

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6534927号  
(P6534927)

(45) 発行日 令和1年6月26日(2019.6.26)

(24) 登録日 令和1年6月7日(2019.6.7)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C07K 14/605 (2006.01)</b>	C O 7 K	14/605
<b>A61K 38/26 (2006.01)</b>	A 6 1 K	38/26
<b>A61P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P	3/10
<b>A61P 3/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P	3/04
<b>A61P 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P	9/10
		I O I
	請求項の数 8	(全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-523532 (P2015-523532)	(73) 特許権者	502453045
(86) (22) 出願日	平成25年7月23日 (2013. 7. 23)		ジーランド ファーマ アクティーゼルス
(65) 公表番号	特表2015-524419 (P2015-524419A)		カブ
(43) 公表日	平成27年8月24日 (2015. 8. 24)		デンマーク国, デーコー-2600 グロ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/065519		ストルップ, スメデランド 36
(87) 国際公開番号	W02014/016300	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成26年1月30日 (2014. 1. 30)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成28年7月14日 (2016. 7. 14)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	61/674, 706		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成24年7月23日 (2012. 7. 23)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	61/785, 611	(74) 代理人	100087413
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルカゴン類似体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

H y - H S Q G T F T S D Y S K Y L D A i b A R A E E F V K W L E S T - O H  
(配列番号22)である化合物、又は医薬的に許容されるその塩若しくは溶媒和物。

【請求項2】

治療的に有効な量の請求項1に記載の化合物又は医薬的に許容されるその塩若しくは溶媒和物を含む、処置を必要としている対象の疾患又は病態を処置するための医薬組成物であって、前記疾患又は病態が、以下の：低血糖、急性低血糖、慢性低血糖、2型糖尿病、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、脂肪肝、プロッカー中毒、インスリノーマ及びVon Gierkes病から成る群から選択される、医薬組成物。

【請求項3】

前記疾患又は病態が、低血糖である、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記低血糖が、以下の：糖尿病性低血糖、急性インスリン誘発性低血糖、非糖尿病性低血糖、反応性低血糖、空腹時低血糖、薬物誘発性低血糖、アルコール誘発性低血糖、胃バイパス誘発性低血糖及び妊娠中に生じる低血糖から成る群から選択される、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

低血糖、急性低血糖、慢性低血糖、2型糖尿病、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満、冠動

脈性心疾患、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、脂肪肝、ブロッカー中毒、インスリノーマ及びVon Gierkes病の処置のための、請求項1に記載の化合物、又は医薬的に許容されるその塩若しくは溶媒和物。

【請求項6】

前記低血糖が、以下の：糖尿病性低血糖、急性インスリン誘発性低血糖、非糖尿病性低血糖、反応性低血糖、空腹時低血糖、薬物誘発性低血糖、アルコール誘発性低血糖、胃バイパス誘発性低血糖及び妊娠中に生じる低血糖から成る群から選択される、請求項5に記載の使用のための化合物、又は医薬的に許容されるその塩若しくは溶媒和物。

【請求項7】

低血糖、急性低血糖、慢性低血糖、2型糖尿病、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、脂肪肝、ブロッカー中毒、インスリノーマ及びVon Gierkes病の処置のための薬剤の調製における、請求項1に記載の化合物、又は医薬的に許容されるその塩若しくは溶媒和物の使用。

10

【請求項8】

前記低血糖が、以下の：糖尿病性低血糖、急性インスリン誘発性低血糖、非糖尿病性低血糖、反応性低血糖、空腹時低血糖、薬物誘発性低血糖、アルコール誘発性低血糖、胃バイパス誘発性低血糖及び妊娠中に生じる低血糖から成る群から選択される、請求項7に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、グルカゴン類似体、並びに例えば、低血糖の処置におけるそれらの医学的な使用に関する。特に、本発明は、液体製剤での使用に好適な安定したグルカゴン類似体に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトプレプログルカゴンは、グルカゴン（Glu又はGCG）、グルカゴン様ペプチド1（GLP1）、グルカゴン様ペプチド2（GLP2）、及びオキシントモジュリン（OXM）を含めた多くの構造的に関連したプログルカゴン由来ペプチドを形成するように組織内で別々に処理された158個のアミノ酸の前駆体ポリペプチドである。これらの分子は、グルコースの恒常性、インスリン分泌、胃内容排出及び腸の成長、並びに摂食の調整を含めたさまざまな生理機能にかかわっている。

30

【0003】

天然グルカゴンは、プレプログルカゴンの第53～81アミノ酸に相当する29個のアミノ酸のペプチドである。グルカゴンは、肝細胞上でグルカゴン受容体に結合し、肝臓がグリコーゲン分解によってグリコーゲンの形で保存されたグルコースの放出を引き起こすことによって血中のグルコースレベルを維持するのに役立っている。これらの蓄えが使い果たされたとき、グルカゴンはまた、糖新生によって追加のグルコースを合成するように肝臓を刺激する。このグルコースが血流内に放出され、低血糖の発生を予防する。

【0004】

40

天然グルカゴン自体の比較的低い物理的及び化学的安定性のために、現在、商業的に入手可能であって、そして、主に過剰量のインスリンを摂取した糖尿病患者の急性低血糖を緩和するための「救助的」状況における使用が意図されるグルカゴン製品は、使用直前に適当な液体媒質中での再構成向けの凍結乾燥させた固形調製物の形で提供されている。低血糖対象は、とりわけ、浮動性めまい及び/又は精神錯乱を呈することもあり、場合によっては意識不明又は意識混濁になることもあるので、低血糖対象が当該グルカゴン製剤に必要とされる最初の液体再構成とその後の注射ができない又はそれらを完了できない状態になる。その結果、この再構成と注射は、過剰なグルカゴン凝集が起こる前の限られた時間の中で製品を取り扱った経験のない別人によっておこなわれなければならないこともある。

50

## 【 0 0 0 5 】

液状溶液中の天然グルカゴンの安定した類似体が望ましいが、そうしたグルカゴン類似体の安定した液体製剤は市販されていない。

その上で、グルカゴン受容体において十分に高い活性を有していることに加えて、水性液体媒質中で（天然グルカゴンが存在しないところで、特に生理的 pH にて）十分に可溶性であり、且つ、（物理的及び化学的に）安定しているグルカゴン類似体に対する必要性が大いにあることは明らかである。

これらの類似体は、（ i ）即時注射に適合させた、すぐに使用できる液体医薬製剤の形態で有利に提供されることができ、且つ、（ i i ）使用前に十分な長期間、（周囲条件下で当該対象又は患者によって持ち運ばれることを含めて）保存されることもできる。

10

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 6 】

いくつかの実施形態において、本発明は、式（ I ）：



{ 式中、

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

$R^2$  が、OH 又は  $NH_2$  であり；そして

Z が、式（ I a ）：

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 Glu Asn Thr (I a)

20

の配列に由来し、且つ、以下の：

X 2 が、Aib 及び Ala から選択され；

X 3 が、His、Pro、Dab (Ac)、Dap (Ac) 及び Gln (Me) から選択され；

X 4 が、DAla であり；

X 9 が、Glu であり；

X 10 が、Val、Leu、N Me Tyr 及び N Me DTyr から選択され；

X 15 が、Glu であり；

30

X 16 が、Aib、Lys、Glu、Leu、Val、DVal、Phe、His、Arg、Pro、DPro、N Me Ser 及び N Me D Ser から選択され；

X 17 が、Ala 及び Ser から選択され；

X 20 が、Glu 及び Lys から選択され；

X 21 が、Glu、Lys 及び Ser から選択され；

X 24 が、Lys、Ser、Glu 及び Ala から選択され；

X 28 が、Ser、Glu 及び Lys から選択されるか、又は存在せず；

X 29 が、Ser 及び Ala から選択されるか、又は存在しない、

のように 2、3、4、9、10、15、16、17、20、21、24、28 及び 29 から選択される（X で示された）アミノ酸配列位置にのみ存在する少なくとも 4 個のアミノ酸置換又は欠失をさらに含むアミノ酸配列であって、

40

但し、Z が、以下の：

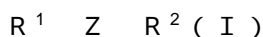
HSQGTFTSDYSKYLD SARAEDFVKWLEST；及び

HSQGTFTSDYSKYLESRRAKEFVEWLEST、

から選択されない。} を有する化合物、又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物を提供する。

## 【 0 0 0 7 】

いくつかの実施形態において、本発明は、式（ I ）：



{ 式中、

50

R<sup>1</sup>が、水素、C<sub>1-4</sub>アルキル、アセチル、ホルミル、ベンゾイル又はトリフルオロアセチルであり；

R<sup>2</sup>が、OH又はNH<sub>2</sub>であり；そして

Zが、式(Ia)：

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 Glu Asn Thr (Ia)

の配列に由来し、且つ、以下の：

X<sub>2</sub>が、Aib及びAlaから選択され；

X<sub>3</sub>が、His及びProから選択され；

X<sub>9</sub>が、Gluであり；

X<sub>10</sub>が、N Me Tyr及びN Me DTyrから選択され；

X<sub>15</sub>が、Gluであり；

X<sub>16</sub>が、Aib、Lys、Glu、Leu、Val、DVal、Phe、His、Arg、Pro、DPro、N Me Ser及びN Me DSerから選択され；

X<sub>17</sub>が、Ala及びSerから選択され；

X<sub>20</sub>が、Glu及びLysから選択され；

X<sub>21</sub>が、Glu、Lys及びSerから選択され；

X<sub>24</sub>が、Lys、Ser、Glu及びAlaから選択され；

X<sub>28</sub>が、Ser及びLysから選択されるか、又は存在せず；

X<sub>29</sub>が、Ser及びAlaから選択されるか、又は存在しない、

のように2、3、9、10、15、16、17、20、21、24、28及び29から選択されるアミノ酸配列位置にのみ存在する少なくとも4個のアミノ酸置換又は欠失をさらに含むアミノ酸配列であって、

但し、Zが、以下の：

HSQGTFTSDYSKYLDSARAEDFVKWLEST；及び

HSQGTFTSDYSKYLESRRAKEFVEWLEST、

から選択されない。}を有する化合物、医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物を提供する。

#### 【0008】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物の2、3、4、9、10、15、16、17、20、21、24、28及び29から選択される(Xで示された)アミノ酸配列位置の少なくとも4個のアミノ酸置換又は欠失は、以下のとおりである：

X<sub>2</sub>が、Aib及びAlaから選択され；

X<sub>3</sub>が、His、Pro、Dab(Ac)、Dap(Ac)及びGln(Me)から選択され；

X<sub>4</sub>が、DAIaであり；

X<sub>9</sub>が、Gluであり；

X<sub>10</sub>が、Val、Leu、N Me Tyr及びN Me DTyrから選択され；

X<sub>15</sub>が、Gluであり；

X<sub>16</sub>が、Aib、Lys、Glu、Leu、Val、Phe、His及びArgから選択され；

X<sub>17</sub>が、Ala及びSerから選択され；

X<sub>20</sub>が、Glu及びLysから選択され；

X<sub>21</sub>が、Glu、Lys及びSerから選択され；

X<sub>24</sub>が、Lys、Ser、Glu及びAlaから選択され；

X<sub>28</sub>が、Ser、Glu及びLysから選択されるか、又は存在せず；

X<sub>29</sub>が、Ser及びAlaから選択されるか、又は存在しない。

#### 【0009】

いくつかの実施形態において、前記少なくとも4個のアミノ酸置換又は欠失は、式(I)

10

20

30

40

50

)の化合物の2、3、4、10、15、16、17、20、21、24、28及び29から選択される(Xで示された)アミノ酸配列位置に存在し、以下のとおりである:

- X2が、Alaであり;
- X3が、Dab(Ac)、Dap(Ac)及びGln(Me)であり;
- X4が、DAIaであり;
- X10が、Leu及びValから選択され;
- X15が、Gluであり;
- X16が、Aib、Lys、Glu、Leu及びValから選択され;
- X17が、Alaであり;
- X20が、Glu及びLysから選択され;
- X21が、Glu及びSerから選択され;
- X24が、Lys、Ser及びGluから選択され;
- X28が、Ser、Glu及びLysから選択され;
- X29が、Alaであるか、又は存在しない。

