチレングリコールである。一つの実施態様において、ジペプチド要素に結合しているデポ・ポリマーの合計した分子量は、約40,000～80,000ダルトンであり、一つの実施態様において、デポ・ポリマーはポリエチレングリコールである。

【0566】

一つの実施態様によると、デポ・ポリマーは、ジペプチド「A-B」の2個のアミノ酸の一方の側鎖（又はジペプチドの「A」の位置に存在するヒドロキシ酸の側鎖）に結合

している。一つの実施態様において、ジペプチド A-B は、システイン又はリシン残基を含んで、デポ・ポリマーの結合を容易にする反応性基を提供する。一つの実施態様において、ジペプチド A-B は、40,000～80,000 ダルトンの範囲から選択される分子量を有するポリエチレングリコールがリシン又はシステイン側鎖に共有結合している、リシン又はシステインを含む。

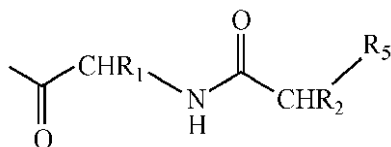
【0567】

幾つかの実施態様において、Q はグルカゴンスーパーファミリーペプチドである。より特定の態様において、Q は、本明細書に記載されているいずれかのようなグルカゴン関連類縁体ペプチドである。

【0568】

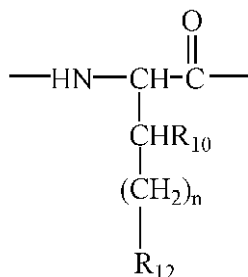
一つの実施態様によると、下記の基：

【化61】



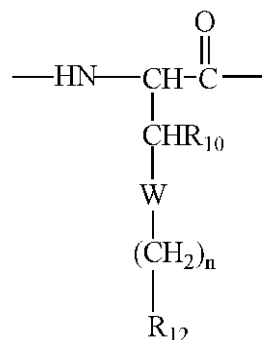
が、A鎖の A1、A4 若しくは A21 又は B鎖の B5、B9、B16 若しくは B25 から選択される位置で共有結合している、インスリンのプロドラッグ誘導体が提供される。一つの実施態様において、インスリンプロドラッグは、配列番号 613 の A鎖及び配列番号 614 の B鎖を含み、A鎖の A4 若しくは A21 又は B鎖の B5、B9 から選択される位置のアミノ酸は、下記の構造：

【化62】



を有する修飾アミノ酸で置換されているか、或いは B16 又は B25 の位置のアミノ酸は、下記の構造：

【化63】



を有する修飾アミノ酸で置換されており、

式中、 R_{10} は、H、 $C_1 \sim C_4$ アルキル及び $(CH_2)_n$ ($C_6 \sim C_{10}$ アリール) からなる群より選択され、W は、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール又は結合であり、n は、0～3 の整数であり、

R_{12} は、下記：

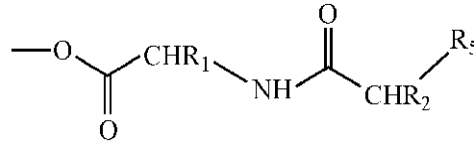
10

20

30

40

【化 6 4】



であり、

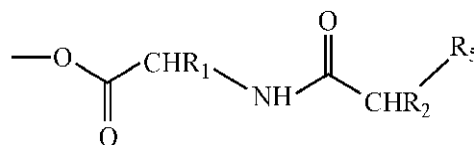
R₁ 及び R₂ は、H、C₁～C₄ アルキル、(C₁～C₄ アルキル) OH、(C₁～C₄ アルキル) SH、(C₂～C₃ アルキル) SCH₃、(C₁～C₄ アルキル) CONH₂、(C₁～C₄ アルキル) COOH、(C₁～C₄ アルキル) NH₂、(C₁～C₄ アルキル) NHC(NH₂+)NH₂、(C₄～C₆) シクロアルキル、(C₀～C₄ アルキル) (C₆～C₁₀ アリール) R₉ 及び CH₂ (C₅～C₉ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、

R₅ は、OH 又は NH₂ であり、そして R₉ は、C₁～C₄ アルキル、NH₂ 又は OH である。一つの実施態様において、R₁ は、CH₂ (CH₃)₂、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆～C₁₀ アリール) 及び CH₂ (C₅～C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択され、R₂ は、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆～C₁₀ アリール) 及び CH₂ (C₅～C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択される。一つの実施態様において、インスリンプロドラッグは、A 5、A 8、A 9、A 10、A 12、A 14、A 15、A 17、A 18、A 21、B 1、B 2、B 3、B 4、B 5、B 9、B 10、B 13、B 14、B 17、B 20、B 21、B 22、B 23、B 26、B 27、B 28、B 29 及び B 30 から選択される位置で 1 個以上の追加のアミノ酸置換を更に含み、一つの実施態様において、これらのアミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。インスリンの所望の活性に悪影響を与えないこれらの位置での適切なアミノ酸置換は、同業者に知られており、例えば、Mayer, et al., Insulin Structure and Function, Biopolymers. 2007;88(5):687-713 において示されており、この開示は参照として本明細書に組み込まれる。一つの実施態様において、インスリンプロドラッグは、A 5、A 8、A 9、A 10、A 12、A 14、A 15、A 17、A 18、B 1、B 2、B 3、B 4、B 5、B 13、B 14、B 17、B 20、B 21、B 22、B 23、B 26、B 27、B 28、B 29 及び B 30 から選択される位置で 1～3 個のアミノ酸置換を含む。一つの実施態様において、インスリンプロドラッグは、天然インスリン B ペプチドの B 1～5 及び B 26～30 の位置のアミノ酸の 1 個以上の欠失により、別の実施態様では、アミノ酸 B 1～5 及び／又は B 26～30 の欠失により、天然インスリン配列に対して更に修飾されている。一つの実施態様において、A 8 のアミノ酸は、ヒスチジン、アルギニン及びリシンからなる群より選択されるアミノ酸である。更なる実施態様において、B 10 のアミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸からなる群より選択されるアミノ酸である。

【0569】

一つの実施態様によると、A 鎖及び B 鎖を含むインスリンプロドラッグが提供され、ここで、A 鎖は配列番号 626 の配列を含み、B 鎖は配列番号 628 の配列を含み、更に、下記の一般構造：

【化 6 5】



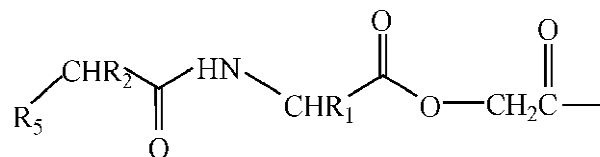
のジペプチドが、エステル結合を介して、A 1、A 4、A 21、B 5、B 9、B 16 又は B 25 位 (配列番号 613 及び配列番号 614 それぞれの天然 A 鎖及び B 鎖配列による) のアミノ酸に結合しており、式中、R₁ 及び R₂ は、H、C₁～C₄ アルキル、(C₁～

C₄ アルキル) OH、(C₁ ~ C₄ 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、(C₄ ~ C₆) シクロアルキル、(C₀ ~ C₄ アルキル) (C₆ ~ C₁₀ アリール) R₉ 及び CH₂ (C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、R₅ は、OH 又は NH₂ であり、そして R₉ は、C₁ ~ C₄ アルキル、NH₂ 又は OH である。一つの実施態様において、R₁ は、CH₂ (CH₃)₂、(C₄ ~ C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ ~ C₁₀ アリール) 及び CH₂ (C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択され、R₂ は、(C₄ ~ C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ ~ C₁₀ アリール) 及び CH₂ (C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択される。一つの実施態様において、R₁ は、CH₂ (CH₃)₂、(C₄ ~ C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ アリール) 及び CH₂ (C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択され、R₂ は、(C₄ ~ C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ アリール) 及び CH₂ (C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択される。更なる実施態様において、インスリンプロドラッグは、配列番号 626 又は配列番号 628 の配列に対して 1 ~ 6 個又は 1 ~ 3 個のアミノ酸置換を更に含む。一つの実施態様において、インスリンプロドラッグの B 鎖は、配列番号 627 の配列を含む。

【0570】

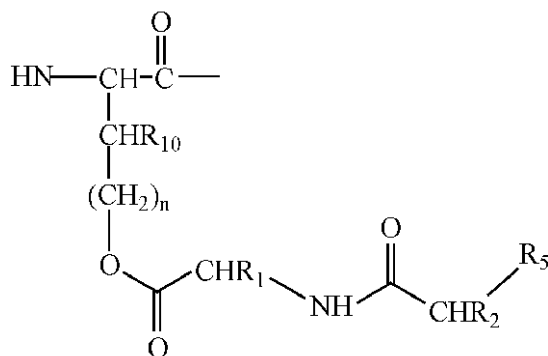
一つの実施態様において、インスリンプロドラッグは、X₅ I V X₆ Q C C X₇ S I C S L Y Q L E N Y C X₈ (配列番号 626) 及び X₁₃ L C G X₉ X₁₀ L V E A L X₁₁ L V C G E R G F X₁₂ (配列番号 628) の配列を含み、ここで、X₆ はグルタミン酸であり、X₇ は、トレオニン、ヒスチジン、アルギニン及びリシンからなる群より選択され、X₈ は、アスパラギン又はグリシンであり、X₉ はセリンであり、X₁₀ は、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモシステイン酸及びシステイン酸からなる群より選択され、X₁₁ 及び X₁₂ は、両方ともチロシンであり、X₁₃ はヒスチジンであり、そして X₅ は、下記構造：

【化 66】



を有し、式中、R₁ は、CH₂ (CH₃)₂、(C₄ ~ C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ ~ C₁₀ アリール) 及び CH₂ (C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択され、R₂ は、(C₄ ~ C₅) シクロアルキル、CH₂ (C₆ ~ C₁₀ アリール) 及び CH₂ (C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R₅ は、OH 又は NH₂ である。代替的な実施態様において、インスリンプロドラッグは、X₅ I V X₆ Q C C X₇ S I C S L Y Q L E N Y C X₈ (配列番号 626) 及び X₁₃ L C G X₉ X₁₀ L V E A L X₁₁ L V C G E R G F X₁₂ (配列番号 628) の配列を含み、ここで、X₅ はグリシンであり、X₇ は、トレオニン、ヒスチジン、アルギニン及びリシンからなる群より選択され、X₁₀ は、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なる群より選択され、X₁₁ 及び X₁₂ は、両方ともチロシンであり、X₆、X₈、X₉ 又は X₁₃ の 1 つは、下記構造：

【化 6 7】



10

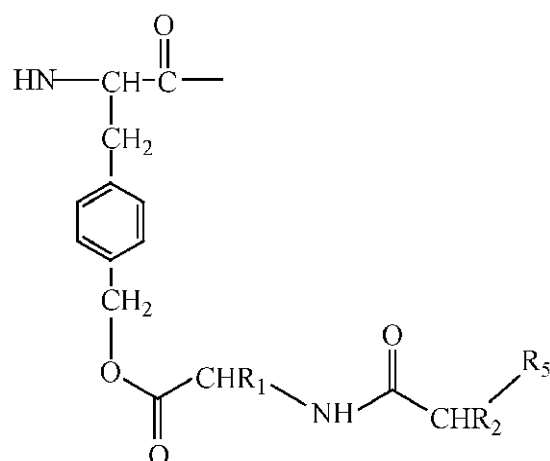
を有し、式中、 R_{10} は、H又は CH_3 からなる群より選択され、 n は、0又は3であり、 R_1 は、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10}$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10}$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH又は NH_2 である。一つの実施態様において、 n は0であり、そして R_{10} はHである。

【0571】

代替的な実施態様において、インスリンプロドラッグは、 $X_5IVX_6QCCX_7SICSLYQLENYCX_8$ (配列番号626) 及び $X_{13}LCGX_9X_{10}LVEALX_{11}LVCGERGFXX_{12}$ (配列番号628) の配列を含み、ここで、 X_5 はグリシンであり、 X_6 はグルタミン酸であり、 X_7 は、トレオニン、ヒスチジン、アルギニン及びリシンからなる群より選択され、 X_8 は、アスパラギン又はグリシンであり、 X_9 はセリンであり、 X_{10} は、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なる群より選択され、 X_{13} はヒスチジンであり、 X_{11} 及び X_{12} の一方は、チロシン又はフェニルアラニンであり、他方は、下記構造：

20

【化 6 8】



30

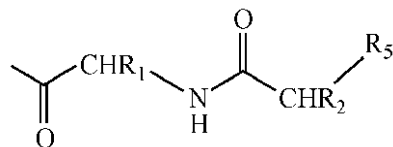
40

を有し、式中、 R_1 は、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10}$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10}$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH又は NH_2 である。

【0572】

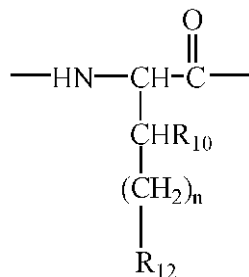
一つの実施態様によると、下記の基：

【化 6 9】



が、グルカゴン又は G L P - 1 ペプチドの 1、2、5、7、8 又は 11 から選択される位置で共有結合している、グルカゴン又は G L P - 1 のプロドラッグ誘導体が提供される。一つの実施態様において、グルカゴン又は G L P - 1 プロドラッグの 2、5、7、8 又は 11 位のアミノ酸は、下記構造：

【化 7 0】

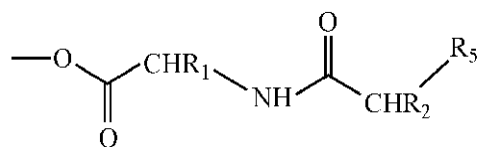


を有するアミノ酸を含み、

式中、 R_{10} は、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル及び $(\text{CH}_2)_n$ ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) からなる群より選択され、 n は、0～3 の整数であり、

R_{12} は、下記：

【化 7 1】



であり、

R_1 及び R_2 は、H、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})\text{OH}$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})\text{SH}$ 、 $(\text{C}_2 \sim \text{C}_3 \text{ アルキル})\text{SCH}_3$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})\text{CONH}_2$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})\text{COOH}$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})\text{NH}_2$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})\text{NHC}(\text{NH}_2)_2$ 、 $(\text{C}_4 \sim \text{C}_6)$ シクロアルキル、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})$ ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) R_9 及び CH_2 ($\text{C}_5 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、

R_5 は、OH 又は NH_2 であり、そして R_9 は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル、 NH_2 又は OH である。一つの実施態様において、 R_1 は、 CH_2 (CH_3)₂、 $(\text{C}_4 \sim \text{C}_5)$ シクロアルキル、 CH_2 ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) 及び CH_2 ($\text{C}_5 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、 $(\text{C}_4 \sim \text{C}_5)$ シクロアルキル、 CH_2 ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) 及び CH_2 ($\text{C}_5 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択される。一つの実施態様において、グルカゴン及び G L P - 1 プロドラッグは、天然配列に対して、1、2、5、8、10、12、13、14、16、17、18、24、28 及び 29 位からなる群より選択される 1 個以上のアミノ酸置換を更に含む。

【0573】

一つの実施態様において、配列番号 612 の誘導体を含むグルカゴンプロドラッグが提供され、ここで、誘導体は、1、2、5、7、8、10、12、13、14、16、17、18、24、28 及び 29 位から選択される位置での 1～6 個又は 1～3 個のアミノ酸置換より配列番号 612 と異なっており、下記の基：

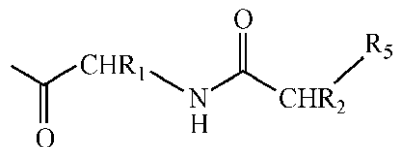
10

20

30

40

【化 7 2】



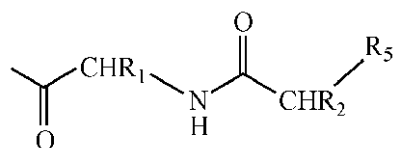
が、グルカゴンペプチドの 1、2、5、7、8 又は 11 から選択される位置で共有結合しており、式中、 R_1 は、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10})$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10})$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

10

【0574】

一つの実施態様において、配列番号 629 の誘導体を含む GLP-1 プロドラッグが提供され、ここで、誘導体は、1、2、3、5、8、10、12、13、14、16、17、18、24、28 及び 29 位から選択される位置での 1～6 個又は 1～3 個のアミノ酸置換より配列番号 629 と異なっており、下記の基：

【化 7 3】



20

が、グルカゴンペプチドの 1、2、5、7、8 又は 11 から選択される位置で共有結合しており、式中、 R_1 は、 $CH_2(CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10})$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2(C_6 \sim C_{10})$ アリール) 及び $CH_2(C_5 \sim C_9)$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

【0575】

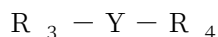
30

一つの実施態様において、グルカゴン及び GLP-1 誘導体は、1、2 及び 16 位の 1 つ以上での置換により天然ペプチドと異なっているアミノ酸配列を含む。一つの実施態様において、グルカゴン及び GLP-1 誘導体は、16 位での置換により天然ペプチドと異なっているアミノ酸配列を含み、ここで置換しているアミノ酸は、Glu、Gln、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸からなる群より選択される。更なる実施態様において、グルカゴン及び GLP-1 誘導体は、1、2 及び / 又は 16 位での置換により天然ペプチドと異なっているアミノ酸配列を含み、ここで、1 位での置換は、D-ヒスチジン、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルーヒスチジン、アセチルーヒスチジン及びホモヒスチジンからなる群より選択され、2 位での置換は、D-セリン、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なる群より選択される。

40

【0576】

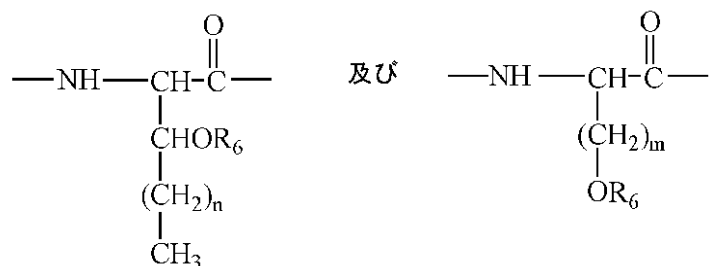
一つの実施態様によると、GLP-1 又はグルカゴンのプロドラッグ類縁体が提供され、ここで、プロドラッグは、下記の一般構造：



で示されるポリペプチドを含み、

式中、Y は、下記：

【化 7 4】

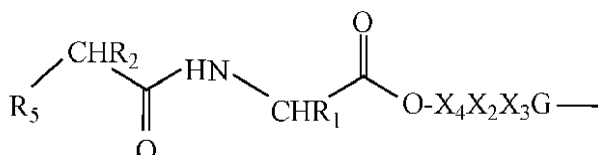


からなる群より選択される構造であり、

10

n は、0～3 から選択される整数であり、m は、1～4 から選択される整数であり、R₃ は、X₁X₂X₃G—（配列番号 6 2 1）又は下記：

【化 7 5】



からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、

20

X₁ は、ヒスチジン、ヒドロキシーヒスチジン、ホモヒスチジン、チロシン及びフェニルアラニンからなる群より選択され、X₂ は、グリシン、アラニン、セリン、バリン、D-アラニン、アミノイソ酪酸、N-メチルアラニン、並びに同様の大きさの天然及び合成アミノ酸からなる群より選択され、X₃ は、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン及びアスパラギンからなる群より選択され、X₄ は、デスアミノヒスチジン、デスアミノホモヒスチジン、デスアミノチロシン及びデスアミノフェニルアラニンからなる群より選択され、

R₄ は、（配列番号 6 1 5）、（配列番号 6 1 6）、（配列番号 6 1 7）、（配列番号 6 1 8）及び（配列番号 6 1 9）からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、

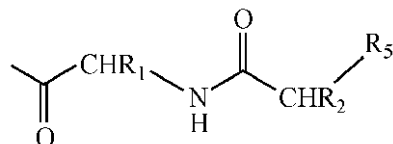
配列番号 6 1 5～6 1 9 の 1 1 位の X は、セリン、グリシン、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸又はホモシステイン酸であり、

30

R₅ は、NH₂ 又は HO であり、

R₆ は、H であるか、又は下記：

【化 7 6】

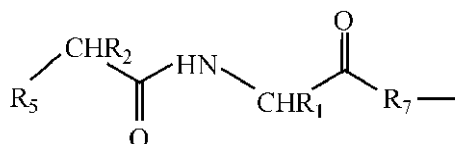


であり、

40

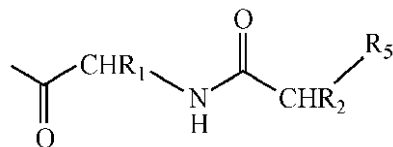
R₁ 及び R₂ は、H、C₁～C₃ アルキル、CH₂CH(CH₃)₂、CH(CH₃)(CH₂CH₃)、(C₄～C₅) シクロアルキル、CH₂(C₆～C₁₀ アリール) 及び CH₂(C₅～C₉ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択され、そして R₅ は、OH 又は NH₂ であるが、但し、R₃ が下記：

