

(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2016-512213

(P2016-512213A)

(43) 公表日 平成28年4月25日(2016.4.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/605 (2006.01)	C O 7 K 14/605	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-562166 (P2015-562166)	(71) 出願人	506042265
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日 (2014.3.13)		メディミュン リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年9月2日 (2015.9.2)		イギリス国 シービー21 6ジーエイチ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/055034		ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グ
(87) 国際公開番号	W02014/140222		ランタ パーク, ミルステイン ビルディ
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)		ング
(31) 優先権主張番号	61/783, 675	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肥満の治療のためのペグ化グルカゴン及びG L P - 1 コアゴニスト

(57) 【要約】

本開示は、代謝疾患、例えば、肥満の治療のためのペグ化 G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列：

【化 1】

HX₁X₂GT FTSDX₃ SX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀ AX₁₁X₁₂FVX₁₃WX₁₄X₁₅X₁₆

(配列番号2)

(X₁ は、 S、 G、 - アミノ - イソ - 酪酸であり；

X₂ は、 Q 又は E であり；

X₃ は、 K (P E G 4 p a l m) の Y であり；

10

X₄ は、 E、 R、 K 又は K (P E G 4 p a l m) であり；

X₅ は、 Y 又は K (P E G 4 p a l m) であり；

X₆ は、 L 又は K (P E G 4 p a l m) であり；

X₇ は、 D 又は E であり；

X₈ は、 S、 E 又は K (P E G 4 p a l m) であり；

X₉ は、 R、 E、 S、 K (g E p a l m)、 K (P E G 2 p a l m)、 K (P E G 3 p a l m)、 K (P E G 4 p a l m) 又は K (P E G 2 - P E G 2 - g E p a l m) であり；

X₁₀ は、 R、 A、 又は K (g E p a l m)、 K (P E G 4 p a l m) であり；

X₁₁ は、 Q、 R、 A、 E 又は K (g E p a l m)、 K (P E G 4 p a l m) であり；

20

X₁₂ は、 D 又は K (g E p a l m) であり；

X₁₃ は、 Q、 A 又は E であり；

X₁₄ は、 L 又は E であり；

X₁₅ は、 V 又は E であり；

X₁₆ は、 非存在であるか、 又は A であり；

分子あたり 1 以下のリシンが、 パルミトイル化される)

を含む単離ペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドが、 以下：

(a)

30

【化 2】

HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLV (配列番号3)

HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLE (配列番号18)

HSQGTFTSDYSKYLDKSRARDFVAWL (配列番号4)

HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWEV (配列番号5)

HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWLE (配列番号6)

HSQGTFTSDYSKYLDEKRAQDFVQWLV (配列番号7)

【化 3】

HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号76)	
HSQGTFTSDYSKYLDSKRARDFVAWL (配列番号77)	
HSQGTFTSDYSKYLDSKRARDFVAWLE (配列番号78)	
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLE (配列番号79)	
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWEV (配列番号80)	
HSQGTFTSDKSKYLDSRARDFVAWL (配列番号81)	10
HSQGTFTSDYSKYLDSRKAQDFVQWLE (配列番号82)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLV (配列番号83)	
HSQGTFTSDYSKKLDSRARDFVAWL (配列番号84)	
HSQGTFTSDYSEYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号85)	
HSQGTFTSDYSEYLDSKRAADFVQWLV (配列番号86)	
HSQGTFTSDYSRYLDSKRARDFVAWL (配列番号87)	
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVAWL (配列番号88)	20
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号89)	
HSQGTFTSDYSKYKDSRRAQDFVQWLV (配列番号90)	
HSQGTFTSDYSKYKDEERAQDFVQWLV (配列番号91)	
HSQGTFTSDYSKYKDSRARDFVAWL (配列番号92)	
HSQGTFTSDYSKYLDSERARDFVAWL (配列番号93)	
HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWLV (配列番号94)	
HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWLE (配列番号95)	30
HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWEV (配列番号96)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRKAQDFVQWLV (配列番号97)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAKDFVQWLV (配列番号98)	
HSQGTFTSDYSKYLDSERAKDFVAWL (配列番号99)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQKFVQWLV (配列番号100)	
HSEGTFTSDYSKYKDSRRAQDFVQWLV (配列番号101)	
HSEGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号102)	40
HGQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号103)	
HGQGTFTSDYSKYLDSKRAEDFVQWLV (配列番号104)	
HGQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVEWL (配列番号105)	
HGQGTFTSDYSKYLDSEKARDFVAWL (配列番号106)	
HGQGTFTSDYSEYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号107)	

【化 4】

HGQGTFTSDYSRYLDSKRARDFVEWLV (配列番号103)
 HGQGTFTSDYSEYLDSKRARDFVEWLV (配列番号104)
 HGQGTFTSDYSKYKDSRRAQDFVQWLV (配列番号105)
 HGQGTFTSDYSKYLESKRAQDFVQWLV (配列番号106)
 HX₁QGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVAWL (配列番号107)
 HX₁QGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号108)
 HX₁QGTFTSDYSKYKDSERARDFVAWL (配列番号109)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLEA (配列番号110)

10

(X₁は、 - アミノ - イソ - 酪酸であり；

10、13、14、16、17、18、20又は21位のアミノ酸が、パルミトイル化リシンであるとき、12位のリシンは、パルミトイル化されず；

10、13、14、16、17、18、20及び21位のアミノ酸が、パルミトイル化リシンではないとき、12位のリシンは、任意選択でパルミトイル化され；また

前記ペプチドは、C末端アミノ酸で、(PEG)_x基によりペグ化されており、ここで、x²は、2～12である)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離ペプチド。

20

【請求項3】

前記リシンが、前記リシン残基のN(イプシロン)基で、パルミトイル基によりパルミトイル化されている、請求項1又は2に記載のペプチド。

【請求項4】

前記パルミトイル基が、リンカーを介して前記リシンに連結されている、請求項3に記載のペプチド。

【請求項5】

前記リンカーが、グルタミン酸塩である、請求項4に記載のペプチド。

【請求項6】

前記リンカーが、PEGリンカーである、請求項4に記載のペプチド。

【請求項7】

前記PEGリンカーが、PEG2、PEG3、PEG4、PEG2-gE、PEG4-gE、又はPEG2-PEG2-gEリンカーである、請求項6に記載のペプチド。

30

【請求項8】

前記ペプチドが、以下：

【化 5】

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLV(PEG)₂ (配列番号3)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLV(PEG)₄ (配列番号3)

【化 6】

HSQGTFTSDYSBYLDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号8)	
HSQGTFTSDYSB ₁ YLSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号9)	
HSQGTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号10)	
HGQGTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号11)	
HSEGFTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号12)	
HSQGTFTSDYSKYBDEERAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号13)	
HSQGTFTSDYSKYLDSERARDFVAWLV(PEG) ₄ (配列番号14)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYBDSERARDFVAWLV(PEG) ₄ (配列番号15)	10
HSQGTFTSDYSKYLDBRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号16)	
HSQGTFTSDYSKYLDB ₁ RRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号17)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLE(PEG) ₄ (配列番号18)	
HSQGTFTSDYSKYLDB ₁ RRAQDFVQWLE(PEG) ₄ (配列番号19)	
HSQGTFTSDYSKYLDBRRAQDFVQWEV(PEG) ₄ (配列番号20)	
HSQGTFTSDYSKYLDB ₁ RRAQDFVQWEV(PEG) ₄ (配列番号21)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRBAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号22)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRB ₁ AQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号23)	
HGQGTFTSDYSKYLDSEBARDFVAWLV(PEG) ₄ (配列番号24)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRABDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号25)	20
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAB ₁ DFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号26)	
HSQGTFTSDYSKYLDSERABDFVAWLV(PEG) ₄ (配列番号27)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQBFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号28)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRAAQBFBVQWLV(PEG) ₄ (配列番号29)	
HSQGTFTSDB ₁ SKYLDSSRARDFVAWLV(PEG) ₄ (配列番号30)	
HSQGTFTSDYSKB ₁ LDSSRARDFVAWLV(PEG) ₄ (配列番号31)	
HSQGTFTSDYSKYB ₁ DSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号32)	
HSQGTFTSDYSKYB ₁ DSSRARDFVAWLV(PEG) ₄ (配列番号33)	
HSQGTFTSDYSKYLDB ₁ SRARDFVAWLV(PEG) ₄ (配列番号34)	30
HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号35)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号36)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₂ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号37)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₃ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号38)	
HSQGTFTSDYSEYLSBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号39)	

【化 7】

HGQGTFTSDYSEYLDSBRARDFVEWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号40)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号41)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号42)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号43)	
HGQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号44)	
HSQGTFTSDYSEYLDSBRAADFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号45)	
HGQGTFTSDYSRYLDSBRARDFVEWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号46)	
HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQRDFVAWL ₁₂ (PEG) ₁₂ (配列番号47)	10
HSQGTFTSDYSRYLDSBRARDFVAWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号48)	
HSQGTFTSDYSEYLDSBRARDFVAWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号49)	
HSQGTFTSDYSKYLDSBRARDFVAWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号50)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₆ RAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号51)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₅ RAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号52)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₄ RAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号53)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVAWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号54)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSBRARDFVAWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号55)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSB ₄ RARDFVAWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号56)	20
HSEGFTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号57)	
HSEGFTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号58)	
HGQGTFTSDYSKYLESBRAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号59)	
HGQGTFTSDYSEYLDSBRAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号60)	
HGQGTFTSDYSKYLESB ₁ RAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号61)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAEDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号62)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVEWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号63)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWL ₂ (PEG) ₂ (配列番号43)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWL ₃ (PEG) ₃ (配列番号43)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWL ₆ (PEG) ₆ (配列番号43)	30
HSQGTFTSDYSKYLDEBRAQDFVQWL ₄ (PEG) ₄ (配列番号64)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWL ₂ (PEG) ₂ (配列番号65)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWL ₃ (PEG) ₃ (配列番号65)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWL ₆ (PEG) ₆ (配列番号65)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWL ₈ (PEG) ₈ (配列番号65)	

【化 8】

HSQGTFTSDYSKYLDSB₁RAQDFVQWLV(PEG)₁₂(配列番号65)
 HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号66)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₃RAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号67)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₂RAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号68)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₁RAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号69)
 HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号70)
 HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLEA(PEG)₄(配列番号66)
 HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWEV(PEG)₄(配列番号71)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₁RAQDFVQWEV(PEG)₄(配列番号72)
 HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG)₂(配列番号35)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRBAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号73)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRB₁AQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号74)
 HSQGTFTSDYSKYLDB₁RRAQDFVQWEV(PEG)₄(配列番号21)
 HSQGTFTSDYSKYLDB₁RRAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号19)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₄RARDFVAWLE(PEG)₂(配列番号75)

10

(X₁ は、 - アミノ - イソ - 酪酸であり ;
 B は、 K (g E - p a l m) であり ;
 B₁ は、 K (P E G 4 - p a l m) であり ;
 B₂ は、 K (P E G 3 - p a l m) であり ;
 B₃ は、 K (P E G 2 - p a l m) であり ;
 B₄ は、 K (P E G 4 - g E - p a l m) であり ;
 B₅ は、 K (P E G 2 - g E - p a l m) であり ;
 B₆ は、 K (P E G 2 - P E G 2 - g E - p a l m) である)
 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

20

【請求項 9】

前記ペプチドが、以下 :

【化 9】

30

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLV (配列番号3)または
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLE (配列番号18)

のアミノ酸配列を含み、かつ、前記ペプチドが、C末端で、6 - アミノヘキサン酸又は 1
 1 - アミノウンデカン酸のいずれかに結合している単離ペプチド。

【請求項 10】

G L P - 1 活性及びグルカゴン活性を含む単離ペプチドであって、前記ペプチドが、前
 記ポリペプチドのC末端で、1 ~ 12 P E G 基の P E G 基を含み、前記ペプチドが、前記
 P E G 基を含まない同じペプチドより、増加した血清力価を有する単離ペプチド。

40

【請求項 11】

前記 P E G 基が、(P E G) x 基であり、x は、2 ~ 12 である、請求項 10 に記載の
 ペプチド。

【請求項 12】

前記 P E G 基が、(P E G) x 基であり、x は、2 ~ 6 である、請求項 10 に記載のペ
 プチド。

【請求項 13】

前記 P E G 基が、(P E G) x 基であり、x は、2 ~ 4 である、請求項 10 に記載のペ
 プチド。

【請求項 14】

前記ペプチドが、前記 P E G 基を含まないペプチドと比較して、増大した G L P 1 活性

50

及び / 又は増大した安定性を有する、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 15】

前記ペプチドが、グルカゴン受容体、GLP-1 受容体、又はグルカゴン受容体と GLP-1 受容体の両方に結合する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 16】

