(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)公開番号
特開2023-100722
(P2023-100722A)
(43)公開日　令和5年7月19日(2023.7.19)

| (51)国際特許分類 | | FI | | |
|---|---|---|---|---|
| *C07K* | *1/113(2006.01)* | C07K | 1/113 | ZNA |
| *C07K* | *5/08 (2006.01)* | C07K | 5/08 | |
| *C07K* | *5/10 (2006.01)* | C07K | 5/10 | |
| *C07K* | *7/00 (2006.01)* | C07K | 7/00 | |
| *C07K* | *14/00 (2006.01)* | C07K | 14/00 | |

審査請求　有　請求項の数　1　ＯＬ　（全121頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-69911(P2023-69911)
(22)出願日　令和5年4月21日(2023.4.21)
(62)分割の表示　特願2018-542998(P2018-542998)の分割
原出願日　平成28年10月28日(2016.10.28)
(31)優先権主張番号　62/247,493
(32)優先日　平成27年10月28日(2015.10.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71)出願人　503216502
タフツ ユニバーシティー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 メドフォード バロウ ホール
(71)出願人　518154457
タフツ メディカル センター
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１１１ ボストン ワシントン ストリート ８００
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　タンパク質分解安定性が改善された新規ポリペプチド並びにその調製方法及び使用方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ポリペプチドのタンパク質分解安定性を改善する方法及び化学修飾されたポリペプチドを提供する。
【解決手段】方法は、ポリペプチド内のＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ基、別の一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つにおけるアルキル化を含む。当該方法により化学修飾されたポリペプチドが、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、本質的に同じ生物活性を有し且つ／又はタンパク質分解に対してより耐性がある、化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物であって、前記ポリペプチドが、以下の化学修飾：
（ｉ）前記ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つが独立して、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$アリール、置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化されること；並びに
（ｉｉ）前記Ｎ末端アミノ基及び前記Ｎ末端第１内部アミド結合からなる群より選択される少なくとも１つのＮＨ基が、Ｘによって誘導体化されること（ここで、各Ｘは、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（ＣＲ$_2$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、－ＯＲ、アルコキシ、ＮＨ$_2$、置換されていてもよいＮＨ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及び置換されていてもよいＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より独立に選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキルから選択される）
のうちの少なくとも１つを有し、前記化学修飾されたポリペプチドが、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、本質的に同じ生物活性を有し且つ／又はタンパク質分解に対してより耐性がある、化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物。
【請求項２】
前記タンパク質分解が、アシルペプチドヒドロラーゼ、ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、ＤＰＰ８、ＤＰＰ９、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、Ｓ９Ｂファミリーオリゴプロピルペプチダーゼ、並びにＤＰＰ４及び／又はＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼからなる群より選択される少なくとも１つによって触媒される、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項３】
前記化学修飾されていないポリペプチドが、インクレチンを含む、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項４】
前記対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より高い血清中安定性を有する、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項５】
前記対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より長いインビボ半減期を有する、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項６】
前記対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より高い血液脳関門透過性又はより高い経口バイオアベイラビリティを有する、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項７】
（ｉ）において、前記ポリペプチドが、少なくとも１つの非置換Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル、非置換Ｃ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、非置換Ｃ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、非置換アリール、又は非置換Ｃ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化されている、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項８】
（ｉ）において、前記ポリペプチドの前記Ｎ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、及び／又はチオール基のうちの１つ又は複数が独立して、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_2$

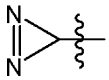
～Ｃ１６アルケニル、及び置換されていてもよいＣ２～Ｃ１６アルキニルからなる群より独立に選択される第１置換基及び第２置換基によって誘導体化されており、前記第１置換基及び前記第２置換基が独立して、同一であるか又は同一でない、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項９】

（ｉ）において、前記Ｎ末端アミノ基が、置換されていてもよいＣ１～Ｃ１６アルキル、置換されていてもよいＣ３～Ｃ１６シクロアルキル、置換されていてもよいＣ２～Ｃ１６アルケニル、及び置換されていてもよいＣ２～Ｃ１６アルキニルからなる群より独立に選択される第１置換基及び第２置換基によって誘導体化されており、前記第１置換基及び前記第２置換基が独立して、同一であるか又は同一でない、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項１０】

（ｉ）において、前記アルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が独立して、Ｃ１～Ｃ１６アルキル、Ｃ３～Ｃ１６シクロアルキル、Ｃ２～Ｃ１６アルケニル、Ｃ２～Ｃ１６アルキニル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、Ｃ１～Ｃ６アルコキシ、アジド、ジアジリル



、－ＣＨＯ、１，３－ジオキソール－２－イル、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）（Ｃ１～Ｃ６アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）２（Ｃ１～Ｃ６アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）２ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ１～Ｃ６アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）２からなる群より独立に選択される少なくとも１つによって置換されており、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又はＣ１～Ｃ１６アルキルである、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項１１】

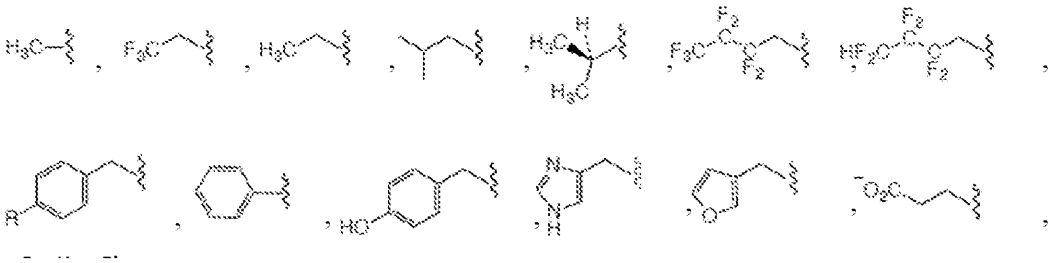
前記アルキル基が、ハロゲン化されたＣ１～Ｃ１６アルキルである、請求項１０に記載の化学修飾されたポリペプチド。