【化 7 7】



である場合、R₆ は H であり、R₆ が下記：

【化 7 8】



である場合、 R_3 は $X_1 X_2 X_3 G-$ (配列番号 6 2 1) であり、更に、 R_6 が H である場合、 R_3 は、 $X_1 X_2 X_3 G-$ (配列番号 6 2 1) ではない。一つの実施態様において、 R_1 は、 $CH_2 (CH_3)_2$ 、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2 (C_6 \sim C_{10}$ アリール) 及び $CH_2 (C_5 \sim C_9$ ヘテロアリール) からなる群より選択され、 R_2 は、 $(C_4 \sim C_5)$ シクロアルキル、 $CH_2 (C_6 \sim C_{10}$ アリール) からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

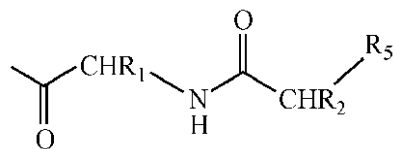
10

【0 5 7 7】

一つの実施態様によると、グルカゴン又は GLP-1 のプロドラッグが提供され、ここで、プロドラッグは、H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R (配列番号 6 0 2) 又は H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T (配列番号 6 1 2) の配列のペプチド誘導体を含み、ペプチド誘導体は、1、2、5、8、10～14、16、17、18、24、28 及び 29 位から選択される位置で配列番号 6 0 2 又は配列番号 6 1 2 に対して 1～6 個のアミノ酸置換を含み、1、2、5、7、8 及び 11 位から選択される位置で、エステル結合を介してペプチドに結合している、下記の式：

20

【化 7 9】



のジペプチドを有する。一つの実施態様において、2、5、7、8 又は 11 位のアミノ酸は、セリン残基であり、ジペプチドは、セリン側鎖と形成したエステル結合を介して結合している。典型的には、これらのプロドラッグは、プロドラッグ形態である間は 10% 未満の活性しか示さず、活性化されると完全な活性を示す。

30

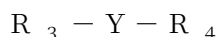
【0 5 7 8】

一つの実施態様によると、GLP-1 のプロドラッグ誘導体が提供される。実施例 4 の表 6 及び 7 に提示されたデータにより開示されているように、物理的及び化学的に安定であり、増強された半減期を示し、酵素の助けを借りることなく生理学的条件下で活性ポリペプチドに変換される、多種多様な GLP-1 プロドラッグ誘導体が調製される。これらの GLP-1 類縁体のうちの 4 つは、生理学的条件下で、20 時間を超える半減期を有する活性ポリペプチドに変換される。これらの類縁体は、天然アミノ酸配列に対して最小限の改変しか有さず、このことは潜在的な免疫源性有害作用を最小限にするはずである。GLP-1 の N 末端でのプロドラッグ化学の確立は、この特定の部位が生体活性にとって極めて重要である他のペプチドへの使用に転化可能であると予測される。

40

【0 5 7 9】

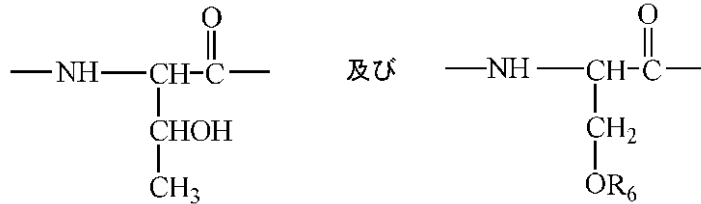
一つの実施態様によると、プロドラッグ GLP-1 類縁体は、一般式：



で示されるポリペプチドを含み、

式中、Y は、下記：

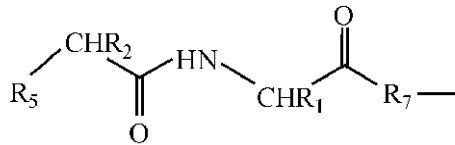
【化 8 0】



からなる群より選択される構造であり、

R₃ は、H X₂ Q G—（配列番号 6 3 5）、F X₂ Q G—（配列番号 6 3 6）、X₁ X₂ Q G—（配列番号 6 3 7）又は下記：

【化 8 1】



からなる群より選択されるアミノ酸であり、

X₁ は、ヒスチジン、ヒドロキシーヒスチジン、ホモヒスチジン、チロシン及びフェニルアラニンからなる群より選択され、X₂ は、グリシン、アラニン、セリン、バリン、D-アラニン、アミノイソ酪酸、N-メチルアラニン、並びに同様の大きさの天然及び合成のアミノ酸からなる群より選択され、

R₄ は、F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R G（配列番号 6 0 3）

、

F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R—アミド（配列番号 6 0 4）、

F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G X_{1 4} P S S G A P P P S—アミド（配列番号 6 0 5）

（ここで X_{1 4} は、A r g 又は G l y である）、

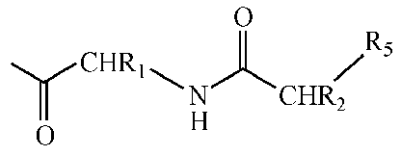
F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R G K R N R N N I A（配列番号 6 0 6）及び

配列番号 3、4、5 又は 6 の誘導体（ここで誘導体は、配列番号 6 0 3、6 0 4、6 0 5 又は 6 0 6 と、1～3 個のアミノ酸により異なり、一つの実施態様では 1～3 個の保存的アミノ酸により異なる）からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、

R₅ は、N H₂ 又は H O であり、

R₆ は、H であるか、又は下記：

【化 8 2】



であり、

R₇ は、O—H X₂ Q G—（配列番号 6 3 5）、O—F X₂ Q G—（配列番号 6 3 6）及び O—Y X₂ Q G—（配列番号 6 3 8）からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、

、

R₁ 及び R₂ は、H、C₁～C₃ アルキル、C H₂ C H（C H₃）₂、C H（C H₃）（C H₂ C H₃）、（C₄～C₅）シクロアルキル、C H₂（C₆ アリール）及び C H₂（C₅～C₉ ヘテロアリール）からなる群より独立して選択されるが、但し、R₃ が下記：

：

10

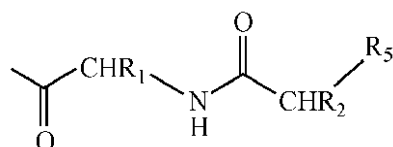
20

30

40

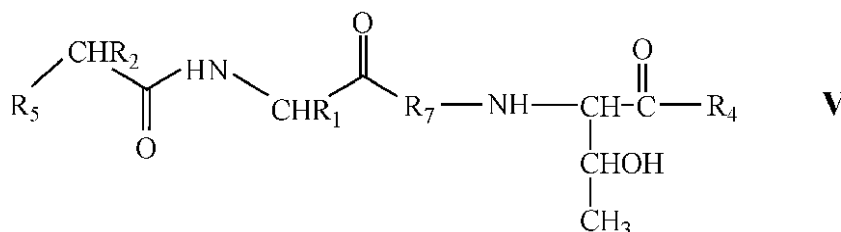
$$\text{R}_5-\text{CHR}_2-\text{C}(=\text{O})\text{HN}-\text{CHR}_1-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_7$$

【化 8 4】



【 0 5 8 0 】

【化 8 5】



R₁ 及び R₂ は、H、C₁ ~ C₃ アルキル、CH₂CH(CH₃)₂、CH(CH₃)₂、CH₂CH₃、(C₄ ~ C₅) シクロアルキル、CH₂(C₆ アリール) 及び CH₂(C₅ ~ C₉ ヘテロアリール) からなる群より独立して選択される。

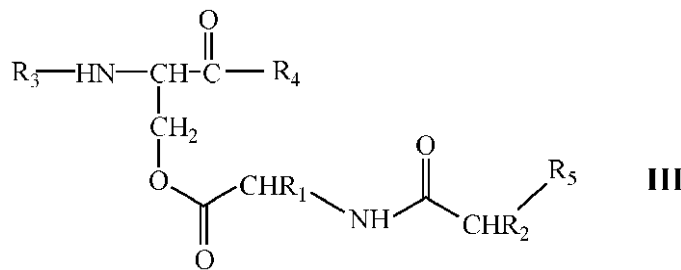
【0581】

一つの実施態様によると、式 I I I 又は V の一般構造を有するプロドラッグであって、 R_1 が、 $CH_2(CH_3)_2$ 及び $CH_2(C_6\text{アリール})$ からなる群より選択され、 R_2 が $CH_2(C_6\text{アリール})$ であり、そして R_5 が OH であるプロドラッグが提供される。更なる実施態様において、 R_4 は、FTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVK GX₁₄ PSSGAPPPS-アミド（配列番号 605）であり、ここで X₁₄ は、Arg 又は Gly である。別の実施態様において、式 I I I 又は V の一般構造を有するプロドラッグであって、 R_1 が $CH_2(CH_3)_2$ であり、 R_2 が、H 又は $CH_2(C_6\text{アリール})$ であり、そして R_5 が NH_2 であるプロドラッグが提供される。更なる実施態様において、 R_4 は、FTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVK GX₅ PSSGAPPPS-アミド（配列番号 605）であり、ここで X₁₄ は、Arg 又は Gly である。

【0582】

一つの実施態様において、式 I I I :

【化 86】



の一般構造を有する GLP-1 プロドラッグが提供され、

式中、

R_3 は、 R_5 HAQG（配列番号 639）、 R_5 FAQG（配列番号 640）、 R_5 YAQG（配列番号 641）からなる群より選択されるアミノ酸であり、

R_4 は、下記：

FTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRG（配列番号 603）、

FTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVKGR-アミド（配列番号 604）及び

FTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVK GX₁₄ PSSGAPPPS-アミド（配列番号 605）

（ここで X₁₄ は、Arg 又は Gly である）

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、

R_5 は、 NH_2 又は HO であり、

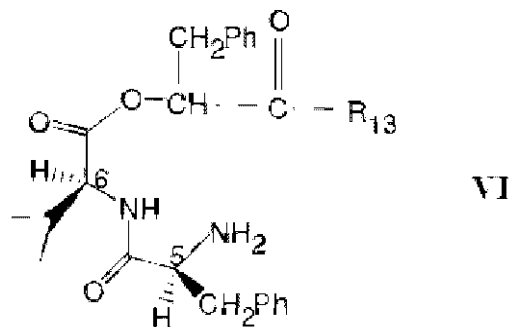
R_1 及び R_2 は、H、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)(CH_2CH_3)$ 、($C_4 \sim C_5$) シクロアルキル、 $CH_2(C_6\text{アリール})$ 及び $CH_2(C_5 \sim C_6\text{ヘテロアリール})$ からなる群より独立して選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。一つの実施態様において、 R_1 は、 $CH_2(CH_3)_2$ 、($C_4 \sim C_5$) シクロアルキル、 $CH_2(C_6\text{アリール})$ 及び $CH_2(C_5 \sim C_6\text{ヘテロアリール})$ からなる群より選択され、 R_2 は、($C_4 \sim C_5$) シクロアルキル、 $CH_2(C_5 \sim C_6\text{アリール})$ からなる群より選択され、そして R_5 は、OH 又は NH_2 である。

【0583】

一つの実施態様によると、式 I I I の一般構造を有するプロドラッグであって、 R_1 が、 $CH_2(CH_3)_2$ 及び $CH_2(C_6\text{アリール})$ からなる群より選択され、 R_2 が $CH_2(C_6\text{アリール})$ であり、そして R_5 が OH であるプロドラッグが提供される。更なる実施態様において、 R_4 は、FTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVK GX₁₄ PSSGAPPPS-アミド（配列番号 605）であり、ここで X₁₄ は、Arg 又は Gly である。別の実施態様において、式 I I I の一般構造を有するプロドラッグであって、 R_1 が $CH_2(CH_3)_2$ であり、 R_2 が、H 又は $CH_2(C_6\text{アリール})$ であり、R

₅ が NH₂ であり、R₄ が、FTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVKGX_{1 4} PSSGAPPPS-アミド（配列番号 605）であり、X_{1 4} が、Arg 又は Gly であるプロドラッグが提供される。一つの実施態様において、式 VI：

【化 87】



10

の一般構造を有するプロドラッグが提供され、

式中、R_{1 3} は、AEGTFTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRPS SGAPPPS-アミド（配列番号 608）又は AQTFTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRPSSGAPPPS-アミド（配列番号 609）であり、本プロドラッグは、およそ 64 時間の半減期を有する。

20

【0584】

合成ペプチドの生体活性は、実施例 2 に詳細に記述されているインビトロ細胞アッセイを使用して決定されている。簡潔には、このアッセイは、細胞に基づいたアッセイであって、ここでは、GLP-1 受容体と、cAMP 応答配列（CRE）に結合したルシフェラーゼ遺伝子とを、宿主細胞に同時形質移入する。ルシフェラーゼ遺伝子の転写は、cAMP 応答配列に結合している cAMP 応答配列結合タンパク質（CREB）により調節される。誘導される cAMP 産生は、受容体への GLP-1 結合に正比例しており、発現されたルシフェラーゼ遺伝子の検出された活性によって示される。本明細書に開示されているプロドラッグは、7.2 の pH 及び 37℃ の温度で PBS 緩衝液においてインキュベートされた後、効力を回復した。更に、本発明の GLP-1 類似体は、天然アミノ酸配列に対して最小限の改変しか有さず、このことは潜在的な免疫源性有害作用を最小限にするはずである。

30

【0585】

本明細書に開示されているプロドラッグを更に修飾して、生理学的 pH の水溶液においてペプチドの溶解性を改善しながら、同時にペプチドの腎臓クリアランスを防止してペプチドの有効持続時間を増強することができる。ペプチドは、血漿タンパク質と比較すると比較的小型の分子サイズであるために、容易に取り除かれてしまう。40kD を超えてペプチドの分子量の増加させると、腎臓の閾値を超え、血漿中の持続時間を有意に延長する。したがって、一つの実施態様において、ペプチドプロドラッグは更に修飾されて、共有結合した親水性部分を含む。一つの実施態様において、親水性部分は、血漿タンパク質ポリエチレン鎖又は免疫グロブリンの Fc 部分である。したがって、一つの実施態様において、本開示のプロドラッグは更に修飾されて、アミノ酸の側鎖に共有結合している 1 つ以上の親水性基を含む。

40

【0586】

一つの実施態様によると、本明細書に開示されているインスリンプロドラッグは、親水性部分を B 鎖の N 末端アミノ酸又は配列番号 627 の 29 位のアミノ酸のいずれかに結合することにより更に修飾される。別の実施態様において、本明細書に開示されているグルカゴン及び GLP-1 プロドラッグは、親水性部分を配列番号 612 及び配列番号 602 それぞれの 20、21、24 位に対応するアミノ酸に結合することにより又はグルカゴン若しくは GLP-1 プロドラッグのカルボキシ末端に修飾アミノ酸を付加することにより

50

、更に修飾される。C末端付加アミノ酸は、修飾されて、アミノ酸に親水性部分を含む。一つの実施態様において、本明細書に開示されているグルカゴン及びGLP-1プロドラッグは、配列番号612及び配列番号602それぞれの24位に対応するアミノ酸に親水性部分を結合することより更に修飾される。一つの実施態様において、親水性部分は、血漿タンパク質ポリエチレン鎖及び免疫グロブリンのFc部分からなる群より選択される。

【0587】

一つの実施態様において、親水性基はポリエチレン鎖であり、一つの実施態様において、2つ以上のポリエチレン鎖が、プロドラッグの2つ以上のアミノ酸側鎖に共有結合している。グルカゴン又はGLP-1プロドラッグでは、複数のポリエチレン鎖を、20、21、24の群より選択される位置に結合することができるし、ペプチドのC末端に、側鎖にポリエチレン鎖が結合した単一の追加のアミノ酸を付加することもできる。一つの実施態様において、C末端に付加されたアミノ酸は、修飾システインである。

【0588】

一つの実施態様によると、本明細書に開示されているプロドラッグはアミノ酸置換により更に修飾され、置換しているアミノ酸は、例えばポリエチレングリコールを含む親水性部分との架橋に適している側鎖を含む。一つの実施態様において、親水性部分が結合するプロドラッグの位置のアミノ酸は、天然又は合成アミノ酸により置換されて（又はプロドラッグのC末端に付加されて）、親水性部分を導入するか又はその容易な結合を可能にする。例えば、一つの実施態様において、20、21、24位（グルカゴン又はGLP-1プロドラッグ）の天然アミノ酸をリシン又はシステイン残基で置換して（或いはリシン又はシステイン残基をC末端に付加して）、ポリエチレン鎖の共有結合を可能にする。

【0589】

一つの実施態様において、プロドラッグは、カルボキシ末端に付加された単一のシステイン残基を有するか、又はプロドラッグペプチドは、少なくとも1つのシステイン残基で置換されており、ここでシステイン残基の側鎖は、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ルアシルのようなチオール反応性試薬で更に修飾される。これらのチオール反応性試薬は、カルボキシ、ケト、ヒドロキシル及び他のエーテル基、並びにポリエチレングリコール単位のような他の親水性部分を含有することができる。代替的な実施態様において、プロドラッグは、カルボキシ末端に付加された単一のリシン残基を有するか又はプロドラッグペプチドは、リシンで置換されており、置換するリシン残基の側鎖は、カルボン酸の活性エステル（スクシンイミド、無水物など）又はポリエチレングリコールのような親水性部分のアルデヒドのようなアミン反応性試薬を使用して更に修飾される。

【0590】

本開示のグルカゴン及びGLP-1プロドラッグは、GLP-1類縁体の機能に重要ではないことが知られている位置で天然グルカゴン及びGLP-1配列のアミノ酸置換を包含する。一つの実施態様において、置換は、1、2、5、8、10、12～14、16～18、24、28及び29、からなる群より選択される1、2、4、5又は6つの位置での保存的アミノ酸置換である。一つの実施態様において、天然GLP-1／グルカゴンペプチドの20、21及び24位、とりわけ天然GLP-1／グルカゴンの21及び24位に対応するアミノ酸は、システイン又はリシンで置換されており、ここでPEG鎖は、置換システイン又はリシン残基と共有結合している。更なる実施態様において、GLP-1類縁体のC末端は修飾されて、カルボン酸基がアミド基で置換されている。

【0591】

プロドラッグがポリエチレングリコール鎖を含むこれらの実施態様において、ポリエチレン鎖は、直鎖の形態であってもよいし、分岐鎖であってもよい。一つの実施態様によると、ポリエチレングリコール鎖は、約20,000～約60,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。複数のポリエチレン鎖をプロドラッグに結合して、最適な溶解性及び血中クリアランス特性を有するプロドラッグを提供することができる。一つの実施態様において、プロドラッグは、約20,000～約60,000ダルトンの範囲

から選択される平均分子量を有する単一ポリエチレングリコール鎖に結合している。別の実施態様において、プロドラッグは、2つのポリエチレングリコール鎖に結合し、2つの鎖の合計した平均分子量は、約40,000～約80,000ダルトンの範囲から選択される。一つの実施態様において、20,000又は60,000ダルトンの平均分子量を有する単一ポリエチレングリコール鎖がプロドラッグに結合している。一つの実施態様において、単一ポリエチレングリコール鎖が、プロドラッグに結合し、約40,000～約50,000ダルトンの範囲から選択される平均分子量を有する。一つの実施態様において、2つのポリエチレングリコール鎖が、プロドラッグに結合し、第1及び第2ポリエチレングリコール鎖は、それぞれ20,000ダルトンの平均分子量を有する。別の実施態様において、2つのポリエチレングリコール鎖が、プロドラッグに結合し、第1及び第2ポリエチレングリコール鎖は、それぞれ40,000ダルトンの平均分子量を有する。

10

【0592】

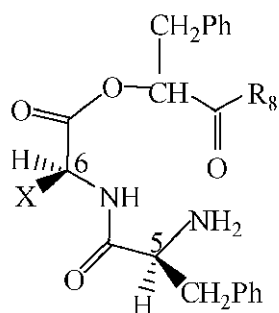
更なる実施態様において、ペプチドに共有結合している2つ以上のポリエチレン鎖を含むグルカゴン又はGLP-1プロドラッグが提供され、ここでグルカゴン鎖の総分子量は、約40,000～約60,000ダルトンである。一つの実施態様において、ペグ化グルカゴン又はGLP-1プロドラッグは、グルカゴン又はGLP-1ペプチドの20、21及び24位の1個以上のアミノ酸に結合しているポリエチレングリコール鎖を含み、ここでPEG鎖の合計した分子量は、約40,000～約80,000ダルトンである。一つの実施態様において、ペプチドに共有結合している2つ以上のポリエチレン鎖を含むインスリンプロドラッグが提供され、ここでグルカゴン鎖の総分子量は、約40,000～約60,000ダルトンである。一つの実施態様において、ペグ化インスリンプロドラッグは、B鎖のN末端及び／又はB鎖の29位（例えば、配列番号627）の1個以上のアミノ酸に結合しているポリエチレングリコール鎖を含み、ここでPEG鎖の合計した分子量は、約40,000～約80,000ダルトンである。