前記ペプチドが、グルカゴン受容体に結合する、請求項 15 に記載のペプチド。

【請求項 17】

前記グルカゴン受容体が、マウスグルカゴン受容体又はヒトグルカゴン受容体である、請求項 16 に記載のペプチド。

10

【請求項 18】

10,000 pM 未満、5000 pM 未満、2500 pM 未満、1000 pM 未満、900 pM 未満、800 pM 未満、700 pM 未満、600 pM 未満、500 pM 未満、400 pM 未満、300 pM 未満、200 pM 未満、100 pM 未満、50 pM 未満、25 pM 未満、20 pM 未満、15 pM 未満、10 pM 未満、5 pM 未満、4 pM 未満、3 pM 未満、又は 2 pM 未満の cAMP アッセイにおける EC50 でヒトグルカゴン受容体に結合する、請求項 17 に記載のペプチド。

【請求項 19】

前記ペプチドが、GLP-1 受容体に結合する、請求項 15 に記載のペプチド。

【請求項 20】

前記 GLP-1 受容体が、マウス GLP-1 受容体又はヒト GLP-1 受容体である、請求項 19 に記載のペプチド。

20

【請求項 21】

10,000 pM 未満、5000 pM 未満、2500 pM 未満、1000 pM 未満、900 pM 未満、800 pM 未満、700 pM 未満、600 pM 未満、500 pM 未満、400 pM 未満、300 pM 未満、200 pM 未満、100 pM 未満、50 pM 未満、25 pM 未満、20 pM 未満、15 pM 未満、10 pM 未満、5 pM 未満、4 pM 未満、3 pM 未満、又は 2 pM 未満の前記 cAMP アッセイにおける EC50 でヒト GLP-1 受容体に結合する、請求項 20 に記載のペプチド。

【請求項 22】

GLP-1 活性のアゴニスト、グルカゴン活性のアゴニスト、又は GLP-1 とグルカゴン活性の両方のアゴニストである、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のペプチド。

30

【請求項 23】

前記ペプチドが、グルカゴン受容体と GLP-1 受容体の両方に結合し、前記グルカゴン受容体より、前記 GLP-1 受容体で、天然リガンドと比較して少なくとも約 2 倍、5 倍、又は 10 倍大きい活性を呈示する、請求項 15 に記載のペプチド。

【請求項 24】

前記ペプチドに結合した異種部分をさらに含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 25】

前記異種部分が、タンパク質、ペプチド、タンパク質ドメイン、リンカー、有機ポリマー、無機ポリマー、ポリエチレングリコール (PEG)、ビオチン、アルブミン、ヒト血清アルブミン (HSA)、HSAFcRn 結合部分、抗体、抗体のドメイン、抗体断片、単鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非 FcRn スカフォールド、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマー、サイトカイン、又は列挙した部分の 2 つ以上の組み合わせである、請求項 24 に記載のペプチド。

40

【請求項 26】

請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

50

【請求項 27】

請求項 26 に記載の組成物を含むキット。

【請求項 28】

GLP-1 類似体の力価を増加する方法であって、PEG 基を GLP-1 類似体に結合させるステップを含み、ここで、前記 PEG 基が、2 ~ 12 PEG 単位を含む方法。

【請求項 29】

前記 PEG 基が、2 ~ 8 PEG 単位を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 PEG 基が、2 ~ 6 PEG 単位を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 PEG 基が、2 ~ 4 PEG 単位を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

過剰体重に起因する、又は過剰体重を特徴とする疾患若しくは病状を治療又は予防する方法であって、治療を必要とする被検者に、有効量の請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のペプチド、又は請求項 26 に記載の組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項 33】

前記疾患又は病状が、肥満である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記ペプチドを注射により投与する、請求項 32 又は 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記注射を皮下投与する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記ペプチドを 1 日 1 回投与する、請求項 34 又は 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記ペプチドを週 1 回投与する、請求項 34 又は 35 に記載の方法。

【請求項 38】

前記被検者が、ヒトである、請求項 32 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

被検者の体重を減少する方法であって、治療を必要とする被検者に、有効量の請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のペプチド、又は請求項 26 に記載の組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項 40】

被検者の 2 型糖尿病を治療する方法であって、治療を必要とする被検者に、有効量の請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のペプチド、又は請求項 26 に記載の組成物を投与するステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013 年 3 月 14 日に提出された米国仮特許出願第 61 / 783, 675 号明細書の利益を主張するものである。尚、この文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子データにて提出した配列表の参照

本出願と一緒に提出した ASCII テキストファイル（名称：GLPGG101WO__ST25；サイズ：44.6 キロバイト；及び作成日：2014 年 3 月 10 日）で電子データにて提出したリストの内容は、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

肥満は、世界規模で主要な、増大しつづける健康問題であり、心血管疾患、腎臓病、高血圧、発作、不妊、呼吸不全、及び2型糖尿病などの生命を脅かす多くの疾患に関連している。

【0004】

グルコン及びグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は、158アミノ酸前駆体ポリペプチドであるプレプログルカゴンに由来し、これは、様々な組織でプロセシングされて、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) など、いくつかの異なるプログルカゴン由来のペプチドを形成するが、これらは、グルコースホメオスタシス、インスリン分泌、胃内容排出、及び腸成長、並びに食物摂取の制御などの多様な生理学的機能に關与する。グルカゴンは、プログルカゴンのアミノ酸33~61 (プレプログルカゴンの53~81) に対応する29アミノ酸ペプチドであるのに対し、GLP-1は、プログルカゴンのアミノ酸72~108 (プレプログルカゴンの92~128) に対応する37アミノ酸ペプチドとして生成される。GLP-1 (7~36) アミド又はGLP-1 (7~37) 酸は、GLP-1の生物学的に活性の形態であり、GLP-1受容体で実質的に同等の活性を示す。

10

【0005】

膵臓によりグルカゴンが生成され、グルカゴン受容体 (「glucR」) と相互作用する。グルカゴンは、肝臓内で作用して、糖新生とグリコーゲン分解によって血糖を高める。血糖が下がり始めると、グルカゴンは、グリコーゲンを分解し、グルコースを放出するように肝臓にシグナルを送り、血糖値を通常のレベルへと上昇させる。

20

【0006】

GLP-1は、グルカゴンと比較して異なる生物学的活性を有する。これは、消化管内L細胞 (gut L cells) から分泌されて、GLP-1受容体に結合する。その活性には、インスリン合成及び分泌の刺激、グルカゴン分泌の阻害、及び食物摂取の阻害が含まれる。

【0007】

グルカゴン及びGLP-1のいずれも、それぞれの受容体でアゴニストとして作用し、減量に有効であることがわかっている。特定のGLP-1類似体は、販売されているか、又は肥満の治療のために開発中であり、例えば、Liraglutide (Novo NordiskからのVICTOZA (登録商標) 及びExenatide (Eli Lilly / AmylinからのByetta (登録商標)) などがある。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

有効な肥満治療のためにさらに多くの薬剤、例えば、可溶性、製剤化性 (formulatability)、安定性、及び効力が改善されたGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドが依然として求められている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本開示は、アミノ酸配列：

40

【化1】

HX₁X₂GT FTSDX₃ SX₄X₅X₆X₇ X₈X₉X₁₀AX₁₁ X₁₂FVX₁₃W X₁₄X₁₅X₁₆ (配列番号2)

(X₁は、S、G、 - アミノ - イソ - 酪酸であり；X₂は、Q又はEであり；X₃は、K (PEG4pal m) のYであり；X₄は、E、R又はK (PEG4pal m) であり；X₅は、Y又はK (PEG4pal m) であり；X₆は、L又はK (PEG4pal m) であり；X₇は、D又はEであり；X₈は、S、E又はK (PEG4pal m) であり；X₉は、R、E、S、又はK (gEpal m)、K (PEG2pal m)、K (PEG3pal m)、K (PEG4pal m) 又はK (PEG2 - PEG2 - gEpal m) であり

50

; X_{10} は、R、A、又はK (g E p a l m)、K (P E G 4 p a l m) であり; X_{11} は、Q、R、A、E 又はK (g E p a l m)、K (P E G 4 p a l m) であり; X_{12} は、D 又はK (g E p a l m) であり; X_{13} は、Q、A 又はE であり; X_{14} は、L 又はE であり; X_{15} は、V 又はE であり; X_{16} は、非存在であるか、又はA (配列番号2) であり; 分子あたりただ1つのアミノ酸が、パルミトイル化される)

を含むか、又はこれから構成される単離ペプチドを提供する。

【0010】

前述したペプチドの特定の実施形態では、 X_{15} 又は X_{16} のカルボキシル基は、ペグ化されている。一部の実施形態では、PEG基は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12単位のポリエチレングリコールオリゴマーである。一部の実施形態では、 X_{15} アミノ酸は、カルボキシル末端で、6-アミノヘキサン酸又は11-アミノウンデカン酸に結合しており、 X_{16} は、非存在である。

10

【0011】

特定の実施形態では、単離ペプチドは、以下：

【化2】

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWL (配列番号3)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLE (配列番号18)
 HSQGTFTSDYSKYLDKSRARDFVAWL (配列番号4)

20

HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWEV (配列番号5)
 HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWLE (配列番号6)
 HSQGTFTSDYSKYLDEKRAQDFVQWL (配列番号7)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWL (配列番号76)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRARDFVAWL (配列番号77)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRARDFVAWLE (配列番号78)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLE (配列番号79)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWEV (配列番号80)
 HSQGTFTSDYSKYLDSSRARDFVAWL (配列番号81)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRKAQDFVQWLE (配列番号82)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWL (配列番号3)
 HSQGTFTSDYSKKLDSRARDFVAWL (配列番号83)
 HSQGTFTSDYSEYLDKRAQDFVQWL (配列番号84)
 HSQGTFTSDYSEYLDKRAADFVQWL (配列番号85)
 HSQGTFTSDYSRYLDSKRARDFVAWL (配列番号86)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVAWL (配列番号87)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWL (配列番号76)
 HSQGTFTSDYSKYKDSRRAQDFVQWL (配列番号88)
 HSQGTFTSDYSKYKDEERAQDFVQWL (配列番号89)
 HSQGTFTSDYSKYKDSRARDFVAWL (配列番号90)
 HSQGTFTSDYSKYLDSERARDFVAWL (配列番号14)
 HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWL (配列番号91)
 HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWLE (配列番号6)
 HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWEV (配列番号5)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRKAQDFVQWL (配列番号92)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAKDFVQWL (配列番号93)
 HSQGTFTSDYSKYLDSERAKDFVAWL (配列番号94)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQKFVQWL (配列番号95)

30

40

50

【化 3】

HSEGTFTSDYSKYKDSRRAQDFVQWLV (配列番号96)
 HSEGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号97)
 HGQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号98)
 HGQGTFTSDYSKYLDSKRAEDFVQWLV (配列番号99)
 HGQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVEWLV (配列番号100)
 HGQGTFTSDYSKYLDSEKARDFVAWL (配列番号101)
 HGQGTFTSDYSEYLDKRAQDFVQWLV (配列番号102)
 HGQGTFTSDYSRYLDSKRARDFVEWLV (配列番号103)
 HGQGTFTSDYSEYLDKRARDFVEWLV (配列番号104)
 HGQGTFTSDYSKYKDSRRAQDFVQWLV (配列番号105)
 HGQGTFTSDYSKYLESKRAQDFVQWLV (配列番号106)
 HX₁QGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVAWL (配列番号107)
 HX₁QGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号108)
 HX₁QGTFTSDYSKYKDSERARDFVAWL (配列番号109)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLEA (配列番号110)

10

(X₁は、 - アミノ - イソ - 酪酸であり；

10、13、14、16、17、18、20又は21位のアミノ酸が、パルミトイル化リシンであるとき、12位のリシンは、パルミトイル化されず； 20

10、13、14、16、17、18、20及び21位のアミノ酸が、パルミトイル化リシンではないとき、12位のリシンは、任意選択でパルミトイル化され；また

ペプチドは、C末端アミノ酸で(PEG)^{x2}基によりペグ化されており、

ここで、x²は、2～12である)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0012】

一部の実施形態では、ペプチドは、リシンを含み、これは、リシン残基のN(イブシロン())基で、パルミトイル基によりパルミトイル化されている。一部の実施形態では、パルミトイル基は、リンカーを介してリシンに連結される。リンカーは、例えば、グルタミン酸塩リンカー又はポリエチレングリコール(PEG)リンカーであってよい。 30

【0013】

一部の実施形態では、PEGリンカーは、例えば、PEG₂、PEG₃、PEG₄、(PEG)₂-gE、(PEG)₄-gE、又は(PEG)₂-(PEG)₂-gEリンカーである。