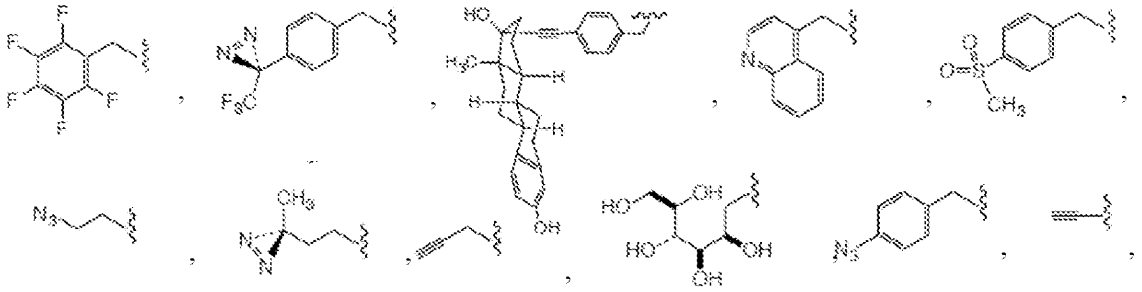
【請求項１２】

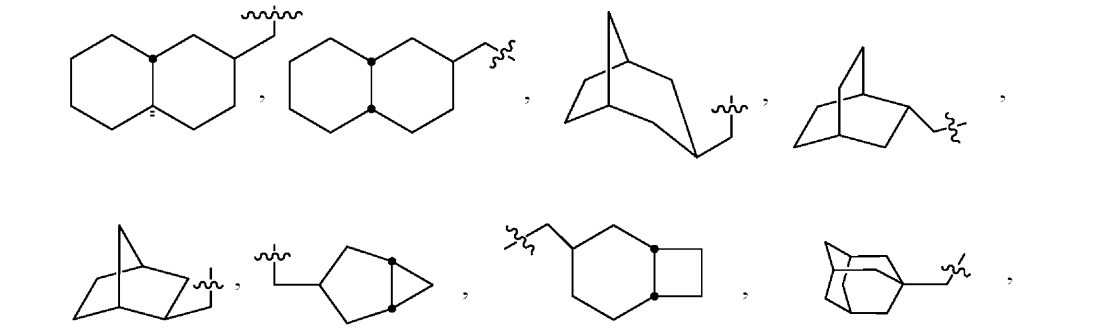
前記アルキル基が、２，２，２－トリフルオロエチルである、請求項１１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