20

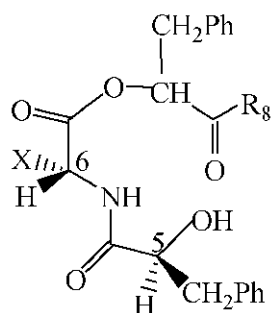
【0593】

一つの実施態様によると、下記：

【化 8 8】

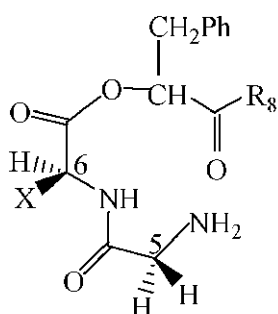


1: L,L-ジペプチド延長

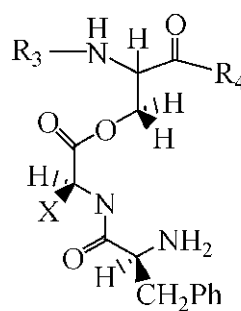


2: L,D-ジペプチド延長

10

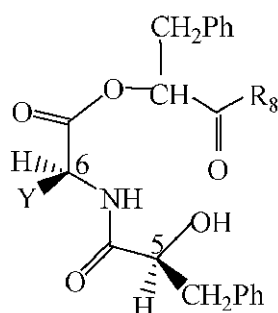


3: L,L-ジペプチド延長

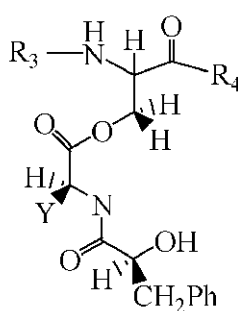


4: L,L-ジペプチド延長

20

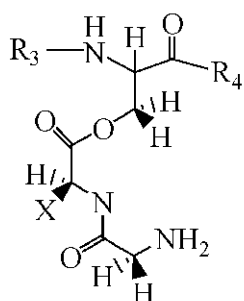


5: L,L-ジペプチド延長



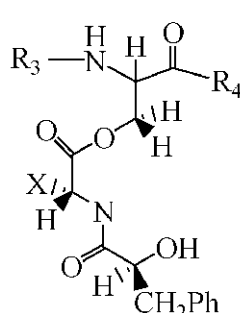
6: L,L-ジペプチド延長

30



7: L,L-ジペプチド延長

及び



8: L,D-ジペプチド延長

40

からなる群より選択される化合物の構造を含むグルカゴン又はG L P - 1 プロドラッグが提供され、

式中、Xは、 $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$ であり、Yは、フェニルであり、

R_3 は、 $\text{X}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{G}$ （配列番号621）であり、 X_1 は、ヒスチジン、ヒドロキシヒスチジン、ホモヒスチジン、チロシン及びフェニルアラニンからなる群より選択され、 X_2 は、グリシン、アラニン、セリン、バリン、D-アラニン、アミノイソ酪酸、N

50

ーメチルアラニン、並びに同様の大きさの天然及び合成アミノ酸からなる群より選択され、 X_3 は、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン及びアスパラギンからなる群より選択され、

R_4 は、下記：

FTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRG (配列番号603)、

FTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRーアミド (配列番号604)、

FTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGX₁₄ PSSGAPPPSーアミド (配列番号605)

(ここで X_{14} は、Arg又はGlyである)、

FTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLMNT (配列番号618) 及び

FTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLMNTPSSGAPPPSーアミド (配列番号620)

からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、

R_8 は、下記：

AEGTFTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGX PSSGAPPPSーアミド (配列番号608)、

AQGTFTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGX PSSGAPPPSーアミド (配列番号609)、

AEGTFTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKG (配列番号630)、

AQGTFTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKG (配列番号631)、

SQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLMNT (配列番号632) 及び

SQGTFTSDYSKYLD SRRRAQDFVQWLMNTPSSGAPPPSーアミド (配列番号633)

からなる群より選択される。

【0594】

一つの実施態様によると、 R_8 は、AEGTR₄ 又はAQGTR₄ からなる群より選択されるポリペプチドを含み、 R_3 は、OH-HAEGー (配列番号642)、HAQGー (配列番号639)、HAEGー (配列番号643)、FAEGー (配列番号644) 及びFAQGー (配列番号640) からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、そして R_4 は、配列番号616及び配列番号618からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。一つの実施態様において、 R_4 は、FTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRG (配列番号603)、FTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRーアミド (配列番号604)、FTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGX₁₄ PSSGAPPPSーアミド (配列番号605) (ここで X_{14} は、Arg又はGlyである) 及びFTSDVSSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRGKRNRNNIA (配列番号606) からなる群より選択される。

【0595】

一つの実施態様によると、グルカゴン又はDLPー1プロドラッグ類縁体であって、血漿タンパク質がペプチドのアミノ酸側鎖に共有結合してグルカゴン又はGLPー1プロドラッグ類縁体の溶解性、安定性及び／又は薬物動態を改善している類縁体が提供される。例えば、血清アルブミンを本明細書に提示されているグルカゴン又はGLPー1プロドラッグ類縁体に共有結合することができる。一つの実施態様において、血漿タンパク質は、配列番号604又は配列番号612のペプチドの20、21、又は24位に対応するアミノ酸に共有結合している。より詳細には、一つの実施態様において、血漿タンパク質は、グルカゴン又はGLPー1プロドラッグ類縁体の21又は24位に対応するアミノ酸に結合している。

【0596】

一つの実施態様によると、免疫グロブリン分子のFc部分を表す直鎖アミノ酸配列が、本明細書に開示されているグルカゴン又はGLPー1プロドラッグ類縁体のアミノ酸側鎖に共有結合して、グルカゴン又はGLPー1プロドラッグ類縁体の溶解性、安定性及び／

10

20

30

40

50

又は薬物動態を改善している、グルカゴン又はG L P-1 プロドラッグ類縁体が提供される。例えば、免疫グロブリン分子のF c 部分を表すアミノ酸配列は、配列番号604のペプチド又はグルカゴン若しくはG L P-1 プロドラッグの20、21又は24位に共有結合することができる。より詳細には、一つの実施態様において、F c 部分は、グルカゴン又はG L P-1 プロドラッグ類縁体の21又は24位に対応するアミノ酸に結合しており、類縁体は、配列番号604又は配列番号612の配列を含む。F c 部分は、典型的には、I g Gから単離されるものであるが、任意の免疫グロブリンからのF c ペプチドフラグメントも同等に機能するはずである。

【0597】

本開示は、本発明のプロドラッグが結合している他の結合体も包含し、この結合は、共有結合を介してでもよいし、リンカーを介してでもよい。結合は、共有化学結合、静電気、水素、イオン、ファンデルワールスような物理的な力又は疎水的若しくは親水の相互作用により達成することができる。ビオチン-アビジン、リガンド/受容体、酵素/基質、核酸/核酸結合タンパク質、脂質/脂質結合タンパク質、細胞付着分子パートナー又は互いに親和性を有する任意の結合パートナー若しくはそのフラグメントを含む、多様な非共有結合系を使用することができる。

【0598】

例示的な結合体には、異種ペプチド又はポリペプチド（例えば、血漿タンパク質を含む）、標的作用物質、免疫グロブリン又はその一部（例えば、可変部領域、C D R若しくはF c 領域）、放射性同位体、蛍光体若しくは酵素標識のような診断用標識、水溶性ポリマーを含むポリマー、又は他の治療若しくは診断剤が含まれるが、これらに限定されない。一つの実施態様において、本発明のプロドラッグポリペプチド及び血漿タンパク質を含む結合体が提供され、ここで血漿タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン及びフィブリノゲンからなる群より選択される。一つの実施態様において、結合体の血漿タンパク質部分は、アルブミン又はトランスフェリンである。幾つかの実施態様において、リンカーは、1～約60個、又は1～30個以上の原子長さ、2～5個の原子、2～10個の原子、5～10個の原子又は10～20個の原子長さの原子鎖を含む。幾つかの実施態様において、鎖原子は全て炭素原子である。幾つかの実施態様において、リンカーの主鎖の鎖原子は、C、O、N及びSからなる群より選択される。鎖原子及びリンカーは、より溶解性のある結合体をもたらすと予想される溶解性（親水性）に従って選択することができる。幾つかの実施態様において、リンカーは、酵素による又は標的組織若しくは臓器若しくは細胞において見出される他の触媒的若しくは加水分解的条件による切断の対象となる官能基を提供する。幾つかの実施態様において、リンカーの長さは、立体障害の潜在性を低減するのに十分な長さである。リンカーが共有結合又はペプチジル結合であり、結合体がポリペプチドである場合、結合体は全体が融合タンパク質であることができる。そのようなペプチジルリンカーは任意の長さであることができる。例示的なリンカーは、約1～50個のアミノ酸長さ、5～50個、3～5個、5～10個、5～15個又は10～30個のアミノ酸長さである。そのような融合タンパク質は、代替的には当業者に既知の組み換え遺伝子操作法により産生することができる。

【0599】

出願人たちは、天然グルカゴン及びG L P-1 が、電荷をカルボキシ末端に導入してペプチドの溶解性を増強しながら、同時にペプチドのアゴニスト特性を保持するように修飾されうることを見出した。増強された溶解性は、ほぼ中性のp Hでのグルカゴン及びG L P-1 溶液の調製及び保存を可能にする。比較的中性のp H（例えば、約5.0～約7.0のp H）でのグルカゴン及びG L P-1 溶液の配合は、類縁体の長期安定性を改善する。

【0600】

出願人たちは、本明細書に開示されているグルカゴン及びG L P-1 プロドラッグを同様に修飾して、比較的中性のp H（例えば、約5.0～約7.0のp H）の水溶液における溶解性を増強しながら、同時に母体タンパク質の活性を保持できることを予測する。し

10

20

30

40

50

たがって、本発明の一つの実施態様は、天然アミノ酸に対して、荷電アミノ酸による天然非荷電アミノ酸の置換により又はカルボキシ末端への荷電アミノ酸の付加により、ペプチドに電荷を付加するように更に修飾されている、グルカゴン又はG L P-1 類縁体を対象とする。一つの実施態様によると、本開示のグルカゴン又はG L P-1 プロドラッグの1～3 個の非荷電天然アミノ酸は、荷電アミノ酸で置換されている。一つの実施態様において、荷電アミノ酸は、リシン、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なる群より選択される。より詳細には、出願人たちは、荷電アミノ酸による、グルカゴン（配列番号6 1 2）の2 8 若しくは2 9 位又はG L P-1（配列番号6 0 2）の2 8 若しくは2 9 及び3 0 位に対応する位置で通常生じるアミノ酸の置換、並びに／又はグルカゴン若しくはG L P-1 プロドラッグのカルボキシ末端への1～2 個の荷電アミノ酸の付加が、生理学的なp H（すなわち、約6. 0～約7. 0のp H）の水溶液におけるプロドラッグの溶解性及び安定性を増強することを発見した。本明細書に開示されているグルカゴン及びG L P-1 プロドラッグのそのような修飾は、特に約5. 0～約7. 0の範囲のp Hの水溶液における溶解性に同様の効果を有すると同時に、母体ペプチドの生物学的活性を保持することが予測される。

10

【0 6 0 1】

使用

開示されているG L P-1、グルカゴン及びインスリンプロドラッグは、これらの生体活性ペプチドについて既に記載されてきたあらゆる使用に適していると考えられる。したがって、本明細書に記載されているプロドラッグを、低血糖症、高血糖症の治療、又はグルカゴンの高／低血中レベル若しくは高／低血中グルコースレベルをもたらす他の代謝疾患の治療に使用することができる。一つの実施態様によると、本明細書に開示されているプロドラッグを使用して治療される患者は、家畜化された動物であり、別の実施態様では、治療される患者はヒトである。

20

【0 6 0 2】

本発明による高血糖症又は低血糖症を治療する方法は、静脈内、腹腔内、皮下若しくは筋肉内のような非経口、鞘内、経皮、直腸内、経口、鼻腔内又は吸入を含む、任意の標準的投与経路を使用して、本開示のプロドラッグを患者に投与する工程を含む。一つの実施態様において、組成物は皮下又は筋肉内投与される。一つの実施態様において、組成物は非経口投与され、プロドラッグ組成物はシリンジの中に予め包装されている。

30

【0 6 0 3】

エキセンディン-4（Exendin-4）は、3 9 個のアミノ酸で作製されるペプチドである。G L P-1 受容体の刺激物質は、食欲を抑制し、減量を誘導することが報告されている。一つの実施態様において、エキセンディン-4の末端アミノ酸1 0 個（すなわち、配列番号6 2 4（G P S S G A P P P S）の配列）が、本開示のグルカゴン及びG L P-1 プロドラッグのカルボキシ末端に結合している。これらの融合タンパク質は、食欲を抑制し、減量／体重維持を誘導する薬理学的活性を有すると予測される。一つの実施態様によると、本開示のプロドラッグ誘導体であって、配列番号6 0 2、配列番号6 1 2、配列番号6 2 2、配列番号6 2 3又は配列番号6 2 9のペプチド配列を含み、カルボキシ末端配列に結合している配列番号6 2 4（G P S S G A P P P S）のアミノ酸配列を更に含む誘導体を、個体に投与して、食欲を減退させるか又は体重の減少を促進する。一つの実施態様によると、患者は家畜化された動物であり、別の実施態様では、治療される患者はヒトである。そのような食欲を減退する又は体重の減少を促進する方法は、体重の低減、体重増加の防止又は薬剤誘導肥満を含む多様な原因の肥満の治療、並びに血管疾患（冠動脈疾患、発作、末梢血管疾患、虚血再灌流など）、高血圧、I I型糖尿病の発症、高脂血症及び筋骨格系疾患を含む肥満に関連する合併症の低減に有用であることが予想される。一つの実施態様において、投与されたペプチドは、配列番号6 0 5の配列を含む。本発明は、本明細書に記載されているグルカゴン及びG L P-1 プロドラッグが、更にこの1 0 アミノ酸カルボキシ末端延長（配列番号6 2 4）と結合してもよいことを考慮するが、本発明は、配列番号6 2 4の1 0 個の隣接アミノ酸を欠いている類縁体を特に考慮する。

40

50

【0604】

減量を誘導する別の化合物としては、オキシントモジュリンがあるが、これは小腸において見出された天然の消化ホルモンである（Diabetes 2005; 54:2390-2395を参照すること）。オキシントモジュリンは、グルカゴンの29アミノ酸配列、その後に続く配列番号625（K R N R N N I A）の8アミノ酸カルボキシ末端延長を含有する、37アミノ酸のペプチドである。したがって、一つの実施態様において、配列番号625の配列のカルボキシ末端延長を更に含む、グルカゴン及びG L P-1のプロドラッグ誘導体が提供される。より詳細には、一つの実施態様によると、本開示のプロドラッグ誘導体は、カルボキシ末端配列に結合している配列番号625（K R N R N N I A）のアミノ酸配列を更に含む、配列番号602、配列番号612、配列番号622又は配列番号623のペプチド配列を含む。これらのペプチドを、減量の誘導又は体重増加の防止に使用することができる。本発明は、本明細書に記載されているグルカゴン及びG L P-1プロドラッグが、更にこの8アミノ酸カルボキシ末端延長（配列番号625）と結合してもよいことを考慮するが、本発明は、配列番号625の8個の隣接アミノ酸を欠いている類縁体を特に考慮する。

10

【0605】

本発明のグルカゴン及びG L P-1プロドラッグを、代謝性いそを罹患している患者に投与することもできる。癌患者の過半数が、意図されない進行性の減量、衰弱、並びに低体脂肪及び筋肉により特徴付けられる代謝性いそを経験していると推定される。この症候群は、A I D S患者において同様に一般的であり、細菌及び寄生虫疾患、リウマチ様関節炎、並びに腸、肝臓、肺及び心臓の慢性疾患においても存在しうる。通常、食欲不振に関連し、加齢の状態又は物理的外傷の結果として表れる可能性がある。代謝性いそは、生活の質を減少し、基礎状態を悪化させる症状であり、死亡の主な原因である。

20

【0606】

組み合わせ

本発明のインスリン、グルカゴン及びG L P-1プロドラッグは、単独で、又は他の抗糖尿病又は抗肥満剤と組み合わせ投与することができる。当該技術において既知であるか又は調査中の抗糖尿病剤には、インスリン；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）、グリピジド（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）のようなスルホニル尿素；レバグリニド（Prandin）又はナテグリニド（Starlix）のようなメグリチニド；メトホルミン（Glucophage）又はフェンホルミンのようなビグアナイド；ロシグリタゾン（Avandia）、ピオグリタゾン（Actos）若しくはトログリタゾン（Rezulin）又は他のP P A R γ インヒビターのようなチアゾリジンジオン；ミグリトール（Glyset）、アルカボース（Precose/Glucobay）のような炭水化物の消化を阻害するアルファグルコシダーゼインヒビター；エクセナチド（Byetta）又はプラムリンチド；ビルダグリプチン又はシタグリプチンのようなジペプチジルペプチダーゼ-4（D P P-4）インヒビター；S G L T（ナトリウム依存性グルコーストランスporter-1）インヒビター；又はF B P a s e（フルクトース1, 6-ビスホスファターゼ）インヒビターが含まれる。

30

40

【0607】

当該技術において既知であるか又は調査中の抗肥満剤には、フェネチルアミン型刺激薬、フェンテルミン、（場合により、フェンフルラミン又はデクスフェンフルラミンを伴う）、ジェチルプロピオン（Tenuate（登録商標））、フェンジメトラジン（Prelu-2（登録商標）、Bontril（登録商標））、ベンズフェタミン（Didrex（登録商標））、シブトラミン（Meridia（登録商標）、Reductil（登録商標））を含む食欲抑制薬；リモナバン（Acomplia（登録商標））、他のカンナビノイド受容体アンタゴニスト；オキシントモジュリン；塩酸フルオキシチン（Prozac）；Qnexa（トピラメート及びフェンテルミン）、Excalia（ブプロピオン及びゾニサミド）又はContrave（ブプロピオン及びナルトレキソン）；或いはゼニカル（Orlistat）若しくはCetilistat（ATL-962としても知られている）又

50

はGT 389-255と類似しているリパーゼインヒビターが含まれる。

【0608】

医薬組成物

本明細書に開示されているプロドラッグを含む医薬組成物を、標準的な薬学的に許容される担体及び当業者に既知の投与経路を使用して、配合及び投与することができる。したがって、本開示は、本明細書に開示されている1つ以上のプロドラッグ又はその薬学的に許容される塩を、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物も包含する。一つの実施態様において、医薬組成物は、リン酸緩衝剤系中に約4.0～約7.0のpHでプロドラッグを1mg/mlの濃度で含む。医薬組成物は、プロドラッグを単独の薬学的に活性な成分として含むことができるし、プロドラッグを1つ以上の追加的な活性剤と組み合わせることもできる。一つの実施態様によると、本発明のグルカゴン又はGLP-1プロドラッグと、インスリン又はインスリン類縁体又は本開示のインスリンプロドラッグの1つとを含む組成物が提供される。あるいは、グルカゴン又はGLP-1プロドラッグと抗肥満ペプチドとを含む、減量を誘導する又は体重増を防止することができる組成物が提供される。適切な抗肥満ペプチドには、米国特許第5,691,309号、同第6,436,435号又は米国特許出願第2005/0176643号に開示されているものが含まれる。

10

【0609】

一つの実施態様によると、医薬組成物であって、好ましくは滅菌され、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、本明細書に開示されている任意の新規プロドラッグと、薬学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤とを含む医薬組成物が提供される。そのような組成物は、グルカゴン、GLP-1又はインスリンプロドラッグを含有することができ、得られる活性ペプチドは、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又はそれ以上の濃度で存在する。一つの実施態様において、医薬組成物は、滅菌されていて、場合により多様な容器に保存されていてもよい水性液剤を含む。本発明の化合物を一つの実施態様に従って使用して、注射可能な予備処方液剤を調製することができる。別の実施態様において、医薬組成物は凍結乾燥粉末剤を含む。医薬組成物を、患者に組成物を投与するための使い捨て装置を含むキットの一部として、更に包装することができる。容器又はキットにラベルを付けて周囲温度又は冷蔵温度で保存することができる。