【0014】

一部の実施形態では、ペプチドは、以下：

【化 4】

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₂ (配列番号3)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号3)	
HSQGTFTSDYSBYLDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号8)	
HSQGTFTSDYSB ₁ YLSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号9)	
HSQGTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号10)	
HGQGTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号11)	
HSEGTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号12)	
HSQGTFTSDYSKYBDEERAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号13)	10
HSQGTFTSDYSKYLDSERARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号14)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYBDSERARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号15)	
HSQGTFTSDYSKYLDBRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号16)	
HSQGTFTSDYSKYLDB ₁ RRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号17)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLE(PEG) ₄ (配列番号18)	
HSQGTFTSDYSKYLDB ₁ RRAQDFVQWLE(PEG) ₄ (配列番号19)	
HSQGTFTSDYSKYLDBRRAQDFVQWEV(PEG) ₄ (配列番号20)	
HSQGTFTSDYSKYLDB ₁ RRAQDFVQWEV(PEG) ₄ (配列番号21)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRBAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号22)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRB ₁ AQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号23)	20
HGQGTFTSDYSKYLDSEBARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号24)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRABDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号25)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAB ₁ DFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号26)	
HSQGTFTSDYSKYLDSERABDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号27)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQBFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号28)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRAAQBQFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号29)	
HSQGTFTSDB ₁ SKYLDSSRARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号30)	
HSQGTFTSDYSKB ₁ LDSSRARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号31)	
HSQGTFTSDYSKYB ₁ DSRRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号32)	30
HSQGTFTSDYSKYB ₁ DSSRARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号33)	
HSQGTFTSDYSKYLDB ₁ SRARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号34)	
HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号35)	
HSQGTFTSDYSKYLDSRB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号36)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₂ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号37)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₃ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号38)	

【化 5】

HSQGTFTSDYSEYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号39)	
HGQGTFTSDYSEYLDSBRARDFVEWLV(PEG) ₄ (配列番号40)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号41)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号42)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号43)	
HGQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号44)	
HSQGTFTSDYSEYLDSBRAADFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号45)	
HGQGTFTSDYSRYLDSBRARDFVEWLV(PEG) ₄ (配列番号46)	10
HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQRDFVAWL(PEG) ₁₂ (配列番号47)	
HSQGTFTSDYSRYLDSBRARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号48)	
HSQGTFTSDYSEYLDSBRARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号49)	
HSQGTFTSDYSKYLDSBRARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号50)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₆ RAQDFVQWLE(PEG) ₄ (配列番号51)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₅ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号52)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₄ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号53)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号54)	
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSBRARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号55)	20
HX ₁ QGTFTSDYSKYLDSB ₄ RARDFVAWL(PEG) ₄ (配列番号56)	
HSEGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号57)	
HSEGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号58)	
HGQGTFTSDYSKYLESBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号59)	
HGQGTFTSDYSEYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号60)	
HGQGTFTSDYSKYLESB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号61)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAEDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号62)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVEWLV(PEG) ₄ (配列番号63)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₂ (配列番号43)	
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₃ (配列番号43)	30
HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG) ₆ (配列番号43)	
HSQGTFTSDYSKYLDEBRAQDFVQWLV(PEG) ₄ (配列番号64)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₂ (配列番号65)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₃ (配列番号65)	
HSQGTFTSDYSKYLDSB ₁ RAQDFVQWLV(PEG) ₆ (配列番号65)	

【化 6】

HSQGTFTSDYSKYLDSB₁RAQDFVQWLV(PEG)₈(配列番号65)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₁RAQDFVQWLV(PEG)₁₂(配列番号65)
 HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号66)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₃RAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号67)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₂RAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号68)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₁RAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号69)
 HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号70)
 HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLEA(PEG)₄(配列番号66)
 HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWEV(PEG)₄(配列番号71)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₁RAQDFVQWEV(PEG)₄(配列番号72)
 HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLV(PEG)₂(配列番号35)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRBAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号73)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRB₁AQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号74)
 HSQGTFTSDYSKYLDB₁RRAQDFVQWEV(PEG)₄(配列番号21)
 HSQGTFTSDYSKYLDB₁RRAQDFVQWLE(PEG)₄(配列番号19)
 HSQGTFTSDYSKYLDSB₄RARDFVAWLE(PEG)₂(配列番号75)

10

(X₁ は、 - アミノ - イソ - 酪酸であり ;
 B は、 K (g E - p a l m) であり ;
 B₁ は、 K (P E G 4 - p a l m) であり ;
 B₂ は、 K (P E G 3 - p a l m) であり ;
 B₃ は、 K (P E G 2 - p a l m) であり ;
 B₄ は、 K (P E G 4 - g E - p a l m) であり ;
 B₅ は、 K (P E G 2 - g E - p a l m) であり ;
 B₆ は、 K (P E G 2 - P E G 2 - g E - p a l m) である)
 のアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 1 5 】

ペプチドが、以下 :

30

【化 7】

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLV (配列番号3)または
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLE (配列番号18)

のアミノ酸配列を含み、かつ、前記ペプチドが、C末端で、6 - アミノヘキサン酸又は1
 1 - アミノウンデカン酸のいずれかに結合している、単離ペプチド。

【 0 0 1 6 】

本発明はまた、GLP - 1 活性及びグルカゴン活性を含む単離ペプチドも提供し、前記
 ペプチドは、ポリペプチドのC末端でPEG基を含み、このペプチドは、PEG基を含ま
 ない同じペプチドより、増加した血清力価を有する。

40

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、ペプチドは、C末端に結合した約2 ~ 12のPEG単位(省略形
 (P E G) x (x は、2 ~ 12である)、例えば、(P E G)₂、(P E G)₃、(P E G)
)₄、(P E G)₅、(P E G)₆、(P E G)₇、(P E G)₈、(P E G)₉、(P E G)
)₁₀、(P E G)₁₁、(P E G)₁₂)を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、xが2 ~
 8の(P E G) x 基であるPEG基を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、xが2 ~
 6の(P E G) x 基であるPEG基を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、xが2 ~
 4の(P E G) x 基であるPEG基を含む。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、本発明のペプチドは、PEG基を含まないペプチドと比較して、

50

増大した G L P 1 活性及び / 又は増大した安定性を有する。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、ペプチドは、グルカゴン受容体に結合する。一部の実施形態では、ペプチドは、G L P - 1 受容体に結合する。一部の実施形態では、ペプチドは、グルカゴン受容体と G L P - 1 受容体の両方に結合する。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、グルカゴン受容体は、マウスグルカゴン受容体又はヒトグルカゴン受容体である。一部の実施形態では、ペプチドは、1 0 , 0 0 0 p M 未満、5 0 0 0 p M 未満、2 5 0 0 p M 未満、1 0 0 0 p M 未満、9 0 0 p M 未満、8 0 0 p M 未満、7 0 0 p M 未満、6 0 0 p M 未満、5 0 0 p M 未満、4 0 0 p M 未満、3 0 0 p M 未満、2 0 0 p M 未満、1 0 0 p M 未満、5 0 p M 未満、2 5 p M 未満、2 0 p M 未満、1 5 p M 未満、1 0 p M 未満、5 p M 未満、4 p M 未満、3 p M 未満、又は 2 p M 未満の c A M P アッセイにおける E C 5 0 でヒトグルカゴン受容体に結合する。

10

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、G L P - 1 受容体は、マウス G L P - 1 受容体又はヒト G L P - 1 受容体である。一部の実施形態では、ペプチドは、1 0 , 0 0 0 p M 未満、5 0 0 0 p M 未満、2 5 0 0 p M 未満、1 0 0 0 p M 未満、9 0 0 p M 未満、8 0 0 p M 未満、7 0 0 p M 未満、6 0 0 p M 未満、5 0 0 p M 未満、4 0 0 p M 未満、3 0 0 p M 未満、2 0 0 p M 未満、1 0 0 p M 未満、5 0 p M 未満、2 5 p M 未満、2 0 p M 未満、1 5 p M 未満、1 0 p M 未満、5 p M 未満、4 p M 未満、3 p M 未満、又は 2 p M 未満の c A M P アッセイにおける E C 5 0 でヒト G L P - 1 受容体に結合する。

20

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態では、ペプチドは、G L P - 1 活性のアゴニスト、グルカゴン活性のアゴニスト、又は G L P - 1 とグルカゴン活性の両方のアゴニストである。一部の実施形態では、ペプチドは、グルカゴン受容体と G L P - 1 受容体の両方に結合し、グルカゴン受容体より、G L P - 1 受容体で、天然リガンドと比較して少なくとも約 2 倍、5 倍、又は 1 0 倍大きい活性を呈示する。

【 0 0 2 3 】

一部の実施形態では、本発明のペプチドは、ペプチドに結合した異種部分をさらに含む。この異種部分は、タンパク質、ペプチド、タンパク質ドメイン、リンカー、有機ポリマー、無機ポリマー、ポリエチレングリコール (P E G)、ビオチン、アルブミン、ヒト血清アルブミン (H S A)、H S A F c R n 結合部分、抗体、抗体のドメイン、抗体断片、単鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非 F n I I I スカフォールド、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマー、サイトカイン、又は列挙した部分の 2 つ以上の組み合わせである。

30

【 0 0 2 4 】

本発明はまた、本明細書に記載する本発明のペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物、及びこのような組成物を含むキットも提供する。

【 0 0 2 5 】

さらに、本発明は、G L P - 1 類似体の力価を増加する方法も提供し、これは、P E G 基を G L P - 1 類似体に結合させるステップを含み、ここで、前記 P E G 基は、2 ~ 1 2 P E G 単位を含む。一部の実施形態では、P E G 基は、2 ~ 8 P E G 単位を含む。一部の実施形態では、P E G 基は、2 ~ 6 P E G 単位を含む。ある実施形態では、P E G 基は、2 ~ 4 P E G 単位を含む。

40

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、過剰体重に起因する、又は過剰体重を特徴とする疾患若しくは病状を治療又は予防する方法であって、治療を必要とする被検者に、有効量の本明細書に記載のペプチド、又は本明細書に記載の組成物を投与するステップを含む方法も提供する。

【 0 0 2 7 】

一部の実施形態では、疾患若しくは病状は、肥満である。

50

【 0 0 2 8 】

本発明の一部の実施形態では、ペプチドを注射により投与する。一部の実施形態では、注射を皮下投与する。一部の実施形態では、注射を1日1回投与する。一部の実施形態では、注射を週1回投与する。一部の実施形態では、被検者はヒトである。

【 0 0 2 9 】

本発明は、被検者の体重を減少する方法であって、治療を必要とする被検者に、有効量の本明細書に記載のペプチド、又は本明細書に記載の組成物を投与するステップを含む方法をさらに提供する。

【 0 0 3 0 】

本明細書に記載のペプチドのいずれかは、1つ又は複数の修飾アミノ酸、例えば、アシル部分の添加を含んでよく、例えば、修飾は、リシン残基のN（イプシロン（ ））基へのパルミトイル部分の付加であってよい。特定の実施形態では、パルミトイル基は、グルタミン酸リンカーを介してリシン残基に連結される。アラニン、6-アミノヘキサン酸及び11-アミノウンデカン酸などの別のリンカーが用いられてきた。さらに別のリンカーも可能であり、PEG部分を含む（例えば、2～8 PEG単位を含む）リンカーなどがある。一部の実施形態では、リンカーは、例えば、2、3又は4 PEG単位などの短いPEG部分を含む。

【 0 0 3 1 】

様々な実施形態では、本明細書に記載する単離ペプチドは、グルカゴン受容体、GLP-1受容体、又はグルカゴンとGLP-1受容体の両方に結合することができる。特定の態様では、グルカゴン受容体は、ヒトグルカゴン受容体であり、及び又はGLP-1受容体は、ヒトGLP-1受容体である。特定の態様では、本明細書に記載する単離ペプチドは、10,000 pM未満、5000 pM未満、2500 pM未満、1000 pM未満、900 pM未満、800 pM未満、700 pM未満、600 pM未満、500 pM未満、400 pM未満、300 pM未満、200 pM未満、100 pM未満、50 pM未満、25 pM未満、20 pM未満、15 pM未満、10 pM未満、5 pM未満、4 pM未満、3 pM未満、又は2 pM未満のcAMPアッセイ（本明細書に記載の通り）におけるEC50でヒトグルカゴン受容体に結合する。特定の態様では、本明細書に記載する単離ペプチドは、10,000 pM未満、5000 pM未満、2500 pM未満、1000 pM未満、900 pM未満、800 pM未満、700 pM未満、600 pM未満、500 pM未満、400 pM未満、300 pM未満、200 pM未満、100 pM未満、50 pM未満、25 pM未満、20 pM未満、15 pM未満、10 pM未満、5 pM未満、4 pM未満、3 pM未満、又は2 pM未満のcAMPアッセイにおけるEC50でヒトGLP-1受容体に結合する。