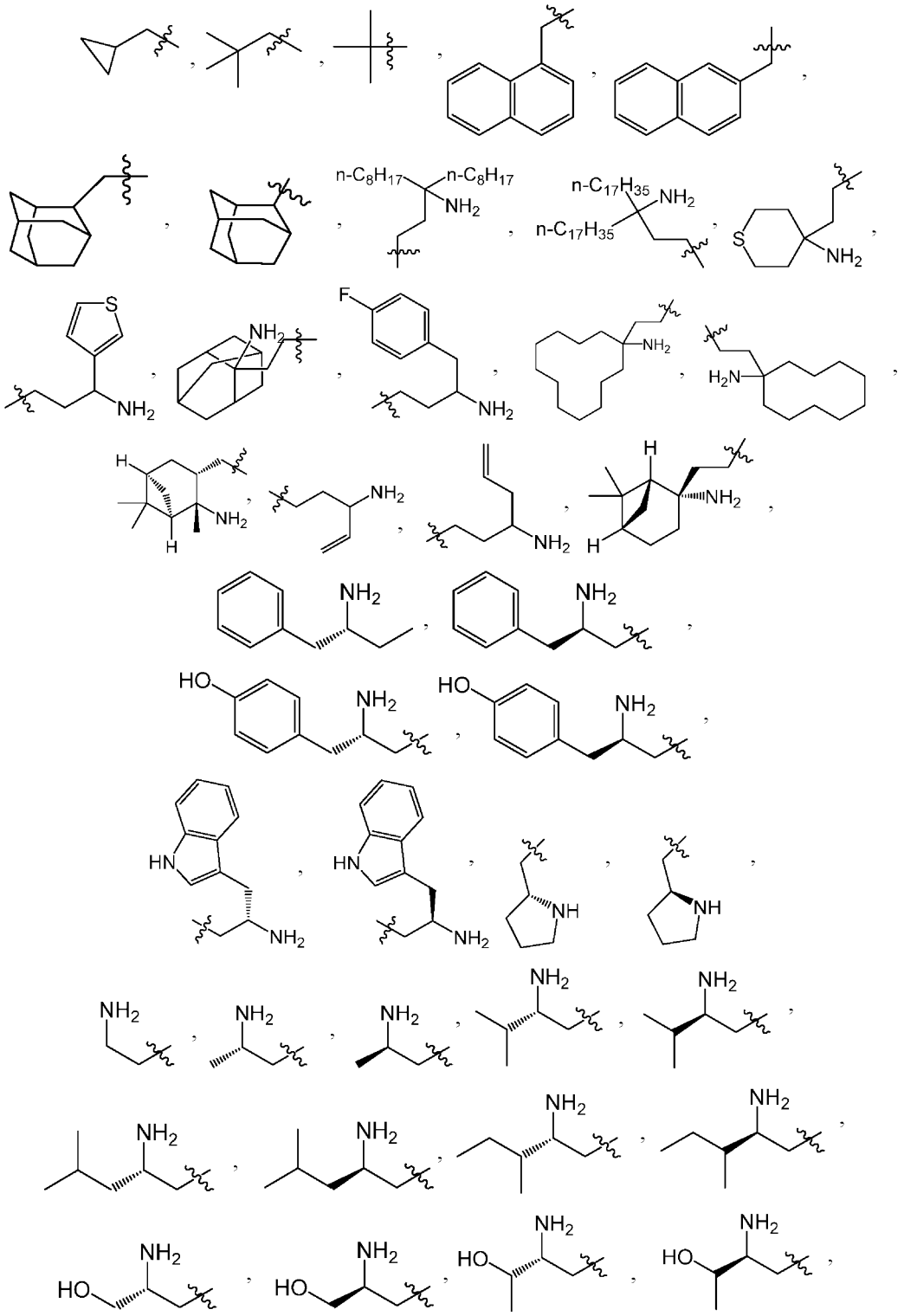
【請求項１３】

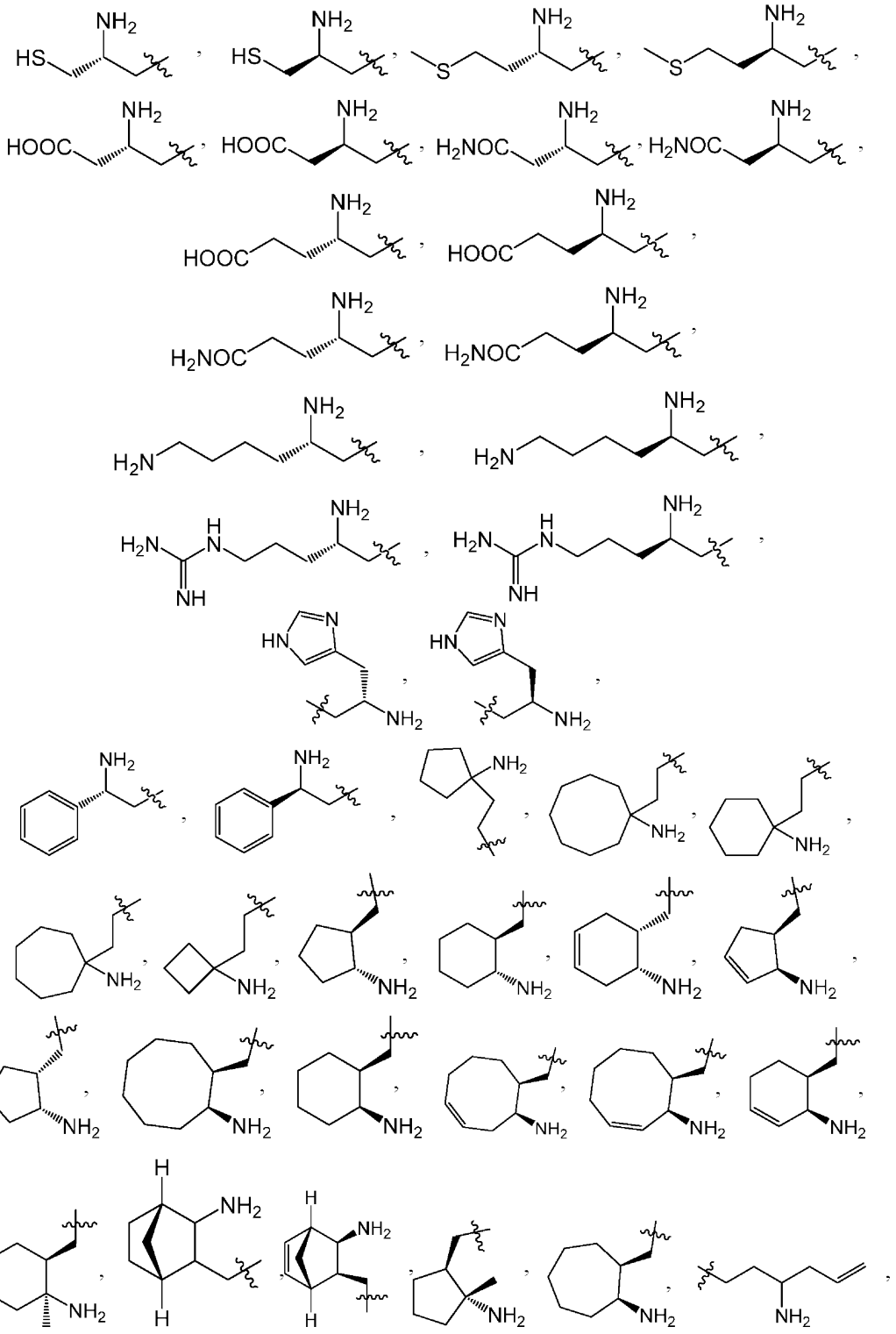
少なくとも１つのアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、又はアルキニル基が、