20

30

【0610】

本明細書に記載されている全ての治療方法、医薬組成物、キット及び他の同様の実施態様は、プロドラッグ化合物が全ての薬学的に許容される塩を含むことを考慮する。

【0611】

キット

一つの実施態様において、プロドラッグ組成物を患者に投与する装置を有するキットが提供される。キットは、多様な容器、例えばバイアル、チューブ、ボトルなどを更に含むことができる。好ましくは、キットは使用説明書も含む。一つの実施態様によると、キットの装置は、エアゾール・ディスペンサーであり、ここで組成物はエアゾール装置内に予め包装されている。別の実施態様において、キットは、シリンジ及び針を含み、一つの実施態様において、プロドラッグ組成物は、シリンジの中に予め包装されている。

40

【0612】

製造方法

本明細書に記載されているプロドラッグは、標準的な合成方法、組み換えDNA技術又はペプチド及び融合タンパク質を調製する他の任意の方法により調製することができ、これらの幾つかの方法は、実施例セクションに記載されている。特定の非天然アミノ酸は標準的な組み換えDNA技術により発現することはできないが、それらを調製する技術は当

50

該技術において知られている。非ペプチド部分を包含する本発明の化合物を、適用可能であれば、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も合成することができる。

【0613】

〔実施例〕

一般的ペグ化プロトコール：（Cys-マレイミド）

典型的には、GLP-Cys類縁体をリン酸緩衝食塩水（5～10mg/ml）に溶解し、0.01Mエチレンジアミン四酢酸を加える（総容量の10～15%）。過剰量（2倍）のマレイミドメトキシPEG試薬（Dow）を加え、反応物を室温で攪拌し、その間、HPLCで反応進行をモニタリングする。8～24時間後、反応混合物を酸性化し、精製のために0.1%TFA/アセトニトリル勾配を使用する分取逆相カラムに装填する。適切な画分をまとめ、凍結乾燥して、所望のペグ化誘導体を得た。

10

【0614】

〔実施例1〕

グルカゴン及びGLP-1類縁体の合成

グルカゴン及びGLP-1のプロドラッグ誘導体を調製する可能性を調査するために、多数のペプチド類縁体と合成した。標準的な手順を本実施例において、並びに図3及び4において簡潔に記載し、詳細を後で考察する。

【0615】

材料：

20

PAM樹脂（PAM樹脂は、 OCH_2 -フェニルアセトアミドメチルーコポリスチレン-1%ジビニルベンゼンである）、（100～180メッシュ、1%DV B架橋ポリスチレン；装填0.7～1.0mmol/g）、Boc保護及びFmoc保護アミノ酸は、Midwest Biotechから購入した。 α -ヒドロキシ酸（フェニル乳酸及びグリコール酸）のような他の試薬は、Aldrichから購入した。Boc保護アミノ酸を使用する固相ペプチド合成は、Applied Biosystem 430A Peptide Synthesizerにより実施した。Fmoc保護アミノ酸合成は、Applied Biosystems Model 433 Peptide Synthesizerを使用して実施した。デブシーペプチドの手作業での合成は、焼結反応容器において類似の手順（Schnolzer, M., et al., (1992) Int J Pept Protein Res 40(3-4):180-193）を使用して実施した。

【0616】

30

ペプチド合成（Bocアミノ酸/HF切断）：

これらの類縁体の合成は、Applied Biosystem Model 430A Peptide Synthesizerにより実施した。合成ペプチドは、アミノ酸の連続付加により構築し、各アミノ酸の活性化エステルは、DMF中の1.9mmol（3.8mlの0.5M溶液）の3-（ジエトキシーホスホリルオキシ）-3H-ベンゾ[d][1,2,3]トリアジン-4-オン（DEPBT）を、2mmolのBoc保護アミノ酸を含有するカートリッジに加えることによって生成した。アミノ酸を、カートリッジの中で窒素ガスを通気することにより溶解した。1mlのN,N-ジイソプロピルエチルアミンをカートリッジに加えて、エステル形成を実施した。この溶液を、PAM樹脂に結合しているC末端残基を0.2mmol含有する反応容器に移し、数回攪拌し、10分間樹脂に結合させた。洗浄して未反応試薬を除去した後、N末端Boc保護基を、トリフルオロ酢酸（TFA）で5分間処理することにより除去した。樹脂をDMFで洗浄し、このサイクルを、鎖が組み立てられるまで工程を所望の回数繰り返した。合成の終了時（典型的には、30個のアミノ酸）には、反応容器は、およそ1.2～1.5gの保護ペプチジル-PAM樹脂を含有した。樹脂をジメチルホルムアミド（DMF）で数回洗浄し、トリフルオロ酢酸で処理して最後のtBoc保護基を除去し、DMF、ジクロロメタン（DCM）で最終的に数回追加的に洗浄し、乾燥した。

40

【0617】

ペプチジル樹脂を無水HFで処理し（このセクションの後記において手順が詳述される）、このことによって、典型的にはおよそ30mg（収率約50%）の粗脱保護ペプチドを得た。

50

【0618】

ペプチド合成（Fmocアミノ酸／HF切断）：

この合成スキームは、選択的な部位の幾つかのアミノ酸において手作業で実施した。この処理において、Fmoc保護アミノ酸は、より広範囲の合成戦略の一部として、内部セリンプロドラッグを合成するためのみに使用した。ここでは、Fmoc化学が合成に使用されるものの、ペプチドは、常に、固体支持体からペプチドを切断するためにHFによる処理を必要とするPAM樹脂に構築されることに留意するべきである。これらのペプチドの収率は、およそ、Boc／PAM合成において前述したものと同一である。

【0619】

この合成は、前のセクションに記載されたとおりに実施した。結合工程の終了時に、ペプチジル樹脂を20%ピペリジンで処理して、N末端Fmoc保護基を除去した。それをDMFで繰り返し洗浄し、この反復サイクルを結合工程の所望の回数繰り返した。全合成の終了時にペプチジル樹脂を、DCMを使用して乾燥し、ペプチドを、無水HFにより樹脂から切断した。

10

【0620】

デシーペプチド合成（アミノエステル形成）

この場合では、ペプチジル樹脂は、N末端アミンの代わりに α -ヒドロキシルN末端延長を有し、アシル化は、 α -ヒドロキシル基において実施された。この反応は、ヒドロキシル基がアミンと比較して弱い求核剤であるので、アミド結合形成よりも長い時間かかる。反応時間は、典型的には12時間であった。

20

【0621】

最初に、各アミノ酸の活性化エステルは、1mmol（0.155ml）のジイソプロピルカルボジイミド（DIC）を、DCM 2ml中のBoc保護アミノ酸残基2mmolの溶液を含有するカートリッジに加えることにより、生成した。これを10℃で10分間冷却した。0.9mmol（244mg）のジメチルアミノピリジン（DMAPI）をカートリッジに加えて、エステル形成を加速させた。この混合物を、ペプチドが合成される、ペプチジル樹脂を含有する容器に移した。反応容器を12時間攪拌した。

【0622】

ペプチジル樹脂を、DCMを使用して乾燥し、所望のペプチドの合成を続けた。全合成の終了時にペプチジル樹脂を、DCMを使用して乾燥し、無水HFで最終的に処理して、所望のペプチドを生成した。

30

【0623】

N末端ヒドロキシルペプチド合成（ α -ヒドロキシルN末端延長）

この反応では、ペプチジル樹脂の遊離アミンを α -ヒドロキシル酸と反応させて、 α -ヒドロキシルN末端延長を形成する。この点において、そのような α -ヒドロキシル酸を2つのみ使用し、すなわち、グリコール酸（OH-グリシン）及びフェニル乳酸（OH-フェニルアラニン）であった。これらの合成も手作業で実施した。ペプチドを α -ヒドロキシル酸の添加により構築し、 α -ヒドロキシル酸の活性化エステルは、0.9mmolのDEPBT（270mg）を、DMF 2ml中のBoc保護残基1mmolの溶液を含有するカートリッジに加えることによって生成した。0.5mlのDIEA（N,N-ジイソプロピルエチルアミン）をカートリッジに加えて、エステル形成を加速させた。この混合物を、ペプチドが合成される、ペプチジル樹脂を含有する容器に移した。反応時間は、6時間であった。

40

【0624】

ペプチジル樹脂を、DCMを使用して乾燥し、所望のペプチドの合成を続けた。全合成の終了時にペプチジル樹脂を、DCMを使用して乾燥し、無水HFで切断して、遊離ペプチドを生成した。

【0625】

ペプチジル樹脂のHF処理

ペプチジル樹脂（30mg～200mg）を切断のためにフッ化水素（HF）反応容器に入れた。500 μ Lのp-クレゾールを、カルボニウムイオンスカベンジャーとして容器に

50

加えた。容器をHF系に接続し、メタノール／ドライアイス混合物の中に沈めた。容器を真空ポンプで排気し、10mlのHFを蒸留して反応容器の中にいれた。このペプチジル樹脂とHFの反応混合物を0℃で1時間攪拌し、その後、真空を確立し、HFを素速く排気した（10～15分間）。容器を注意深く取り外し、およそ35mlのエーテルを充填して、ペプチドを沈殿させ、FH処理によりもたらされたp-クレゾール及び小型有機保護基を抽出した。この混合物を、テフロンフィルターを利用して濾過し、2回繰り返して、全ての過剰クレゾールを除去した。この濾液を廃棄した。沈殿ペプチドを、およそ20mlの10%酢酸（水溶液）で溶解した。所望のペプチドを含有するこの濾液を収集し、凍結乾燥した。

【0626】

10

質量分析を使用した分析

質量スペクトルを、標準的なESIイオン供給源を備えたSciex API-IIIエレクトロスプレー四重極質量分析機を使用して得た。使用したイオン化条件は以下である：陽イオンモードのESI；イオンスプレー電圧3.9kV；オルフィス電位60V。使用した噴霧及びカーテングスは、流速、9L/分の窒素であった。質量スペクトルを、1工程あたり0.5Th及び滞留時間が2ミリ秒の600～1800Thompsonで記録した。試料（約1mg/mL）を、1%酢酸を有する50%アセトニトリル水溶液に溶解し、外部シリンジポンプにより5μL/分の速度で導入した。

【0627】

ペプチドをESI-ESによりPBS溶液で分析したとき、最初にこれらを、製造会社（Millipore Corporation, Billerica, MA、<http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737>を参照すること）により提示された説明書に従って、0.6μLのC4樹脂を含有するZipTip固相抽出チップを使用して脱塩した。

20

【0628】

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析：

予備分析を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及びMALDI分析を使用して、これらの粗ペプチドにより実施して、リン酸緩衝食塩水（PBS）緩衝剤（pH7.2）における相対的変換率の近位値を得た。粗ペプチド試料を、1mg/mLの濃度でPBS緩衝剤に溶解した。1mlの得られた溶液を1.5mlのHPLCバイアルに保存し、次に密封して37℃でインキュベートした。100μlのアリコートが多様な時間間隔で抜き取り、室温に冷却し、HPLCで分析した。

30

【0629】

HPLC分析は、214nmでUV検出器を使用するBeckman System Gold Chromatography系を使用して実施した。HPLC分析は、150mm×4.6mmのC18 Vydacカラムで実施した。流速は1ml/分であった。溶媒Aは、蒸留水中0.1%TFAを含有し、溶媒Bは、90%CH₃CN中0.1%TFAを含有した。直線勾配を用いた（15分間で40%から70%のB）。データを収集し、Peak Simple Chromatographyソフトウェアを使用して分析した。

【0630】

加水分解の初期速度を使用して、それぞれのプロドラッグの解離速度定数を測定した。プロドラッグ及び薬剤の濃度を、それぞれのピーク領域から推定した。プロドラッグの一次反応解離速度定数を、多様な時間間隔でプロドラッグの濃度の対数をプロットすることにより決定した。このプロットの勾配は、速度定数「k」を与える。次に多様なプロドラッグの分解の半減期を、式： $t_{1/2} = 0.693/k$ を使用して計算した。

40

【0631】

HPLCを使用した分取精製

およそその $t_{1/2}$ を示すプロドラッグが確認されると、プロドラッグを精製した。精製は、シリカに基づいた1×25cmのVydac C18（粒径5μ、孔径300Å）カラムのHPLC分析を使用して実施した。使用した器具は、Waters Associates 600型ポンプ、717型注入器及び486型UV検出器であった。214nmの波長を全ての試料に使用した

50

。溶媒 A は、蒸留水中 10% $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、1% TFA を含有し、溶媒 B は、 CH_3CN 中 0.1% TFA を含有した。直線勾配を用いた（2 時間で 0% から 100% の B）。流速は、1.2 ml/分であり、画分の大きさは 6 ml であった。約 350 mg の粗ペプチドから、典型的には 80 mg の純粋なペプチド（収率約 23%）を得た。

【0632】

〔実施例 2〕

バイオアッセイ実験設計：cAMP 検出のためのルシフェラーゼに基づいたレポーター遺伝子アッセイ

cAMP を誘導するグルカゴン及び GLP-1 類縁体又はプロドラッグのそれぞれの能力を、ホタルルシフェラーゼに基づいたレポーターアッセイにより測定した。誘導される cAMP 産生は、受容体へのグルカゴン又は GLP-1 の結合に正比例している。グルカゴン又は GLP-1 受容体のそれぞれと、cAMP 応答配列に結合しているルシフェラーゼ遺伝子とを同時形質移入された HEK293 細胞を、バイオアッセイに用いた。

【0633】

細胞を、0.25% ウシ増殖血清（HyClone, Logan, UT）が補充されたダルベッコ最小必須培地（Invitrogen, Carlsbad, CA）における 16 時間の培養により血清を取り除き、次に GLP-1 類縁体又はプロドラッグいずれかの希釈系列と共に、96 ウェルポリーD-リシン被覆「バイオコート」プレート（BD Biosciences, San Jose, CA）において 37°C、5% CO_2 で 5 時間インキュベートした。インキュベーションの終了時に、100 μL の LucLite ルミネセンス基質試薬（Perkin-Elmer, Wellesley, MA）を各ウェルに加えた。プレートを短時間振とうし、暗黒で 10 分間インキュベートし、発光を 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。有効 50% 濃度（ EC_{50} ）は、Origin ソフトウェア（OriginLab, Northampton, MA）を使用して計算した。

【0634】

〔実施例 3〕

GLP-1 アミドに基づいたプロドラッグの生体活性

I) GLP-オキシントモジュリン

最後の 8 個のアミノ酸がオキシントモジュリン由来である GLP-オキシントモジュリンキメラペプチド（配列番号 610）を合成した。

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGKRNRNNIA
（配列番号 610）

【0635】

このキメラペプチドを合成する合理的な背景は、（1）およそ 4300 Da の質量のペプチドを合成できることを実証すること及び（2）このペプチドが生物学的に活性があることが示される場合、延長 C 末端を有する GLP-1 類縁体を、他の修飾を有する GLP-1 ペプチドの塩基配列として使用できること、という 2 つであった。

【0636】

GLP-オキシントモジュリンペプチドは、4322.5 ダルトンの質量を有することが見出された。GLP-オキシントモジュリンペプチドの受容体結合活性は、実施例 2 に記載されている GLP-受容体ルシフェラーゼアッセイにより、ルシフェラーゼアッセイにおける天然 GLP-1 ペプチドと少なくとも同じ程度に強力であると決定された。

【0637】

II) N 末端へのジペプチドの付加

分子内環化、切断及びジケトピペラジン（DKP）又はジケトモルホリン（DMP）の形成におけるプロドラッグの能力を研究するために、異なるジペプチドを GLP-1（aa7-37）の N 末端に共有結合した。生物学的に不活性なジペプチド延長 GLP-1 ペプチドを、DKP 又は DMP の形成を伴うアミド結合の切断による活性ペプチド薬剤 GLP-1（aa7-37）への変換のために設計した。これを図 5A 及び 5B に概略的に表す。多様な半減期を有するプロドラッグは、ジペプチドのアミノ酸の側鎖（ R_1 及び R_2

）を化学的に修飾することにより想像される。

【0638】

合成された第1ペプチド（ $G_5P_6H_7$ ，GLP（8-37）と呼ばれる）は、GLP-1（aa7-37）のN末端に結合しているGly-Proジペプチドを含んだ。ペプチドを、上記に記載された固相合成により合成的に調製した。合成は、MALDI-MS分析により確認した（3509.5Da）。

【0639】

Pro-Proジペプチド又はPro-Hisジペプチドのいずれかを含むGLP-1（aa7-37）に基づいたペプチドプロドラッグを、同様に合成した。ジペプチド延長Gly-Phe又はPhe-Pheを合成して、アミド結合の切断を立体的に補助することによりDPK形成を促進した。プロリンのシス配向は、DKPの形成に最適な立体配座をジペプチドが採用するのを促進することに寄与すると仮定された。

10

【0640】

Pro-Hisジペプチドを含むペプチドに関して、目的のカルボニル結合は、2つのヒスチジン（アミノ酸Y及びヒスチジル離脱基）の間に挟まれていた。この設計は、ジケトピペラジン形成を介したアミド結合のプロトン補助切断を対象とした。

【0641】

アミド結合の酸塩基触媒された一般的な加水分解は、単一アミノ酸（ γ -Glu、Glu、Phe又はHis）の付加を含むペプチドを合成することによって試みられた。離脱基が活性ペプチド（GLP-1（aa7-37））のN末端のヒスチジンであるので、イミダゾール環が、一般的な酸塩基触媒による切断を補助しうることが目的であった。

20

【0642】

N末端延長ペプチドを、それぞれ、PBS緩衝剤において37℃でおよそ1週間インキュベートした。あるいは、ペプチドを、それぞれ100℃で120分間加熱して、アミド結合の切断を加速した。プロドラッグの切断を逆相HPLC及びMSで分析した。表1に示されているように、切断されたペプチドのうち、アミド結合の強靱さを示しているものはない（表1）。

【0643】

表1：天然GLP-1（aa7-37）を形成するための H_7 ，GLP（7-37）プロドラッグの切断の試み

30

【表 1】

化合物 番号	ペプチド (Xaa ¹ Yaa ² -GLP1)	100°C における 切断速度	37°C における 切断速度
1	GP	切断なし	切断なし
2	PP	切断なし	切断なし
3	γ Glu	切断なし	切断なし
4	E	切断なし	切断なし
5	P	切断なし	切断なし
6	H	切断なし	切断なし
7	PH	切断なし	切断なし

化合物 4、5 及び 6 では、単一アミノ酸が G L P - 1 の N 末端に付加された。

全ての場合において、G L P - 1 の 1 位（ヒスチジル離脱基）にはヒスチジンがある。

【0644】

これらのデータに基づいて、イミダゾール核は、アミド結合の切断を緩和する役割を果たしたと仮定した。この可能性を試験するために、異なる離脱基を有するペプチドを研究した。具体的には、7 位の H i s が P h e で置換されている G L P - 1 の a a 7 - 3 7 を含むペプチド（F₇, G L P（8 - 3 7）と呼ばれる）を、上記に記載された手順を使用して合成し、精製した。このペプチドは、天然 G L P の 10 % の抗力を有する完全なアゴニストと決定された。ジペプチドを F₇, G L P（8 - 3 7）の N 末端に付加して、ジペプチドと活性ペプチド（F₇, G L P（8 - 3 7））の N 末端との間のアミド結合の切断及び D K P の形成について研究した。F₇, G L P（8 - 3 7）の第 1 ペプチドプロドラッグにおいて、G l y - P r o を N 末端に付加し、第 2 ペプチドプロドラッグでは、サルコシンを使用し、このことは、切断速度を増強することが以前に報告されている（Hamel, A. R. et al., (2004) Journal of Peptide Research 63: 147-154）。両方のジペプチド延長はアミド結合の切断を立体的に補助するように設計されているが、アミド結合は、切断に対して耐性の状態を維持した（表 2）。

【0645】

表 2：ジペプチド延長 F₇, G L P（7 - 3 7）の切断の試み

【表 2】

化合物 番号	ペプチド (Xaa ¹ Yaa ² -F ^{7a} -GLP8-37)	100°C における 切断速度	37°C における 切断速度
1	GP	切断なし	切断なし
2	GSar ^b	切断なし	切断なし

「a」：全ての場合において、G L P の 1 位（フェニルアラニン離脱基）にはフェニル

アラニンがある。

「b」：S a rはサルコシンを表す。

【0646】

I I I) F₇, G L P (8-36) - C E XのN末端へのジペプチドの付加

F₇, G L P (8-37) 類縁体は、P B S中で37℃で不十分な溶解性を示すことが見出された。したがって、酸基の代わりにC末端アミドを有するエキセンディン-4の最後の10個のアミノ酸を含む、配列番号611の修飾G L P-1 類縁体 (G L P (7-36) - C E Xアミドと呼ばれる) を調製した。