【 0 0 3 2 】

特定の実施形態では、本明細書に記載する単離ペプチドは、GLP-1活性のアゴニスト、グルカゴン活性のアゴニスト、又はGLP-1とグルカゴン活性の両方のアゴニストである。一部の実施形態では、本明細書に記載する単離ペプチドは、グルカゴン受容体とGLP-1受容体の両方に結合し、グルカゴン受容体より、GLP-1受容体で、天然リガンドと比較して少なくとも約2倍大きい活性を呈示する。一実施形態では、ペプチドは、グルカゴンに対するグルカゴン受容体より、GLP-1と比較して、GLP-1Rで、5～10倍高い相対力価を呈示する。

【 0 0 3 3 】

特定の実施形態では、本発明に記載の単離ペプチドは、ペプチドに結合する異種部分をさらに含んでよい。一部の態様では、異種部分は、タンパク質、ペプチド、タンパク質ドメイン、リンカー、有機ポリマー、無機ポリマー、ポリエチレングリコール（PEG）、ビオチン、アルブミン、ヒト血清アルブミン（HSA）、HSA FcRn結合部分、抗体、抗体のドメイン、抗体断片、単鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非FnIIIスカフォールド、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマー、サイトカイン、又はこれらの部分の2つ以上の組み合わせ

10

20

30

40

50

である。

【0034】

また、本明細書に記載する単離ペプチドと、担体とを含む医薬組成物も提供される。このような医薬組成物を含むキットもさらに提供される。

【0035】

さらにまた、過剰体重に起因する、又は過剰体重を特徴とする疾患若しくは病状を治療又は予防する方法であって、治療を必要とする被検者に、有効量の本明細書に記載の単離ペプチド、又はこのようなペプチドを含有する組成物を投与するステップを含む方法も提供する。特定の態様では、疾患又は病状は、肥満、インスリン抵抗性、耐糖能障害、糖尿病前期、空腹時血糖値上昇、2型糖尿病、高血圧、脂質異常症（又はこれら代謝リスク因子の組み合わせ）、グルカゴン産生腫瘍、心血管疾患、例えば、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化（atherosclerosis）、動脈硬化、冠動脈性心疾患、又は抹消動脈疾患；発作、呼吸不全、腎疾患、及びこれらのいずれかの併発であってよい。本方法によれば、本明細書に記載する単離ペプチドは、注射、例えば、皮下注射により投与することができる。本方法によれば、ペプチドは、1日1回投与することができる。一部の実施形態では、注射は、週1回投与することができる。特定の実施形態では、被検者は、ヒトである。

10

【0036】

さらには、過剰体重に起因する、又は過剰体重を特徴とする疾患若しくは病状を治療又は予防する方法であって、治療を必要とする被検者に、有効量の本明細書に記載の単離ペプチド、又はこのようなペプチドを含有する組成物を投与するステップを含む方法も提供する。本方法によれば、本明細書に記載する単離ペプチドは、注射、例えば、皮下注射により投与することができる。本方法によれば、ペプチドは、1日1回投与することができる。一部の実施形態では、注射は、週1回投与することができる。特定の実施形態では、被検者は、ヒトである。

20

【発明を実施するための形態】

【0037】

定義

本開示全体を通して、用語「1つの(a)」又は「1つの(an)」実体は、1つ又は複数の該実体を指し；例えば、「1つのポリヌクレオチド」は、1つ又は複数のポリヌクレオチドを示すと理解される。従って、用語「1つの(a)」(又は「1つの(an)」)及び「少なくとも1つの」は、本明細書において置換え可能に用いることができる。

30

【0038】

さらに、本明細書で用いる「及び/又は」は、2つの明示された特徴又は構成要素の各々を他のものと一緒に又はなしで、具体的に開示するものとして理解すべきである。従って、本明細書において、「A及び/又はB」のようなフレーズに用いられる用語「及び/又は」は、「A及びB」、「A又はB」、「A」(単独)、並びに「B」(単独)を包含することが意図される。同様に、「A、B、及び/又はC」のようなフレーズに用いられる用語「及び/又は」は、以下の側面：A、B及びC；A、B、又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；A(単独)；B(単独)；並びにC(単独)を包含することが意図される。

40

【0039】

本明細書において、態様が、「含む」という表現と共に記載されている場合はいずれも、「から構成される」及び/又は「からほぼ構成される」の用語で記載される別の類似の態様も提供されることは理解されたい。

【0040】

別に定義されない限り、本明細書で用いる技術及び科学用語は全て、本開示が関連する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press

50

s ; The Dictionary of Cell and Molecular Biology , 第3版 , 1999 , Academic Press ; 及び Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology , 改訂版 , 2000 , Oxford University Press は、本開示に用いられる用語の多くの一般的辞書を当業者に提供する。

【0041】

単位、接頭語、及び記号は、それぞれが国際単位系 (S I) により容認される形態で表示する。数値の範囲は、範囲を定める数値を含む。別に指示のない限り、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシの方向で、左から右に記載する。本明細書に記載する見出しは、開示の様々な態様の限定ではなく、これらは、参照により全体を本明細書に組み込むことができる。従って、すぐ下に定義する用語は、本明細書の全体を参照することにより、より十全に定義される。

10

【0042】

本明細書で用いる場合、用語「ポリペプチド」は、単数の「ポリペプチド」、さらには複数の「ポリペプチド」を包含することが意図され、2つ以上のアミノ酸の任意の1つ又は複数の鎖を含む。従って、本明細書で用いる場合、1つの「ペプチド」、1つの「ペプチドサブユニット」、1つの「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、「アミノ酸配列」、又は2つ以上のアミノ酸の任意の1つ又は複数の鎖を指すのに用いられるいずれか他の用語は、たとえこれら用語の各々が、より特有の意味を有し得るとしても、「ポリペプチド」の定義に含まれる。用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかに代わり、またはそのいずれかと置換え可能に用いることができる。この用語はさらに、翻訳後又は合成後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護/遮断基による誘導体化、タンパク質切断、又は非天然アミノ酸による修飾を受けたポリペプチドも含む。

20

【0043】

さらに具体的には、本明細書で用いる場合、用語「ペプチド」は、完全長ペプチド及び断片、その変異体若しくは誘導体、例えば、GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチド (例えば、長さ29、30、若しくは31アミノ酸) を包含する。本明細書に開示する「ペプチド」例えば、GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、例えば、半減期を延長するために、Fcドメイン又はアルブミンドメインなどの別の成分を含む融合ポリペプチドの一部であってよい。本明細書に記載するペプチドは、いくつかの異なる方法で誘導体化することもできる。

30

【0044】

用語「断片」、「類似体」、「誘導体」、又は「変異体」は、GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを指す場合、少なくとも一部の要望される活性、例えば、グルカゴン及び/又はGLP - 1 受容体への結合を保持する任意のペプチドを含む。本明細書に記載するGLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドの断片は、発現、精製、及び又は被験者への投与の際に、望ましい特性を呈示するタンパク質分解断片、欠失断片を含む。

【0045】

本明細書で用いる場合、用語「変異体」は、アミノ酸置換、欠失、挿入、及び/又は修飾によって、記載したペプチドとは異なるペプチドを指す。当分野では公知の突然変異誘導技術を用いて、変異体を作製することができる。変異体はさらに、あるいは、これに代わり、他の修飾を含むことができ、例えば、半減期、可溶性、若しくは安定性を増大するために、ペプチドを異種アミノ酸配列若しくは他の部分に結合又はカップリング、例えば、融合させることができる。本明細書に記載のペプチドに結合又はカップリングさせる部分の例として、限定するものではないが、アルブミン、免疫グロブリンFc領域、ポリエチレングリコール (PEG) などが挙げられる。ペプチドはまた、ペプチド (例 : 6 - His) の合成、精製若しくは同定を容易にするために、又は固体支持体とのポリペプチドの結合を増強するために、リンカー又は他の配列に結合させるか、又はカップリングして作製することもできる。

40

50

【 0 0 4 6 】

本明細書で用いる場合、用語「配列同一性」は、2つ以上のポリヌクレオチド配列同士、又は2つ以上のポリペプチド配列同士の関係を指す。1つの配列のある位置が、比較配列の対応位置と同じ核酸塩基又はアミノ酸によって占められているとき、配列は、その位置で「同一」とであると言う。「配列同一性」の割合(%)は、両配列において同一の核酸塩基又はアミノ酸が存在する位置の数を決定して、「同一」位置の数を得ることにより計算する。次に、「同一」位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割ってから、100を掛けることにより、「配列同一性」の割合(%)を取得する。「配列同一性」の割合(%)は、2つの最適にアラインメントした配列を、比較ウィンドウにわたって比較することにより決定する。比較のために配列を最適にアラインメントする目的で、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の部分は、ギャップと呼ばれる付加又は欠失を含んでもよいが、参照配列は、不変のまま維持する。最適なアラインメントは、ギャップがあっても、参照及び比較配列間で、考えられる最大の「同一」位置を生み出すアラインメントである。2つの配列同士の「配列同一性」の割合(%)は、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)(2004年9月1日現在)から入手可能なプログラム「BLAST 2 Sequences」のバージョンを用いて決定することができ、このプログラムは、プログラムBLASTN(ヌクレオチド配列の比較用)とBLASTP(ポリペプチド配列の比較用)を含み、これらのプログラムは、Karlin及びAltschul(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12):5873-5877, 1993)のアルゴリズムに基づく。「BLAST 2 Sequences」を使用する場合、2004年9月1日現在デフォルトパラメータであるパラメータを語長(3)、オープンギャップペナルティ(11)、伸長ギャップペナルティ(1)、ギャップドロップオフ(50)、期待値(10)について用いることができ、また、限定はしないが、マトリクスオプションなどの任意の他の必要なパラメータを用いてもよい。

10

20

【 0 0 4 7 】

用語「組成物」又は「医薬組成物」は、治療を必要とする被検者、例えば、肥満を治療中のヒト被検者への投与のための、例えば、薬学的に許容される担体、賦形剤、又は希釈剤と一緒に、本明細書に記載のGLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドを含有する組成物を指す。

30

【 0 0 4 8 】

用語「薬学的に許容される」は、正しい医学的判断の範囲内で、過剰な毒性又は他の合併症なしに、妥当な利益/リスク比で、ヒト及び動物の組織との接触に好適な組成物を指す。

【 0 0 4 9 】

「有効な量」は、単一用量又はシリーズの一部としてのいずれかで、被検者に投与した場合、治療、例えば、肥満の治療に有効な、本明細書に記載するGLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドの量である。ある量は、例えば、その投与により、減量又は体重維持(例えば、増量の予防)、体脂肪の減少、低血糖の予防若しくは調節、高血糖の予防若しくは調節、インスリン合成の促進、又は食物摂取の抑制のうち1つ又は複数が達成されるとき、有効である。この量は、治療を受ける全ての被検者について一定量であってもよいし、又は治療しようとする被検者の体重、健康状態、及び体調、要望される減量又は体重維持の程度、ペプチドの製剤化、医学的状況の専門家による評価、並びに他の関連因子に応じて変動し得る。

40

【 0 0 5 0 】

用語「被検者」は、本明細書に記載するGLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドを用いた治療を必要とする任意の被検者、特に哺乳動物の被検者を意味する。哺乳動物の被検者として、限定はしないが、ヒト、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、クマ、乳牛、類人猿、サル、オランウータン、及びチンパンジーなどが挙げられる。一実施形態では、被検者は、ヒト被検者である。

50

【0051】

本明細書で用いる場合、「それを必要とする被検者」は、治療することが望ましい個体、例えば、体重若しくは体脂肪減少、体重若しくは体脂肪維持を促進すること又は、指定された期間にわたって増量を予防若しくは最小限にすることが望ましい肥満の被検者又は肥満になりやすい被検者を指す。

【0052】

本明細書で用いる場合、「GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチド」は、グルカゴン受容体において、ネイティブグルカゴンと比べ、少なくとも約1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又はそれを超える活性を呈示し、かつ、アッセイ1の条件下で、GLP-1受容体において、ネイティブGLP-1と比べ、少なくとも約1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又はそれを超える活性を呈示するキメラペプチドである。