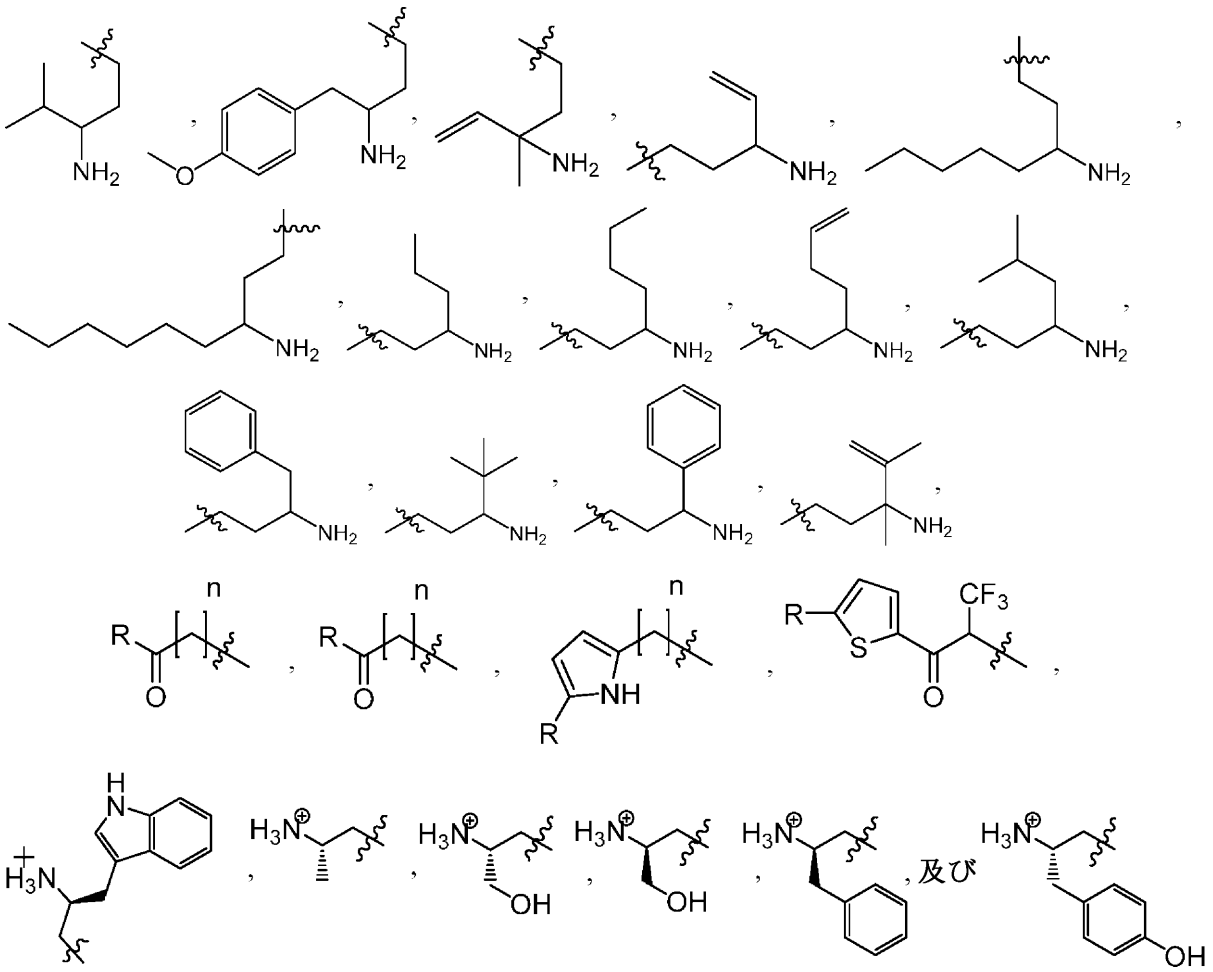







n-C8H17
n-C8H17
NH2
n-C17H35
NH2
n-C17H35
S
NH2
S
NH2
NH2
F
NH2
NH2
H2N
H
NH2
H
NH2
NH2
H
NH2
NH2
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HN
NH2
HN
NH2
NH
NH
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HO
NH2





（式中、ｎは、１～６の範囲の整数であり、且つＲは、水素又は置換されていてもよいアルキル若しくはアリールである）からなる群より選択される、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項１４】

少なくとも１つのアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が、２，２，２－トリフルオロ－１－エチル、２，２，３，３，３－ペンタフルオロ－１－プロピル、２，２，３，３，４，４，４－ヘプタフルオロ－１－ブチル、エチル、イソプロピル、ベンジル、置換されているベンジル、アダマンター１－イル－メチル、キノリン－４－イル－メチル、２－アミノ－１－プロピル、４－フェニル－ベンジル、１Ｈ－イミダゾール－４－イル－メチル、４－ヒドロキシ－ベンジル、４－［３－（トリフルオロメチル）－３Ｈ－ジアジリン］－ベンジル、及び（８Ｒ，９Ｒ，１３Ｓ，１４Ｒ）－３，１７－ジヒドロキシ－１３－メチル－７，８，９，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－デカヒドロ－６Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－１７－イル－エチニル－メチルからなる群より選択される、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項１５】

約２４０Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項１６】

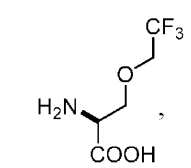
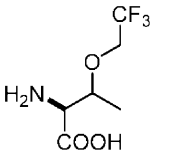
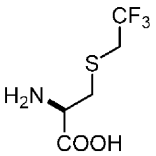
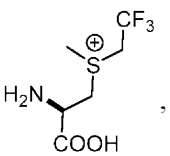
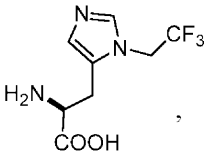
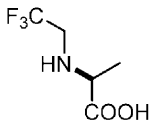
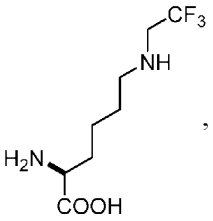
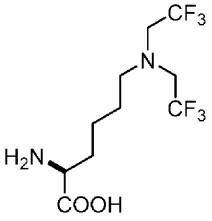
前記Ｎ末端アミノ基において、約１９０Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている、請求項１５に記載の化学修飾されたポリペプチド。

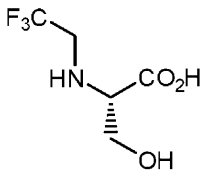
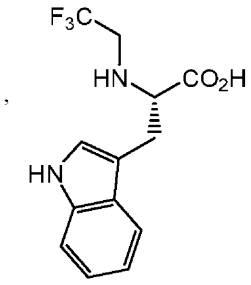
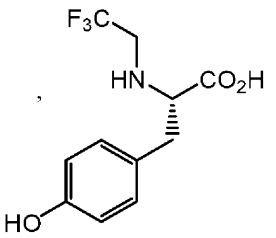
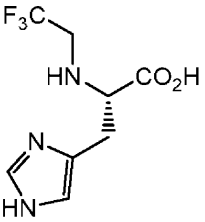
【請求項１７】

約３～約１００個のアミノ酸を含む、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項１８】

約３～約４９個のアミノ酸を含む、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項１９】
約８０～約１００個のアミノ酸を含む、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項２０】
少なくとも前記Ｎ末端アミノ基が、置換されていてもよいＣ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_{3}$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_{2}$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_{2}$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化されている、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項２１】


,

,

,

,

,

,

,

.


,

,

,及び


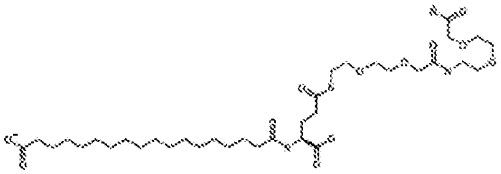
からなる群より選択される少なくとも１つのアミノ酸残基を含む、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項２２】
前記ポリペプチドが、
ＧＬＰ－１
(H*AEGTFTS*DVS*S*YLEGQAAK*EFIAWLVK*GR)

；
エキセナチド
(H*GEGT*FT*S*DLS*KQM*EEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPPS*-$NH_2$)

；
リラグルチド
(H*AEGT*FT*S*DVS*S*Y*LEGQAA-($N^6$- パルミトイルグルタミル)K*EFIAWLVRGRG)

；
セマグルチド
(H*AibEGT*FT*S*DVS*S*Y*LEGQAA-(X)K*EFIAWLVRGRG)

（配列中、リジンのε－アミノ基に結合したＸは、



である）；
タスポグルチド
(H*AibEGT*FT*S*DVS*S*YLEGQAAK*EFIAWLVK*AibR-$NH_2$)

；
リキシセナチド
(H*GEGT*FT*S*DLS*K*QM*EEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPS*K*K*K*K*K*K*K*-$NH_2$)

；
トリアゴニスト
(H*AibQGT*FT*S*D-(γ-E-$C_{16}$アシル)KS*K*YLDERAAQDFVQWLLDGGPS*S*GAPPPS*-$NH_2$)

；
エキセンディン
(H*GEGTFTS*DLS*KQMEEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPPS)

；
ＶＩＰ
(H*S*DAVFTDNYTRLRK*QMAVK*K*YLNS*ILN)