10

#### 【0010】

いくつかの実施形態において、前記少なくとも4個のアミノ酸置換又は欠失は、式(I)の化合物の2、3、4、16、17、20、21、24、28及び29から選択される(Xで示された)アミノ酸配列位置に存在し、以下のとおりである:

- X2が、Alaであり;
- X3が、Dab(Ac)、Dap(Ac)、Gln(Me)又はHisであり;
- X4が、DAIaであり;
- X16が、Aib、Lys、Gluから選択され;
- X17が、Alaであり;
- X20が、Glu及びLysから選択され;
- X21が、Glu及びSerから選択され;
- X24が、Lys、Ser及びGluから選択され;
- X28が、Ser、Glu及びLysから選択され;
- X29が、Alaであるか、又は存在しない。

20

#### 【0011】

当然のことながら、あらゆる個別分子が、式(Ia)の配列と少なくとも4つの相違点を有し、そしてそれは、提供された定義の中で認められた少なくとも4個の置換及び欠失のあらゆる組み合わせであり得る。

30

ペプチド配列Zには、式(Ia)のアミノ酸配列と比較して、(組み合わせを含めて)最大4個の置換及び欠失、最大5個の置換及び欠失、最大6個の置換及び欠失、最大7個の置換及び欠失、最大8個の置換及び欠失、最大9個の置換及び欠失、最大10個の置換及び欠失、最大11個の置換及び欠失、最大12個の置換及び欠失、又は最大13個の置換及び欠失を有していてもよい。

例えば、化合物は、4~11個の置換及び欠失、6~11個の置換及び欠失、6~9個の置換及び欠失、又は4~9個の置換及び欠失を有していてもよい。

本発明の化合物は、グルカゴンアゴニスト活性を有する。

40

本発明の化合物は、天然ヒトグルカゴンと比較して、溶解性及び/又は安定性が改善された。

#### 【0012】

改善された溶解性とは、天然グルカゴンと比較して、pH4(例えば、pH4の100mM酢酸緩衝液中)、pH5(例えば、pH5の100mM酢酸緩衝液中)、pH6(例えば、pH6の100mMリン酸緩衝液中)、pH7(例えば、pH7の100mMリン酸緩衝液中)、及び/又はpH7.5(例えば、pH7.5の100mMリン酸緩衝液中)にて改善された溶解性を含み得るか、又は構成し得る。測定は、実施例4で設定した条件下でおこなわれ得る。1mg/mlの溶解性が望ましい場合もある。

改善された安定性とは、天然ヒトグルカゴンと比較して、改良された物理的安定性及び

50

／又は改善された化学的安定性を含み得る、及び／又は引き起こし得る。

改善された物理的安定性とは、例えば可溶性又は不溶性の凝集体、例えばフィブリルを形成する凝集傾向の低減を含み得るか、又は引き起こし得る。凝集（例えば、フィブリル形成）は、例えばpH 7.5及び4.0にて、1 mg/mlの溶存ペプチドの開始濃度において測定されてもよい。任意の適当な期間、例えば、24時間、48時間又は96時間が用いられてもよい。凝集は、攪拌のあるなしにかかわらず、実施例5で設定した条件下で測定できる。

#### 【0013】

改善された化学的安定性とは、一般的にプロテアーゼ又はペプチダーゼ活性の混入がない中で、水性緩衝液中でペプチドが切断又は分解する傾向の低減を含み得るか、又は引き起こし得る。安定性は、例えばpH 4.0又は7.5及び4.0にて、1 mg/mlの溶存ペプチドの開始濃度において測定されてもよい。評価は、好適な期間のインキュベーション後に維持された完全なペプチドを測定することを含み得る。これは、実施例6で規定されるように完全なペプチド純度を測定することを伴ってもよい。インキュベーションは、任意の好適な期間、例えば、1日間、7日間又は14日間おこなわれ得る。安定性は、実施例6で設定した条件下で測定され得る。

10

#### 【0014】

本発明の更なる実施形態において、これだけに限定されるものではないが、以下のものが含まれる：

（例えば、急性又は慢性低血糖の処置における）治療法に使用するための本発明の化合物、又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物；

20

本発明の化合物、医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物、及び医薬的に許容し得る担体を含む医薬組成物；

それを必要としている対象の疾患又は病態を処置する方法であって、前記対象に処置的に有効な量の本発明の化合物、又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物、或いは本発明の医薬組成物を投与することを含む前記方法；

（例えば、急性又は慢性低血糖の処置における）治療法に使用するための薬剤の製造における本発明の化合物、又はその塩若しくは溶媒和物、或いは本発明の医薬組成物の使用；

本発明の化合物（ペプチド）又はペプチドZをコードする核酸構築物（例えば、DNA又はRNA構築物）；

30

本発明のそのような核酸構築物を含む発現ベクター；及び

本発明のそのような核酸構築物又は発現ベクターを含む宿主細胞。

#### 【0015】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物又は方法によって処置されるべき疾患又は病態は、以下の：低血糖、急性低血糖、慢性低血糖、2型糖尿病、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化症、高血圧、脂質異常症、脂肪肝、

ブロッカー中毒、インスリノーマ及びVon Gierkes病から成る群から選択される。特定の実施形態において、疾患又は条件は低血糖である。ある実施形態において、低血糖は、以下の：糖尿病性低血糖、急性インスリン誘発性低血糖、非糖尿病性低血糖、反応性低血糖、空腹時低血糖、薬物誘発性低血糖、アルコール誘発性低血糖、胃バイパス誘発性低血糖及び妊娠中に生じる低血糖から成る群から選択される。

40

#### 【0016】

いくつかの実施形態において、本発明は、低血糖の処置のための化合物、又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物を含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】麻酔した、5時間絶食させた正常血糖雄Sprague Dawleyラットにおける120分間の血糖値に対する、ピヒクル（PBS、pH 7.4）、ヒトグルカゴン（20 nmol/kg体重）又は発明の化合物14（20及び60 nmol/kg体重）それぞれの単

50

回皮下投与の効果を示すグラフである。データは、SEMを伴った平均値である（ $n = 6$  / 群）。 発明の詳細な説明

【0018】

本明細書中に別段の定義がない限り、本出願で使用される科学技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。一般的に、本明細書中に記載した化学、分子生物学、細胞及び癌生物学、免疫学、微生物学、薬理学、並びにタンパク質及び核酸化学と関係して使用される用語体系及びそれらの技術は、当該技術分野で周知であり、且つ一般的に使用されるものである。

【0019】

本出願で言及されたすべての刊行物、特許、及び公開特許出願は、言及によって具体的に本明細書中に援用される。矛盾する場合には、その具体的な定義を含んでいる本明細書が統制する。

10

【0020】

本明細書中に記載した発明の各実施形態は、単独で、又は1若しくは複数の本発明の他の実施形態と組み合わせて利用され得る。

定義

【0021】

別段の指定がない限り、以下の定義が特定の用語に与えられ、そしてそれが、本明細書中に使用される。

【0022】

この明細書を通じて、「comprise」という語又は「comprises」若しくは「comprising」などの変化形は、述べられた整数（若しくは成分）又は整数（若しくは成分）の群の包含を含意すると理解されるが、その他の整数（若しくは成分）又は整数（若しくは成分）の群を除外するものではない。

20

【0023】

単数形の「a」、「an」及び「the」は、文脈で明確に別段の命令がない限り、複数形を含んでいる。

【0024】

用語「含む」は、「これだけに限定されるものではないが、含む」を意味するように使用される。「含む」及び「これだけに限定されるものではないが、含む」は互換的に使用される。

30

【0025】

「患者」、「対象」及び「個体」という用語は、互換的に使用されてもよく、ヒト又はヒト以外の動物のどちらかを指す。これらの用語は、ヒト、霊長類、家畜動物（例えばウシ、ブタ）、コンパニオン・アニマル（例えばイヌ、ネコ）及び齧歯類（例えばマウスやラット）などの哺乳類を含んでいる。

【0026】

先に提供されている本明細書で用いられた特定の用語又は表現の意味に関する説明に加えて、以下の定義/説明もまた適用される：

「医薬的に許容し得る担体」という用語には、あらゆる標準的な医薬担体、又は経口、肺、直腸、鼻、局所、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内、皮内、経皮又は腔内投与に好適な組成物又は製剤に使用されるものなどの希釈剤が含まれる。処置用途のための医薬的に許容し得る担体は、医薬的技術で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) 中に記載されている。液状組成物では、担体として非緩衝化又は緩衝化水溶液を用いることが多い。例えば、弱酸性、弱アルカリ性又は生理的 pH の無菌の生理的食塩水又はリン酸緩衝食塩水 (PBS) が使用されてもよい。関連する pH 緩衝液（そのいくつかは医薬組成物に関連して既に先に触れられた）としては、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン (TRIS)、N トリス（ヒドロキシメチル）メチル 3 アミノプロパンスルホン酸 (TAPS)、重炭酸アンモニウム、ジエタノールアミン、ヒスチジン（好ましい

40

50

緩衝液であることが多い)、アルギニン及びリジン、並びにそれらの混合物が挙げられる。前記用語には、動物又はヒトにおける使用のためにUS薬局方に掲載されたあらゆる剤がさらに包含される。

【0027】

「医薬的に許容され得る塩」という用語は、本発明との関連において、それを用いて処置されるべき患者又は対象に有害でない塩を指す。そのような塩は、一般的な酸付加塩又は塩基性塩である。酸付加塩としては、無機酸の塩及び有機酸の塩が挙げられる。好適な酸付加塩の制限されることのない例としては、塩酸塩、リン酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩及びクエン酸塩が挙げられる。塩基性塩の例としては、陽イオンが、例えばナトリウムやカリウムなどのアルカリ金属イオン、例えばカルシウムなどのアルカリ土類金属イオン、並びに例えば、タイプNR(R')<sub>3</sub><sup>+</sup>{式中、RとR'は独立に、任意に置換されたC<sub>1-6</sub>アルキル、任意に置換されたC<sub>2-6</sub>アルケニル、任意に置換されたアリールを、又は任意に置換されたヘテロアリールを表す。}の、置換されたアンモニウムイオンから選択される塩が挙げられる。医薬的に許容され得る塩のその他の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mack Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985、及びより最新の版、並びにEncyclopaedia of Pharmaceutical Technologyに記載されている。

10

【0028】

本発明との関連において「溶媒和物」という用語は、溶質(この場合、本発明の化合物又は医薬的に許容し得るその塩)と溶媒によって形成されると化学量論的に定義される複合体を指す。(特に医薬的に許容され得る溶媒和物の場合に)関連する溶媒としては、これだけに限定されるものではないが、水、エタノール及び酢酸が挙げられる。当該溶媒分子が水である溶媒和物は、通常「水和物」と呼ばれる。

20

【0029】

本発明との関連において用いられる「処置的に有効な量」及び「処置的に有効な用量」という用語は(特に、本発明の化合物との関連において)、所定の病態(障害、疾患)若しくは傷害、及び好ましくはそこから生じる合併症の回復、緩和、部分的な停止、又は回復若しくは治癒のその他の形での促進に十分な量又は用量を指す。特定の目的に有効な量又は用量は、病態又は傷害の重症度、並びに処置される対象又は患者の体重及び全身状態に依存する。適当な量又は用量の決定は、通常の技量の訓練された医師(又は獣医)の技能の範疇にある。

30

【0030】

本発明との関連において用いられる「処置」(並びに「処置すること」や他のその文法的な変化形)という用語は、有益な又は所望の臨床結果を得るためのアプローチを指す。本発明の目的のために、有益な又は所望の臨床結果としては、これだけに限定されるものではないが、検出可能であるか検知不可能であるかにかかわらず、症状の緩和、疾患の範囲の縮小、安定化した(すなわち、悪化しない)病状、疾病進行の遅延又は減速、病状の改善又は緩和、及び(部分的であるか全体的であるかにかかわらず)寛解が挙げられる。