10

【0053】

本明細書で用いる場合、用語「ネイティブグルカゴン」は、配列番号1の配列を含む、天然に存在するグルカゴン、例えば、ヒトグルカゴンを指す。用語「ネイティブGLP-1」は、天然に存在するGLP-1、例えば、ヒトGLP-1を指し、例えば、GLP-1(7~36)アミド(配列番号2)、GLP-1(7~37)酸(配列番号3)又はこれら2つの化合物の混合物を包含する総称である。本明細書で用いる場合、「グルカゴン」又は「GLP-1」は、それ以上の呼称がない場合、ネイティブヒトグルカゴン又はネイティブGLP-1をそれぞれ意味するものとする。他に指示のない限り、「グルカゴン」は、ヒトグルカゴンを指し、また、「GLP-1」は、ヒト「GLP-1」を指す。

20

【0054】

GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチド

本明細書には、グルカゴン受容体とGLP-1受容体の両方に結合するペプチドが記載される。特定の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、グルカゴン及びGLP-1活性のコアゴニストである。このようなペプチドは、本明細書において、GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドと呼ぶ。本明細書に記載するGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、減量を促進し、増量を予防するか、又は望ましい体重を維持する上で好都合な比でGLP-1及びグルカゴン活性を有し、かつ最適化された可溶性、製剤化性、及び安定性を備える。特定の実施形態では、本明細書に記載するGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、ヒトGLP-1及びヒトグルカゴン受容体において活性であり、特定の実施形態では、GLP-1受容体において天然リガンドと比較した相対活性は、グルカゴン受容体でのものより、少なくとも約1倍、2倍、5倍、8倍、10倍、15倍、20倍、又は25倍高い。

30

【0055】

特定の実施形態では、本明細書に開示するGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、グルカゴン及びGLP-1受容体において望ましい力価を有し、減量を促進する上で望ましい相対力価を有する。特定の実施形態では、開示するGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、cAMPアッセイ(実施例2を参照)でのEC50により示されるように、GLP-1受容体において、10,000 pM未満、5000 pM未満、2500 pM未満、1000 pM未満、900 pM未満、800 pM未満、700 pM未満、600 pM未満、500 pM未満、400 pM未満、300 pM未満、200 pM未満、100 pM未満、50 pM未満、25 pM未満、20 pM未満、15 pM未満、10 pM未満、5 pM未満、4 pM未満、3 pM未満、又は2 pM未満の*in vitro*力価を呈示する。特定の実施形態では、本明細書に開示するGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、cAMPアッセイ(実施例2を参照)でのEC50により示されるように、グルカゴン受容体において、10,000 pM未満、5000 pM未満、2500 pM未満、1000 pM未満、900 pM未満、800 pM未満、700 pM未満、600 pM未満、500 pM未満、400 pM未満、300 pM未満、200 pM未満、100 pM未満

40

50

、50 pM未満、25 pM未満、20 pM未満、15 pM未満、10 pM未満、5 pM未満、4 pM未満、3 pM未満、又は2 pM未満の *in vitro* 力価を呈示する。特定の実施形態では、本明細書に開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、アッセイ2で用いる場合、ネイティブリガンドと比較して、約0.01~0.50の範囲、例えば、約0.02~0.30、例えば、約0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、又は0.30の相対 GLP1-R / glucR 力価比を有する。

【0056】

10

特定の実施形態では、開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、cAMP アッセイ（実施例2を参照）での EC50 により示されるように、グルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチド（胃抑制ペプチド）（GIPIR: gastric inhibitory peptide）で、10,000 pM未満、5000 pM未満、2500 pM未満、1000 pM未満、900 pM未満、800 pM未満、700 pM未満、600 pM未満、500 pM未満、400 pM未満、300 pM未満、200 pM未満、100 pM未満、50 pM未満、25 pM未満、20 pM未満、15 pM未満、10 pM未満、5 pM未満、4 pM未満、3 pM未満、又は2 pM未満の *in vitro* 力価を呈示する。

【0057】

20

特定の実施形態では、本明細書に開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、許容可能な可溶性、製剤化しやすさ、血漿安定性、及び改善された薬物動力学特性の1つ又は複数の基準を有する。特定の実施形態では、開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、広範な pH 範囲にわたって標準バッファー中に可溶性である。

【0058】

特定の実施形態では、GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、一般的バッファー溶液中に、最大0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.7 mg/ml、0.8 mg/ml、0.9 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、4 mg/ml、5 mg/ml、6 mg/ml、7 mg/ml、8 mg/ml、9 mg/ml、10 mg/ml、又はそれを超える濃度で、バッファー系に、例えば、0.25~150 mMのイオン強度の範囲で可溶性であり、限定はしないが、リン酸バッファー、Tris バッファー、グルタミン酸バッファー、酢酸バッファー、コハク酸バッファー、又はヒスチジンバッファーが挙げられる。例示的バッファーとしては、100 mMグルタミン酸 pH 4.5 バッファー、100 mM酢酸 pH 5 バッファー、100 mMコハク酸 pH 5 バッファー、100 mMリン酸 pH 6 バッファー、100 mMヒスチジン pH 6 バッファー、100 mMリン酸 pH 6.5 バッファー、100 mMリン酸 pH 7.0 バッファー、100 mMヒスチジン pH 7.0 バッファー、100 mMリン酸 pH 7.5 バッファー、100 mM Tris pH 7.5 バッファー、100 mM Tris pH 8.0 バッファーが挙げられる。特定の実施形態では、開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、例えば、pH 4.0~pH 8.0 の pH 範囲にわたって、例えば、pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、又は8.5で、0.8 mg/ml の標準的バッファーに可溶性である。特定の実施形態では、開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、pH 4.5~8.0、5.0~8.0、5.5~8.0、6.0~8.0、6.5~8.0、7.0~8.0、4.5~8.5、5.5~8.5、5.5~8.5、6.0~8.5、6.5~8.5、又は7.0~8.5 の標準的バッファーに可溶性である。

30

40

【0059】

特定の実施形態では、開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、標準的医薬製剤中に製剤化可能である。例示的製剤として、限定はしないが、以下のものが挙げられる：0.1 M Tris pH 7.5、150 mM マンニトール、最終製剤 pH =

50

7.2; 0.05 M Tris、50 mM アルギニン/プロリン、最終製剤 pH = 8.0; 又はリン酸ナトリウムバッファー (pH 8) / 1.85 % W/V プロピレングリコール、最終製剤 pH = 7.0。特定の実施形態では、開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、最大 0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.7 mg/ml、0.8 mg/ml、0.9 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、4 mg/ml、5 mg/ml、6 mg/ml、7 mg/ml、8 mg/ml、9 mg/ml、10 mg/ml、又はそれを超える濃度で、上記又は他の製剤に可溶性である。

【0060】

特定の実施形態では、開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、血清又は血漿中のプロテアーゼに対して許容可能に安定している。グルカゴン又は GLP-1 の一般的分解産物としては、+1 産物 (酸) 及び DPP-IV-分解産物がある。+1 質量を有する産物は、グルタミンのアミド基又は C 末端での脱アミド化から生じ得る。分解産物は、血漿中のプロテアーゼ DPP-IV の作用から生じ得る。特定の実施形態では、開示する GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、37 の血漿中 24 時間後、最大 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、又は 100 % のレベルで血漿中に安定したままである。

10

【0061】

本明細書において、アミノ酸配列:

【化 8】

HX₁X₂GT FTSDX₃ SX₄X₅X₆X₇ X₈X₉X₁₀AX₁₁ X₁₂FVX₁₃W X₁₄X₁₅X₁₆ (配列番号2)

20

(ここで、X₁は S、G、-アミノ-イソ-酪酸であり; X₂は、Q 又は E であり; X₃は、K (PEG 4 pal m) の Y であり; X₄は、E、R 又は K (PEG 4 pal m) であり; X₅は、Y 又は K (PEG 4 pal m) であり; X₆は、L 又は K (PEG 4 pal m) であり; X₇は、D 又は E であり; X₈は、S、E 又は K (PEG 4 pal m) であり; X₉は、R、E、S、又は K (gE pal m)、K (PEG 2 pal m)、K (PEG 3 pal m)、K (PEG 4 pal m) 又は K (PEG 2 - PEG 2 - gE pal m) であり; X₁₀は、R、A、又は K (gE pal m)、K (PEG 4 pal m) であり; X₁₁は、Q、R、A、E 又は K (gE pal m)、K (PEG 4 pal m) であり; X₁₂は、D 又は K (gE pal m) であり; X₁₃は、Q、A 又は E であり; X₁₄は、L 又は E であり; X₁₅は、V 又は E であり; X₁₆は、非存在又は A (配列番号 2) であり; 分子あたり唯一つのアミノ酸が、パルミトイル化される)

30

を含む GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドが提供される。

【0062】

前述したペプチドの特定の実施形態では、X₁₅のカルボキシル基は、ペグ化されている。一部の実施形態では、PEG 基は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12 単位のポリエチレングリコールオリゴマーである。一部の実施形態では、X₁₅アミノ酸は、カルボキシル末端で、6-アミノヘキサン酸又は 11-アミノウンデカン酸に結合している。

40

【0063】

特定の実施形態では、単離ペプチドは、以下:

【化 9】

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWL V (配列番号3)
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLE (配列番号18)
HSQGTFTSDYSKYLDKSRARDFVAWL V (配列番号4)
HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWEV (配列番号5)
HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAQDFVQWLE (配列番号6)
HSQGTFTSDYSKYLDEKRAQDFVQWL V (配列番号7)
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWL V (配列番号76)
HSQGTFTSDYSKYLDSKRARDFVAWL V (配列番号77)
HSQGTFTSDYSKYLDSKRARDFVAWLE (配列番号78)
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLE (配列番号79)
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWEV (配列番号80)
HSQGTFTSDYSKYLDSSRARDFVAWL V (配列番号81)
HSQGTFTSDYSKYLDSRKAQDFVQWLE (配列番号82)
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWL V (配列番号3)
HSQGTFTSDYSKKLDSSRARDFVAWL V (配列番号83)
HSQGTFTSDYSEYLSKRAQDFVQWL V (配列番号84)
HSQGTFTSDYSEYLSKRAADFVQWL V (配列番号85)
HSQGTFTSDYSRYLSKRARDFVAWL V (配列番号86)
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVAWL V (配列番号87)
HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWL V (配列番号76)
HSQGTFTSDYSKYKDSRRAQDFVQWL V (配列番号88)
HSQGTFTSDYSKYKDEERAQDFVQWL V (配列番号89)
HSQGTFTSDYSKYKDSSRARDFVAWL V (配列番号90)
HSQGTFTSDYSKYLDSERARDFVAWL V (配列番号14)

10

20

【化 1 0】

HSQGTFTSDYSKYLDKRRQDFVQWLV (配列番号91)
 HSQGTFTSDYSKYLDKRRQDFVQWLE (配列番号6)
 HSQGTFTSDYSKYLDKRRQDFVQWEV (配列番号5)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRKAQDFVQWLV (配列番号92)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRQDFVQWLV (配列番号93)
 HSQGTFTSDYSKYLDSERQDFVQWLV (配列番号94)
 HSQGTFTSDYSKYLDSRRQKFVQWLV (配列番号95)
 HSEGTFTSDYSKYKDSRRQDFVQWLV (配列番号96)
 HSEGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号97)
 HGQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号98)
 HGQGTFTSDYSKYLDSKRAEDFVQWLV (配列番号99)
 HGQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVEWLV (配列番号100)
 HGQGTFTSDYSKYLDSEKARDFVQWLV (配列番号101)
 HGQGTFTSDYSEYLSKRAQDFVQWLV (配列番号102)
 HGQGTFTSDYSRYLSKRARDFVEWLV (配列番号103)
 HGQGTFTSDYSEYLSKRARDFVEWLV (配列番号104)
 HGQGTFTSDYSKYKDSRRQDFVQWLV (配列番号105)
 HGQGTFTSDYSKYLESKRAQDFVQWLV (配列番号106)
 HX₁QGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号107)
 HX₁QGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLV (配列番号108)
 HX₁QGTFTSDYSKYKDSERARDFVQWLV (配列番号109)
 HSQGTFTSDYSKYLDSKRAQDFVQWLEA (配列番号110)

10

20

30

(X₁は、 - アミノ - イソ - 酪酸であり；

10、13、14、16、17、18、20又は21位のアミノ酸が、パルミトイル化リシンであるとき、12位のリシンは、パルミトイル化されず；

10、13、14、16、17、18、20及び21位のアミノ酸が、パルミトイル化リシンではないとき、12位のリシンは、任意選択でパルミトイル化され；また

ペプチドは、C末端アミノ酸で(P E G) ×²基によりペグ化されており、

ここで、x²は、2～12である)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0064】

本明細書に提供するG L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドとして、限定はしないが、表1に記載するペプチドが挙げられる(グルカゴンは、比較の目的で示すに過ぎず、本発明の一部を形成するわけではない)：