；
ＰＡＣＡＰ
(H*S*DGIFTDS*YS*RYRK*QMAVK*K*YLAAVLGK*RYKQRVK*NK*)

；
ＧＩＰ
(Y*AEGTFIS*DYS*IAMDK*IHQQDFVNWLLAQK*GK*K*NDWK*HNITQ)

；
Ｍｅｔ－エンケファリン
(Y*GGFM)

；
ＢＮＰ
(Y*PSKPDNPGEDAPAEDMARYYS*ALRHYINLITRQRY)

；
サブスタンスＰ
(R*PK*PQQFFGLM)

；
Ｔｙｒ－ＭＩＦ－１
(Y*LG)

；
Ｔｙｒ－Ｗ－ＭＩＦ－１
(Y*PWG)

；
グルカゴン
(H*SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT)

；
成長ホルモン放出ホルモン（ＧＨＲＨ）；
下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（ＰＡＣＡＰ）ＡＤＣＹＡＰ１；
グルカゴン（ＧＣＧ）；
胃抑制ポリペプチド（ＧＩＰ）；
セクレチン（ＳＣＴ）；
血管作動性腸管ペプチド（ＶＩＰ）；
ＯＸＭ（オキシントモジュリン）；
ＰＴＨ（副甲状腺ホルモン）；
ペプチドＹＹ３－３６及びペプチドＹＹ１－３６（ＰＹＹ）；
ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）；
ＶＩＰペプチド（血管作動性腸管ペプチド）；
ＧＬＰ－１＋ＧＩＰ；ＧＬＰ－１＋アミリン；ＧＬＰ－１＋ガストリン；ＧＬＰ－１＋エストロゲン；ＧＬＰ－１＋ＰＹＹ、ＧＬＰ－１＋コレシスチンキナーゼ（ＣＣＫ）からなる群より選択される少なくとも１つのデュアルアゴニスト；
ＧＬＰ－１Ｒ＋グルカゴンの受容体のデュアルアゴニスト；
混合アゴニスト；
アルビグルチド；
デュラグルチド；
他のＧＬＰ－１Ｒアゴニスト；
アミリン；
ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、並びに／又はＤＰＰ４及び／若しくはＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼの他の基質；
他の修飾によって安定化されたＧＬＰ－１アナログ；あるいは
前記配列のいずれかに対して少なくとも７５％の同一性を有する配列
からなる群より選択され、＊によって印を付けられた前記残基のうちの少なくとも１つが、Ｒによってアルキル化又はアシル化されている、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項２３】
前記ポリペプチドの半減期が、前記対応する化学修飾されていないポリペプチドに対して少なくとも１０倍増加している、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項２４】
前記対応する化学修飾されていないポリペプチドの生物活性の少なくとも約５％を保持している、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。
【請求項２５】
副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）、ＰＹＹ３－３６、コレシストキニン、ＰＹＹ１－３６、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体１又は２、成長ホルモン放出因子、グルカゴン、エキセンディン、ＧＬＰ－１、胃抑制ペプチド、リラグルチド、プレアルブミン、ペプチドＨＩ－２７、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、及び血管作動性腸管ペプチド（ＶＩＰ）からなる群より選択される化学修飾されたポリペプチドであって、
Ｎ末端アミノ基が、（ｉ）置換されていてもよい$C_{1}$～$C_{16}$アルキル、置換されていてもよい$C_{3}$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_{2}$～$C_{16}$アルケニル、

及び置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルからなる群より選択される１つ、又は（ｉｉ）置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、→Ｏ、－ＯＨ、アルコキシ、ＮＨ$_2$、ＮＨ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及びＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より選択される１つ、によって誘導体化されており、

前記誘導体化が、前記ポリペプチドを、対応する化学修飾されていないタンパク質に対して前記ポリペプチドの生物活性を低下させることなく、アシルアミノ酸遊離酵素、ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、ＤＰＰ８、ＤＰＰ９、全Ｓ９Ｂファミリーオリゴプロピルペプチダーゼ、並びにＤＰＰ４及び／又はＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼからなる群より選択される少なくとも１つによる分解に対して安定化させる、
化学修飾されたポリペプチド。

【請求項２６】

請求項１～２５のいずれか一項に記載の少なくとも１種のポリペプチドを含む、薬学的に許容できる組成物。

【請求項２７】

請求項１～２５のいずれか一項に記載の少なくとも１種のポリペプチドを投与することを含む、少なくとも１種の疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、前記疾患又は障害が、短腸症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、禁煙、神経変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、先天性高インスリン血症、低血糖、糖尿病、体重増加、肥満、及び代謝症候群からなる群より選択される、方法。

【請求項２８】

ポリペプチドのインビボ半減期を、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して増加させる方法であって、

（ｉ）前記ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ基、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つの置換基を化学修飾することであって、各化学修飾が、前記置換基を、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$アリール、置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化することを独立に含む、化学修飾すること、並びに

（ｉｉ）前記Ｎ末端アミノ基及び前記ＮＨから選択される少なくとも１つの置換基を化学修飾することであって、前記置換基を基Ｘによって誘導体化することを独立に含み、Ｘは、それぞれの場合において独立して、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（ＣＲ$_2$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、アルコキシ、ＮＨ$_2$、ＮＨ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及びＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキルから選択される、化学修飾すること
のうちの少なくとも１つを含む、方法。

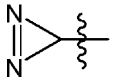
【請求項２９】

ポリペプチドの血液脳関門透過性又は経口バイオアベイラビリティを、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して改善する方法であって、