「処置」はさらに、処置がなかった際に予想される生存と比較して、生存を延長することを指すこともできる。「処置」は、障害の発生を予防するか又は病理を変更することを企図しておこなわれた干渉である。従って、「処置」は、治療的処置と予防対策又は防止対策(prophylactic or preventative measures)の両方を指す。予防対策又は防止対策との関連において使用されるとき、化合物は、疾患又は疾患の発生を完全に予防しなければならないというわけではない。処置を必要とする人には、既に障害に罹患している人、並びに障害の発生を予防すべき状態にある人が含まれる。「処置」はまた、処置がなかったものと比較して、病理又は症状(例えば、体重増加又は低血糖)の悪化の阻害又は軽減も意味しているので、関連病態の完全な休止を含意することを必ずしも必要としているわけではない。

40

【0031】

本発明との関連において用いられる「アゴニスト」という用語は、問題の受容体型を活

50

性化する物質（リガンド）を指す。

本明細書を通じて、天然のアミノ酸に関して従来の一文字コード及び三文字コードが使用されている。別段の指示がない限り、言及は、本明細書中で言及されているアミノ酸のL異性体型に対しておこなわれている。

【0032】

Dab(Ac) : 4 N アセチル 2, 4 ジアミノ酪酸、(2S) 4 (アセチルアミノ) 2 アミノブタン酸又は4 (アセチルアミノ) 2 アミノブタン酸(L体)。

Dap(Ac) : 3 N アセチル 2, 3 ジアミノプロピオン酸又は3 (アセチルアミノ) 2 アミノプロパン酸(L体)。

Gln(Me) : メチル L グルタミン。

N Me Tyr : 窒素でメチル化されているチロシン。

N Me DTyr : 窒素でメチル化されているD チロシン。

N Me Ser : 窒素でメチル化されているセリン。

N Me D Ser : 窒素でメチル化されているD セリン。

Aib : アミノイソ酪酸。

【0033】

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

【0034】

本明細書中に開示されている配列は共通して、配列のアミノ末端(N末端)に「Hy-」部分、及び「配列のカルボキシ末端(C末端)に「-OH」部分又は「-NH<sub>2</sub>」部分のどちらかを組み込んだ配列である。そのような場合、そして、別段の指示がない限り、問題の配列のN末端における「Hy-」部分は水素原子を示し[すなわち、式I及びIaではR<sup>1</sup>=水素=Hy-; N末端における遊離の一級又は二級アミノ基の存在に相当する]、それに対して、配列のC末端における「-OH」又は「-NH<sub>2</sub>」部分は、それぞれヒドロキシ基[例えば式I及びIaではR<sup>2</sup>=OH; C末端におけるカルボキシ(COOH)基の存在に相当する]又はアミノ基[としては、式I及びIaではR<sup>2</sup>=NH<sub>2</sub>; C末端におけるアミド(CONH<sub>2</sub>)基の存在に相当する]を示す。本発明の各配列では、C末端の「-OH」部分はC末端の「-NH」部分と置換されてもよいし、逆もまた同様である。

【0035】

本発明のいくつかの実施形態は、式(I) :

R<sup>1</sup> Z R<sup>2</sup>(I)

{式中、

R<sup>1</sup>が、水素、C<sub>1-4</sub>アルキル、アセチル、ホルミル、ベンゾイル又はトリフルオロアセチルであり;

R<sup>2</sup>が、OH又はNH<sub>2</sub>であり;そして

Zが、式(Ia) :

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 Glu Asn Thr(Ia)

の配列に由来し、且つ、以下の:

X<sub>2</sub>が、Aib及びAlaから選択され;

X<sub>3</sub>が、His、Pro、Dab(Ac)、Dap(Ac)及びGln(Me)から選択され;

X<sub>4</sub>が、DAlaであり;

10

20

30

40

50

X 9 が、G l u であり；  
 X 1 0 が、V a l、L e u、N M e T y r 及び N M e D T y r から選択され；  
 X 1 5 が、G l u であり；  
 X 1 6 が、A i b、L y s、G l u、L e u、V a l、D V a l、P h e、H i s、A  
 r g、P r o、D P r o、N M e S e r 及び N M e D S e r から選択され；  
 X 1 7 が、A l a 及び S e r から選択され；  
 X 2 0 が、G l u 及び L y s から選択され；  
 X 2 1 が、G l u、L y s 及び S e r から選択され；  
 X 2 4 が、L y s、S e r、G l u 及び A l a から選択され；  
 X 2 5 が、A r g、L y s、H i s、I l e、L e u、A l a、M e t、C y s、A s  
 n、V a l、S e r、G l u、A s p、G l n、T h r 及び ( p ) T y r から選択され；  
 X 2 8 が、S e r、L y s 及び G l u から選択されるか、又は存在せず；  
 X 2 9 が、S e r 及び A l a から選択されるか、又は存在しない、  
 のように 2、3、4、9、10、15、16、17、20、21、24、28 及び 29 から  
 選択される ( X で示された ) アミノ酸配列位置にのみ存在する少なくとも 4 個の置換又  
 は欠失を含むアミノ酸配列であって、

但し、Z が、以下の：

H S Q G T F T S D Y S K Y L D S A R A E D F V K W L E S T ; 及び

H S Q G T F T S D Y S K Y L E S R R A K E F V E W L E S T、

から選択されない。} を有する化合物、又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和  
 物に関する。

【 0 0 3 6 】

本発明のいくつかの実施形態は、式 ( I ) :

$R^1 Z R^2$  ( I )

{ 式中、

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

$R^2$  が、OH 又は  $NH_2$  であり；そして

Z が、式 ( I a ) :

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 G l u A s n T h r ( I a )

の配列に由来し、且つ、以下の：

X 2 が、A i b 及び A l a から選択され；

X 3 が、H i s 及び P r o から選択され；

X 9 が、G l u であり；

X 1 0 が、N M e T y r 及び N M e D T y r から選択され；

X 1 5 が、G l u であり；

X 1 6 が、A i b、L y s、G l u、L e u、V a l、D V a l、P h e、H i s、A  
 r g、P r o、D P r o、N M e S e r 及び N M e D S e r から選択され；

X 1 7 が、A l a 及び S e r から選択され；

X 2 0 が、G l u 及び L y s から選択され；

X 2 1 が、G l u、L y s 及び S e r から選択され；

X 2 4 が、L y s、S e r、G l u 及び A l a から選択され；

X 2 5 が、A r g、L y s、H i s、I l e、L e u、A l a、M e t、C y s、A s  
 n、V a l、S e r、G l u、A s p、G l n、T h r 及び ( p ) T y r から選択され；

X 2 8 が、S e r 及び L y s から選択されるか、又は存在せず；

X 2 9 が、S e r 及び A l a から選択されるか、又は存在しない、

のように 2、3、9、10、15、16、17、20、21、24、28 及び 29 から選  
 択される ( X で示された ) アミノ酸配列位置にのみ存在する少なくとも 4 個の置換又は欠

10

20

30

40

50

失を含むアミノ酸配列であって、

但し、Zが、以下の：

HSQGTFTSDYSKYLD SARAEDFVKWLEST；及び

HSQGTFTSDYSKYLESRRAKEFVEWLEST、

から選択されない。}を有する化合物、又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物に関する。

【0037】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物の2、3、4、9、10、15、16、17、20、21、24、28及び29から選択される(Xで示された)アミノ酸配列位置の少なくとも4個のアミノ酸置換又は欠失は、以下のとおりである：

X2が、Aib及びAlaから選択され；

X3が、His、Pro、Dab(Ac)、Dap(Ac)及びGln(Me)から選択され；

X4が、DALaであり；

X9が、Gluであり；

X10が、Val、Leu、NMeTyr及びNMeDTyrから選択され；

X15が、Gluであり；

X16が、Aib、Lys、Glu、Leu、Val、Phe、His及びArgから選択され；

X17が、Ala及びSerから選択され；

X20が、Glu及びLysから選択され；

X21が、Glu、Lys及びSerから選択され；

X24が、Lys、Ser、Glu及びAlaから選択され；

X28が、Ser、Glu及びLysから選択されるか、又は存在せず；

X29が、Ser及びAlaから選択されるか、又は存在しない。

【0038】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物の2、3、4、10、15、16、17、20、21、24、28及び29から選択される(Xで示された)アミノ酸配列位置の少なくとも4個のアミノ酸置換又は欠失は、以下のとおりである：

X2が、Alaであり；

X3が、Dab(Ac)及びGln(Me)であり；

X4が、DALaであり；

X10が、Leu及びValから選択され；

X15が、Gluであり；

X16が、Aib、Lys、Glu、Leu及びValから選択され；

X17が、Alaであり；

X20が、Glu及びLysから選択され；

X21が、Glu及びSerから選択され；

X24が、Lys、Ser及びGluから選択され；

X28が、Ser、Glu及びLysから選択され；

X29が、Alaであるか、又は存在しない。

【0039】

いくつかの実施形態において、X3は、Dab(Ac)及びGln(Me)から選択される。

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物の2、3、4、16、17、20、21、24、28及び29から選択される(Xで示された)アミノ酸配列位置の少なくとも4個のアミノ酸置換又は欠失は、以下のとおりである：

X2が、Alaであり；

X3が、Dab(Ac)、Dap(Ac)、Gln(Me)又はHisであり；

X4が、DALaであり；

X 1 6 が、A i b、L y s、G l u から選択され；  
 X 1 7 が、A l a であり；  
 X 2 0 が、G l u 及び L y s から選択され；  
 X 2 1 が、G l u 及び S e r から選択され；  
 X 2 4 が、L y s、S e r 及び G l u から選択され；  
 X 2 8 が、S e r、G l u 及び L y s から選択され；  
 X 2 9 が、A l a であるか、又は存在しない。

## 【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態において、X 1 7 は、A l a である。

いくつかの実施形態において、X 2 5 は、A r g、H i s 又は L y s から選択される。  
 いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、例えば W O 2 0 1 1 / 1 1 7 4 1 7 で  
 言及されているものなどの、2 5 位での置換を含んでいてもよい。前記文献を参照により  
 本明細書中に援用する。しかしながら、本発明では、グルカゴン類似体の増強された物理  
 的安定性を得るために、そのような 2 5 位での置換は必要とされていない。

10

いくつかの実施形態において、X 2 7 は、S e r、L y s、G l u 及び A s p から選択  
 される。いくつかの実施形態において、X 2 7 は：G l u 及び A s p から選択される。い  
 くつかの実施形態において、X 2 7 は、G l u である。

## 【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態において、X 2 8 及び / 又は X 2 9 は、先に開示されたもの以外の  
 アミノ酸残基であってもよい。いくつかの実施形態において、置換は、親水性置換（例え  
 ば、A r g、L y s、A s n、H i s、G l n、A s p、S e r、又は G l u）であって  
 もよい。いくつかの実施形態において、X 2 8 及び / 又は X 2 9 は：G l u、A s p、L  
 y s、A r g、S e r、L e u、A l a 及び G l y から選択され得る。いくつかの実施形  
 態において、X 2 8 は、G l u 又は A s p である。いくつかの実施形態において、X 2 9  
 は、G l u 又は A s p である。いくつかの実施形態において、X 2 8 は、G l u であり、  
 且つ、X 2 9 は、G l u である。

20

## 【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態において、X 1 7 は、A l a であり、且つ、X 2 7 は、G l u であ  
 る。いくつかの実施形態において、X 2 0 は、G l u であり、且つ、X 2 7 は、G l u だ  
 る。いくつかの実施形態において、X 1 7 は、A l a であり、X 2 0 は、G l u であり  
 、且つ、X 2 7 は、G l u である。いくつかの実施形態において、X 1 6 は、A i b であ  
 り、且つ、X 2 7 は、G l u である。いくつかの実施形態において、X 1 6 は、A i b だ  
 り、X 2 1 は、S e r であり、且つ、X 2 7 は、G l u である。いくつかの実施形態に  
 おいて、X 1 6 は、A i b であり、X 2 1 は、S e r であり、X 2 7 は、G l u であり、  
 且つ、X 2 8 は、S e r である。