H₇ A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G X P S S G A P P P S - アミド (配列番号611)

10

【0647】

G L P (7-36) - C E Xアミドは、天然G L P-1 配列よりもインビトロにおいておよそ10倍を超えて強力であることが観察されており、このペプチドの類縁体は、P B S中で明らかに溶解度がより高いことが見出されている。

【0648】

G l y - G l yジペプチド (G₅ G₆ F₇, G L P (8-36) - C E X) 又はアルファアミノ基がヒドロキシル基で置換されたO H - G l y - G l yジペプチド (O H - G₅ G₆ F₇, G L P (8-36) - C E X) を含む、7位のH i sがP h eに代わっているG L P (7-36) - C E Xアミドの類縁体のプロドラッグを合成した。これらのペプチドを試験し、嵩高の少ないグルシル離脱基の効果を調べ、いずれかの求核剤 (アミン又はヒドロキシル) が2, 5-ジケトピペラジン又は2, 5-ジケトモルホリンのそれぞれの形成によりアミド結合を切断し、それによって活性F₇, G L P (8-36) - C E Xペプチドを再生できるかについて決定した。プロドラッグの切断を、上記に記載されたとおりに試験し、結果を表3に示す。

20

【0649】

表3：G₇, G L P (7-36) - C E XのN末端へ付加されたジペプチドの切断の試み
【表3】

化合物 番号	ペプチド (Xaa1Yaa2- G ^{7a} GLP-CEX)	100℃における 切断速度	37℃における 切断速度
3	GG	切断なし	切断なし
4	HO-GG	切断なし	切断なし

30

「a」：全ての場合において、G L Pの1位 (グリシル離脱基) にはグリシンがある。

【0650】

表3に示されている結果に基づいて、アミド結合は、2, 5-ジケトピペラジン (D K P) 又は2, 5-ジケトモルホリン (D M P) のいずれかの形成による生理学的条件下での切断が非常に困難であると結論付けられた。このことは、高温下であっても、試験した求核剤及び離脱基と無関係であった。

40

【0651】

〔実施例4〕

G L P-1 エステルに基づいたプロドラッグの生体活性

I V) デシーペプチド及びエステル

デシーペプチドは、エステル結合を介して別のペプチドのN末端のヒドロキシル基にジペプチドを付加することによって合成した。結合手順は、実験セクションに記載されており、これらは極めて効果的であることが実証された。前記のように、分子内環化 (ジケト

50

ピペラジン形成)及び母体薬剤(N末端ヒドロキシルペプチド)の放出について異なる傾向のジペプチドを研究した。ジペプチドを付加するに際し、エステル結合を切断するアミン求核剤とエステル結合を切断するヒドロキシル求核剤の両方を調製し、研究した。

【0652】

V) HO-F_7 , $\text{GLP}(8-36)-\text{CEX}$ のOH末端へのジペプチドの付加

HO-F_7 , $\text{GLP}(8-36)-\text{CEX}$ ペプチドを、 $\text{GLP}(8-36)-\text{CEX}$ PAM樹脂から合成し(合成スキームを図1に表す)、これらの実験において母体薬剤として役立てた。このペプチドは、 0.008 nM の EC_{50} 値を有し(図2)、一方、天然 GLP-1 は、 0.011 nM の EC_{50} 値を有す。したがって、 HO-F_7 , $\text{GLP}(8-36)-\text{CEX}$ は、天然 GLP-1 と少なくとも同じ程度に強力であることが見出された。このことは最も重要であり、ヒスチジンをフェニル乳酸で置換できるので、いくらか予想外の観察である。このことは、追加の評価の根拠となった。続く実験は、同様の結果をもたらした。この結果は HO-F_7 , $\text{GLP}(8-36)-\text{CEX}$ の CEX 延長の機能である可能性が存在する。この点において、エキセンディン-4のC末端領域が GLP-1 受容体への親和性を増加すると報告されている。

10

【0653】

HO-F_7 , $\text{GLP}(8-36)-\text{CEX}$ の α ヒドロキシル基をアシル化し、エステル結合を切断するアミン求核剤(図5A)及びエステル結合を切断するヒドロキシル求核剤(図5B)の両方を調製し、研究した。図5A及び図5Bに示されているように、2,5-ジケトピペラジン(アミン求核剤)又は2,5-ジケトモルホリン(ヒドロキシル求核剤)と共に、生物学的に活性な HO-F_7 , $\text{GLP}(8-36)-\text{CEX}$ が放出される。

20

【0654】

2,5-ジケトピペラジン(DKP)又は2,5-ジケトモルホリン(DMP)の可能な形成及び HO-F_7 , $\text{GLP}(8-36)-\text{CEX}$ の同時の生成を探索するために、プロドラッグをPBS緩衝剤において 37°C でおよそ1週間インキュベートした。またペプチドを 100°C で加熱して、切断に対する感受性を決定した(表4)。

【0655】

表4:ジペプチド延長 HO-F_7 , $\text{GLP}(7-36)-\text{CEX}$ の切断

【表 4】

ペプチド 番号	ペプチド (Yaa1Xaa2-O-Phe ⁷ -GLP-8-36-CEX)	37°C における 切断の $t_{1/2}^*$
1	Gly-Gly	0.87 時間
2	HO-Gly-Gly	1.13 時間
3	HO-Phe-Val	切断なし
4	HO-Phe-dVal	50.58 時間
5	HO-Phe-Ala	2.83 時間
6	HO-Phe-dAla	2.41 時間
7	HO-Phe-Gly	2.46 時間
8	HO-Phe-Phe	33.31 時間
9	HO-Phe-dPhe	7.65 時間
10	Phe-Val	64.0 時間

10

20

* $t_{1/2}$ は P B S (p H 7. 2) における 3 7 °C での H O - P h e - G L P 8 - 3 6 - C E X の 5 0 % 放出に必要な時間である。標準的な一次反応プロットにより計算される。# 3 含むこれらのエステルは全て 1 0 0 °C で切断された。全ての場合において、G L P の 1 位 (ヒドロキシルフェニルアラニン離脱基) には H O - P h e がある。

【0 6 5 6】

表 4 に示されている最初の 2 つのペプチド (ペプチド 1 及び 2) を分析して、いずれかの求核剤 (アミン又はヒドロキシル) がエステル結合を D K P 又は D M P それぞれの形成により切断できるかを決定した。結果は、エステルがアミドよりも切断に対してより感受性があるという予想を確認した。ペプチド 3、4、8、9 及び 1 0 の比較的遅い切断速度は、ジペプチド延長 (P h e 又は V a l) の嵩高がプロドラッグ切断速度に大きく影響を与えたことを示唆している。メチルと水素側鎖の間に実質的に差はないが (ペプチド 5、6 及び 7)、イソプロピル基 (β 分岐) の存在は、ペプチド 3、4 及び 1 0 において明白なように、エステル切断の速度を著しく減速させる。ヒドロキシルと比較してアミンがより強力な求核剤であるので、ペプチド 1 0 はペプチド 3 よりも速く解離し、これは、ペプチド 1 及び 2 においても実証されている。最後に、ペプチド 8 及び 9 の間の $t_{1/2}$ の大きな差は、ジペプチドにおける側鎖の相互作用 (図 5 A 及び 5 B の R_1 及び R_2) も、重要な役割を果たすことを示している。この同じ効果がペプチド 3 及び 4 において示されている。両方の場合において、L、D-ジペプチドジアステレオ異性体は、対応する L、L-ジアステレオ異性体よりも速く切断される。

30

40

【0 6 5 7】

ペプチド 4、8 及び 1 0 の構造を図 6 A ~ 6 C に表す。観察されたプロドラッグの半減期は、置換基 X が嵩高になると増加する (表 4 のペプチド 3、4、8、9 及び 1 0)。これは、おそらく、X の大きさが増加すると遷移状態 (T S) がより立体障害的になるためである。したがって活性化エネルギーが増加し、それによってプロドラッグの安定性が増加する。

【0 6 5 8】

50

これは、2対の立体異性体（ペプチド3と4、8と9）において特に例示されている。ここで、ジペプチド延長のC末端の単一アミノ酸の立体化学を変えることによって、速度に大きな差が観察された。対応する遷移状態の立体障害は、L, D-ジアステレオ異性体と比較してL, L-ジペプチドジアステレオ異性体においてはるかに大きい。したがって、ペプチド3は、ペプチド4と比較してより大きい $t_{1/2}$ を有し、ペプチド8は、ペプチド9よりも大きい $t_{1/2}$ を有する。

【0659】

ペプチド10は、 $F_5V_6-O-F_7$, GLP(8-36)-CEXである。これは64時間の $t_{1/2}$ を有し、生理学的条件下での切断において最長の持続時間のプロドラッグを表す。この場合の遷移状態は、フェニルアラニルとバリル側鎖との立体相互作用のため、かなり妨げられている。

【0660】

母体薬剤 $HO-F_7$, GLP(8-36)-CEX(4019Da)を形成するペプチド10(図6B)(4264Da)の切断は、分子内環化である。したがって、他の不純物の存在は、内部解離の速度に影響を与えないと想定される。加えて、プロドラッグ及び薬剤の両方を、汚染ペプチドの最中でもMALDI分析により追跡している。

【0661】

類似デシペプチドの第2セットも、切断速度に対するジペプチド延長構造の効果を更に試験して研究した(表5)。これらの合成は、図3及び4に概説されたものと同じパターンに従っている。主な差は、この場合では、 R_2 又はY部位が嵩高フェニルアラニルの代わりに障害の少ない水素(グリシル残基)であることである。この場合、グリコール酸(OH-グリシン)又はグリシンをプロドラッグの末端に使用した。

【0662】

表5： $HO-G_5X_6-O-F_7$, GLP(7-36)CEXのエステル結合の切断

【表5】

化合物番号	ペプチド (Yaa1Xaa2-O-Phe ⁷ -GLP-8-36-CEX)	37°Cにおける 切断の $t_{1/2}$ *
1	Gly-Gly	0.87 時間
2	HO-Gly-Gly	1.13 時間
3	HO-Gly-Val	4.70 時間
4	HO-Gly-dVal	5.13 時間
5	HO-Gly- ¹ AIB	0.75 時間
6	HO-Gly- ² PhG	0.49 時間
7	HO-Gly- ³ tBut	切断せず
8	HO-Gly-Phe	0.70 時間
9	HO-Gly-dPhe	0.93 時間
10	Gly-Val	20.38 時間

$t_{1/2}$ はPBS(pH7.2)における37°Cでの $HO-Phe-GLP8-36-CEX$ の50%放出に必要な時間である。標準的な一次反応プロットにより計算される。

これらのエステルは全て100℃で切断された。全ての場合において、GLPの1位（ヒドロキシルフェニルアラニン離脱基）にはOH-Ph eがある。₁ A I B：α-アミノイソ酪酸；₂ Ph G：フェニルグリシン；₃ t B u t：第三級ブチル

【0663】

分析は、既に説明したものと同一方法で完了した。表4に示されている最初の2つのペプチド（ペプチド1及び2）を分析して、いずれかの求核剤（アミン又はヒドロキシル）がエステル結合を2, 5-ジケトピペラジン又は2, 5-ジケトモルホリンそれぞれの形成により切断できるかを決定した。これら2つのペプチドを表5により分析し、再度試験して、陽性対照として役立てた。予測したように、研究した求核剤は両方ともエステル結合を切断することができた。この化合物セット（表5の化合物2～9）は、立体嵩高が除去されているので、前記の場合よりも速く切断すると予測される。Xの大きさが構造的に嵩高になると、遷移状態はますます密集してくる。したがって活性化エネルギーが増加し、それによってプロドラッグの安定性が増加する。このことは、Xがイソプロピル（バリン）基である化合物10において見られる（化合物構造については図6Dを参照すること）。Xが第三級ブチル基（化合物7）である場合、化合物は、37℃のPBS緩衝剤（pH7.2）において全く切断しない。表5において、立体異性体の対（化合物3と4、8と8）は、ほぼ同じ速度で解離する。このことは、おそらく、立体異性体がエネルギーにおいて大きな差を示さないからである（おそらく、グリシンの非キラル性質のためである）。したがって、この場合では、グリシル、L-ジペプチド延長及びグリシル、D-ジペプチド延長の両方は、同等のエネルギー遷移状態を有する。

10

20

【0664】

化合物3が化合物10よりも速く解離するという観察は、pH7.2及び37℃でアミンと比較すると、ヒドロキシルがより強力な求核剤であることを示唆している。この異常についての1つの可能な説明は、N末端アミンのpKaが化合物10において僅かに増加しているということでありうる。その結果、7.2のpHにおいて、アミン求核剤は、不均衡にプロトン化され、したがってプロドラッグ切断のより遅い速度の原因となっている。

【0665】

したがって、この結果は、側鎖の構造特性（特に、バリン及びtert-ブチルグリシンを含有するジペプチドにおいて明らかなβ分岐）を示し、求核剤の立体化学及びpKaは、切断の相対的速度を決定する役割を果たす。幾つかの速い及び遅い切断エステルプロドラッグ候補が同定され、生物作用能について試験した。

30

【0666】

V I）選択された長期作用プロドラッグ候補のバイオアッセイ

4つの長期持続時間プロドラッグを生物作用能試験による更なる分析のために選択した。全てのペプチドをHPLCにより精製し、MALDI-MS分析により質量を確認した後、ルシフェラーゼに基づいたバイオアッセイを実施した。抗力率を、母体の平均EC₅₀と対応するプロドラッグの平均EC₅₀とを比較する目的で計算した。結果を表6にまとめる。

【0667】

表6：選択した長期作用エステルプロドラッグのバイオアッセイ

40

【表 6】

類縁体 番号	ペプチド($t_{1/2}$): (Yaa1Xaa2-O-Phe-GLP-8- 36-CEX)	EC ₅₀ ± 標準偏差 (nM)	母体に対する %活性
1	HO-F ⁷ -GLP8-36 CEX (母体薬剤候補)	0.028 ± 0.006	100% (母体薬剤)
2	HO-Phe-dVal ($t_{1/2}$ = 50.5 時間)	0.40 ± 0.06	7%
3	Phe-Val ($t_{1/2}$ = 64.0 時間)	2.070 ± 0.41	1.3%
4	HO-Phe- Phe ($t_{1/2}$ = 33.3 時間)	0.771 ± 0.249	3.6%
5	Gly-Val ($t_{1/2}$ = 20.3 時間)	0.230 ± 0.10	12%

10

【0668】

これらの観察は、エステル結合ジペプチド配列の、母体薬剤の末端ヒドロキシル基への付加が、薬剤の効力を顕著に低減することを明白に示している。2つのペプチドを更に分析して、プロドラッグがPBS (pH 7.2) における24時間のインキュベーションの後で母体薬剤の効力に戻るかを決定した。選択されたペプチドは、 $t_{1/2}$ 値に基づいて類縁体4及び5 (表6) であった。

20

【0669】

これらの実験は、HPLC精製試料を使用し、ルシフェラーゼに基づいたアッセイにより実施した。効力率の計算は、母体の平均EC₅₀とプロドラッグの平均EC₅₀とを比較して行った。結果を表7にまとめ、図7及び8に図示する。

【0670】

表7：プロドラッグから薬剤への変換を示すバイオアッセイの結果

30

【表 7】

類縁体 番号	ペプチド ($t_{1/2}$): (Yaa1Xaa2-O-Phe-GLP-8- 36-CEX)	EC ₅₀ ± 標準偏差 (nM)	母体に対する %活性
GLP-1 母体	HO-F ⁷ -GLP8-36-CEX (母体薬剤候補)	0.023 ± 0.010	100% (母体薬剤)
5 (168 時間)*	Gly-Val ($t_{1/2}$ = 20.3 時間) 168 時間インキュベート済み	0.024 ± 0.012	95.8 %
4 (0 時間)	HO-Phe- Phe ($t_{1/2}$ = 33.3 時間) インキュベーション前	0.612 ± 0.270	3.7 %
4 (24 時間)	HO-Phe- Phe ($t_{1/2}$ = 33.3 時間) 24 時間インキュベート済み	0.134 ± 0.050	17.2 %
5 (0 時間)	Gly-Val ($t_{1/2}$ = 20.3 時間) インキュベーション前	0.211 ± 0.072	10.9 %
5 (24 時間)	Gly-Val ($t_{1/2}$ = 20.3 時間) 24 時間インキュベート済み	0.05 ± 0.020	46 %

* - P B S 中で 1 週間インキュベーションした後の類縁体 5 (効力はほぼ完全に回復した)

0 - 括弧内の時間は対応するペプチドのインキュベーションの時間を意味する

【0671】

表 7 の類縁体 5 は、1 週間のインキュベーションの後でその効力は母体薬剤に近い効力に変換されている。両方のプロドラッグは、母体薬剤への漸進的変換のため、P B S 中で 24 時間インキュベートされた後、大きな効力を示す (図 7 及び 8 を参照すること)。

【0672】

V I I) ペプチドの内部部位からのエステルプロドラッグ

本明細書に開示されているプロドラッグは、生理学的条件下 (p H = 7. 2 及び温度 = 37 °C) で自発的に変換して、母体薬剤を生じる。この変換においては、p H 及び温度に依存しており、それはこれらが生理学的に実質的に不変であるからであり、またこのことは、プロドラッグから活性形態へのあらゆる特定の酵素仲介プロセッシングの必要性を排除する。N 末端に確立されたプロドラッグ化学は、また、エステルプロドラッグを調製することができる内部生体活性部位への使用に転化可能であるはずである。

【0673】

エステルプロドラッグを作製するために、ジペプチドを付加することができるセリン／トレオニン残基の賢明な選択が探索されてきた。ペプチドは、G L P - 1 の末端での結果と同様の様式で、ジペプチドの付加の前に生物学的に活性でなければならず、付加の後で不活性でなければならない。したがって、ペプチド変種を、プロドラッグ修飾形態の探求の前に、生物学的活性について試験した。

【0674】

内部部位におけるプロドラッグの合成及び分析

2つのペプチドを、内部プロドラッグ候補開発の可能な出発点として合成した。第1のペプチドは、(H7F), (E9Q), GLP(8-36)-CEXであり、第2のペプチドは、(H7F), (E9Q), (T11S), GLP(8-36)-CEXであった。エステルプロドラッグの合成は、第5アミノ酸のヒドロキシル基((H7F), (E9Q), GLP(8-36)-CEX及び(H7F), (E9Q), (T11S), GLP(8-36)-CEXそれぞれのトレオニン又はセリン側鎖)において試みられた。これらの分子では、12位のPheまで、PAM樹脂に対してBocベンジル型合成を実施した。残りの合成は、Fmocに基づいた化学を使用して完了した。このことは、セリン側鎖の保護基を選択的に除去し、多くの全ての保護基をそのまま残す機会を与えた。このことは、11位のセリンの遊離ヒドロキシル基の選択的アシル化を可能にした。

【0675】

より詳細には、Bocベンジル戦略は、セリンのヒドロキシル保護ベンジル基が、除去のためにHF処理を必要とするので、合成の全体にわたって使用することができなかった。したがって、HF処理が樹脂からペプチドを同時に除去するので、エステルプロドラッグをペプチド樹脂において合成することができなかった。これが、Serを11位(Fmoc-O-tブチル-L-セリン)に付加し、続いてGly、Gln、Ala及びPheをFmoc-保護アミノ酸として付加した理由である。セリンのt-ブチル保護基は、TFAで2時間処理して選択的に除去した。Boc保護ジペプチド部分をこのヒドロキシル基に付加して、エステルプロドラッグの合成を終了させた。最終Boc保護基をTFAで処理して除去し、N末端Fmoc基をDMF中20%ピペリジンで処理して除去した。これは、セリン及びトレオニン残基のヒドロキシル側鎖からジペプチドエステルを構築する有用な戦略であることが見出された。3位のグルタミン酸残基もグルタミンで置換して、側鎖カルボキシル基へのあらゆる不要な結合を防止した。これは、以前の報告が3位はGLP-1効力にとって重要でないと示唆しているので、活性の損失をもたらさないと想定された。

【0676】

既に記載したように、HPLCによるこれらのペプチドの精製及びMALDIによる質量の確認の後、バイオアッセイを実施した。抗力率を計算し、ペプチド(薬剤候補)の平均EC₅₀を天然GLP-1の平均EC₅₀と比較した。結果を表8にまとめ、図9に示す。

【0677】

表8：内部セリン／トレオニン薬剤候補のバイオアッセイの結果

【表8】

化合物 番号	ペプチド (t _{1/2})	EC ₅₀ ±標準偏差 (nM)	GLP-1 に対する %活性
1	GLP-1	0.02 ± 0.00	100%
2	F ⁷ Q ⁹ S ¹¹ -GLP8-36 CEX	0.10 ± 0.02	20 %
3	F ⁷ Q ⁹ T ¹¹ -GLP8-36 CEX	0.06 ± 0.02	33.33 %