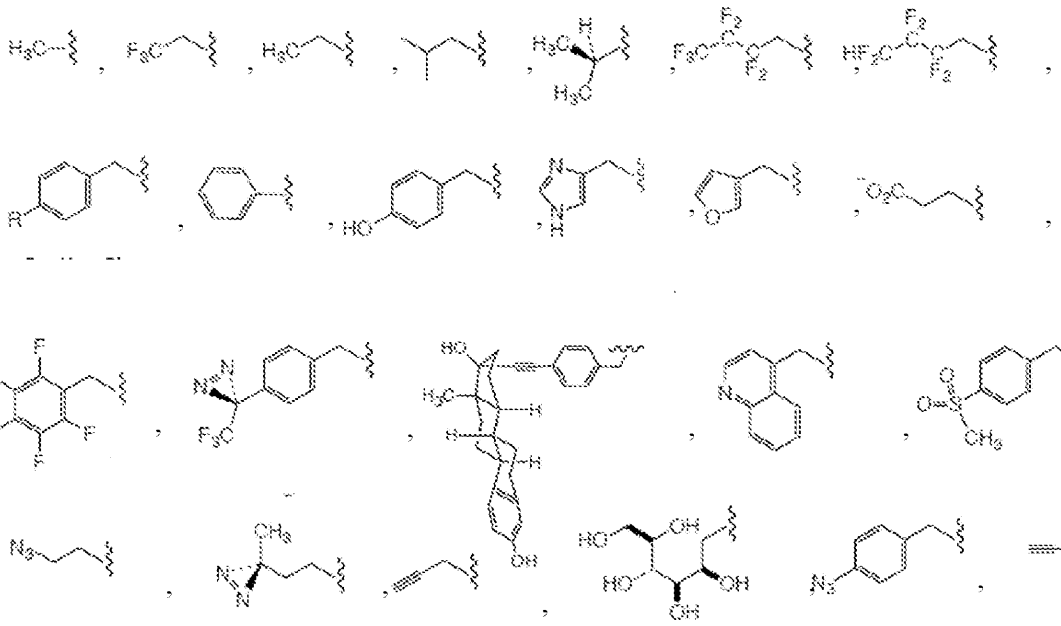
（ｉ）前記ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ基、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つの置換基を化学修飾することであって、各化学修飾が、前記置換基を、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化することを独立に含む、化学修飾すること、並びに

（ｉｉ）前記Ｎ末端アミノ基及び前記ＮＨから選択される少なくとも１つの置換基を化学修飾することであって、前記置換基を基Ｘによって誘導体化することを独立に含み、Ｘは

、それぞれの場合において独立して、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（ＣＲ$_2$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、アルコキシ、ＮＨ$_2$、ＮＨ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及びＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキルから選択される、化学修飾すること
のうちの少なくとも１つを含む、方法。
【請求項３０】
（ｉ）において、前記ポリペプチドが、少なくとも１つの非置換Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル、非置換Ｃ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、非置換Ｃ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は非置換Ｃ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化される、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
（ｉ）において、前記アルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が独立して、Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、Ｃ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、Ｃ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、Ｃ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルコキシ、アジド、ジアジリル



、－ＣＨＯ、１，３－ジオキソール－２－イル、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ヘテロシクリル、アリール、置換されていてもよいフェニルのヘテロアリール、置換されていてもよいベンジルのヘテロアリール、置換されていてもよい－（ＣＲ$_2$）$_{1～6}$－フェニルのヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）（Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$（Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）$_2$（式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキルである）からなる群より独立に選択される少なくとも１つによって置換されている、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記アルキル基が、ハロゲン化Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキルである、請求項３３～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記アルキル基が、２，２，２－トリフルオロエチルである、請求項３３～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
前記少なくとも１つのアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が、