30

## 【 0 0 4 3 】

H i s、P r o、D a b ( A c ) 及び G l n ( M e ) から選択されるアミノ酸残基での  
 、式 ( I a ) の 3 位におけるアミノ酸残基 ( X 3 ) の置換の可能性に加えて、3 位は、例  
 えば D a p ( A c ) などの通常は非天然型アミノ酸（すなわち、哺乳類タンパク質では天  
 然に起こらないもの）になるグルタミンの類似体で置換されてもよい [ すなわち、X 3 =  
 D a p ( A c ) ]。とはいえ、本明細書中で提供される定義のすべてにおいて、本発明は  
 、同じ一般式によって定義されるが、D a p ( A c ) が X 3 において認められない化合物  
 をさらに包含する。

40

## 【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、Z が以下のものから成る群から選択  
 される：

H S Q G T F T S D Y S K Y L D S A R A E S F V K W L E S T ( 配列番号 2 )

H S Q G T F T S D Y S K Y L D S A R A E D F V K W L E E T ( 配列番号 3 )

H S Q G T F T S D Y S K Y L D K A R A E D F V K W L E S T ( 配列番号 4 )

H S Q G T F T S D Y S K Y L D S A R A E D F V A W L E S T ( 配列番号 5 )

50

HSQGTFTSDYSKYLD E A R A K D F V E W L E K T (配列番号6)  
 HSQGTFTSDYSKYLD S A R A E D F V E W L E S T (配列番号7)  
 HSQGTFTSDYSRYL E S A R A E D F V K W L E S T (配列番号8)  
 HSQGTFTSDYSKYL E S A R A E D F V K W L E S T (配列番号9)  
 HSQGTFTSDYSKYLD S A R A E E F V K W L E S T (配列番号10)  
 HSQGTFTSDYSKYLD S A R A E D F V S W L E S T (配列番号11)  
 HSQGTFTSDLSKYLD S A R A E D F V K W L E S T (配列番号12)  
 HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A E D F V K W L E S T (配列番号13)

10

HSQGTFTSDYSKYLD S A R A E D F V K W L E S (配列番号14)  
 HSQGTFTSDYSKYLD E A R A E D F V K W L E S T (配列番号15)  
 HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A E S F V K W L E S T (配列番号16)

【0045】

HSQGTFTSDYSKYL E S A R A E S F V K W L E S T (配列番号17)  
 HSQGTFTSDYSKYLD L A R A E D F V K W L E S T (配列番号18)  
 HSQGTFTSDYSKYLD K R R A E D F V S W L E S T (配列番号19)  
 HSQGTFTSDYSKYLD V A R A E S F V K W L E S T (配列番号20)  
 H A Q G T F T S D Y S K Y L D A i b A R A E S F V K W L E S T (配列番号21)

20

HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A E E F V K W L E S T (配列番号22)  
 H S Q D A l a T F T S D Y S K Y L D A i b A R A E S F V K W L E S T (配列番号23)  
 HSQGTFTSDVSKYLD A i b A R A E S F V K W L E S T (配列番号24)

H S [ D a b ( A c ) ] G T F T S D Y S K Y L D A i b A R A E S F V K W L E S T (配列番号25)  
 HSQGTFTSDYSKYLD A i b R R A E S F V K W L E S T (配列番号26)

30

H S [ G l n ( M e ) ] G T F T S D Y S K Y L D A i b A R A E S F V K W L E S T (配列番号27)

【0046】

HSQGTFTSDYSKYLD E A R A K S F V E W L E K T (配列番号28)  
 HSQGTFTSDYSKYLD E A R A K S F V E W L E S T (配列番号29)  
 HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A K S F V E W L E K T (配列番号30)  
 HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A E S F V K W L E S A (配列番号31)

40

HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A E S F V K W L E S T (配列番号32)  
 H S [ D a b ( A c ) ] G T F T S D Y S K Y L D A i b A R A E S F V K W L E S T (配列番号33)  
 HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A E E F V S W L E K T (配列番号34)

HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A E K F V E W L E S T (配列番号35)

【0047】

HSQGTFTSDYSKYLD A i b A R A E E F V A W L E S T (配列番号36)

50

HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEET (配列番号37)

HSQGTFTSDYSKYLE Aib ARAEEFVKWLEST (配列番号38)

SHSGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEST (配列番号39)

HS [Dab(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEST (配列番号40) 及び

HS [Dap(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEST (配列番号41)。

10

【0048】

本発明の特定の化合物としては、以下の：

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEFVKWLEST OH 化合物1

;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEFVKWLEET OH 化合物2

;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD KARAEFVKWLEST OH 化合物3

;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEFVAWLEST OH 化合物4

;

20

Hy HSQGTFTSDYSKYLDE ARAKDFVEWLEKT OH 化合物5

;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEFVEWLEST OH 化合物6

;

Hy HSQGTFTSDYSRYLES SARAEFVKWLEST OH 化合物7

;

Hy HSQGTFTSDYSKYLE SARAEFVKWLEST OH 化合物8

;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEFVKWLEST OH 化合物9

;

30

【0049】

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEFVSWLEST OH 化合物1

0;

Hy HSQGTFTSDLSKYLD SARAEFVKWLEST OH 化合物1

1;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEDFVKWLEST OH

化合物12;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEFVKWLES OH 化合物13

;

Hy HSQGTFTSDYSKYLDE ARAEDFVKWLEST OH 化合物1

4;

40

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAESFVKWLEST OH

化合物15;

Hy HSQGTFTSDYSKYLE SARAEFVKWLEST OH 化合物1

6;

Hy HSQGTFTSDYSKYLDL ARAEDFVKWLEST OH 化合物1

7;

Hy HSQGTFTSDYSKYLDK RRAEDFVSWLEST OH 化合物1

8;

Hy HSQGTFTSDYSKYLDV ARAESFVKWLEST OH 化合物1

50

9 ;

## 【0050】

Hy HAQGTFTSDYSKYLD Aib ARAESFVKWLEST OH  
化合物20 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEST OH  
化合物21 ;

Hy HSQ DA1a TFTSDYSKYLD Aib ARAESFVKWLEST  
OH 化合物22 ;

Hy HSQGTFTSDVSKYLD Aib ARAESFVKWLEST OH  
化合物23 ;

Hy HS [Dab(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAESFV  
KWLEST NH<sub>2</sub> 化合物24 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib RRAESFVKWLEST OH  
化合物25 ;

Hy HS [Gln(Me)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAESFV  
KWLEST OH 化合物26 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLDEARAKSFVEWLEKT OH 化合物2  
7 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLDEARAKSFVEWLEST OH 化合物2  
8 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAKSFVEWLEKT OH  
化合物29 ;

## 【0051】

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAESFVKWLESA OH  
化合物30 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAESFVKWLEST NH<sub>2</sub>  
化合物31 ;

Hy HS [Dab(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAESFV  
KWLEST OH 化合物32 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVSWLEKT OH  
化合物33 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEKFVEWLEST OH  
化合物34 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVAWLEST OH  
化合物35 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEET OH  
化合物36 ;

Hy HSQGTFTSDYSKYLE Aib ARAEEFVKWLEST OH  
化合物37 ;

Hy HSHGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEST NH<sub>2</sub>  
化合物38 ;

Hy HS [Dab(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFV  
KWLEST OH 化合物39 ;

## 【0052】

Hy HS [Dab(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFV  
KWLEST NH<sub>2</sub> 化合物40 ;

Hy HS [Dap(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFV  
KWLEST NH<sub>2</sub> 化合物41 ;

並びに医薬的に許容され得るその塩及び溶媒和物が挙げられる。

## 【0053】

10

20

30

40

50

本発明の后者の特定の化合物（ペプチド）、並びに医薬的に許容され得るその塩及び溶媒和物のそれぞれが、本発明の特定の実施形態をさらに構成する。

よって、一実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAESFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEDFVKWLEET OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLDKARAEDFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

10

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEDFVAWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

【0054】

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD EARA KDFVEWLEKT OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEDFVEWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

20

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSRYLESARAEDFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLESARAEDFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEEFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

30

【0055】

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEDFVSWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDLSKYLD SARAEDFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD AibARAEDFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

40

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD SARAEDFVKWLES OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD EARAEDFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

【0056】

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD AibARAESFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

50

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LES ARAESFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LDL ARAEDFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LDKRRAEDFVSWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

## 【0057】

10

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LDV ARAESFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HAQGTFTSDY SKY LD Aib ARAESFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LD Aib ARAEEFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

20

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQ DA1a TFTSDY SKY LD Aib ARAESFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

## 【0058】

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDV SKY LD Aib ARAESFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HS [Dab(Ac)]GTFTSDY SKY LD Aib ARAESFVKWLEST NH<sub>2</sub>、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

30

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LD Aib RRAESFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HS [Gln(Me)]GTFTSDY SKY LD Aib ARAESFVKWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

## 【0059】

40

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LDE ARAKSFVEWLEKT OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LDE ARAKSFVEWLEST OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、  
 Hy HSQGTFTSDY SKY LD Aib ARAKSFVEWLEKT OH、  
 又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

## 【0060】

別の実施形態において、本発明の化合物は、

50

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAESFVKWLESA OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAESFVKWLEST NH<sub>2</sub>  
、

又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HS [Dab(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAESFV  
KWLEST OH、

又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。 10

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVSWLEKT OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

【0061】

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEKFVEWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVAWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。 20

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEET OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSQGTFTSDYSKYLE Aib ARAEEFVKWLEST OH、  
又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

【0062】

さらに別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HSHGTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFVKWLEST NH<sub>2</sub>  
、 30

又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HS [Dab(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFV  
KWLEST OH、

又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HS [Dab(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFV  
KWLEST NH<sub>2</sub>、又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

別の実施形態において、本発明の化合物は、

Hy HS [Dap(Ac)] GTFTSDYSKYLD Aib ARAEEFV  
KWLEST NH<sub>2</sub>、 40

又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物である。

【0063】

本発明の化合物は、ペプチド配列内に1若しくは複数の分子内架橋を有していてもよい。そのような架橋のそれぞれは、通常他の3つのアミノ酸残基によって隔てられている配列内の2つのアミノ酸残基の側鎖間(すなわち、アミノ酸Aの側鎖とアミノ酸A+4の側鎖の間)で形成される。

例えば、そのような架橋は、アミノ酸残基対12と16、16と20、20と24、又は24と28の側鎖間で形成され得る。問題の2つの側鎖は、イオン性相互作用を通して、又は共有結合を介して互いに連結され得る。よって、かかるアミノ酸残基対は、例えば 50

、塩橋を形成するか、又はイオン性相互作用を結果的にもたすことができる逆帯電した側鎖を備えていてもよい。そのような場合、問題のアミノ酸残基の一方、例えばG l u又はA s pであり得、それと同時にもう片方が、例えばL y s又はA r gであり得る。L y sとG l u又はL y sとA s pの対合はまた、ラクタム環の形成につながることもある。

【0064】

医薬組成物

いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の化合物（又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物）及び医薬的に許容し得る担体を含む医薬組成物に関する。かかる医薬組成物は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995に記載されているような慣用の技術によって調製することができる。

10

【0065】

本発明の液状医薬組成物のある実施形態は、約0.01mg/ml～約25mg/ml、例えば、約1mg/ml～約10mg/mlなど、例えば、約1mg/ml～5mg/mlの濃度で存在する本発明の化合物を含み得る。いくつかの実施形態において、組成物は、2.0～10.0のpHを有する。本発明の医薬組成物は、緩衝液系、（単数若しくは複数の）保存料、（単数若しくは複数の）等張化剤、（単数若しくは複数の）キレート化安定化剤及び/又は（単数若しくは複数の）界面活性剤をさらに含んでもよい。本発明の液状医薬組成物の特に有用な実施形態は、水性組成物、すなわち、水を含む組成物である。そのような組成物は、水性溶液又は水性懸濁液の形態であってもよい。本発明の水性医薬組成物の好ましい実施形態は、水性溶液である。本発明との関連において、「水性組成物」という用語は通常、少なくとも50重量%（50% w/w）の水を含む組成物を指す。同様に、「水性溶液」という用語は通常、少なくとも50% w/wの水を含む溶液を指し、そして、「水性懸濁液」という用語は、少なくとも50% w/wの水を含む懸濁液を指す。