GLP-1を基準として使用した。

【0678】

ペプチド(H7F), (E9Q), GLP(8-36)-CEX及び(H7F), (E9Q), (T11S), GLP(8-36)-CEXは、それぞれ天然GLP-1の20%及び33.3%の効力を有する完全なアゴニストであった。これら両方のペプチドは、可能性のある薬剤候補として開発するのに十分に強力であると決定された。

【0679】

G l y - G l y ジペプチドは、合成の容易さについての初期調査として、G L P - 1 類縁体へ付加されることが想像された。セリン側鎖のヒドロキシル基は、より嵩高のトレオニン側鎖と比較して容易にアシル化された。1つの可能性のあるプロドラッグである (H 7 F), (E 9 Q), [T 1 1 S - O β - (G l y - G l y)], G L P (8 - 3 6) - C E X は、G l y - G l y ジペプチドをセリン側鎖のヒドロキシル基へ付加することにより合成した。この点において、G l y - G l y 末端エステルプロドラッグの $t_{1/2}$ は、約1時間であり (表5)、一方、内部エステルプロドラッグの $t_{1/2}$ は、およそ3倍長いことが見出された。

【0680】

(H 7 F), (E 9 Q), [T 1 1 S - O β - (G l y - G l y)], G L P (8 - 3 6) - C E X プロドラッグは、 $t_{1/2} = 2.7$ 時間で解離して、2, 5 - ジケトピペラジン (D K P) と共に、母体薬剤の (H 7 F), (E 9 Q), (T 1 1 S), G L P (8 - 3 6) - C E X を生じることが観察された。このプロドラッグの絶対効力は、その半減期が、細胞培養に基づいたルシフェラーゼアッセイにおけるプロドラッグのインキュベーション時間 (5時間) よりも短いので、決定されなかった。プロドラッグの半減期 (2.7時間) は、ほぼ70%のプロドラッグが活性実体に5時間で変換したことを示し、したがって、アッセイをこのプロドラッグで正確に実施することができなかった。しかし、内部セリンプロドラッグを活性実体に変換する能力は確立された。

【0681】

プロドラッグから薬剤への変換条件 ($pH = 7.2$ 及び温度 = $37^{\circ}C$) は、生理学的に実質的に不変であるので、G L P - 1 のO末端に確立されたプロドラッグ化学を、内部部位からの切断に使用することも見出された。

【0682】

〔実施例5〕

以下の実施例において、アミノ酸位置は、野生型で未熟の G L P - 1 (配列番号 6 6 7) に従っており、全てのペプチドは、C末端カルボキシレート基の代わりにC末端アミド基を含んだ。

【0683】

初期平均体重の $49.5 g$ を有する6群の糖尿病誘導肥満 (D I O) マウス (1群あたり8匹のマウス) に、 $2 nmol/kg$ の P B S ビヒクル対照及び下記に記載されたペプチド A ~ E の1つで腹腔内注射した。

【0684】

ペプチド A (本明細書において「ペプチド B (d F, d F)」とも呼ばれる) は、G L P - 1 に基づいたペプチドのプロドラッグであり、そのプロドラッグジペプチド部分 (d - P h e - d P h e) は、ペプチド B と呼ばれる生体活性 G L P - 1 ペプチドにO末端を介して結合している。ペプチド A は、配列番号 6 4 5 のアミノ酸配列を有する。

【0685】

ペプチド B (本明細書において、「H O - P h e 7, G l u 2 2 G L P - C e x」ともよばれる) は、ペプチド A 及び C の G L P - 1 に基づいたペプチドの非プロドラッグ形態である。ペプチド B は、配列番号 6 4 6 のアミノ酸配列を有し、7位の H i s がフェニル乳酸 (P L A) で置換され、8位の A l a が A I B で置換されている、22位の G l y が G l u で置換されている、そしてC末端がエキセンディン-4のC末端アミノ酸により9個のアミノ酸で延長されている点において、天然 G L P - 1 (配列番号 6 6 7) と異なっている。

【0686】

ペプチド C (本明細書において「ペプチド B (d F, d V)」とも呼ばれる) は、ペプチド B の G L P - 1 に基づいたペプチドの第2プロドラッグ形態であり、そのプロドラッグジペプチド部分 (d - P h e - d - V a l) は、生体活性 G L P - 1 ペプチドにO末端を介して結合している。ペプチド C は、配列番号 6 4 7 のアミノ酸配列を有する。

【0687】

ペプチドD（本明細書において「Ser11, Glu22 GLP-Cex」とも呼ばれる）は、GLP-1に基づいたペプチドであり、11位のThrがSerで置換されている、8位のAlaがAlBで置換されている、22位のGlyがGluで置換されている、そしてC末端がエキセンディン-4のC末端アミノ酸により9個のアミノ酸で延長されている点において、天然GLP-1（配列番号667）と異なっている。ペプチドDは、配列番号648のアミノ酸配列を有する。

【0688】

ペプチドE（本明細書において「ペプチドD Ser11(dF, dV)」とも呼ばれる）は、ペプチドDのプロドラッグであり、そのプロドラッグジペプチド部分(d-Ph 10
e-d-Val)は、生体活性GLP-1ペプチドに、11位のSerのヒドロキシル基とd-Valのカルボキシレート基との間に形成されたエステル結合を介して結合している。ペプチドEは、配列番号649のアミノ酸配列を有する。

【0689】

化合物のうちの1つ又はビヒクル対照の注射の15分後(0時点)、25%(w/v)グリコール食塩溶液を、体重1kgあたり1.5gの用量で注射した。マウスの血中グルコース濃度を、化合物又はビヒクル対照の注射の時点、グルコース注射の時点、グルコース注射の15、30、60及び120分後に測定した。

【0690】

図12に示されているように、ペプチドA～Eのうちの1つを与えたあらゆる群において、グルコース注射後の血中グルコース濃度は、ビヒクル対照を注射したマウスにおけるグリコール注射後の血中グルコースレベルと比較して上昇しなかった。ペプチドB及びDのプロドラッグ形態(すなわち、ペプチドA、C及びE)を注射したマウスの血中グルコース濃度は、ペプチドの対応する非プロドラッグ形態を注射したマウスの血中グルコースレベルよりも高く、GLP-1受容体への化合物の最大結合を防止するジペプチドプロドラッグ部分の能力を示している。プロドラッグの差動効果は、プロドラッグがGLP-1に基づいたペプチドのN末端に結合したときに見られる効果と比較して、プロドラッグジペプチド部分が11位のアミノ酸の側鎖に結合したときのほうが大きかった。

【0691】

〔実施例6〕

以下の実施例において、アミノ酸位置は、野生型で未熟のGLP-1（配列番号667）に従っており、全てのペプチドは、C末端カルボキシレート基の代わりにC末端アミド基を含んだ。

【0692】

マウスに2nmol/kgのPBSビヒクル対照又は下記に記載されているペプチドF～Hの1つを注射した以外は、実施例5に記載された実験を繰り返した。

【0693】

ペプチドF（本明細書において「desNH₂-His7, Ser8, Glu22 GLP-Cex」とも呼ばれる）は、GLP-1に基づいたペプチドであり、7位のHisがデスアミノ-Hisで置換されている、8位のAlaがSerで置換されている、22 40
位のGlyがGluで置換されている、そしてC末端がエキセンディン-4のC末端アミノ酸により9個のアミノ酸で延長されている点において、天然GLP-1（配列番号667）と異なっている。ペプチドFは、配列番号650のアミノ酸配列を有する。

【0694】

ペプチドG（本明細書において「ペプチドF-Ser2(dF, dV)」とも呼ばれる）は、ペプチドFのプロドラッグであり、そのプロドラッグジペプチド部分(d-Ph 50
e-d-Val)は、ペプチドFに、ペプチドFの2位のSerのヒドロキシル基とd-Valのカルボキシレート基との間に形成されたエステル結合を介して結合している。ペプチドGは、配列番号651のアミノ酸配列を有する。

【0695】

ペプチドH（本明細書において「ペプチドA-Ser2(dF, dV)」とも呼ばれる）は、本明細書においてペプチドX(His7, Ser8, Glu22 GLP-Cex)と呼ばれるGLP-1に基づいたペプチドプロドラッグである。ペプチドXは、8位のAlaがSerで置換されている、22位のGlyがGluで置換されている、そしてC末端がエキセンディン-4のC末端アミノ酸により9個のアミノ酸で延長されている点において、天然GLP-1（配列番号667）と異なっている。ペプチドHのプロドラッグジペプチド部分(dPhe-dVal)は、ペプチドXに、ペプチドXの2位のSerのヒドロキシル基とd-Valのカルボキシレート基との間に形成されたエステル結合を介して結合している。ペプチドHは、配列番号652のアミノ酸配列を有する。

【0696】

10

マウスの血中グルコースレベルを、実施例5に記載されたとおりに測定した。図13に示されているように、ペプチドF~Hは、グリコールの注射を受けたマウスにおいて、血中グルコースの上昇を抑制した。ペプチドFのプロドラッグ形態（すなわち、ペプチドG）を注射したマウスの血中グルコース濃度は、対応する非プロドラッグ形態を注射したマウスの血中グルコースレベルよりも高く、GLP-1受容体へのペプチドの最大結合を防止するジペプチドプロドラッグ部分の能力を示している。

【0697】

〔実施例7〕

以下の実施例において、アミノ酸位置は、野生型で未熟のGLP-1（配列番号667）に従っており、全てのペプチドは、C末端カルボキシレート基の代わりにC末端アミド基を含んだ。

20

【0698】

マウスに0.67nmol/kgの水ビヒクル対照又は実施例5及び6に記載されたペプチドD、E、F及びGの1つを注射した以外は、実施例5に記載された実験を繰り返した。マウスの血中グルコースレベルを、実施例5に記載されたとおりに測定した。図14に示されているように、GLP-1に基づいたペプチドのプロドラッグ形態を注射したマウスは、対応する非プロドラッグ形態を注射したマウスのグルコースレベルと比較して、グルコースを注射したときに高い血中グルコースレベルを示した。これらのデータは、GLP-1受容体へのGLP-1に基づいたペプチドの最大結合を防止するプロドラッグ部分の能力を示す。

30

【0699】

〔実施例8〕

以下の実施例において、アミノ酸位置は、野生型で未熟のGLP-1（配列番号667）に従っており、全てのペプチドは、C末端カルボキシレート基の代わりにC末端アミド基を含んだ。

【0700】

初期平均体重の56gを有する9群の糖尿病誘導肥満(DIO)マウス（1群あたり8匹のマウス）に、15又は70nmol/kgの下記に記載されているペプチドY、Z、F-Peg及びG-Peg又はPBSビヒクル対照を1回腹腔内注射し、1週間追跡した。

【0701】

40

ペプチドY（本明細書において「Aib8, Glu22 GLP-Cex 40kPeg」とも呼ばれる）は、GLP-1に基づいたペプチドであり、8位のAlaがAIBで置換されている、22位のGlyがGluで置換されている、30位のAlaが、40kDaのPEGに共有結合しているCysで置換されている、そしてC末端がエキセンディン-4のC末端アミノ酸により9個のアミノ酸で延長されている点において、天然GLP-1（配列番号667）と異なっている。ペプチドYは、配列番号653のアミノ酸配列を有する。

【0702】

ペプチドZ（本明細書において「GLP Aib8, Ser11(dF, dV) Glu22 GLP-Cex 40kPeg」とも呼ばれる）は、GLP-1に基づいたペプチ

50

ドのプロドラッグであり、8位のAlaがAlBで置換されている、11位のThrがSerで置換されている、22位のGlyがGluで置換されている、30位のAlaが、40kDaのPEGに共有結合しているCysで置換されている、そしてC末端がエキセンディン-4のC末端アミノ酸により9個のアミノ酸で延長されている点において、天然GLP-1（配列番号667）と異なっている。ペプチドZのプロドラッグジペプチド部分（d-Ph3-d-Val）は、GLP-1に基づいたペプチドに、11位（配列番号667の番号付けによる）のSerのヒドロキシル基とd-Valのカルボキシレートとの間に形成されたエステル結合を介して結合している。ペプチドZは、配列番号654のアミノ酸配列を有する。

【0703】

ペプチドF-Peg（本明細書において「GLP des-NH₂His7, Ser8, Glu22-Cex 40kPeg」とも呼ばれる）は、GLP-1に基づいたペプチドであり、7位のHisがデスアミノ-Hisで置換されている、8位のAlaがSerで置換されている、22位のGlyがGluで置換されている、30位のAlaが、40kDaのPEGに共有結合しているCysで置換されている、そしてC末端がエキセンディン-4のC末端アミノ酸により9個のアミノ酸で延長されている点において、天然GLP-1（配列番号667）と異なっている。ペプチドF-Pegは、配列番号655のアミノ酸配列を有する。

【0704】

ペプチドG-Peg（「GLP des-NH₂His7, Ser8（dFdV）, Glu22-Cex 40kPeg」と呼ばれる）は、ペプチドFのプロドラッグであり、そのプロドラッグジペプチド部分（d-Phe-d-Val）は、8位のSerのヒドロキシル基とd-Valのカルボキシレートとの間に形成されたエステル結合を介して結合している。ペプチドG-Pegは、配列番号656のアミノ酸配列を有する。

【0705】

ペプチドのうちの1つ又はビヒクル対照の注射の60分後（0時点）、25%（w/v）グリコール食塩溶液を、体重1kgあたり1.5gの用量で注射した。マウスの血中グルコース濃度を、ペプチド又はビヒクル対照の注射の時点（-60時点）、グルコース注射の時点（0時点）、グルコース注射の15、30、60及び120分後に測定した。

【0706】

図15に示されているように、ペプチドY、Z、F-Peg、G-Pegのいずれかを注射したマウスの群の血中グルコース濃度は、ビヒクル対照を注射したマウスの血中グルコースレベルと比較して低かった。

【0707】

各群のそれぞれのマウスの体重を、ビヒクル対照又はペプチドの注射の1、3、5及び7日後に測定した。体重の総変化は、ビヒクル又はペプチドの注射の時点の群の平均体重を、注射の7日後の群の平均体重から引いて計算した。マウスの各群の食餌摂取も、1週間の間測定した。総食餌摂取を、ビヒクル対照又はペプチドの注射の7日後に測定した。図17に示されているように、総食餌摂取は、ペプチドY、Z、F-Peg、G-Pegのいずれかを注射した全てのマウスの群において減少した。ペプチドYは、食欲の減少及び体重の減少において4つのペプチドのうち最も強力であると思われた。この結果は、天然アミノ酸配列の機能である。Ser11置換又はデスアミノHis7は全体的な効能を低減する。重要なことには、ペプチドF-Peg及びG-Pegが同様に機能を果たし、エステルプロドラッグのみが導入されたとき、1週間の研究にわたって測定された全体的な効能が同等であることを示している。

【0708】

〔実施例9〕

以下のアッセイを使用して、生体活性ペプチドの溶解性、受容体結合活性及び安定性について試験する。

【0709】

グルカゴン溶解性アッセイ：

グルカゴン（又は類縁体）の溶液（1 mg/ml又は3 mg/ml）を0.01 NのHClで調製する。100 µlの原液を、0.01 NのHClで1 mlに希釈し、UV吸光度（276 nm）を決定する。残りの原液のpHを、200～250 µlの0.1 M Na₂HOP₄（pH 9.2）を使用して、pH 7に調整する。溶液を4℃で一晩放置し、次に遠心分離する。次に100 µlの上澄みを、0.01 NのHClで1 mlに希釈し、UV吸光度を決定する（2回繰り返す）。

【0710】

初期吸光度の読み取りを容量の増加で補正し、以下の計算を使用して、溶解率を確立する：

$$\text{最終吸光度} / \text{初期吸光度} \times 100 = \text{溶解率}$$

【0711】

グルカゴン受容体結合アッセイ

グルカゴン受容体へのペプチドの親和性を、シンチレーション近接アッセイ技術を利用する競争結合アッセイにより測定する。シンチレーション近接アッセイ緩衝剤（0.05 Mのトリス-HCl、pH 7.5、0.15 MのNaCl、0.1 %w/vのウシ血清アルブミン）により作製したペプチドの一連の3倍希釈を、0.05 nMの（3-[¹²⁵I]-ヨードチロシル）Tyr¹⁰グルカゴン（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）、1 ウェルあたり1～6 マイクログラムの、ヒトグルカゴン受容体を過剰発現している細胞から調製した原形質膜画分及び1 mg/ウェルのポリエチレンジオキシル処理ムギ胚芽凝集素A型シンチレーション近接アッセイビーズ（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）を有する、96 ウェル白色/透明底プレート（Corning Inc., Acton, MA）で混合する。ロータリー振とう器により800 rpmで5分間振とうしてから、プレートを室温で12時間インキュベートし、次にMicroBeta450液体シンチレーションカウンター（Perkin-Elmer, Wellesley, MA）で読み取る。試験試料の最高濃度よりも4倍高い濃度の「コールドの」天然リガンドを入れたウェルで非特異的結合（NSB）放射能を測定し、競合物質を入れなかったウェルで総結合放射能を検出した。特異的結合の率を以下のように計算する：特異的結合率 = （（結合 - NSB） / （総結合 - NSB）） × 100。IC₅₀値は、Originソフトウェア（OriginLab, Northampton, MA）を使用して決定する。

【0712】

グルカゴン類縁体の安定性アッセイ

各グルカゴン類縁体を水又はPBSに溶解し、初期HPLC分析を実施する。pHを調整した後（4、5、6、7）、試料を37℃で特定の時間インキュベートし、HPLCにより再び分析して、ペプチドの完全性を決定する。特定の目的のペプチドの濃度を決定し、無傷まま残っている率を初期分析と比較して計算する。

【0713】

〔実施例10〕

グルカゴン関連類縁体ペプチドの名称は、以下のように読まれるべきである：語「グルカゴン」の後に続く括弧で示されている範囲は、ペプチドに存在するグルカゴンのアミノ酸を示し、グルカゴンの天然アミノ酸のアミノ酸置換は、語「グルカゴン」の前の、数字が後に続いているアミノ酸の存在（例えば、PLA6、E9、Glu9など）により示されている。アミノ酸の後に続いている数詞（例えば、「PLA6」の「6」）は、天然グルカゴン（配列番号612）の番号付けによるアミノ酸の位置を示す。

【0714】

以下の手順を使用して、多様なグルカゴン関連類縁体ペプチドを作製する。

【0715】

〔PLA6、E9〕グルカゴン（6-29）アミドの合成

ペプチド配列TSEYSKYLD SRR A QDFVQWLMNT（配列番号951；〔E3〕グルカゴン（7-29））を、最初に、カップリング試薬として0.1 mmolのDIC/HOBtを使用する0.1 mmolのRink MBHAアミドを用いる0.1 mmolのFmo

10

20

30

40

50

c/HOBT/DCC化学プログラムを使用した、ABI 433A自動ペプチド合成機により固相合成した。以下のFmocアミノ酸を使用した：Ala、Arg (Pmc)、Asp (OtBu)、Asn (Trt)、Glu (OtBu)、Gln (Trt)、Leu、Lys (Boc)、Met、PLA、Ser (tBu)、Thr (tBu)、Trp (Boc)、Tyr (tBu) 及びVal。

【0716】

自動合成の後、ペプチジル樹脂を、3フェニル乳酸 (83mg、0.5mmol) 及びDEPBT (150mg、0.5mmol) と、4mlの5% DIEA/DMF中、約2時間手動で結合させて、以下の配列を有するペプチジル樹脂を得た：HO-PLA-Thr-Ser-Glu-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-NH₂ (配列番号950)。

10

【0717】

ペプチジル樹脂を、0.5gのフェノール、0.5mlの水及び0.5mlのチオアニソールの添加を伴う、8.5mlのTFAにより、室温で2時間処理した。TFAに溶解したペプチドを濾過し、40mlのエーテルを加えて、ペプチドを沈殿させた。粗ペプチドを遠心分離し、酢酸水溶液に溶解し、凍結乾燥した。粗ペプチド収量は200～250mgであり、精製した後、収量は、純度95%のペプチドが25～40mg (総収率10～15%) であった。ペプチドを一般的な分析HPLCで分析したところ7.66分の保持時間を示し、ESI-MS分析は、ペプチド分子量2986.3に相当する所望質量の2986.0を示した。