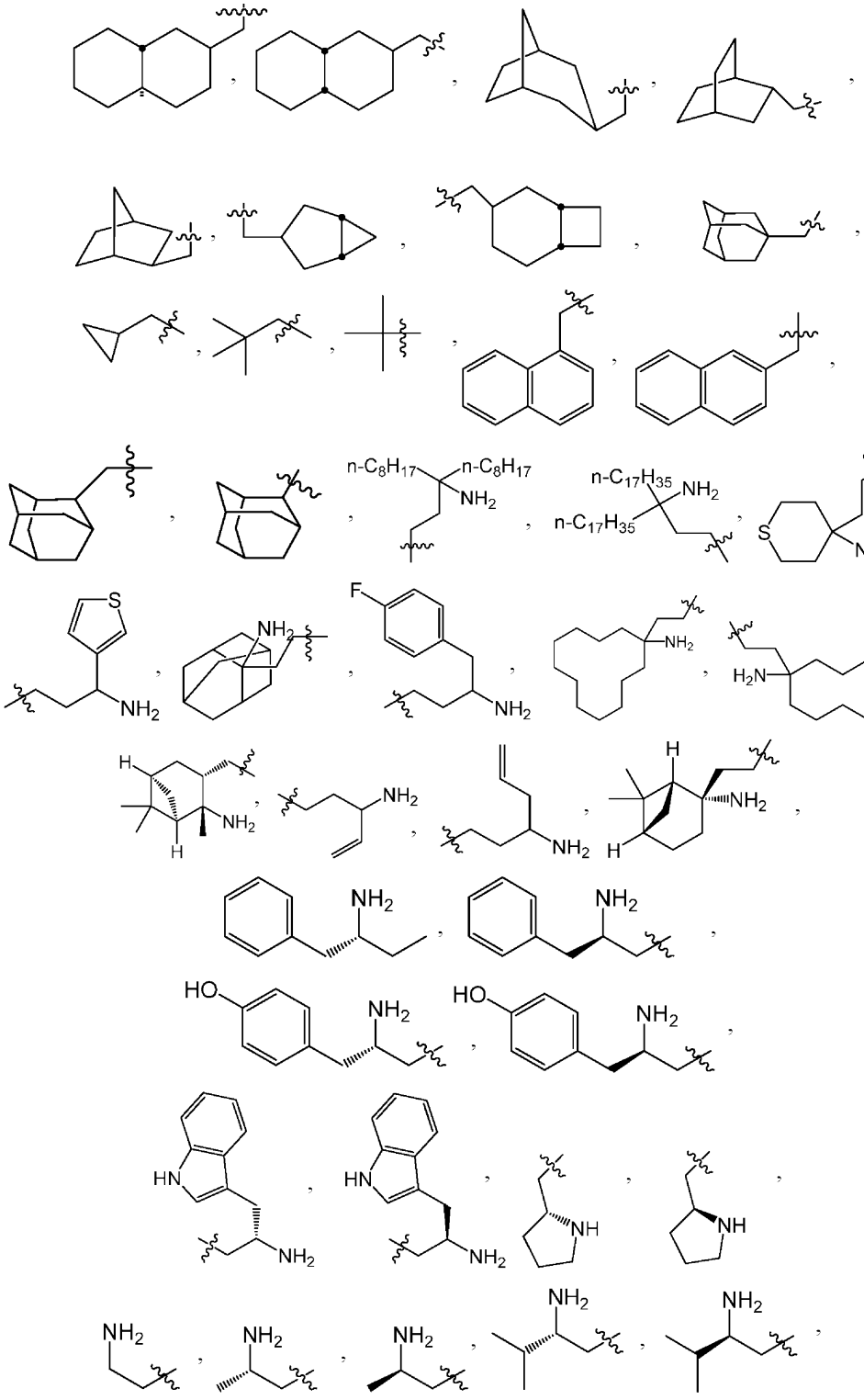
10

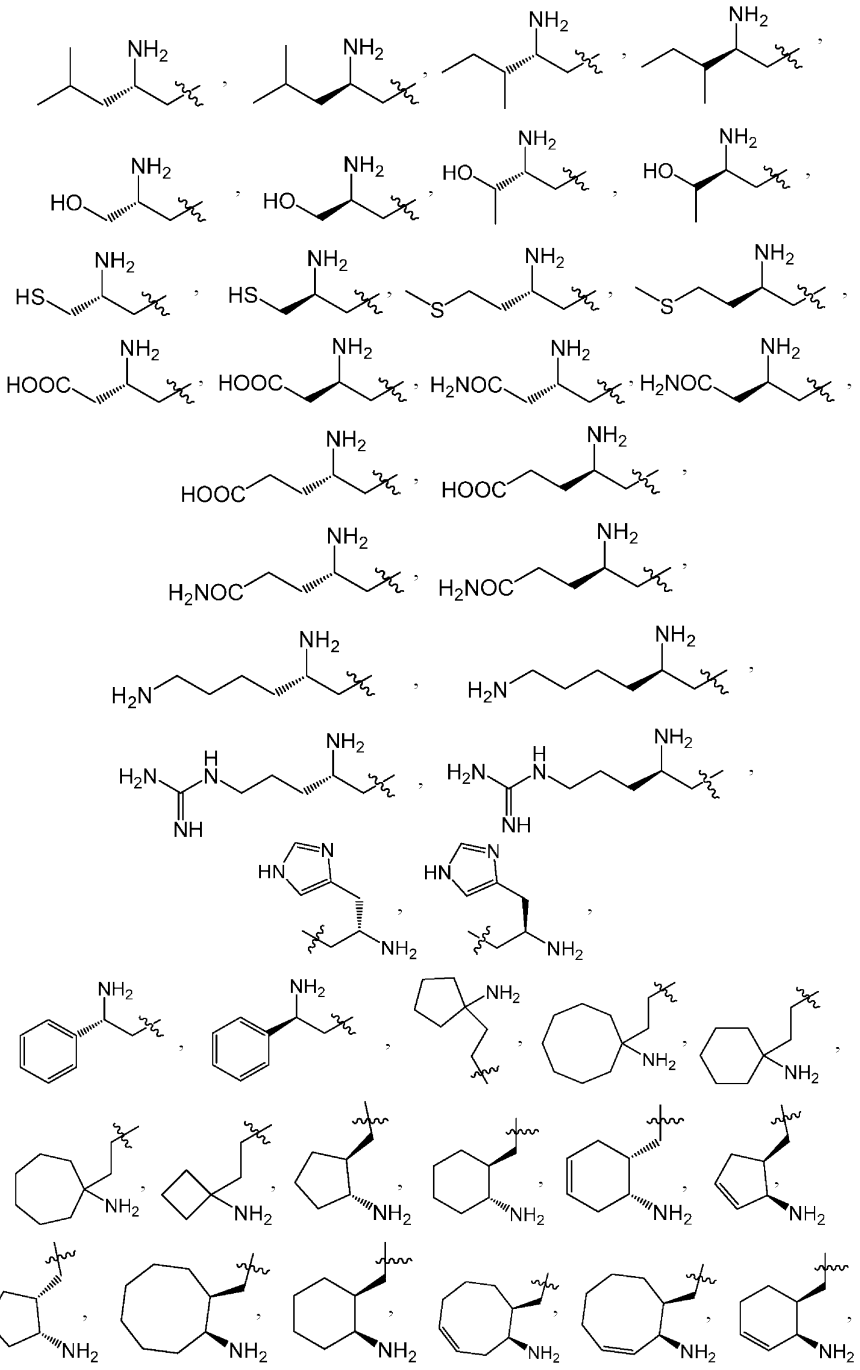
20

30

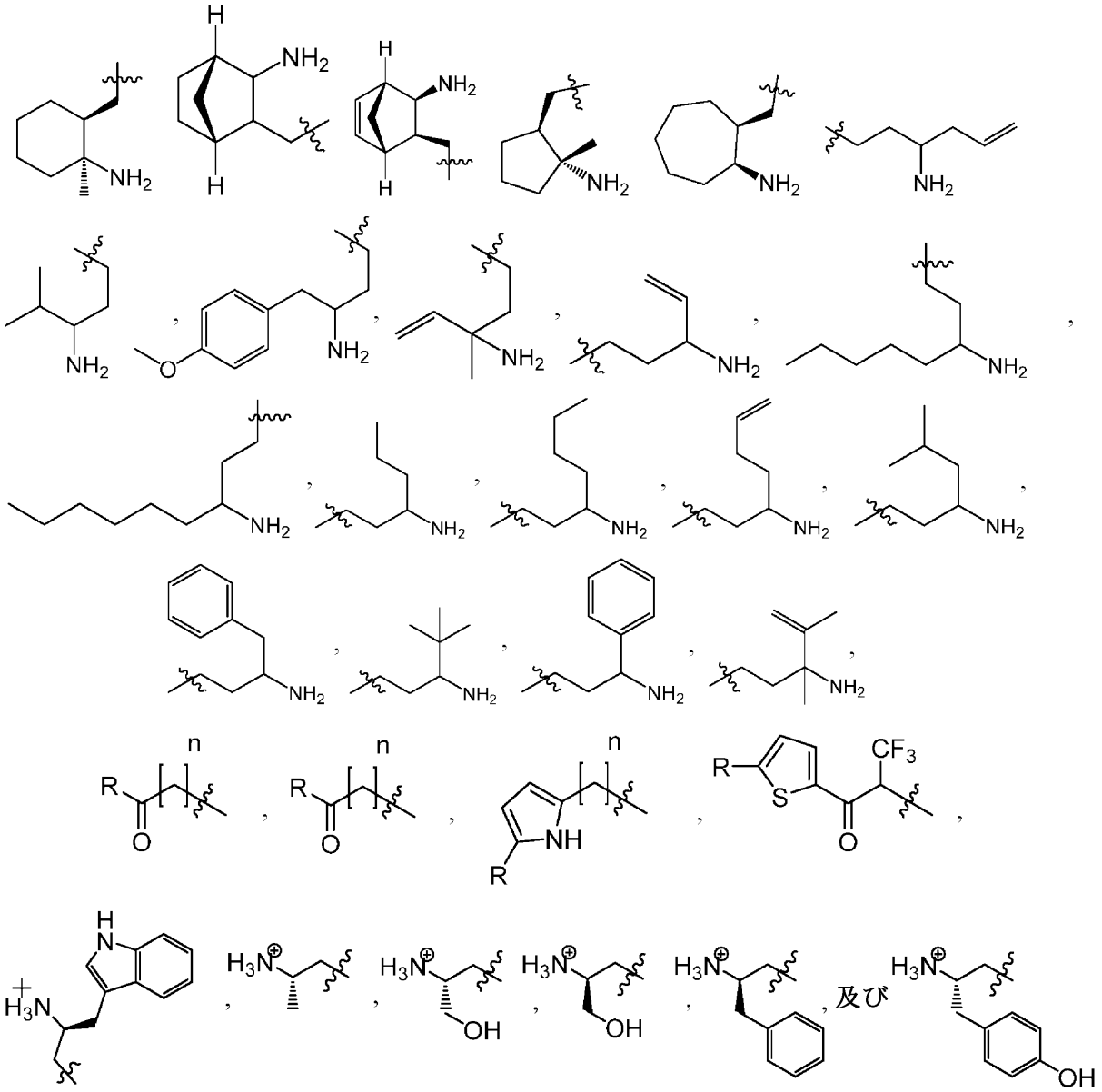
40

50


n-C8H17
n-C8H17
NH2
n-C17H35
NH2
n-C17H35
S
NH2
S
NH2
F
NH2
NH2
H2N
H
NH2
H
NH2
NH2
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HN
NH2
HN
NH2
NH
NH
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2



, , , , .



（式中、ｎは、１～６の範囲の整数であり、且つＲは、置換されていてもよいアルキル又は置換されていてもよいアリールである）からなる群より選択される、請求項３３～３６のいずれか一項に記載の方法。

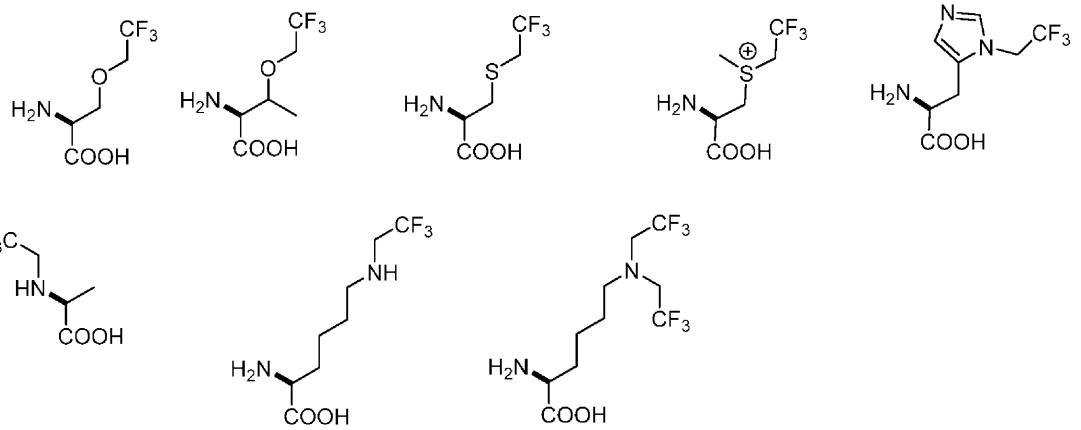
【請求項３５】

少なくとも１つのアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が、２，２，２－トリフルオロ－１－エチル、２，２，３，３，３－ペンタフルオロ－１－プロピル、２，２，３，３，４，４，４－ヘプタフルオロ－１－ブチル、エチル、イソプロピル、ベンジル、置換されているベンジル、アダマンタ－１－イル－メチル、キノリン－４－イル－メチル、２－アミノ－１－プロピル、４－フェニル－ベンジル、１Ｈ－イミダゾール－４－イル－メチル、４－ヒドロキシ－ベンジル、４－［３－（トリフルオロメチル）－３Ｈ－ジアジリン］－ベンジル、及び（８Ｒ，９Ｒ，１３Ｓ，１４Ｒ）－３，１７－ジヒドロキシ－１３－メチル－７，８，９，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－デカヒドロ－６Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－１７－イル－エチニル－メチルからなる群より選択される、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。