20

【0066】

いくつかの実施形態において、本発明の医薬組成物は、緩衝液と一緒に、0.1mg/ml以上の濃度にて本発明の化合物（又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物）の水溶液を含み、そしてその組成物は、約2.0～約10.0のpH、例えば、約6.5～約8.0など、例えば、約6.5～約8.5、例えば、約7.0～約8.5、又は約6.0～約8.5などのpHを有する。

30

【0067】

本発明の医薬組成物の他の実施形態において、組成物のpHは、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.8、9.9及び10.0から成るリストから選択されるpHである。組成物のpHは、本発明の構成化合物の等電点から少なくとも1pH単位（すなわち、高いか又は低い）であり得、例えば、本発明のグルカゴン類似体化合物の等電点から少なくとも2pH単位（すなわち、高いか又は低い）であり得る。

40

【0068】

本発明の緩衝液含有医薬組成物の更なる実施形態において、緩衝液又は緩衝物質は：酢酸塩緩衝液（例えば、酢酸ナトリウム）、炭酸ナトリウム、クエン酸（例えば、クエン酸ナトリウム）、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リジン、アルギニン、リン酸塩（例えば、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム及びリン酸三ナトリウムの中から選択される）、トリス（すなわち、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）、H E P E S（すなわち、4（2ヒドロキシエチル）1ピペラジンエタンスル

50

ホン酸)、BICINE(すなわち、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン)、及びTRICINE(すなわち、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン)、並びにコハク酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩及びアスパラギン酸塩緩衝液及びその混合物から成る群から選択される。

【0069】

本発明の医薬組成物の更なる実施形態において、組成物は、医薬的に許容され得る保存料を含む。関連する保存料としては：フェノール、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸エチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル、p-ヒドロキシ安息香酸ブチル、2-フェノキシエタノール、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール、エタノール、クロロブタノール、チオメロザール、プロノポール、安息香酸、イミド尿素、クロルヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、クロロクレゾール、塩化ベンゼトニウム、クロルフェネシン[すなわち、3-(p-クロルフェノキシ)プロパン-1,2-ジオール]及びその混合物から成る群から選択される保存料が挙げられる。保存料は、最終的な液状組成物中に0.1mg/ml~30mg/ml、例えば、0.1mg/ml~20mg/mlなど(例えば、0.1mg/ml~5mg/ml又は5mg/ml~10mg/ml又は10mg/ml~20mg/ml)の濃度で存在していてもよい。医薬組成物における保存料の使用は、当業者にとって周知である。これに関連して、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995を引用することができる。

【0070】

更なる実施形態において、本発明の医薬組成物は、等張化剤(すなわち、組成物の等張性を与える目的で組成物中に含まれている医薬的に許容され得る作用物質)を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、注射によって対象に投与される。関連する等張化剤としては：塩(例えば、塩化ナトリウム)、糖及び糖アルコール、アミノ酸(グリシン、アルギニン、リジン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン及びトレオニンを含む)、アルジトール(グリセロール、プロピレングリコール(すなわち、1,2-プロパンジオール)、1,3-プロパンジオール及び1,3-ブタンジオールを含む)、ポリエチレングリコール(PEG400を含む)、並びにその混合物から成る群から選択される作用物質が挙げられる。好適な糖としては、例えば、フルクトースや、グルコースや、マンノースや、ソルボースや、キシロースや、マルトースや、ラクトースや、スクロースや、トレハロースや、デキストランや、プルランや、デキストリンや、シクロデキストリンや、可溶性デンプンや、ヒドロキシエチルデンプンや、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩などの単糖、二糖及び多糖、並びに水溶性グルカンが挙げられる。いくつかの実施形態において、スクロースが用いられてもよい。好適な糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラシチトール、ズルシトール、キシリトール及びアラビトールを含めたヒドロキシル化C<sub>4</sub>~C<sub>8</sub>炭化水素が挙げられる。いくつかの実施形態において、マンニトールが用いられてもよい。上述の糖又は糖アルコールは、個別に使用されても、組み合わせで使用されてもよい。使用される等張化剤の量は、液体製剤に可溶性であり、等張を確立し、且つ、組成物の安定性に逆効果でない限り、決められた制限はない。最終的な液状組成物中の等張化剤(例えば、糖又は糖アルコール)の濃度は、例えば、約1mg/ml~約150mg/ml、例えば、1mg/ml~50mg/mlなどであり得る。特定の実施形態において、濃度は、1mg/ml~7mg/ml、又は8mg/ml~24mg/ml、又は25mg/ml~50mg/mlであり得る。医薬組成物における等張化剤の使用は、当業者にとって周知である。これに関連して、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995を引用することができる。

【0071】

本発明の医薬組成物の更なる実施形態において、組成物はキレート剤を含む。関連するキレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、クエン酸及びアスパラギン酸の塩、並びにその混合物が挙げられる。キレート剤は、最終的な液状組成物中に0.1

10

20

30

40

50

mg/ml ~ 5 mg/ml、例えば、0.1 mg/ml ~ 2 mg/ml 又は 2 mg/ml ~ 5 mg/ml などの濃度で適切に存在し得る。医薬組成物におけるキレート剤の使用は、当業者にとって周知のことである。これに関連して、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995を引用することができる。

【0072】

本発明の医薬組成物の更なる実施形態において、組成物は安定化剤を含む。医薬組成物における安定化剤の使用は、当業者にとって周知であり、そして、これに関連して、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995を引用することができる。本発明の特に有用な医薬組成物は、別の方法では液状媒質状態での保存中に凝集体形成を呈することもある本発明の化合物（例えば、本発明のペプチド）を含む処置的な活性成分を含む安定した液状組成物である。このような関係において、「凝集体形成」とは、溶液から目に見える沈殿をいくらか生じるより大きな集合体の形成を結果的にもたらずペプチド分子の間の物理的相互作用を指す。本明細書中に使用される「液状媒質状態での保存中」とは、調製された時点で、かならずしもすぐに対象に投与されるというわけではない液状組成物の保存を指す。代わりに、調製に続いて、それは、液状形態、凍結状態、又は液状形態若しくは対象への投与に好適な他の形態へのその後の再構成のための乾燥形態での保存のために包装されてもよい。本明細書中に使用される「乾燥形態」とは、フリーズドライ（すなわち、凍結乾燥）、スプレードライ又は風乾のいずれかによって乾かされた最初は液状であった医薬組成物又は製剤を指す。その液状医薬組成物の保存中のペプチドによる凝集体形成は、問題のペプチドの生物学的活性に悪影響を与え、そして、医薬組成物の処置効率の損失をもたらす。さらに、そのようなペプチド含有医薬組成物が点滴システムを使用して投与される場合には、凝集体形成は、配管、膜又はポンプの詰まりなどの他の問題を引き起こすこともある。よって、本発明のペプチドは、これらの問題を克服するのに有益であってもよい。

【0073】

本発明の医薬組成物中に組み込むのに適当な安定化剤の例としては、これだけに限定されるものではないが、次の：それらの遊離塩基形態又は塩形態のアミノ酸、例えば、アルギニン、リジン、アスパラギン酸又はグルタミン酸などの荷電側鎖を担持するアミノ酸、又は例えば、グリシン又はメチオニン（メチオニンの取り込みが、そのような酸化の影響を受けやすい少なくとも1つのメチオニン残基を含むペプチド内のメチオニン残基の酸化をさらに阻害し得るという点において）などのアミノ酸；特定の重合体（例えば、ポリエチレングリコール（PEG 3350など）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン（PVP）及びカルボキシノヒドロキシセルロース、並びにその誘導体）；シクロデキストリン；硫黄含有物質（例えば、モノチオグリセロール、チオグリコール酸及び2-メチルチオエタノールなど）；そして、界面活性剤（Poloxamer 又は Polysorbate (Tween) タイプの非イオン性界面活性剤を含めた非イオン性界面活性剤など）が挙げられる。医薬組成物における界面活性剤の使用は、当業者にとって周知である。これに関連して、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> edition, 1995を引用することができる。

【0074】

追加タイプの成分もまた、本発明の医薬組成物中に存在していてもよい。そのような成分のクラスの制限されることのない例としては、湿潤剤、乳化剤、抗酸化剤、増量剤、油性ビヒクル及びタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン又はゼラチン）が挙げられる。

本発明の医薬組成物は、様々な部位にそのような処置を必要としている患者に投与してもよい。例えば、吸収をバイパスする部位、例えば、動脈、静脈又は心臓、且つ、吸収を伴う部位、例えば、皮膚、皮下、筋肉又は腹部への投与で投与することができる。より一般的には、本発明による医薬組成物の投与は、さまざまな投与経路、例えば、非経口、上皮、真皮又は経皮経路によるものであってもよい。いくつかの実施形態において、例えば、舌、舌下、頬側、経口、腔、又は直腸などの他の経路が有用であり得る。

【0075】

本発明の組成物は、例えば、溶液、懸濁液又は乳濁液などの様々な剤形で投与されてもよく、そしてそれは、制御放出、持続放出、長期放出、遅延放出、又は徐放薬物送達システムの製剤で有用である。排他的ではなく、より詳しく述べると、本発明の医薬組成物は、当業者にとって周知である非経口制御放出及び持続放出システムに関して有用である。これに関連して、Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed., Marcel Dekker, New York, 2000) and Drugs and the Pharmaceutical Sciences vol. 99 : Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed., Marcel Dekker, New York, 2000)が一般的に参照される。

#### 【0076】

(本発明の液状医薬組成物の)非経口投与は、シリンジ、場合によってペン型シリンジを用いて、例えば、皮下、筋肉内、腹腔内、又は静脈内注射によっておこなわれてもよい。あるいは、非経口適用は、例えば、対象又は患者によって持ち運ばれ、且つ、本発明の液状組成物の入ったリザーバと対象若しくは患者への組成物の送出/投与のための注入ポンプを含むデバイス又はシステムの形態で注入ポンプによって、或いは対象又は患者の体内への埋め込みに好適な対応する小型化デバイスの形態でおこなうことができる。

#### 【0077】

本明細書中で用いられる「安定化された組成物」という用語は、高い物理的安定性、高い化学的安定性又は高い物理的及び化学的安定性を有する組成物を指す。「物理的安定性」という用語は、本明細書中で使用される場合、例えば、ペプチドをストレス、及び/又は不安定化性界面や表面、例えば、疎水性表面や界面などとの相互作用にさらした結果として、ペプチド(例えば、本発明の化合物)の可溶性又は不溶性凝集体を形成する傾向の指標を指す。水性ペプチド組成物の物理的安定性は、様々な期間、異なった温度にて好適なコンテナ(例えば、カートリッジ又はバイアル)内に充填した組成物を機械的/物理的ストレス(例えば、攪拌)に晒した後に、目視検査及び/又は混濁度測定によって評価され得る。組成物は、それが視覚的混濁度を呈するとき、ペプチド凝集に関して物理的に不安定であると分類され得る。あるいは、組成物の懸濁度は、当業者に周知の簡単な混濁度測定で評価できる。水性ペプチド組成物の物理的安定性はまた、ペプチドの立体配座状態の分光プローブとして機能する作用物質を使用することによって評価することもできる。プローブは好ましくは、ペプチドの非天然配座異性体に優先的に結合する小分子である。そのような小分子分光プローブの一例は、チオフラビンTである。チオフラビンTは、アミロイドフィブリルを検出するために広く使用されている蛍光色素である。フィブリル及び、もしかすると他のペプチド立体配置が存在する場合には、ペプチドのフィブリル形態に結合すると、チオフラビンTは、約450nmで新たな励起最大及び約482nmで強い放出を生じる。未結合のチオフラビンTは、問題の波長では本質的に非蛍光である。