20

【0718】

同様の手順を使用して、分析HPLCで7.25分及び計算分子量の2973.3に相当するESI-MSの2973.5を有する〔PLA6, D9〕グルカゴン (6-29) アミド；分析HPLCで7.46分及び計算分子量の2973.3に相当するESI-MSの2973.0を有する〔PLA6, D9, D28〕グルカゴン (6-29) アミド；分析HPLCで7.20分及び計算分子量の3002.3に相当するESI-MSの3002.0を有する〔PLA6, C8, E9〕グルカゴン (6-29) アミド；分析HPLCで7.38分及び計算分子量の3002.3に相当するESI-MSの3002.0を有する〔PLA6, E9, C16〕グルカゴン (6-29) アミド；分析HPLCで7.33分及び計算分子量2961.3に相当するESI-MSの2961.0を有する〔PLA6, E9, C24〕グルカゴン (6-29) アミド；分析HPLCで7.43分及び計算分子量の2947.3に相当するESI-MSの2947.0を有する〔PLA6, D9, C24〕グルカゴン (6-29) アミド；分析HPLCで7.28分及び計算分子量の3924.3に相当するMALDI-MSの3925.5を有する〔PLA6, E9, C40〕グルカゴン (6-40) アミドのペプチドを合成した。

30

【0719】

〔hCys (SO₃H) 9〕グルカゴン (6-29) アミドの合成

ペプチド配列YSKYLD SRR A QDFVQWLMN (配列番号951；グルカゴン (10-29)) を、最初に、カップリング試薬として0.1mmolのDIC/HOBTを使用する0.1mmolのRink MBHAアミドを用いる0.1mmolのFmoc/HOBT/DCC化学プログラムを使用した、ABI 433A自動ペプチド合成機により固相合成した。

40

【0720】

自動合成した後、ペプチジル樹脂を、Fmoc-ホモCys (SO₃Na)-OH (130mg、0.3mmol)、HOBT (45.2mg、0.33mol) 及びDIC (52.0ul、0.33mol) と、4mlのDMF中、手動で約2時間結合させた。ニンヒドリン試験の後、半分のペプチジル樹脂 (0.05mmol) を、残りの3つのアミノ酸Ser、Thr及びPheと更に自動的に組み合わせて、以下の配列のペプチジル樹脂を得た：H₂N-Phe-Thr-Ser-ホモCys (SO₃H)-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-G

50

l n - T r p - L e u - M e t - A s n - T h r - N H 2 (配列番号 9 5 2) 。

【0721】

以下の F m o c アミノ酸を使用した：A l a、A r g (P m c)、A s p (O t B u)、A s n (T r t)、G l n (T r t)、ホモ C y s (S O 3 N a)、L e u、L y s (B o c)、M e t、P h e、S e r (t B u)、T h r (t B u)、T r p (B o c)、T y r (t B u) 及び V a l 。

【0722】

ペプチジル樹脂を、0.5 g のフェノール、0.5 ml の水及び 0.5 ml のチオアニソールの添加を伴う、8.5 ml の T F A により、室温で 2 時間処理した。T F A に溶解したペプチドを濾過し、40 ml のエーテルを加えて、ペプチドを沈殿させた。粗ペプチドを遠心分離し、酢酸水溶液に溶解し、凍結乾燥した。粗ペプチド収量は 100 ~ 130 mg であり、精製した後、15 ~ 20 mg (総収率 10 ~ 15 %) のペプチドを純度 95 % で得た。ペプチドを一般的な分析 H P L C で分析したところ 6.73 分の保持時間を示し、E S I - M S 分析は、ペプチド分子量 3021.3 に相当する所望質量の 3021.0 を示した。

10

【0723】

同様の手順によって、分析 H P L C で保持時間 6.82 分、及び E S I - M S で計算分子量の 3122.4 に相当する 3122.5 を示す [h C y s (S O 3 H) 9] グルカゴン (5 - 29) アミド；分析 H P L C で保持時間 6.83 分、及び E S I - M S で計算分子量の 3179.3 に相当する 3178.5 を示す [h C y s (S O 3 H) 9] グルカゴン (4 - 29) アミド；分析 H P L C で保持時間 6.79 分、及び E S I - M S で計算分子量の 3394.7 に相当する 3394.5 を示す [h C y s (S O 3 H) 9] グルカゴン (2 - 29) アミド；分析 H P L C で保持時間 7.17 分、及び E S I - M S で計算分子量の 3022.3 に相当する 3022.0 を示す [P L A 6, h C y s (S O 3 H) 9] グルカゴン (6 - 29) アミドを合成した。

20

【0724】

[P L A 6, E 9, C 2 4 (1.2 K)] グルカゴン (6 - 29) アミドの合成

20 mg (0.00675 mmol) の [P L A 6, E 9, C 2 4] グルカゴン (6 - 29) アミド及び 12.5 mg (0.01 mmol) の m - d P E G T M 2 4 - M A L (分子量 1239、Quanta biodesign Ltd. Powell, OH) を、9 ml の 25 % アセトニトリル水及び 1 ml の 1 M トリス塩基緩衝剤 (p H 8.0 ~ 8.5 に調整) に溶解した。反応物を室温で攪拌し、反応の進行を分析 H P L C によりモニターした。H P L C により初期生成物が何も検出されなかった後 (約 2 時間後)、反応混合物を分取 H P L C により直接精製した。

30

【0725】

凍結乾燥した後、分析 H P L C の分析が保持時間 7.48 分を示し、E S I - M S で計算値 [M + H ₂ O] の 4218.0 に相当する 4218.5 を示した、約 10 ~ 12 mg の [P L A 6, E 9, C 2 4 (1.2 K)] グルカゴン (6 - 29) アミドを得た。

【0726】

同様の手順を使用して、分析 H P L C の分析が 7.25 分の保持時間を示し、E S I - M S が計算分子量の 4327.8 に相当する 4327.5 を示す [C 5 (1.2 K), E 9] グルカゴン (5 - 29) アミド；分析 H P L C の分析が 7.25 分の保持時間を示し、E S I - M S が計算 [M + H ₂ O] の 4259.0 に相当する 4260.0 を示す [C 8 (1.2 K), E 9] グルカゴン (6 - 29) アミドを合成した。

40

【0727】

[P L A 6, E 9, C 2 4 (20 K)] グルカゴン (6 - 29) アミドの合成

15 mg (0.005 mmol) の [P L A 6, E 9, C 2 4] グルカゴン (6 - 29) アミド及び 140 mg (0.006 mmol) の 20 K m - P E G - M A L (分子量約 22 K、Nektar, Huntsville, AL) を、9 ml の 25 % アセトニトリル水及び 1 ml の 1 M トリス塩基緩衝剤 (p H 8.0 ~ 8.5 に調整) に溶解した。反応物を室温で攪拌し、反応の進行を分析 H P L C によりモニターした。H P L C により初期生成物が何も検出されなかった後 (約 6 時間後)、反応混合物を分取 H P L C により直接精製した。画分を、214 nm の分析

50

HPLCにより調べ、また、280nmのUVで測定した。90%のHPLC純度を有し、UV測定による高吸光度(A280nm=1.0~2.0)も有する画分をまとめ、凍結乾燥した。分析HPLCの分析が8.5~8.6分の保持時間を示し、MALDI-MSが24K~26Kの幅広い質量分析を示す、約60~80mgの〔PLA6, E9, C24(20K)〕グルカゴン(6-29)アミドを得た。

【0728】

同様の手順を使用して、〔PLA6, C8(20K), E9〕グルカゴン(6-29)アミド、〔PLA6, E9, C16(20kDa)〕グルカゴン(6-29)アミド、〔PLA6, E9, C40(20kDa)〕グルカゴン(6-40)アミド、〔PLA6, D9, C16(20K)〕グルカゴン(6-29)アミド及び〔PLA6, D9, C24(20K)〕グルカゴン(6-29)アミドを合成した。

10

【0729】

〔PLA6, E9, C24(40kDa)〕グルカゴン(6-29)アミドの合成

15mg(0.005mmol)の〔PLA6, E9, C24〕グルカゴン(6-29)アミド及び240mg(0.006mmol)の40K m-PEG-MAL(分子量約40K、Chirotech Technology Ltd., Cambs CB4 0WG, Germany)を、18mlの25%アセトニトリル水及び2mlの1Mトリス塩基緩衝剤(pH8.0~8.5に調整)に溶解した。反応物を室温で攪拌し、反応の進行を分析HPLCによりモニターした。HPLCにより初期生成物が何も検出されなかった後(約6時間後)、反応混合物を分取HPLCにより直接精製した。画分を、214nmの分析HPLCにより調べ、また、280nmのUVで測定した。90%のHPLC純度を有し、UV測定による高吸光度(A280nm=1.0~2.0)も有する画分をまとめ、凍結乾燥した。分析HPLCの分析が8.60~8.8分の保持時間を示す、約100~120mgの〔PLA6, E9, C24(40K)〕グルカゴン(6-29)アミドを得ることができる。

20

【0730】

同様の手順を使用して、〔PLA6, C8(40K), E9〕グルカゴン(6-29)アミド、〔PLA6, E9, C16(40K)〕グルカゴン(6-29)アミド、〔PLA6, E9, C40(40K)〕グルカゴン(6-40)アミド、〔PLA6, D9, C16(40K)〕グルカゴン(6-29)アミド及び〔PLA6, D9, C24(40K)〕グルカゴン(6-29)アミドを合成した。

30

【0731】

二量体〔PLA6, E9, C24〕グルカゴン(6-29)アミドの合成

20mg(0.00675mmol)の〔PLA6, E9, C24〕グルカゴン(6-29)アミドを6mlのPBS緩衝剤、1mlの1Mトリス塩基(pH8.0~8.5に調整)及び3mlのDMSOに溶解した。反応混合物を開放容器中で攪拌し、分析HPLCにより2時間毎にモニターした。初期生成物(HPLC RTにより7.4分)が無くなった後、そして二量体生成物(HPLC RTにより7.4分)が生成物において優勢になった後(12時間後)、混合物を0.1%TFA 10%アセトニトリル水で希釈し、分取HPLCにより直接精製した。凍結乾燥した後、計算分子量の5920.6に相当するESI-MSの5920.0を有する、約6~8mgの二量体〔PLA6, E9, C24〕グルカゴン(6-29)アミドを得た。

40

【0732】

同様の手順を使用して、計算分子量の5916.6に相当するESI-MSの5916.0を有する二量体〔C9〕グルカゴン(6-29)アミド及び計算分子量の6174.8に相当するESI-MSの6174.0を有する二量体〔C5, E9〕グルカゴン(5-29)アミドを合成した。

【0733】

アシル化及び／又はペグ化ペプチドを以下のように調製する。

ペプチドは、CS Bio 4886 Peptide Synthesizer又はApplied Biosystems 430A Peptide Synthesizerのいずれかを使用して、固体支持樹脂上に合成する。Schnolzer et al., In

50

t. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992) に記載されている現場中和化学を使用する。アシル化ペプチドでは、アシル化される標的アミノ酸残基（例えば、10位）をN ϵ -FMOCリシン残基で置換する。DMF中の20%ピペリジンによる、合成の完了したN末端BOC保護ペプチドの30分間の処理によって、FMOC/ホルミル基を除去する。遊離 ϵ -アミノLys残基への結合は、FMOC保護スパーサーアミノ基（例えば、FMOC-(N-BOC)-トリプトファン-OH）又はアシル鎖（例えば、C17-COOH）のいずれかの10倍モル過剰量と、DMF/DIEA中のPyBOP又はDEPBTカップリング試薬との結合により達成される。その後のスパーサーアミノ酸のFMOC基の除去に続いて、アシル鎖との結合が繰り返される。100%TFAによる最終処理は、あらゆる側鎖保護基及びN末端BOC基の除去をもたらす。ペプチド樹脂を、5% DIEA/DMFで中和し、乾燥し、次にHF/p-クレゾール95:5を0℃で1時間使用して支持体から切断する。エーテル抽出の後、5%HOAc溶液を使用して粗ペプチドを溶媒和する。次に溶液の試料を、正確な分子量のペプチドを含有しているかについてESI-MSにより確認する。正確なペプチドを、100%CH₃CN中の10%CH₃CN/0.1%TFAから0.1%TFAの直線勾配を使用してRP-HPLCにより精製する。Vydac C18の22mm×250mmタンパク質カラムを精製に使用する。アシル化ペプチド類縁体は、一般に、緩衝剤比率の20:80で完全に溶離する。一部と一緒にプールし、分析RP-HPLCにより純度を調べる。純粋な画分を凍結乾燥して、白色の固体ペプチドを得る。

10

【0734】

20

ペプチドがアシル化されるラクタム架橋及び標的残基を含む場合、アシル化は、ペプチド主鎖へのアミノ酸の付加に加えて、上記に記載されたとおりに実施される。

ペプチドベグ化では、40kDaのメトキシポリ（エチレングリコール）マレイミドプロピオンアミド（Chirotech Technology Ltd.）を、ペプチドとPEGの両方を溶解して透明な溶液にするのに必要な最小量の溶媒（一般に、2～3mgのペプチドを使用する反応において2mL未満）を使用して、7Mの尿素、50mMのトリス-HCl緩衝剤中のモル当量のペプチドと反応させる。室温での激しい攪拌を開始して4～6時間行い、反応を分析RP-HPLCにより分析する。ベグ化生成物は、保持時間が減少しているので出発物質と異なっていると思われる。精製は、初期ペプチド精製に使用した条件と同じ条件のVydac C4カラムにより実施する。溶離は、緩衝剤比率が50:50の付近で生じる。純粋なベグ化ペプチドの画分が見出され、凍結乾燥する。

30

【0735】

コレステロール化ペプチドの合成

コレステロール修飾ペプチドは、ラクタム化ペプチドをプロモアセチル化コレステロール誘導体と溶液中で結合することによって調製した。ペプチドは、従来の固相ペプチド合成（SPPS）を使用して組み立てた。PLA誘導体化ペプチド鎖はラクタム架橋を介して環化した。標準的な切断手順及び精製方法を適用して、所望のデプシペプチドを得た。

【0736】

〔実施例〕

コレステロール結合ラクタム架橋ペプチド〔PLA6, K10 (COCH₂CH₂SHol), E16K20 (ラクタム), D28〕G(2-29)アミドの合成

40

配列HO-PLA-TSDKSKYLDERRAKDFVQWLMDTを有するペプチジル樹脂〔PLA6, K10, E16, K20, D28〕グルカゴン(6-29)は、0.2mmolのMBHAアミド樹脂を用い、カップリング試薬としてDEPBTを用いるABI 430A自動ペプチド合成機を使用した固相Boc化学により合成した。以下のBocアミノ酸を使用した: Ala、Arg (Tos)、Asp (OCHx)、Asn (Xan)、Glu (OCHx)、Gln (Xan)、Leu、Lys (2-Cl-Z)、Met、PLA、Ser (OBzl)、Thr (OBzl)、Trp (HOC)、Tyr (2, 6-ジ-Cl-Bzl) 及びVal (但し、16位のグルタミン酸は、Boc-Glu (OFm)-OHにより組み込まれ、20位のリシンは、Boc-Lys (Fmoc)-OHによ

50

り組み込まれ、10位のリシンは、Boc-Lys(Alloc)-OHにより組み込まれた)。DMF中20%ピペリジンにより16及び20位のFm及びFmoc保護基を除去した後、ペプチジル樹脂を10%DIEA/DMF中のDEPBT 300mg(1mmol)で4時間処理して、ラクタム架橋を形成した。このラクタム架橋ペプチジル樹脂を、10mLのCHCl₃中の100mg(0.4当量)のPd(PPh₃)₄、120μLのPhSiH₃、0.25mLのN-メチルモルホリン及び0.5mLの酢酸から構成される溶液によりN₂雰囲気下で約3時間処理して、Alloc基を除去した。次に3-トリチルチオプロピオン酸をDEPBTと結合して、HO-PLA-Thr-Ser-Asp-Lys(COCH₂CH₂SH)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu*-Arg-Arg-Ala-Lys*-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-NH₂(*はラクタム架橋である)の配列を有するペプチジル樹脂を得た。

10

【0737】

ペプチジル樹脂を液体フッ化水素で処理して、固体支持体から粗ペプチドを切断し、全ての保護基を除去した。ペプチドを、分取HPLCにより精製し、MS及び分析RP-HPLCにより分析した。精製したペプチドは、分析RP-HPLCにより単一ピークを示し、ESI-MS分析により、ペプチド〔PLA6, K10(COCH₂CH₂SH), E16K20(ラクタム), D28〕G(6-29)アミドの計算分子量の3051.0ダルトンに相当する所望の質量の3050.7を生じた。

【0738】

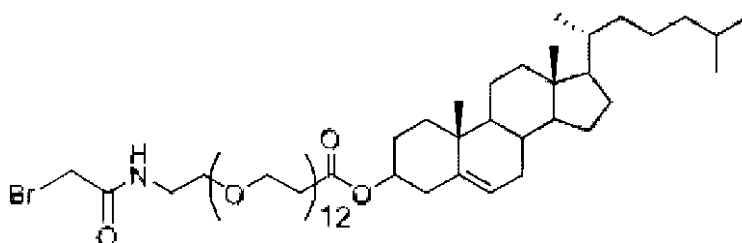
20

コレステロール結合ペプチド〔PLA6, K10(COCH₂CH₂S-Chol), E16K20(ラクタム), D28〕G(6-29)アミドを合成するために、10mg(3.28μM)の〔PLA6, K10(COCH₂CH₂SH), E16K20(ラクタム), D28〕G(6-29)アミドを、50mMのトリス-HClを含有する7M尿素緩衝剤(pH8.0)2mLに溶解した。この溶液に、10mg(9μM)のコレステロール試薬Br-Oxa₁₂-Chol(下記の構造を参照すること)を、室温に加えた。反応をHPLCによりモニターした。約4時間後、反応溶液をHPLCにより直接精製した。精製したコレステロール結合ペプチドは、分析クロマトグラフィーにより単一ピークを示し、ESI-MS分析により、ペプチド〔PLA6, K10(COCH₂CH₂S-Chol), E16K20(ラクタム), D28〕G(6-29)アミドの計算分子量の4073.0ダルトンに相当する所望の質量の4073.0を生じた。

30

【0739】

【化89】



40

Br-Oxa₁₂-コレステロール

【0740】

同様の手順を使用して、本出願に報告されている〔PLA6, E16K20(ラクタム), D28, K30(COCH₂CH₂S-Chol)〕G(6-30)アミド及び〔PLA6, E16K20(ラクタム), D28, K40(COCH₂CH₂S-Chol)〕G(6-40)アミドのような他のコレステロール結合及びラクタム架橋ペプチドを合成した。

【0741】

50

グルカゴンに基づいたデブシペプチド〔Thr 5-O-PLA 6, E 9〕グルカゴン（2-29）アミド及び〔Thr 5-O-PLA 6, E 9〕グルカゴン（1-29）アミドの合成

ペプチド配列HO-PLA-TSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT〔PLA 6, E 9〕グルカゴン（6-29）（配列番号971）は、0.2 mmolのMBHAアミド樹脂を用い、カップリング試薬としてDEPBTを用いるABI 430A自動ペプチド合成機を使用した固相Boc化学により合成した。以下のBocアミノ酸を使用した：Ala、Arg（Tos）、Asp（OcHx）、Asn（Xan）、Glu（OcHx）、Gln（Xan）、Leu、Lys（2-Cl-Z）、Met、PLA、Ser（OBzl）、Thr（OBzl）、Trp（HOC）、Tyr（2, 6-ジ-Cl-Bzl）及びVal。このペプチドに、DCM中のBoc-Thr（OBzl）-OH（2 mmol）／DIC（1 mmol）／DMA P（0.2 mmol）から構成される前活性化対称無水溶液を用いて約16時間手動で結合することによって、樹脂上にデシペプチド（エステル結合）を形成した。残りのアミノ酸を標準的Boc化学により結合して、以下の配列のデシペプチジル樹脂を得た：Ser-Gln-Gly-Thr-O-PLA-Thr-Ser-Glu-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-NH₂（配列番号964）。

10

【0742】

ペプチジル樹脂を液体フッ化水素で処理して、固体支持体から粗ペプチドを切断し、全ての保護基を除去した。デブシペプチドを、分取HPLCにより精製し、MS及び分析HPLCにより分析した。純粋なペプチドは、分析クロマトグラフィーにより単一ピークを示し、ESI-MS分析により計算分子量の3359.0ダルトンに相当する所望の質量の3359.6を生じた。

20

【0743】

同様の手順を使用して、N末端ヒスチジン残基の単一付加結合により、デブシペプチド〔Thr 5-O-PLA 6, E 9〕グルカゴン（1-29）アミド（配列番号965）を合成した。純粋なペプチドは、分析クロマトグラフィーにより単一ピークを示し、ESI-MS分析により計算分子量の3496.8ダルトンに相当する所望の質量の3495.9を生じた。