【0065】

【 表 1 】

表1: GLP-1/グルカゴンペプチド配列

ペプチド	配列	配列番号
グルカゴン	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	1

g357	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLVX1	3	10
g358	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLVX2	3	
g355	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLVZ2	3	
g356	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLVZ4	3	
g416	HSQGTFTSDYSBYLDSRRAQDFVQWLVZ4	8	
g417	HSQGTFTSDYSB1YLDSSRAQDFVQWLVZ4	9	
g426	HSQGTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLVZ4	10	
g514	HGQGTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLVZ4	11	
g515	HSEGTFTSDYSKYBDSRRAQDFVQWLVZ4	12	
g807	HSQGTFTSDYSKYBDEERAQDFVQWLVZ4	13	
g773	HSQGTFTSDYSKYLDSERARDFVAWLZ4	14	20
g868	HX3QGTFTSDYSKYBDSERARDFVAWLZ4	15	
g424	HSQGTFTSDYSKYLDBRRAQDFVQWLVZ4	16	
g425	HSQGTFTSDYSKYLDB1RRAQDFVQWLVZ4	17	
g494	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLEZ4	18	
g495	HSQGTFTSDYSKYLDB1RRAQDFVQWLEZ4	19	
g496	HSQGTFTSDYSKYLDBRRAQDFVQWEVZ4	20	
g497	HSQGTFTSDYSKYLDB1RRAQDFVQWEVZ4	21	
g422	HSQGTFTSDYSKYLDSRBAQDFVQWLVZ4	22	
g423	HSQGTFTSDYSKYLDSRB1AQDFVQWLVZ4	23	
g735	HGQGTFTSDYSKYLDSEBARDFVAWLZ4	24	30
g456	HSQGTFTSDYSKYLDSRRABDFVQWLVZ4	25	
g457	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAB1DFVQWLVZ4	26	
g774	HSQGTFTSDYSKYLDSERABDFVAWLZ4	27	
g808	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQBFVQWLVZ4	28	
g809	HSQGTFTSDYSKYLDSRAAQBFVQWLVZ4	29	
g971	HSQGTFTSDB1SKYLDSSRARDFVAWLZ4	30	
g970	HSQGTFTSDYSKYB1LSSRARDFVAWLZ4	31	
g427	HSQGTFTSDYSKYB1DSRRAQDFVQWLVZ4	32	
g969	HSQGTFTSDYSKYB1DSSRARDFVAWLZ4	33	
g972	HSQGTFTSDYSKYLDB1SRARDFVAWLZ4	34	40
g414	HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLVZ4	35	
g415	HSQGTFTSDYSKYLDSRB1RAQDFVQWLVZ4	36	
g434	HSQGTFTSDYSKYLDSB2RAQDFVQWLVZ4	37	
g435	HSQGTFTSDYSKYLDSB3RAQDFVQWLVZ4	38	
g676	HSQGTFTSDYSEYLDSBRAQDFVQWLVZ4	39	
g677	HGQGTFTSDYSEYLDSBRARDFVEWLZ4	40	
g500	HX3QGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLVZ4	41	
g501	HX3QGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLVZ4	42	

【表 2】

g430	HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLVZ4	43	
g431	HGQGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLVZ4	44	
g775	HSQGTFTSDYSEYLDSBRAADFVQWLVZ4	45	
g719	HGQGTFTSDYSRYLDSBRARDFVEWLVZ4	46	
g828	HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQRDFVAWLZ12	47	
g827	HSQGTFTSDYSRYLDSBRARDFVAWLZ4	48	
g784	HSQGTFTSDYSEYLDSBRARDFVAWLZ4	49	
g800	HSQGTFTSDYSKYLDSBRARDFVAWLZ4	50	
g966	HSQGTFTSDYSKYLDSB6RAQDFVQWLEZ4	51	10
g965	HSQGTFTSDYSKYLDSB5RAQDFVQWLVZ4	52	
g964	HSQGTFTSDYSKYLDSB4RAQDFVQWLVZ4	53	
g870	HX3QGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVAWLZ4	54	
g869	HX3QGTFTSDYSKYLDSBRARDFVAWLZ4	55	
g968	HX3QGTFTSDYSKYLDSB4RARDFVAWLZ4	56	
g432	HSEGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLVZ4	57	
g433	HSEGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLVZ4	58	
g498	HGQGTFTSDYSKYLESBRAQDFVQWLVZ4	59	
g695	HGQGTFTSDYSEYLDSBRAQDFVQWLVZ4	60	
g499	HGQGTFTSDYSKYLESB1RAQDFVQWLVZ4	61	
g693	HGQGTFTSDYSKYLDSBRAEDFVQWLVZ4	62	20
g694	HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVEWLVZ4	63	
g691	HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLVZ2	43	
g690	HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLVZ3	43	
g692	HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLVZ6	43	
g810	HSQGTFTSDYSKYLDEBRAQDFVQWLVZ4	64	
g437	HSQGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLVZ2	65	
g436	HSQGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLVZ3	65	
g438	HSQGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLVZ6	65	
g439	HSQGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLVZ8	65	
g440	HSQGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLVZ12	65	
g428	HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLEZ4	66	
g502	HSQGTFTSDYSKYLDSB3RAQDFVQWLEZ4	67	30
g503	HSQGTFTSDYSKYLDSB2RAQDFVQWLEZ4	68	
g429	HSQGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWLEZ4	69	
g516	HGQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLEZ4	70	
g533	HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLEAZ2	66	
g458	HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWEVZ4	71	
g459	HSQGTFTSDYSKYLDSB1RAQDFVQWEVZ4	72	
g533	HSQGTFTSDYSKYLDSBRAQDFVQWLVZ2	35	
g454	HSQGTFTSDYSKYLDSRB1AQDFVQWLEZ4	73	
g455	HSQGTFTSDYSKYLDSRB1AQDFVQWLEZ4	74	
g497	HSQGTFTSDYSKYLDB1RRAQDFVQWEVZ4	21	
g495	HSQGTFTSDYSKYLDB1RRAQDFVQWLEZ4	19	40
g967	HSQGTFTSDYSKYLDSB4RARDFVAWLEZ2	75	

【 0 0 6 7 】

ここで、

Z x は、PEG x であり；Z 2 は、PEG 2 であり；Z 3 は、PEG 3 であり；Z 4 は、PEG 4 であり；Z 6 は、PEG 6、Z 8 は、PEG 8 であり；Z 1 2 は、PEG 1 2 であり；

X 1 は、6 - アミノヘキサン酸であり；X 2 は、1 1 - アミノウンデカン酸であり；X 3 は、- アミノ - イソ - 酪酸であり；B は、K (g E - p a l m) であり；B 1 は、K (P E G 4 - p a l m) であり；B 2 は、K (P E G 3 - p a l m) であり；B 3 は、K (

PEG2 - palm) であり; B4 は、K (PEG4 - gE - palm) であり; B5 は、K (PEG2 - gE - palm) であり; B6 は、K (PEG2 - PEG2 - gE - palm) である

「K (gE - Palm)」は、グルタミン酸リンカーを介してイプシロン () 窒素に結合したパルミトイル基を有するリシンを指す。

【0068】

製造方法。本開示は、GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドの製造方法を提供する。本明細書に記載する GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、任意の好適な方法により製造することができる。例えば、特定の実施形態では、本明細書に記載する GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、当業者には周知の方法、例えば、Merri
field (1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2154) により記載される固相合成法により、化学的に合成される。例えば、標準的試薬 (例えば、実施例 1 で説明するような) を用いる自動合成装置により、固相ペプチド合成を達成することができる。

【0069】

あるいは、本明細書に記載する GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、当業者には周知である好都合なベクター / 宿主細胞の組み合わせを用いて、組換えにより生産することもできる。GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを組換えにより生産するための様々な方法が入手可能である。一般に、GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を適切な発現ビヒクル、例えば、挿入されたコード配
列の転写及び翻訳に必要なエレメントを含有するベクターに挿入する。GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドをコードする核酸を適正なリーディングフレーム内のベクターに挿入する。次に、GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを発現する好適な宿主細胞に、発現ベクターをトランスフェクトする。好適な宿主細胞として、限定はしないが、細菌、酵母、又は哺乳動物細胞がある。市販の様々な宿主発現ベクター系を用いて、本明細書に記載の GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを発現させ得る。

【0070】

修飾、コンジュゲート、融合、及び誘導体化。特定の実施形態では、本明細書に記載の GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、アミノ酸修飾により安定化される。特定の実施形態では、C 末端アミノ酸のカルボキシル基を、6 - アミノヘキサン酸又は 11 -
アミノウンデカン酸との結合により修飾する。特定の実施形態では、1 つ又は複数のアミノ酸残基がアシル化されている GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドが提供される。例えば、特定の実施形態では、本明細書に記載の GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、1 つ又は複数のリシン残基を含有するが、ここで、パルミトイル部分は、N (イプシロン ()) 基と結合している。特定の実施形態では、リシンとパルミトイル基との間に、リンカーが組み込まれる。このリンカーは、グルタミン酸基、又は限定はしないが、アラニン及びアミノヘキサン酸などの別のリンカー、あるいは、本明細書に記載する PEG リンカーのいずれであってもよい。コレステロール又はミリストイル基の添加など、様々なアシル化方法を用いることができる。これ以外にも、リンカー - パルミトイル部分をシステインの側鎖に結合して、これを本明細書に記載する分子においてリシンの
代わりに用いることができる。

【0071】

上記に代わり、又はこれに加えて、例えば、半減期を延長するために、本明細書に記載の GLP - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを異種部分と結合することができる。異種部分は、タンパク質、ペプチド、タンパク質ドメイン、リンカー、有機ポリマー、無機ポリマー、ポリエチレングリコール (PEG)、ビオチン、アルブミン、ヒト血清アルブミン (HSA)、HSA - FcRn 結合部位、抗体、抗体のドメイン、抗体断片、単鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非 FcRn I I I スカフォールド、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマー、サイトカイン、又はこれらの部分の 2 つ以上の組み合わせであってよい。

10

20

30

40

50

【0072】

例えば、GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドを異種ポリペプチドと融合させることができる。組換え遺伝子融合及び発現又は化学結合のいずれかによって、本ペプチドをタンパク質と融合させることができる。融合するパートナーとして好適なタンパク質として、限定はしないが、ヒト血清アルブミン、抗体、及び抗体のFc部分との融合を含む抗体断片がある。GLP-1は、力価を保持しながら、これらのタンパク質と融合されている(L. Baggio et al, Diabetes 53 2492 - 2500 (2004); P. Barrington et al Diabetes, Obesity and Metabolism 13 426 - 433 (2011); P. Paulik et al アメリカ糖尿病学会 (American Diabetes Association) 2012, Poster 1946)。伸長された組換えペプチド配列は、ペプチドに高分子量を付与することも記載されている(V. Schellenberger et al Nature Biotechnol 27 1186 - 1190 (2009); PASylation (欧州特許出願公開第2173890号明細書))。特定の実施形態では、C末端での融合パートナー、例えば、アルブミン又はFc部分と一緒に、GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドを融合タンパク質のN末端部分として組み込む。本明細書に記載のGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、ヒト血清アルブミンに対する親和性を有する「Albudabs」などのペプチド又はタンパク質ドメインに融合することもできる(M. S. Dennis et al J Biol Chem 277 35035 - 35043 (2002); A. Walker et al Protein Eng Design Selection 23 271 - 278 (2010))。本明細書に開示するGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドを異種ポリペプチド、例えば、アルブミン又はFc領域と融合させる方法は、当業者には周知である。

10

20

【0073】

さらに安定化させるか、又は半減期を延長するために、他の異種部分をGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドと結合することもできる。化学的融合の場合、特定の実施形態は、遊離N末端の維持を特徴とするが、誘導体化のための別の地点を作製することもできる。さらに別の方法は、高分子量ポリエチレングリコール(PEG)などの大きな化学物部分(large chemical moiety)とペプチドを誘導体化するものである。「ペグ化GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチド」は、これに共有結合したPEG鎖を有する。GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドの誘導体化、例えば、ペグ化を、パルミトイル化したリシン、あるいは、置換された、又は誘導体化を可能にするような伸長により組み込まれたシステインなどの残基において実施することができる。前述のGLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドフォーマットは、in vitro及び/又はin vivoで、相対力価と、GLP-1及びグルカゴン受容体活性化の間の均衡とに関して特徴付けることができる。

30

【0074】

一般的用語「ポリエチレングリコール鎖」又は「PEG鎖」は、エチレンオキシドの縮合ポリマーと水の混合物を指し、これは、一般式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ (nは、2、3、4、5、6、7、8、9、又はそれを超える整数である)で表される分岐又は直鎖状である。PEG鎖は、約500 ~ 約40,000ダルトンの範囲から選択される平均総分子量を有するポリエチレングリコールのポリマーを含む。PEG鎖の平均分子量は、数値により示され、例えば、PEG-5,000は、約5,000の総平均分子量を有するポリエチレングリコール鎖を指す。