#### 【0078】

「化学的安定性」という用語は、本明細書中で使用される場合、天然ペプチド構造と比較した場合に、潜在的な生物学的効果の低下及び/又は潜在的な免疫原性の増大を有する化学的分解産物の形成をもたらすペプチド構造における化学的共有結合変化に関するペプチドの安定性を指す。様々な化学的分解産物が、天然ペプチドのタイプ及び詳細な性質、並びにペプチドが晒されている環境によって形成され得る。一般的に、ペプチド組成物の化学的分解の排除は、完全に避けられないことが多く、化学的分解産物の形成量の増大は、当業者に周知のとおり、そのような組成物の保存及び使用中に見られることが多い。多くのペプチドは、グルタミンル又はアスパラギンル残基中の側鎖アミド基が加水分解されて遊離カルボン酸を形成する分解過程を受けやすい。他の分解経路は、2個以上のペプチド分子がアミド基転移化、及び/又はジスルフィド相互作用を介して互いに共有結合して共有結合オリゴマー及びポリマー分解産物の形成をもたらしている高分子量変態生成物の形成を伴う(例えば、Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T.J. and Manning M.C., Plenum Press, New York 1992を参照)。(例えば、メチオニン残基の)酸化は、ペプチドの化学的分解の別の形態である。ペプチド組成物の化学的安定性は、様々な環境条件にさらした後の様々な時点で化学的分解産物の量を測定することによって評価でき

10

20

30

40

50

る（例えば、分解形成物の形成は、温度を上げることによって促進できることが多い）。個々の分解産物のそれぞれの量は、様々なクロマトグラフィー技術（例えば、SEC HPLC及び/又はRP HPLC）を使用して、分子サイズ及び/又は荷電に基づいて分解産物を分離することによって決定できる。

【0079】

低pHにおけるグルカゴン自体の化学的不安定性は、主として、アスパラギン酸残基の異性化及び開裂、グルタミン残基の脱アミド及びメチオニンの酸化によるものである。概して、Asn及びGlnの脱アミドは、それぞれL AspとL isoAsp又はL GluとL isoGluを生じるように開くことができる環状イミド環の中間体を介して、高pH条件下で起こり、pH7.4付近の生理的pHにおいて顕著な速度で起こる。環状イミド環の中間体もまた、環状イミドの遅いラセミ化を示す、対応するD 異性体の少量の形成につながり得る。

10

【0080】

生理的pHより低いpH値では、Asn及びGlnの脱アミド速度は低下するが、Asp及びGluからの環状イミドの形成と、それによる異性化の速度はpHとともに増強される。環状イミド形成は、pH4～pH6で最も多い。環状イミド中間体の形成もまた、ペプチド配列の開裂を結果的にもたらしすることができる。

従って、先に概説したように、「安定化組成物」は、高い物理的安定性、高い化学的安定性、又は高い物理的及び化学的安定性を有する組成物を指すことができる。一般に、指定された有効期限に達するまでは、使用及び保存（推奨されている使用及び保存条件に従って）の間に、組成物は少なくとも安定でなければならない。

20

【0081】

本発明の医薬組成物（例えば、液状組成物）の特定の実施形態において、組成物は、少なくとも2週間の使用、及び少なくとも6カ月の保存にわたって安定である。更なる実施形態において、組成物は、少なくとも2週間の使用、及び少なくとも1年間の保存にわたって安定である。より一層更なる実施形態において、組成物は、少なくとも2週間の使用、及び少なくとも2年間の保存にわたって安定である。他の実施形態において、組成物は、少なくとも4週間の使用、及び少なくとも2年間の保存にわたって、又は少なくとも4週間の使用、及び3年間超の保存にわたってさえ安定である。本発明のかかる医薬組成物の特に有用な実施形態は、少なくとも6週間の使用、及び少なくとも3年間の保存にわたって安定である。この点に関して、この段落の目的に関する「使用」という用語は、処置目的で組成物を利用することを目的として医薬組成物を保存から取り出し、その結果その医薬組成物を異なった周囲条件（明、暗、温度、攪拌などの条件）にさらすことを指し、それに対して、この段落の目的に関する「保存」という用語は、約5を超えない温度にて冷蔵庫又は冷凍庫内の非攪拌条件下での保存を指す。当業者であれば、これらの医薬組成物がさらされ得る使用及び保存条件の一般的な範疇を理解するであろう。

30

【0082】

核酸、発現ベクター及び宿主細胞

本発明は、本発明の化合物又は本発明の化合物のペプチド配列Zをコードする核酸分子（例えば、単離された核酸分子）を提供する。

40

当然のことながら、本発明の化合物又はペプチド配列Zは、そのペプチド配列Zが天然に存在するアミノ酸、すなわち、哺乳類タンパク質に天然に生じる20個のアミノ酸だけしか含まないとき、典型的には、核酸配列によってのみコードされ得る。

【0083】

先に述べたように、本発明は、とりわけ、本発明の核酸構築物配列を、その発現に向けられた1以上の配列と任意に組み合わせて含む発現ベクター、並びに本発明の発現ベクターを含む宿主細胞に関する。好ましくは、宿主細胞は、本発明の化合物又は本発明の化合物のペプチド配列Zを有する化合物を発現し、そして、分泌できる。いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の化合物を製造する方法を提供するが、その方法は、かかる化合物を発現するのに好適な条件下で本発明の宿主細胞を培養し、そして、これにより生

50

じる化合物を精製することを含む。あるいは、前記方法は、本発明の化合物のペプチド配列 Z を有する化合物を発現し、それに続いて N 及び / 又は C 末端を改変して、本発明の化合物を得ることを含んでもよい。本発明は、( i ) 本発明の核酸、( i i ) 本発明の発現ベクター、及び ( i i i ) 医療的処置方法における使用のために本発明の化合物を発現し、そして、任意に分泌できる宿主細胞をさらに提供する。核酸、発現ベクター及び宿主細胞は、本発明の化合物を用いてそれら自体が処置され得る、本明細書中に記載したあらゆる疾患の処置に使用され得る。そのため、本発明の化合物を含む医薬組成物、本発明の化合物の投与、又はそのあらゆる処置用途に対する言及は、文脈が別段の要求をする場合を除いて、本発明の核酸、発現ベクター又は宿主細胞の同等な使用を包含すると解釈されるものとする。

10

**【 0 0 8 4 】**

## ペプチド合成

本願発明のペプチドは、標準的な化学的合成方法、遺伝子組み換え発現系の使用、又はその他の好適な最先端の方法によって製造され得る。よって、グルカゴン類似体は、以下の：

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

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

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

20

を含む方法、あるいは、ペプチドの断片を得るための ( a )、( b )、及び ( c ) の方法のいずれかの組み合わせを利用し、それに続いて断片をつなぎ合わせて (例えば、連結して) 完全なペプチドを得、そしてそのペプチドを回収すること、を含めた多くのやり方で合成され得る。

**【 0 0 8 5 】**

固相又は液相ペプチド合成を用いて本発明の化合物を合成することが好まれ、そしてその方法論は、ペプチド合成の当業者にとって周知である。これに関連して、W O 9 8 / 1 1 1 2 5、並びに Fields, G.B. et al., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". In: Synthetic Peptides (2nd Edition) 及びそこに提供された実施例を引用することができる。

30

**【 0 0 8 6 】**

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

40

**【 0 0 8 7 】**

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

50

## 【 0 0 8 8 】

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

## 【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態において、本発明の形質転換細胞は、微生物、例えば細菌(例えばエシェリキア(*Escherichia*)属(例えばE. コリ(*E. coli*))、バチルス(*Bacillus*)属(例えばB. ズブチリス(*B. subtilis*))、サルモネラ(*Salmonella*)属、若しくはマイコバクテリウム(*Mycobacterium*)属(好ましくは非病原性のもの、例えばM. ボビス(*M. bovis*) B C G)の種)、酵母(例えばサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)若しくはピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)など)、或いは原虫などである。あるいは、形質転換細胞は、多細胞生物に由来することもある、例えば、その細胞は、真菌細胞、昆虫細胞、藻類細胞、植物細胞、又は動物細胞、例えば哺乳動物細胞などであってもよい。クローニング及び/又は最適化された発現を目的として、形質転換細胞は、本発明の核酸構築物を複製することができる。核酸構築物を発現する細胞は、本発明の有用な実施形態であり、本発明のペプチドの小規模又は大規模な調製のために使用できる。

10

## 【 0 0 9 0 】

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

20

## 【 0 0 9 1 】

有効性

本発明の化合物は、グルカゴンアゴニスト活性を有する。

グルカゴン(Glu又はGCG)受容体への関連化合物の結合を、アゴニスト活性の指標として使用できる。代替の実施形態において、受容体へのかかる化合物の結合によって引き起こされる細胞内シグナル伝達を計測する生物学的アッセイもまた使用され得る。例えば、グルカゴン受容体作動薬によるグルカゴン受容体の活性化は、細胞サイクリックAMP(cAMP)形成を刺激する。よって、前記受容体を発現している好適な細胞におけるcAMPの産生は、受容体活性を観察するのに使用できる。

30

## 【 0 0 9 2 】

当業者は好適なアッセイ形式を認識し、そして実施例が以下に提供されている。例えば、アッセイには、一次受入番号GI: 4503947(NP\_\_000151.1)又は一次受入番号P47871を有するヒトグルカゴン受容体(GCGR)を利用することもできる。当業者は、前駆タンパク質の配列に関する場合には、シグナル配列を欠いた成熟タンパク質を使用してアッセイがおこなわれ得ることを、これに関連して理解する。好適な細胞は、一般的に哺乳動物細胞、例えば、齧歯動物又は霊長類細胞、例えば、ラット、マウス、ハムスター細胞、又は、例えばHEK293細胞などのヒト細胞である。それらは、その内因性グルカゴン受容体を発現しても、(例えば、上述したヒト配列を有する)グルカゴン受容体を発現するように操作されていてもよかった。アッセイは、実施例3の材料を使用し、且つ、実施例3で設定した条件下でおこなわれてもよい。

40

## 【 0 0 9 3 】

所定の受容体における作動薬の効力の数的評価基準としてEC<sub>50</sub>値が使用されることもあり、そして、EC<sub>50</sub>値は、特定のアッセイにおいて、問題の受容体に対するその化合物の最大活性の半分を達成するのに必要とされる化合物の濃度の評価基準である。

## 【 0 0 9 4 】

処置用途

化合物(及び医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物)、並びに本発明の医薬組成物は、さまざまな病態又は疾患の処置又は予防に有効であり得る。任意に、化合物(及び医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物)は、1若しくは複数の追加の処置的に

50

活性な物質と組み合わせ使用されてもよい。これにより、関連する処置用途としては：低血糖（急性と慢性の両方）、2型糖尿病（2型糖尿病における疾病進行を含む）、耐糖能異常、1型糖尿病、肥満（太り過ぎ又は肥満に関連する疾患又は状態を含む）、冠動脈性心疾患、アテローム性動脈硬化症、高血圧、脂質異常症、脂肪肝、ブロッカー中毒、インスリノーマ及びVon Gierkes病の処置又は予防；対象が太り過ぎになるのを予防；体重の減少；食物摂取の削減；エネルギー消費量の増大；耐糖能異常（IGT）から2型糖尿病への進行の遅延；2型糖尿病からインスリンを必要とする糖尿病への進行の遅延；食欲の調整又は満腹感の誘発（病的飢餓の処置及び過食症の処置を含む）；並びに成功している減量後の体重のリバウンドの予防が挙げられる。一般的原理のとおり、本発明の化合物（及び医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物）、並びに本発明の医薬組成物は、血糖値を制御するのに有用であり得る。

10

## 【0095】

本発明に従って処置又は予防ができる低血糖の形態の中に、糖尿病性低血糖（急性インスリン誘発性低血糖を含む）、非糖尿病性低血糖、反応性低血糖、空腹時低血糖、薬物誘発性低血糖、アルコール誘発性低血糖、胃バイパス誘発性低血糖及び妊娠中に生じる低血糖が存在する。

本発明の化合物（及び医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物）、並びに本発明の医薬組成物の追加の適用としては、例えば腹部の造影などの撮像法（例えば、X線、コンピュータ断層撮影（CT）又は磁気共鳴（MR）造影）に関する平滑筋弛緩薬（鎮痙剤）としての使用が挙げられる。