30

【図 5 A】

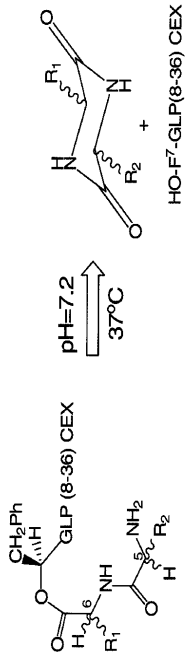


Fig. 5A

【図 5 B】

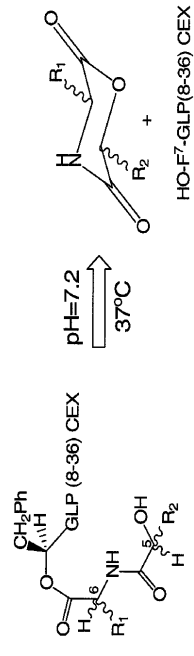
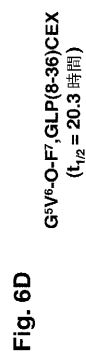
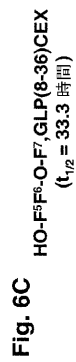
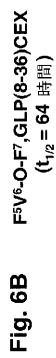
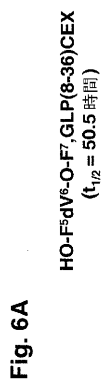


Fig. 5B

【図 6】



【図 7】

Gly-Val-O-Phe⁷-GLP(8-36)CEX の効力

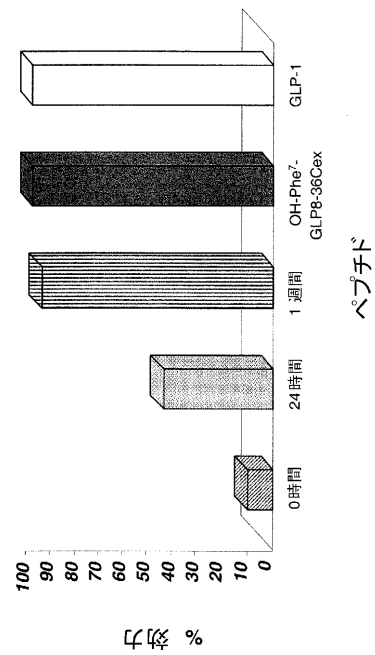


Fig. 7

【図 8】

OH-Phe-Phe-O-Phe⁷-GLP(8-36)CEX の効力

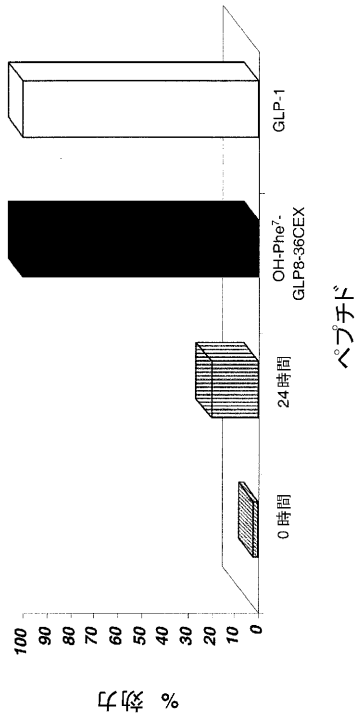


Fig. 8

【図 9】

GLP-1 及び Phe⁷, Gln⁹, Ser¹¹ 又は Thr¹¹ GLP-1 類縁体の生体活性

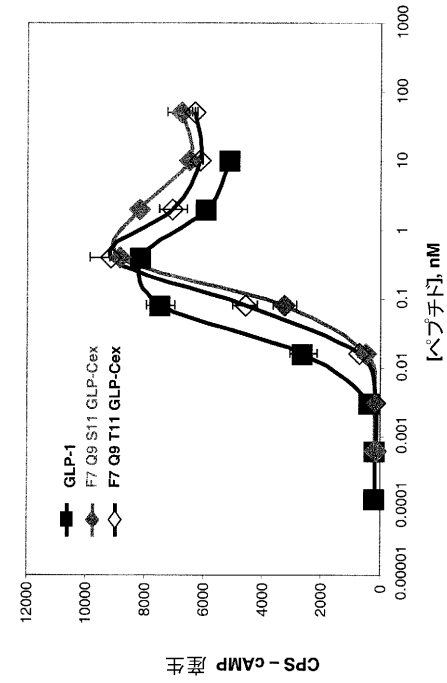


Fig. 9

【図 10】

F⁷Q⁹S¹¹-(Gly-Gly)-GLP(8-36)Cex プロドラッグの F⁷Q⁹S¹¹-GLP(8-36)Cex への変換

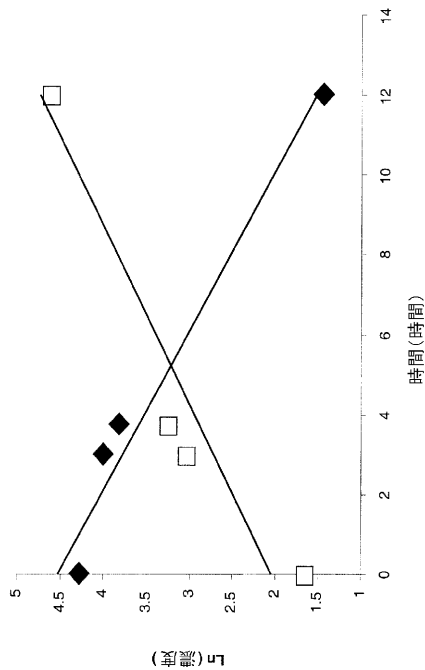


Fig. 10

黒菱形はプロドラッグの消滅を表す
白四角は薬剤の出現を表す

【図 11 A】

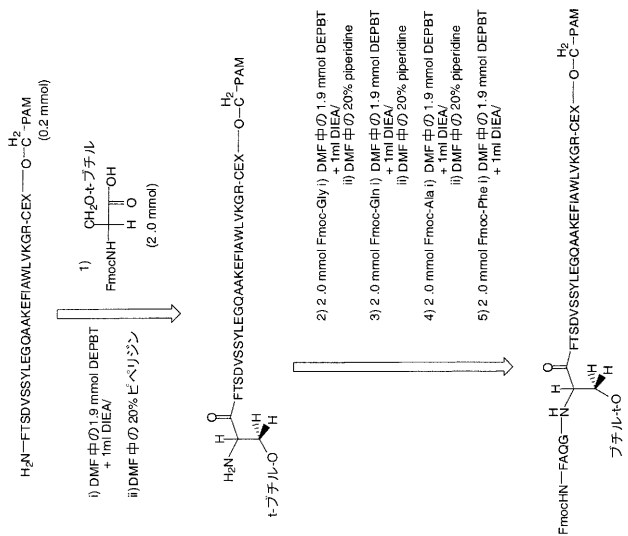


Fig. 11A

【図 1 1 B】

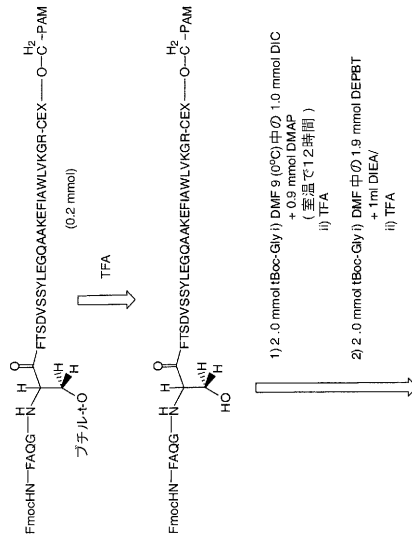


Fig. 11B

【図 1 1 C】

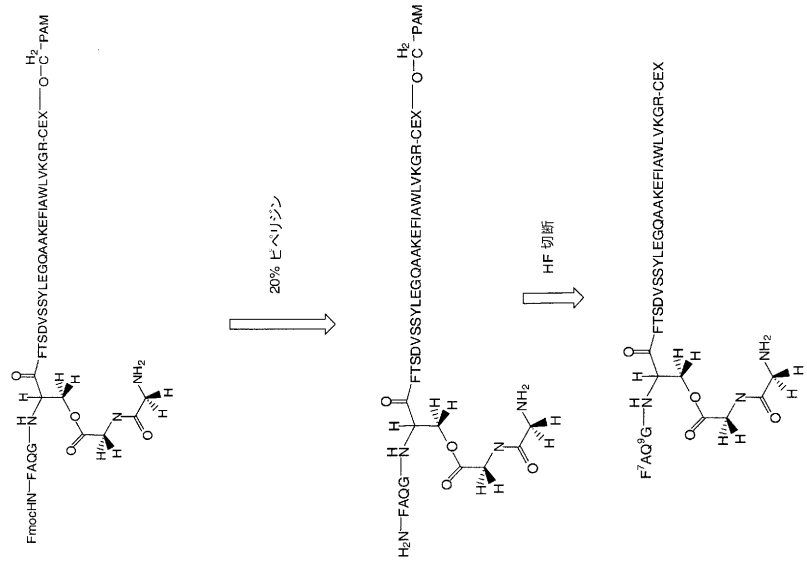


Fig. 11C

【図 1 2】

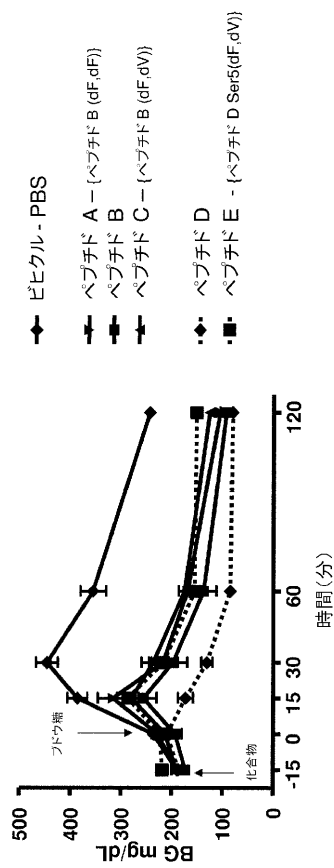


Figure 12

【図 1 3】

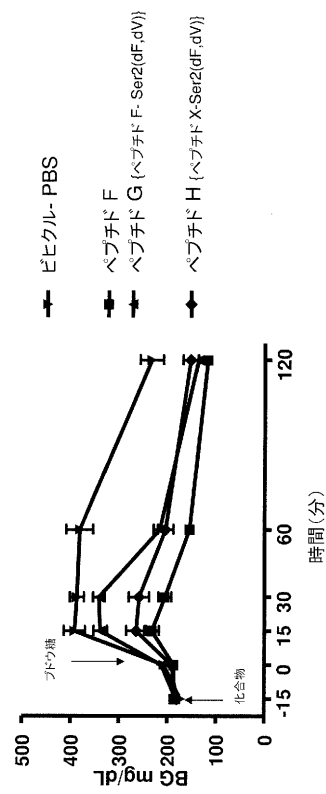
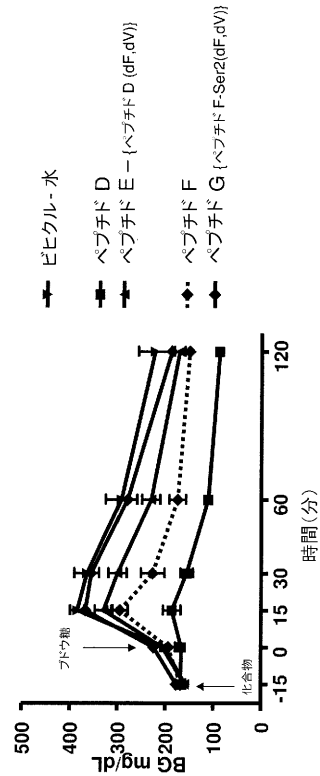


Figure 13

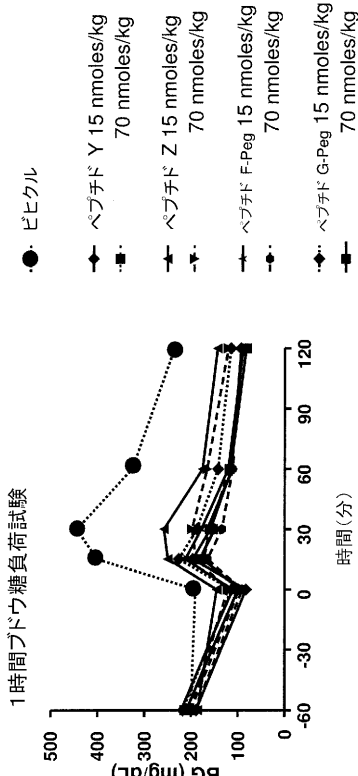
【 図 1 4 】

Figure 14



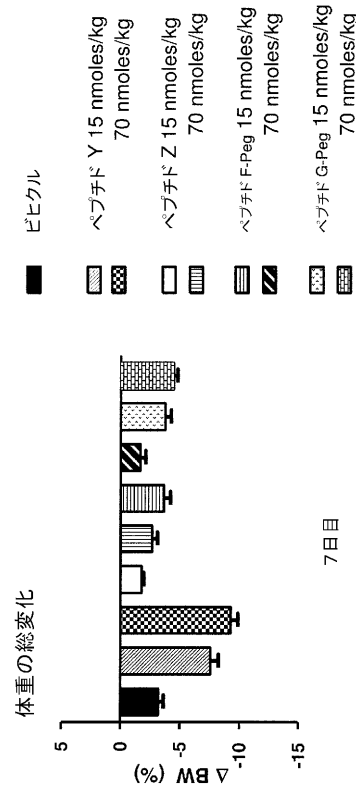
【 図 1 5 】

Figure 15



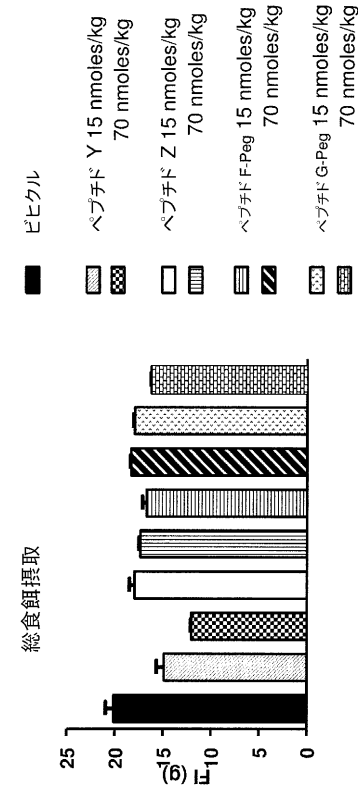
【 図 1 6 】

Figure 16



【 図 1 7 】

Figure 17



【図 18】

Figure 18

ペプチド名	最大同一性配列	配列長	配列番号
GHRH	YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRL	29	657
PHM	HADGVFTSDFSKLLGQLSAKKYLSLML	27	660
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN	28	658
PACAP-27	HSDGIFTDSYRYRKQMAVKKYLAAVL	27	659
エキセチン-4	HGEGTFTSDLSKQWEEAAVRLFIWLKNGPSSGAPPS	39	662
GLP-1	HAEGETTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG	31	601
グルカゴン	HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMT	29	612
オキシントモジュリン	HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMTKRNRNIA	37	665
GIP	YAEGETTSDYSTAMDKIHQODFVNWLLAOKGKNDWKHNITQ	42	664
GLP-2	HADGSFSDENITLLDNLAARDFINWLIQTITD	33	663
テレクチン	HSDGTFTSELRLREGARLQRLQLGLV	27	661

【配列表】
2011511778000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/31593
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/00 (2009.01) USPC - 530/345; 530/324 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 530/345; 530/324 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 514/772.4; 514/18; 514/8; 514/12 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patent/Scholar: peptide, prodrug, dipeptide, GLP-1, ester linkage, insulin, albumin, Fe		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	De. Design of peptide-based prodrug chemistry and its application to glucagon-like peptide 1. Masters Thesis Aug 2007. [Retrieved from the Internet on 18 Jun 2009: <http://scholarworks.iu.edu/dspace/browse?value=De%2C+Arnab&type=author>]; pg 8, para 2; pg 16, para 3; pg 40, para 1; pg 66, para 2; pg 77, para 1-2; pg 79, para 1	6, 17 1-5, 7-8, 10, 12, 17, 37-39, 48-50
Y	US 2007/0203058 A1 (Lau et al.) 30 Aug 2007 (30.08.2007) para [0006], [0013], [0084], [0129], [0219]-[0220]	1-5, 7-8, 10, 12, 17, 37-39, 48-50
Y	GenBank entry AAH05278. 15 Jul 2006. [Retrieved from the Internet 18 Jun 2009: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/13528972>]	10, 12
Y	US 2006/0171920 A1 (Shechter et al.) 03 August 2006 (03.08.2006) para [0017], [0020], [0021]	10, 12
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 June 2009 (18.06.2009)		Date of mailing of the international search report 16 JUL 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Les W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/31593

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/31593

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 55-78
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I, claims 1-8, 10, 12, 17, 37-39, 48-50, drawn to a prodrug comprising general formula I and III, wherein claims 2-3, 8 are limited to glucagon, wherein R4 of claim 17 is limited to SEQ ID NO:615.

Group II-V+, claims 1-8, 10, 12, 17, 37-39, 50-54, drawn to a prodrug comprising general formula I and III, wherein claims 2-3, 8 are limited to glucagon, wherein R4 of claim 17 is limited to SEQ ID NO:16-19, respectively. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect additional SEQ ID NO(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s).

Group VI+, claims 1-7, 9, 11-16, 17-39, 48-54, drawn to a prodrug comprising general formula I and III, limited to insulin. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional SEQ ID NO(s) and/or combination(s) thereof. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s).

----- Please see extra sheet for continuation -----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8, 10, 12, 17, 37-39, 50-54, wherein claims 2,3, 8 are limited to glucagon, wherein R4 of claim 17 is limited to SEQ ID NO:615.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/31593

***** SUPPLEMENTAL PAGE *****

Continuation of: Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Group VII+, claims 6-7, 40-54, drawn to a prodrug comprising SEQ ID NO: 622 and 623.

Group VIII+, claims 1-8, 10, 12, 17-39, 48-54 drawn to a prodrug comprising general formula I and III, limited to GLP-1. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional SEQ ID NO(s) and/or combination(s) thereof. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s).

Group IX, claims 79-85, drawn to a complex comprising the general structure A-B-Q;
wherein Q is a bioactive peptide, polypeptide, or protein;
A is an amino acid or a hydroxyl acid;
B is an amino acid; and A-B is a dipeptide that is linked to Q through formation of an ester bond between B and a hydroxyl group of Q.

The inventions listed as Groups I-IX do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I-IX share the technical feature of a peptide prodrug wherein a bioactive peptide is connected to its modifiers via an ester bond. However, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art of WO 1998/11126 A1 to Larsen et al. that teaches peptide prodrugs containing an alpha-hydroxyacid linker (abstract, "Peptide prodrugs of the general formula (I): X-L-Z, wherein X designates a pharmaceutically active peptide sequence, e.g. Leu-enkephalin; Z designates a peptide pre-sequence of 2 to 20 amino acid units, preferably comprising lysine and glutamic acid; and L is a linking group comprising from 3 to 9 backbone atoms, wherein the bond between the C-terminal carbonyl of X and L is different from a C-N amide bond. Preferably, the bond between X and L is an ester bond. It has been found that it is possible to obtain a remarkable increase in the resistance towards degradation by proteolytic enzymes such as carboxypeptidase A, pepsin A, leucine aminopeptidase, alpha-chymotrypsin when masking a pharmaceutically active peptide as a prodrug of the formula (I)"). As the above peptide prodrug was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, Groups I-IX lack unity because the claimed sequences do not share a common utility and a substantial structural feature disclosed as being essential to that utility.

Groups I-IX therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P 3/04
A 6 1 K	38/26	(2006.01)	A 6 1 K 37/28
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K 37/32
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C 0 7 K 14/00
C 0 7 K	14/605	(2006.01)	C 0 7 K 14/605
C 0 7 K	14/62	(2006.01)	C 0 7 K 14/62

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

(72)発明者 ディマルキ, リチャード, ディー.
アメリカ合衆国・インディアナ州 4 6 0 3 3 ・カーメル・ウィルミントン ドライブ 1 0 8 9
0

(72)発明者 デ, アルナブ
アメリカ合衆国・インディアナ州 4 7 4 0 8 ・ブルーミントン・ノース リンカーン ストリート 5 1 9 ・アパートメント 2

F ターム (参考) 4C076 AA12 BB11 CC16 CC21 EE23 EE41 FF63 GG45
4C084 AA02 BA01 BA08 BA19 CA18 CA59 DB01 DB22 DB34 DB35
DB38 MA05 NA05 NA14 NA15 ZA701 ZC351
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 BA57 CA40 DA30 DA37 EA30 FA20