40

【0075】

PEG化は、当分野では公知のPEG化反応のいずれかにより実施することができる。例えば、Focus on Growth Factors, 3:4-10, 1992及び欧州特許出願公開第0154316号明細書及び同第0401384号明細書を参照されたい。PEG化は、反応性ポリエチレングリコール分子(又は類似の反応性水

50

溶性ポリマー)とのアシル化反応又はアルキル化反応を用いて実施することができる。

【0076】

P E G 化 G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを調製する方法は、一般に、小さなアミノ P E G を樹脂にカップリングすることにより調製した後、他のアミノ酸を順次カップリングして、P E G 化ペプチドを作出するものである。従って、上記ステップは、概して、(a) アミノポリエチレングリコールを樹脂支持体と反応させた後、(b) ペプチド鎖伸長を実施することを含む。

【0077】

医薬組成物

さらには、代謝疾患、例えば、肥満の治療のために製剤化される、有効量の本明細書に記載の G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを含有する組成物、例えば、医薬組成物が提供される。

10

【0078】

本開示の組成物は、公知の方法に従い製剤化することができる。好適な調製方法は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995) に記載されており、この文献は、参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。組成物は、限定はしないが、水溶液、エマルジョン、ゲル、懸濁液、凍結乾燥形態、又は当分野で知られる任意の他の形態などの様々な形態であってよい。さらに、組成物は、例えば、希釈剤、結合剤、安定剤、及び防腐剤などの薬学的に許容される添加剤を含んでもよい。製剤化されたら、本発明の組成物を被検者に直接投与することができる。

20

【0079】

本発明の組成物と一緒に用いることができる担体は、当分野では公知であり、限定はしないが、例えば、チログロブリン、ヒト血清アルブミンのようなアルブミン、破傷風トキソイド、及びポリ L - リシン、ポリ L - グルタミン酸のようなポリアミノ酸、インフルエンザ、B 型肝炎ウイルスコアタンパク質などが挙げられる。様々な水性担体を用いることができ、例えば、水、緩衝水、0.8%食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などがある。従来の公知の滅菌技術で組成物を滅菌することもできるし、又は濾過滅菌することもできる。得られた組成物をそのまま、又は凍結乾燥して、使用のためにパッケージングすることができ、凍結乾燥した調製物は、投与前に滅菌液と合わせる。組成物は、生理学的条件に近づけるのに必要な、pH 調節及び緩衝剤、張性調節剤、湿潤剤などの薬学的に許容される補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミンなどを含有してもよい。

30

【0080】

肥満を治療する方法、モデル系

G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、グルカゴンの作用、例えば、食物摂取の阻害又は血糖値の調節と、G L P - 1 の作用、例えば、胃運動性の阻害、又はインスリン放出の促進を組み合わせることができる。従って、これらは、過剰な脂肪組織の排除を加速し、持続可能な減量を誘導すると共に、血糖コントロールを改善することができる。G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドはまた、高コレステロール、及び高 L D L - コレステロール又は異常な H D L / L D L 比などの心血管リスク因子を低減するように作用することもできる。

40

【0081】

本開示は、肥満又は肥満関連疾患若しくは障害を治療する方法を提供し、この方法は、治療を必要とする被検者に、本明細書に開示する G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを投与するステップを含む。さらに、肥満又は肥満関連疾患若しくは障害の治療のための G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドも提供される。さらには、肥満又は肥満関連疾患若しくは障害の治療のための薬剤の製造における、本明細書に記載の G L P - 1

50

／グルカゴンアゴニストペプチドの使用も提供される。

【 0 0 8 2 】

本明細書に記載する G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、増量の予防、減量の促進、過剰体重の低減、又は病的肥満を含む肥満の治療（例えば、食欲、給餌、食物摂取、カロリー摂取、及び／又はエネルギー消費の管理により）のために投与することができる。さらに、本明細書に記載する G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、他の肥満関連代謝障害の治療に用いることもできる。他の肥満関連障害の例を以下に挙げるが、これらに限定されるわけではない：インスリン抵抗性、耐糖能障害、糖尿病前期、空腹時血糖値上昇、2 型糖尿病、高血圧、脂質異常症（又はこれら代謝リスク因子の組み合わせ）、グルカゴン産生腫瘍、心血管疾患、例えば、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化（*atherosclerosis*）、動脈硬化、冠動脈性心疾患、又は抹消動脈疾患、発作、呼吸不全、又は腎疾患。

10

【 0 0 8 3 】

「治療」は、有益又は要望される臨床結果を取得するアプローチである。本明細書に記載するように、開示される G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドからの有益又は要望される臨床結果としては、限定はしないが、体重減少、増量の低減、食欲抑制、血清グルコース及び血清インスリンレベルの低減若しくは安定化、肥満関連疾患の程度の改善、緩和、安定化、軽減、又は肥満関連疾患進行の遅延若しくは緩徐化が挙げられる。「治療」は、特定の実施形態では、治療的処置と、予防又は防止的措置との両方を指す。治療を必要とする者は、疾患をすでに有する者、及び疾患を予防しようとする者を含む。治療とは、治療が存在しない場合と比較して、肥満関連症状（例えば、増量）の増大を阻害又は抑制することを意味し、必ずしも関連病状の完全な停止を包含することを意味するわけではない。

20

【 0 0 8 4 】

本明細書に記載する G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドの投与経路は、例えば、経口、非経口、吸入又は局部であってよい。本明細書で用いる場合、用語「非経口」は、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋内、皮下、直腸、又は腔内投与を含む。投与のための別の形態例として、注射液、特に、静脈内又は動脈内注射又は滴注用の溶液がある。本明細書に記載する G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、単回用量又は複数回用量として投与することができる。特定の実施形態では、G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、皮下注射により投与する。

30

【 0 0 8 5 】

非経口製剤は、単回ボラス用量、注入又は負荷ボラス用量（*loading bolus dose*）に続く維持用量であってよい。これらの組成物は、特定の一定又は変動間隔、例えば、1 日 1 回、又は「必要に応じた」基準に基づき、投与することができる。また、要望される最適応答（例えば、治療又は予防応答）をもたらすように、投与レジメンを調節することもできる。

【 0 0 8 6 】

投与しようとする G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドの量は、本開示によれば、過度の実験なしで、当業者によって容易に決定することができる。G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドの投与方式及びそれぞれの量に影響を与える因子として、限定はしないが、疾患の重症度（例えば、肥満の程度）、被検者の病歴、並びに治療を受けている被験者の年齢、身長、体重、健康状態、及び体調が挙げられる。同様に、投与しようとする G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドの量は、投与方式及び被検者が、この薬剤の単回用量又は複数回用量のいずれを受けるかによって変わり得る。特定の実施形態では、本明細書に記載する G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドは、注射により、1 日 1 回投与することができる。一部の実施形態では、注射は、週 1 回投与する。

40

【 0 0 8 7 】

キット

また別の実施形態では、本開示は、G L P - 1 / グルカゴンアゴニストペプチドを含む

50

キットを提供し、これは、本明細書に記載の方法を実施するために用いることができる。特定の実施形態では、キットは、1つ又は複数の容器に入った、本明細書に開示のGLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドを含む。当業者であれば、当分野では公知の確立されたキットフォーマットの1つに、開示されるGLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドを容易に組み込むことができることを容易に認識されよう。

【実施例】

【0088】

実施例1：GLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドの合成、修飾、及び特性決定
GLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドを以下のように合成した：

A．略語のリスト：

Ahx：6アミノヘキサン酸

Aib：-アミノイソ-酪酸

Aud：11-アミノウンデカン酸

Boc：tert-ブチロキシカルボニル

tert-Bu：tert-ブチル

DCM：ジクロロメタン

DIC：ジイソプロピルカルボジイミド

Fmoc：9-フルオレニルメトキシカルボニル

HOBt：1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

HPLC：高性能液体クロマトグラフィー

Mtt：4-メチルトリチル

NMP：N-メチルピロリドン

palm：パルミチン酸

Pbf：2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル

TFA：トリフルオロ酢酸

TIS：トリイソプロピルシラン

Trt：トリフェニルメチル、トリチル

【0089】

B．ペプチド合成、精製、及び特性決定

NovaSyn TGR又は予めロードしたFmoc-Wang樹脂(NovaBiochem)上でのペプチド鎖の伸長を、Prelude固相ペプチド合成装置(Protein Technologies, Tucson, AZ, USA)を用いて実施した。N-メチルピロリドン(NMP)でのアミノ酸のヒドロキシベンゾトリアゾールエステルのカップリングのために製造者供給のプロトコルを適用した。アミノポリエチレングリコールのアミノ基及びアミノ酸のアミノ基の半永久的保護のために、フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基を使用し、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、チロシンについてはtert-ブチル(tert-Bu)で、アルギニンについては2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル(Pbf)で、また、ヒスチジンについてはトリチル(Trt)で、側鎖を保護した。1位のヒスチジンのN末端アミノ基をtert-ブチロキシカルボニル基(Boc)で保護した。続いて側鎖の化学修飾が必要であれば、Lys(Mtt)をペプチド鎖に組み込んだ。

【0090】

ペプチド鎖伸長が終了したら、2%TFA及び5%TISを含有するDCM(10×7ml、各0.5分)で、ペプチド樹脂を処理することにより、Mtt基を除去した。アミノ酸、及びPEGリンカー及び脂質部分とLysの側鎖のカップリングを、HOBtの存在下で、カップリング試薬としてDICを用い、Preludeペプチド合成装置で実施した。

【0091】

TFA:TIS:水(95:2.5:2.5)の混合物を用いて、樹脂からペプチドを切断した。室温で2時間後、ペプチジル樹脂を濾過し、TFAで洗浄した後、合わせた濾

10

20

30

40

50

液を真空で乾燥まで蒸発させた。残留物をエーテルと一緒に粉碎し、形成された沈殿物を濾過し、エーテルで洗浄した後、乾燥させた。粗ペプチドを水中の5%酢酸に溶解させ、Varian 920-LCシステムに取り付けたPolaris 3 C8-Aカラム上の逆相高速液体クロマトグラフィーにより分析した。15分間にわたる10~90%バッファーBの標準勾配システムを分析に用いた。バッファーAは、水中0.1%TFAであり、バッファーBは、アセトニトリル中0.1%TFAであった。HPLCプロファイルを210nmで記録した。半分取C18 RP XBridge Watersカラムを用いたVarian ProStarシステムで分取を実施した。30分間にわたる、30~70%バッファーBの勾配で、水及びアセトニトリルの前述した溶媒系を分離に用いた。クロマトグラフィーにより均質な産物(>97%純度)をエレクトロスプレー質量分析により分析した(Mass Lynx, Waters)。

10

【0092】

実施例2: *in vitro* 試験

細胞cAMP活性アッセイにおけるペプチドの生物学的活性

ペプチドは、生物学的に活性であり、1つ又は複数の細胞受容体応答を刺激し得る。実施例1の方法により合成したGLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドの生物学的活性を、生物学的活性、例えば、1つ又は複数の細胞受容体応答の刺激について、下記の方法により試験した。ヒト、マウス、ラット、又はイヌGLP-1受容体(GLP-1R)、グルカゴン受容体(GCGR)又はグルコース依存性インスリン分泌性ペプチド(胃抑制ポリペプチド)受容体(GIPR)を発現する安定な細胞株を、標準的方法によりHEK 293又はCHO細胞において産生させた。これら各種受容体のペプチド活性化により、cAMPセカンドメッセンジャーの下流生産が起こるが、これは、機能活性アッセイで測定することができる。

20

【0093】

A. アッセイ方法:

アッセイ培地: 0.5mM IBMX (Sigma #I7018) を含有する、DMEM (Gibco #41966) 中の10%FBS。

代替アッセイバッファー: 0.5mM IBMXを含む、HBSS (カルシウム及びマグネシウム含有)、25mM HEPES (Gibco #15630) 中の0.1%BSA (Sigma #A3059)、pH7.4。

30

【0094】

低タンパク質結合384ウェルプレート(Greiner #781280)を用いて、アッセイ培地で作製した試験サンプルの11回の1:5連続希釈を実施した。サンプル希釈物は全て、2回反復して作製した。

【0095】

目的の受容体を発現する細胞の凍結クライオバイアル(cryo-vial)を水浴中で急速に解凍し、予熱したアッセイ培地に移した後、240xgで5分旋回させた。最適化濃度(すなわち、 1×10^5 細胞/mlのhGCGR細胞、 0.5×10^5 細胞/mlのhGLP-1r及びhGIPr細胞)で、細胞をアッセイ培地に再懸濁させた。