20

## 【0096】

## 併用療法

先に既に示したとおり、本発明による化合物（又は医薬的に許容され得るその塩若しくは溶媒和物）を用いた処置は、他の1若しくは複数の薬理的活性物質又は作用物質、例えば抗糖尿病薬、抗肥満薬、食欲抑制薬、抗高血圧症薬、糖尿病から生じているか、又は糖尿病に関連している合併症を治療及び/又は予防するための薬剤ならびに肥満から生じているか、又は肥満に関連している合併症及び障害を治療及び/又は予防するための薬剤から選択される第2か、又はそれ以上の薬理学的活性物質と組み合わせ実施され得る。本内容では、「抗糖尿病薬」という表現には、インスリン耐性及び疾患を治療及び/又は予防するための化合物が包含され、ここで、インスリン耐性は病態生理学的機構である。

30

## 【0097】

そのような薬理学的活性物質の例は、インスリン及びインスリン類似体、GLP-1アゴニスト、スルホニル尿素（例えばトルブタミド、グリベンクラミド、グリピジド及びグリクラジド）、ピグアニド、例えばメトホルミン、メグリチニド、グルコシダーゼ阻害薬（例えばアコルボース（acorbose））、グルカゴンアンタゴニスト、ジペプチジルペプチダーゼ-IV（DPP-IV）阻害薬、グルコース新生及び/又はグリコーゲン分解の刺激に参与している肝酵素の阻害薬、グルコース取り込み調節薬、トログリタゾン及びシグリタゾンなどのチアゾリジンジオン、抗高脂血症薬などの脂質代謝を調節する化合物（例えば、HMG Co A阻害薬（スタチン））、食物摂取量を低下させる化合物、RXRアゴニスト及び細胞のATP-依存性カリウムチャンネルに作用する薬剤、例えばグリベンクラミド、グリピジド、グリクラジド及びレパグリニド；コレステラミン、コレステポール、クロフィブラート、ゲムフィブロジル、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、プロブコール、デキストロサイロキシニン、ネテグリニド（neteglinide）；レパグリニド；アルプレノロール、アテノロール、チモロール、ピンドロール、プロプラノロール及びメトプロロールなどの遮断薬、ベナゼプリル（benazepril）、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル（fosinopril）、リシノプリル、アラトリオプリル（alatriopril）、キナプリル及びラミプリル（ramipril）などのACE（アンジオテンシン転換酵素）阻害薬、ニフェジピン、フェロジピン、ニカルジピン、イスラジピン、ニモジピン、ジルチアゼム及びベラパミルなどのカルシウムチャンネル遮断薬ならびにドキサゾシン、ウラピジル、プラゾシン及びテラゾシンなどの遮断薬；CART（コカインアンフェタミ

40

50

ン規制されたトランスクリプト)アゴニスト、NPY(ニューロペプチドY)アンタゴニスト、MC4(メラノコルチン4)アゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、TNF(腫瘍壊死因子)アゴニスト、CRF(コルチコトロピン放出因子)アゴニスト、CRFBP(コルチコトロピン放出因子結合タンパク質)アンタゴニスト、ウロコルチン(urocortin)アゴニスト、 $\alpha$ -MSH(メラノサイト刺激ホルモン)アゴニスト、MCH(メラノサイト-濃縮ホルモン)アンタゴニスト、CCK(コレシストキニン)アゴニスト、セロトニン再取り込み阻害薬、セロトニン及びノルアドレナリン再取り込み阻害薬、混合セロトニン及びノルアドレナリン作動性化合物、5HT(セロトニン)アゴニスト、ボンベシニアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、成長ホルモン、成長ホルモン放出化合物、TRH(チレオトロピン放出ホルモン)アゴニスト、UCP2又は3(未結合タンパク質2又は3)調節薬、レプチンアゴニスト、DAアゴニスト(例えばプロモクリプチン、ドブレキシン(doprexin))、リパーゼ/アミラーゼ阻害薬、RXR(レチノイドX受容体)調節薬、TR $\alpha$ アゴニスト、並びにヒスタミンH3アンタゴニストである。

10

#### 【0098】

(単数若しくは複数の)本発明による化合物と、1又は複数の上述の化合物及び場合によって1又は複数のさらなる薬理的活性物質との任意の適切な組み合わせは、本発明の範囲内にある。

#### 【実施例】

#### 【0099】

##### 実験方法

以下で用いた略語は、以下のとおりである：

COMU：1 [(1 (シアノ 2 エトキシ 2 オキソエチリデンアミノオキシ)ジメチルアミノ モルホリノメチレン)]メタンアミニウムヘキサフルオロホスファート

DCM：ジクロロメタン

DMF：N,Nジメチルホルムアミド

DIPEA：ジイソプロピルエチルアミン

EtOH：エタノール

Et<sub>2</sub>O：ジエチルエーテル

HATU：N [(ジメチルアミノ) 1H 1,2,3 トリアゾール[4,5 b]ピリジン 1 イルメチレン] NメチルメタンアミニウムヘキサフルオロホスファートNオキシド

HPLC：高速液体クロマトグラフィー

IBMX：3 イソブチル 1 メチルキサンチン

MeCN：アセトニトリル

MS：質量分析法

PBS：リン酸緩衝食塩水

RP：逆相

TFA：トリフルオロ酢酸

TIS：トリイソプロピルシラン

#### 【0100】

##### グルカゴン類似体の一般的な合成手順

固相ペプチド合成(SPPS)を、ポリスチレン樹脂(TentaGel S Ram又はTentagel S PHB-Thr(tBu))上のDMFにおいて標準的なFmoc戦略を使用したマイクロ波支援合成装置により実施した。塩基としてのDIPEAと一緒に、HATU又はCOMUをカップリング剤として使用した。ペピリジン(DMF中に20%)を脱保護のために使用した。擬プロリン：Fmoc Phe Thr(、Me、Me pro) OH、Fmoc Asp Ser(、Me、Me pro) OH及びFmoc Glu Ser(、Me、Me pro) OH(NovaBiochemから購入)を適切な場所で使用した

40

50

。ヒトグルカゴンを、本明細書中に記載した合成方法及び精製手順を使用して、同様に合成及び精製した。

#### 【0101】

切り出し：

未精製ペプチドを、95/2.5/2.5% (v/v) のTFA/TIS/水を用いて室温にて2時間処理することによって樹脂から切り出した。TFAの大部分を減圧下で取り除き、未精製ペプチドを沈殿させ、ジエチルエーテルで洗浄し、そして周囲温度にて乾燥させた。

#### 【0102】

ペプチド精製

未精製のペプチドを、緩衝液A (0.1%の含水TFA) と緩衝液B (0.1%のTFAと90%のMeCNを含む水溶液) のグラジエントを用いた標準的なRP HPLCによって精製した。画分を、分析用HPLCとMSによって分析し、そして、関連画分を、貯留し、そして、凍結乾燥した。

そのペプチドを、調製用RP HPLCによって緩衝液A' (0.1%の含水ギ酸) と緩衝液B' (0.1%のギ酸と90%のMeCNを含む水溶液) のグラジエントを使用することでさらに精製した。TFAを、凍結乾燥前に採取した画分に加えた。最終生成物を、分析用HPLCとMSによって特徴づけした。

#### 【0103】

分析用HPLC

ペプチドを、緩衝液A' (上記を参照) と緩衝液B' (上記を参照) のグラジエントを使用して分析用HPLC法によって分析した。

#### 【0104】

実施例1

化合物7の合成

化合物7 (配列番号8) を、Tentagel S PHB Thr (tBu) 樹脂 (1.13 g、0.24 mmol/g)、カップリング試薬としてCOMU、溶媒としてDMF及び上で記載したFmoc化学物質を使用したCEM Liberty Peptide Synthesizerにより合成した。擬プロリン：Fmoc Phe Thr (、Me、Me pro) OH (6/7位に)、及びFmoc Asp Ser (、Me、Me pro) OH (15/16位に) を、配列内に使用した。

#### 【0105】

前記ペプチドを、上記のように樹脂から切り出し、そして、精製を、35 ml/分の流速の緩衝液A (上記を参照) と緩衝液B (上記を参照) の混合物を用いたGemini NXカラム (5 cm、C18、10ミクロン) により実施した。生成物を、47分にわたる20%から50%への緩衝液Bのリニアグラジエントを用いて溶出し、そして、関連画分を分析用HPLCとMSによって分析した。貯留した画分を、凍結乾燥し、そして、水中に再溶解し、その後、10 ml/分の流量の緩衝液A' (上記を参照) と緩衝液B' (上記を参照) の混合物を用いたGemini NXカラム (2.12 x 25 cm、C18 (110A) ; 10ミクロン) による更なる精製に供した。生成物を、47分にわたる5%から40%への緩衝液B' のリニアグラジエントを用いて溶出し、そして、関連画分を分析用HPLCとMSによって分析した。TFAを貯留した画分に加え、そして、それらを凍結乾燥して、112 mgとなった。純度は、分析用HPLCで測定したように99% (上記を参照) であり、そして、モノアイソトピック質量は、MSによって測定したように3409.55 Daであった (計算値3409.58 Da)。

#### 【0106】

実施例2

ヒトグルカゴン受容体を発現する細胞株の作出

ヒトグルカゴン受容体 (グルカゴンR) (一次受入番号P47871) をコードするcDNAを、cDNAクローンBC104854 (MGC: 132514 / IMAGE: 8

10

20

30

40

50

143857) からクローン化した。グルカゴンRをコードするDNAを、サブクローニングのために末端の制限部位をコードするプライマーを使用してPCRによって増幅した。5'末端プライマーは、効果的な翻訳を確実にするために近コザック・コンセンサス配列をさらにコードした。グルカゴンRをコードするDNAの忠実度を、DNA配列決定法によって確認した。グルカゴンRをコードするPCR産物を、ネオマイシン(G418)耐性マーカーを含んでいる哺乳動物発現ベクター内にサブクローニングした。グルカゴンRをコードする哺乳動物発現ベクターを、標準的なリン酸カルシウムトランスフェクション法によってHEK293細胞内にトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後に、限界希釈クローニングのために細胞を播種し、培地中の1mg/mlのG418を用いて選択した。3週間後に、グルカゴンRを発現する細胞の12個の生き残ったコロニーを採取し、増殖させ、以下で記載するとおりグルカゴンR有効性アッセイにおいて試験した。化合物プロファイリングのために、1つのグルカゴンR発現クローンを選択した。

10

## 【0107】

## 実施例3

## グルカゴン受容体アッセイ

0.01%のポリ-L-リジンコートした96ウェルのマイクロタイタープレート内に1ウェルあたり60,000個の細胞の割合で、ヒトグルカゴンRを発現するHEK293細胞を播種し、100 $\mu$ lの成長培地中での培養において1日成長させる。グルカゴンRによるcAMPの誘導の分析のために、我々は、製造業者の取扱説明書に従ってPerkin Elmer製のAlphaScreenR cAMP Assay Kitを使用した。分析の日に、成長培地を取り除き、細胞を、IBMXを含む200mlの同梱のアッセイ緩衝液で1回洗浄した。漸増濃度の試験ペプチド、100mlのアッセイ緩衝液/IBMX中、37 $^{\circ}$ Cにて15分間、細胞をインキュベートした。次に、ペプチド/アッセイ緩衝液を取り除き、そして、細胞を、1ウェルあたり80mlの溶解緩衝液の添加、及び室温にて少なくとも10分間のインキュベーションによって溶解させた。それぞれのウェルから10mlの細胞溶解物を、384ウェルOptiPlateに移し、Donor及びAcceptorビーズと混ぜ、そして、室温にて1時間インキュベートした。cAMP含有量を、Envisionプレートリーダーにより計測した。EC<sub>50</sub>及び基準化合物(グルカゴン)と比較した相対的有效性を、コンピュータ支援曲線適合法によって推定した。

20

30

## 【0108】

## 実施例4

## 溶解性の評価

HClでpH2.5に調整した脱塩水中の試験ペプチドの原液(2mg/ml; 280nmにおける溶液の吸光度の計測によって決定し、そして、ペプチドの中のトリプトファンとチロシンの含有量に基づいた理論上の減衰係数を使用した)を調整し、アリコートをし、それぞれ100mMの酢酸緩衝液(pH4.0)と100mMのリン酸緩衝液(pH7.5)中に1:1に希釈し、標準的な平底、非殺菌96ウェルUV Microplate内に入れた。280及び325nmにおけるサンプル(単一試料、n=1)の吸光度を、周囲温度に予熱した吸光度ベースのプレートリーダーで計測した。1mg/mlのペプチド溶解性に関するにり吸光度基準は、(プレート中の8個の緩衝液サンプルの標準偏差の5~6倍である)325nm 0.02吸光度単位における吸光度であった。