40

【0096】

希釈プレートから、5mLレプリカを黒色浅型ウェル(shallow-well)U底384ウェルプレート(Corning #3676)にスタンプした。これに、5mL細胞懸濁液を添加して、プレートを室温で30分インキュベートした。

【0097】

市販のcAMPダイナミック2HTRFキット(Cisbio、Cat 62AM4PEJ)を用いて、cAMPレベルを測定した後、製造業者の推奨事項に従い、2つのステッププロトコルを実施した。手短には、抗cAMPクリプテート(ドナー発蛍光団)及びcAMP-d2(アクセプター発蛍光団)を、キットに備えられたコンジュゲート及び溶解バッファーで各々1/20希釈することにより、個別に作製した。5mLの抗cAMPクリプテートをアッセイプレートの全てのウェルに添加し、5mLのcAMP-d2

50

を、非特異的結合 (NSB) ウェル以外の全てのウェルに添加し、これらにコンジュゲート及び溶解バッファーを添加した。プレートを室温で 1 時間インキュベートした後、励起波長 320 nm 及び発光波長 620 nm 及び 665 nm を用いて、Envision (Perkin Elmer) で読み取った。

%デルタ F 値は、各ウェルについて以下の通りである：

【数 1】

$$\% \text{デルタ} F (\Delta F) = \frac{(\text{サンプル} A665/A620 \text{ 比} - \text{NSB } A665/A620 \text{ 比})}{(\text{NSB } A665/A620 \text{ 比})} \times 100$$

10

【0098】

培地のみウェル (非特異的結合 (NSB)) を %デルタ F 計算用のバックグラウンドとして用いた。次に、Data Processor ソフトウェアを用いて、4 パラメータロジスティック解析によりデータを解析し、%活性化プロットとしてグラフ化し；このグラフから、各サンプルについての EC50 値を取得した。アッセイウィンドウは、基底の細胞 cAMP レベルとしてのネガティブコントロール (全結合をもたらす細胞と両 HTRF 試薬) と、参照リガンドコントロール (例えば、細胞とリガンド (例えば、GLP-1) 及び両 HTRF 試薬) により生じた最大応答によって定義されるポジティブコントロールにより決定する。

【0099】

20

EC50 は、基底及び最大応答間の中間の応答を誘導する濃度として定義される、50% 効果濃度を指す。ペプチドサンプルの連続希釈により、用量応答曲線を得ることができ、この曲線から、EC50 値を決定することができる。EC50 が低いほど、試験サンプルの力価は優れている。

【0100】

合成した GLP-1 / グルカゴンアゴニストペプチドと、cAMP アッセイで決定した EC50 値を表 2 に示す。

【0101】

【表 3】

表2: 更なるGLP-1/グルカゴンアゴニストペプチドのcAMP活性

	GLP1 EC ₅₀ nM	Glcg EC ₅₀ nM	パルミトイル化	C-末端	その他の置換
グルカゴン		0.003			
g357	1.6	0.08		LV-Ahx	
g358	3.2	0.03		LV-Aud	
g355	0.67	0.03		LV(PEG)2	
g356	0.05	0.12		LV(PEG)4	
g416	1	0.6	K(gEpalm)12	LV(PEG4)	
g807	1.4	0.01	K(gEpalm)14	LV(PEG4)	E16, E17
g773, 799	0.04	0.08	K(gEpalm)14	LV(PEG4)	R20 A24 E17
g868	0.014	0.02	K(gEpalm)14	LV(PEG4)	R20 A24, E17 Aib2
g426	0.124	0.003	K(gEpalm)14	LV(PEG4)	
g514	0.1	0.02	K(gEpalm)14	LV(PEG4)	G2
g515	0.1	0.4	K(gEpalm)14	LV(PEG4)	E3
g424	0.4	0.009	K(gEpalm)16	LV(PEG4)	
g494	4	0.002	K(gEpalm)16	LE(PEG4)	
g496	8	24	K(gEpalm)16	EV(PEG4)	
g422	0.2	0.7	K(gEpalm)18	LV(PEG4)	
g735	0.8	>1800	K(gEpalm)18	LV(PEG4)	R20 A24 E17 G2
g456	1.3	0.07	K(gEpalm)20	LV(PEG4)	
g774	35	2.3	K(gEpalm)20	LV(PEG4)	E17 A24
g808	50	0.12	K(gEpalm)21	LV(PEG4)	
g809	0.43	0.07	K(gEpalm)21	LV(PEG4)	A18
g971	0.015	0.007	K(PEG4palm)10	LV(PEG4)	R20 A24 S17
g417	0.02	0.003	K(PEG4palm)12	LV(PEG4)	
g970	0.014	0.003	K(PEG4palm)13	LV(PEG4)	R20 A24 S17
g427	0.004	0.002	K(PEG4palm)14	LV(PEG4)	
g969	0.01	0.006	K(PEG4palm)14	LV(PEG4)	R20 A24 S17
g425	0.008	0.002	K(PEG4palm)16	LV(PEG4)	
g495	0.09	0.002	K(PEG4palm)16	LE(PEG4)	
g497	15	0.3	K(PEG4palm)16	EV(PEG4)	
g972	0.03	0.03	K(PEG4palm)16	LV(PEG4)	R20 A24 S17
g423	0.01	0.004	K(PEG4palm)18	LV(PEG4)	
g457	0.03	0.004	K(PEG4palm)20	LV(PEG4)	
g414	0.2	0.016	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	
g676	1.2	40	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	E12
g677	0.3	25	K(gEpalm)17	LV(PEG4),	E12 R20 E24, G2
g500	0.08	0.16	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	Aib2
g430	0.35	0.8	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	G2
g775	0.23	0.08	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	A20 E24
g719	0.09	0.75	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	R20 E24, R12, G2
g828	0.04	0.02	K(gEpalm)17	LV(PEG12)	R20 A24, R12
g827	0.2	0.04	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	R20 A24, R12
g784	0.3	1.5	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	R20 A24, E12
g800	0.09	0.014	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	R20 A24
g870	0.09	11	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	A24, Aib2

【表 4】

g869	0.11	0.065	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	R20 A24, Aib2
g432	0.07	2.2	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	E3
g498	0.6	2	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	G2, E15
g695,676	0.2	4	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	G2 E12
g693	0.1	>2	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	G2, E20
g694	0.07	0.2	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	G2, E24
g691	0.05	0.13	K(gEpalm)17	LV(PEG2)	G2
g690	0.06	0.1	K(gEpalm)17	LV(PEG3)	G2
g692	0.06	0.13	K(gEpalm)17	LV(PEG6)	G2
g810	0.5	0.03	K(gEpalm)17	LV(PEG4)	E16
g415	0.007	0.002	K(PEG4palm)17	LV(PEG4)	
g431	0.006	0.004	K(PEG4palm)17	LV(PEG4)	G2
g501	0.03	0.003	K(PEG4palm)17	LV(PEG4)	Aib2
g433	0.004	0.03	K(PEG4palm)17	LV(PEG4)	E3
g499	0.02	0.03	K(PEG4palm)17	LV(PEG4)	G2 E15
g966	0.012	0.001	K(PEG2,PEG2,gEpalm)17	LE(PEG4)	R20 A24
g965	0.017	0.002	K(PEG2,gEpalm)17	LV(PEG4)	R20 A24
g964	0.015	0.002	K(PEG4,gEpalm)17	LV(PEG4)	R20 A24
g968	0.025	0.006	K(PEG4,gEpalm)17	LV(PEG4)	R20 A24 Aib2
g434	0.005	0.02	K(PEG3palm)17	LV(PEG4)	
g435	0.01	0.002	K(PEG2palm)17	LV(PEG4)	
g437	0.006	0.002	K(PEG4palm)17	LV(PEG2)	
g436	0.01	0.002	K(PEG4palm)17	LV(PEG3)	
g438	0.005	0.002	K(PEG4palm)17	LV(PEG6)	
g439	0.008	0.002	K(PEG4palm)17	LV(PEG8)	
g440	0.008	0.002	K(PEG4palm)17	LV(PEG12)	
g428	0.2	0.003	K(gEpalm)17	LE(PEG4)	
g516	0.6	0.08	K(gEpalm)17	LE(PEG4)	G2
g533	0.09	0.003	K(gEpalm)17	LEA(PEG2)	
g458	0	9	K(gEpalm)17	EV(PEG4)	
g533	0.09	0.003	K(gEpalm)17	LEA(PEG2)	
g454	0.5	0.08	K(gEpalm)18	LE(PEG4)	
g497	15	0.3	K(PEG4palm)16	EV(PEG4)	
g495	0.09	0.002	K(PEG4palm)16	LE(PEG4)	
g429	0.004	0.005	K(PEG4palm)17	LE(PEG4)	
g503	0.02	0.002	K(PEG3palm)17	LE(PEG4)	
g502	0.03	0.001	K(PEG2palm)17	LE(PEG4)	
g459	14	0.3	K(PEG4palm)17	EV(PEG4)	
g967	0.016	0.006	K(PEG4gEpalm)17	LE(PEG2)	R20 A24 E27
g455	0.012	0.001	K(PEG4palm)18	LE(PEG4)	

略語: K(gE-palm) = γ グルタミン酸リンカーを介して、 ϵ 窒素に結合したパルミトイル基を有するリシン; Aib、 α -アミノイソ酪酸。K(PEG_xpalm) = ϵ 窒素で、x個のPEG単位及び1つのパルミトイル基と結合したリシン。記載した置換は、下記アミノ酸配列に対するものである:
HSQGTFTSDYSKYLSRRAQDFVQW+表示のC末端アミノ酸

【 0 1 0 3 】

本開示は、本開示の個別の態様の単一の例示として意図される記載の具体的実施形態、並びに本開示の範囲内で機能的に均等であるあらゆる組成物又は方法によって範囲を限定されるわけではない。実際に、本明細書において図示及び記載するもの以外に、本開示の様々な改変形態が、以上の説明及び添付の図面から、当業者には明らかになるであろう。こうした改変形態は、添付する特許請求の範囲に含まれるものとする。

【 0 1 0 4 】

本明細書で述べた全ての刊行物及び特許出願は、あたかも各刊行物又は特許出願が、具体的かつ個別に参照により組み込まれると示されているのと同じ範囲まで、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【 配 列 表 】

2016512213000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 C07K14/605
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAE S Y ET AL: "The fatty acid conjugated exendin-4 analogs for type 2 antidiabetic therapeutics", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 144, no. 1, 21 May 2010 (2010-05-21), pages 10-16, XP027036550, ISSN: 0168-3659 [retrieved on 2010-04-30] the whole document	1-40
X	WO 2010/148089 A1 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; SMILEY DAV) 23 December 2010 (2010-12-23) abstract; example 16; sequence 524 ----- -/--	1-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2014

Date of mailing of the international search report

23/07/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Meyer, Wolfram

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/055034

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/143209 A1 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; YANG BIN []) 17 November 2011 (2011-11-17) the whole document -----	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/055034**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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

1-40(partially)

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 Application No. PCT/ EP2014/ 055034

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-40(partially)

An isolated peptide comprising the amino acid sequence SEQ
ID NO: 3 wherein no more than one lysine is palmitoylated
per molecule.

2-41. claims: 1-40(partially)

An isolated peptide comprising the amino acid sequence SEQ
ID NO: X wherein no more than one lysine is palmitoylated
per molecule
whereby X= 4-7, 14, 18, 76-110 repectively

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/055034

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010148089 A1	23-12-2010	AU 2010260058 A1	02-02-2012
		CA 2765026 A1	23-12-2010
		CN 102459325 A	16-05-2012
		EP 2443146 A1	25-04-2012
		JP 2012530145 A	29-11-2012
		KR 20120087875 A	07-08-2012
		PE 09142012 A1	22-08-2012
		RU 2012101274 A	27-07-2013
		SG 176858 A1	28-02-2012
		TW 201103556 A	01-02-2011
		US 2012172295 A1	05-07-2012
		WO 2010148089 A1	23-12-2010

WO 2011143209 A1	17-11-2011	AR 081043 A1	30-05-2012
		CA 2797095 A1	17-11-2011
		CN 103079587 A	01-05-2013
		EP 2569000 A1	20-03-2013
		JP 2013534906 A	09-09-2013
		KR 20130062931 A	13-06-2013
		US 2013123178 A1	16-05-2013
		WO 2011143209 A1	17-11-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00

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

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100196966

弁理士 植田 渉

(72)発明者 ベドナレク, マリア

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA03 BA01 BA08 BA19 BA23 MA66 NA14 ZA70

ZC35 ZC41

4H045 AA10 AA30 BA18 BA41 BA57 CA40 DA01 DA30 DA70 DA75

EA27 FA33 FA74