40

## 【0109】

本発明の多数の化合物が、4~7.5、より詳しく述べると、pH4とpH5(例えば、酢酸緩衝液中)、並びにpH6、pH7及びpH7.5(例えば、リン酸緩衝液中)のpH範囲において1mg/mlの溶解性を呈する。

## 【0110】

## 実施例5

## 物理的安定性の評価

フィブリル形成の形をとる凝集を、アミロイド特異的な色素であるチオフラビンT(T

50

h T ) を使用して検出した。このチオフラビン T は、溶液中のフィブリルの存在を実証するために頻りに利用されている (例えば、Groenning, M., J. Chem. Biol. 3(1) (2010), pp. 1-18; Groenning et al., J. Struct. Biol. 158 (2007) pp. 358-369; and Levine, H., III, Protein Sci. 2 (1993) pp. 404-410 を参照)。すべての試験ペプチドを、HCl で pH 2.5 に調整した脱塩水中に周囲温度にて溶解した。1 mg/ml のペプチド、40 μ の ThT 及び 50 mM のリン酸緩衝液、pH 7.5 を含む溶液を、三連で 96 ウェル黒色蛍光プレート (透明な底部) に入れた。データは、40 にて 96 時間にわたり、それぞれ 300 秒間の自動混合 (攪拌) を先行させ、その後 10 分の一定の間隔で収集した。実験全体を繰り返したが、攪拌はしなかった。フィブリル形成の遅延時間 (時間単位) として表される物理的安定性は、初期の安定期と増殖期を表す 2 つの線形回帰の間の交点と定義された。

10

## 【0111】

## 実施例 6

## 化学的安定性の評価

50 mM の酢酸緩衝液 (pH 4.0) 及び 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) 中のそれぞれの試験ペプチドの原液 (1 mg/ml; 280 nm における溶液の吸光度の計測によって決定し、そして、ペプチドの中でトリプトファンとチロシンの含有量に基づいた理論上の減衰係数を使用した) をそれぞれ調製した。サンプルを、ガラスバイアルに入れて、40 でインキュベートした。そのサンプルを、アセトニトリル/トリフルオロ酢酸/水溶出系を使用したグラジエント溶出を使用して C18 カラムによる逆相 HPLC 法で

20

## 【0112】

最初に、純度を以下のとおり決定した：

純度 (面積%) = (メインピーク的面積 / すべてのピークの合計面積) × 100。

次に、以下のとおり、所定のペプチドの各 pH 値について、時間 0 (T = 0) の純度を 100 に設定することによって、純度を時点間で標準化した：

時間 t (T = t) における標準化面積% = [面積% (T = t) / 面積% (T = 0)] × 100。

*in vitro* における活性の結果 (EC<sub>50</sub> 値として表される) 及び溶解性の評価の結果は、表 1 (以下) にまとめられており、そして、物理的及び化学的安定性の評価の結果は、表 2 (以下) にまとめられている。表 2 の標準化した純度の値は、14 日間のインキュベーション後に決定した。

30

## 【0113】

## 実施例 7

## 急性グルコース放出

天然ヒトグルカゴン (20 nmol/kg の用量) のそれと比較して、正常血糖の雄 Sprague Dawley ラット (Taconic, Lille Skensved, Denmark, 9 ~ 10 週齢) の急性グルコース放出に対する本発明の化合物 14 (それぞれ 20 及び 60 nmol/kg 体重の用量) の効果を調査した。ラットは、投与の 5 時間前に絶食させた。動物 (n = 6 / 群) に、ピピクル (PBS, pH 7.4)、試験化合物又はグルカゴンを単回、皮下 (SC) 注射した。血液サンプルを、5 μl の毛細管を使用して、投与前 (t = 0) 及びその後 2 時間にわたって 15 分毎に尾静脈から採取した。安定したベースラインの血糖値を確実にするために、実験中は、動物を (hypnorm/dormicum の標準的な混合物用いて) 麻酔した。血糖濃度を、Biosen Glucose Analyser (EKF-diagnostic GmbH, Germany) を使用して測定した。データは、図 1 にまとめられている。

40

## 【0114】

## 実施例 8

## 薬物動態

マウス、ラット及びイヌにおける天然ヒトグルカゴンと本発明の代表的な化合物との比

50

較薬物動態学的評価をおこなった。2つの化合物は、例えば、半減期 ( $t_{1/2}$ ) や分布容量に関して、類似した薬物動力学特性を呈した。

【 0 1 1 5 】

【 表 1 】

表 1. 本発明の化合物に関するEC<sub>50</sub>及び溶解性のデータ

化合物番号	配列ID番号	GCG-R EC <sub>50</sub> in vitro [nM]#	pH7.5における 溶解性
グルカゴン	1	0.013	<1 mg/mL
1	2	0.064	≧1 mg/mL
2	3	0.18	≧1 mg/mL
3	4	0.030	≧1 mg/mL
4	5	0.34	≧1 mg/mL
5	6	0.17	≧1 mg/mL
6	7	1.0	≧1 mg/mL
7	8	0.93	≧1 mg/mL
8	9	0.38	≧1 mg/mL
9	10	0.030	≧1 mg/mL
10	11	0.32	≧1 mg/mL
11	12	0.11	≧1 mg/mL
12	13	0.030	≧1 mg/mL
13	14	0.070	≧1 mg/mL
14	15	0.15	≧1 mg/mL
15	16	0.030	≧1 mg/mL
16	17	0.39	≧1 mg/mL
17	18	0.029	≧1 mg/mL
18	19	0.026	≧1 mg/mL
19	20	0.054	≧1 mg/mL
20	21	0.24	≧1 mg/mL
21	22	0.0095	≧1 mg/mL
22	23	0.024	≧1 mg/mL
23	24	0.16	≧1 mg/mL
24	25	0.0078	≧1 mg/mL
25	26	0.0066	≧1 mg/mL
26	27	0.0069	≧1 mg/mL
27	28	0.063	≧1 mg/mL
28	29	0.035	≧1 mg/mL
29	30	0.023	≧1 mg/mL
30	31	0.016	≧1 mg/mL
31	32	0.0072	≧1 mg/mL
32	33	0.0093	≧1 mg/mL
33	34	0.044	≧1 mg/mL
34	35	0.028	≧1 mg/mL
35	36	0.014	≧1 mg/mL
36	37	0.010	≧1 mg/mL
37	38	0.094	≧1 mg/mL
38	39	0.0047	≧1 mg/mL
39	40	0.0044	≧1 mg/mL
40	40	0.0035	≧1 mg/mL
41	41	0.0038	≧1 mg/mL

#すべての値で、有効数字2桁を用いた

【 0 1 1 6 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. 本発明の化合物に関する物理的及び化学的安定性のデータ

化合物 番号	配列ID 番号	pH4.0における 標準化した純度、 14日後[%]	pH7.5における 標準化した純度、 14日後[%]	pH7.5における 物理的安定性 [時間：分] (攪拌なし)	pH7.5における 物理的安定性 [時間：分] (攪拌あり)
1	2	N/A	N/A	05:18±00:23	01:49±00:10
2	3	83.5	86.2	FND	FND
3	4	85.0	86.5	FND	72:50±06:16
4	5	80.5	84.6	FND	FND
5	6	91.8	89.6	FND	FND
8	9	実施せず	実施せず	85	57:02±0:43
9	10	実施せず	実施せず	開始時	53:20±05:46
10	11	実施せず	実施せず	FND	FND
11	12	78.6	89.9	FND	FND
12	13	86.8	90.8	FND	FND
13	14	84.6	88.8	FND	80:10±14:54
14	15	89.5	92.4	FND	FND
15	16	89.1	95.1	FND	FND
16	17	89.1	実施せず	12:57±00:02	実施せず
17	18	89.9	88.3	62±4	41:33±04:18
18	19	実施せず	実施せず	15:04±00:41	03:48±00:06
19	20	実施せず	実施せず	開始時	実施せず
20	21	実施せず	実施せず	FND	FND
21	22	89.8	93.5	FND	FND
22	23	91.1	95.3	FND	FND
23	24	実施せず	実施せず	FND	FND
24	25	92.8	94.4	FND	FND
25	26	93.8	89.8	FND	FND
26	27	90	93.9	FND	FND
27	28	実施せず	実施せず	46:20±04:43	18:00±04:00
28	29	実施せず	実施せず	08:33±00:05	02:20±00:17
29	30	91	91.6	FND	FND
30	31	88.6	91.4	FND	FND
31	32	93.1	91.7	FND	FND
32	33	91.2	96.3	FND	FND
33	34	実施せず	実施せず	実施せず	FND
34	35	実施せず	実施せず	実施せず	FND
35	36	実施せず	実施せず	実施せず	FND
36	37	実施せず	実施せず	実施せず	FND
37	38	実施せず	実施せず	実施せず	FND
38	39	実施せず	実施せず	実施せず	FND

\*FND=フィブリル化が検出されなかった

10

20

30

40

【 図 1 】

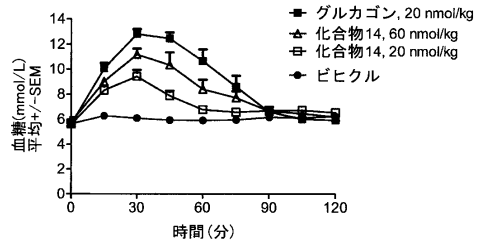


Fig. 1

【 配列表 】

0006534927000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
C 1 2 N 15/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
		C 1 2 N	15/16 Z N A

(31)優先権主張番号 PA201300360

(32)優先日 平成25年6月14日(2013.6.14)

(33)優先権主張国 デンマーク(DK)

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ディッテ リベール

デンマーク国, デーコー - 2 7 0 0 プレンスホイ, デグネモセ アレ 6 4

(72)発明者 リーセ ギーム

デンマーク国, デーコー - 2 0 0 0 , フレデリクスベルウ, フレデリクスバイ 2 0

審査官 佐藤 巖

(56)参考文献 特表2012-511900(JP, A)

特表2011-524418(JP, A)

国際公開第2011/117416(WO, A1)

国際公開第2013/098408(WO, A1)

特表2014-527975(JP, A)

特表2010-515686(JP, A)

国際公開第2011/117415(WO, A1)

特表2012-511901(JP, A)

国際公開第2011/163473(WO, A1)

特表2011-511753(JP, A)

CHABENNE, J.R. et al., J. Diabetes Sci. Technol., 2010年, Vol.4, No.6, pp.1322-1331

松山辰男, 四條暇学園大学 リハビリテーション学部紀要, 2011年, 第7号, pp.1-12

UNSON, C.G. et al., J. Biol. Chem., 1994年, Vol.269, No.17, pp.12548-12551

UNSON, C.G. et al., J. Biol. Chem., 1998年, Vol.273, No.17, pp.10308-10312

CHABENNE, J. et al., Mol. Metabol., 2014年 1月22日, Vol.3, pp.293-300

STURM, N.S. et al., J. Med. Chem., 1998年, Vol.41, pp.2693-2700

川島淳一ら, 日本内科学会雑誌, 1999年, 第88巻, 第2号, pp.336-338

pl計算結果1, Compute pl/Mw, ExpASy, 2017年 6月13日, Retrieved from the Internet, URL, <http://www.expasy.org>pl計算結果2, Compute pl/Mw, ExpASy, 2017年 6月13日, [retrieved on 2017-06-13], Retrieved from the Internet, URL, <http://www.expasy.org>

KRSTENANSKY, J.L., Int. J. Pept. Protein Res., 1988年, Vol.32, No.6, pp.468-475

SAPSE, A.-M. et al., Mol. Med., 2002年, Vol.8, No.5, pp.251-262

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 4 / 6 0 5

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

UniProt/GeneSeq

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)