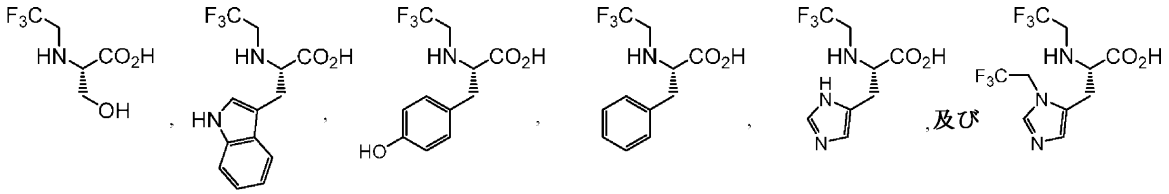
【請求項３６】

前記ポリペプチドが、約２４０Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３７】
前記ポリペプチドが、前記Ｎ末端アミノ基において、約２４０Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記ポリペプチドが、約５～約１００個のアミノ酸を含む、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記ポリペプチドが、約３～約４９個のアミノ酸を含む、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
前記ポリペプチドが、約８０～約１００個のアミノ酸を含む、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
少なくとも前記Ｎ末端アミノ基が、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化される、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
前記ポリペプチドが、



からなる群より選択される少なくとも１つのアミノ酸残基を含む、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
前記ポリペプチドが、構造：



を有する誘導体化されたアミノ酸、その塩、又は溶媒和物を含む、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
遊離アミノ基を含むポリペプチドを誘導体化する方法であって、請求項４３に記載の誘導体化されたアミノ酸を、前記誘導体化されたアミノ酸の遊離カルボン酸が前記ポリペプチドの遊離アミノ酸とアミド結合を形成する条件下で前記ポリペプチドと接触させることを含む、方法。
【請求項４５】

対象内の細胞又は組織を画像化する方法であって、それを必要とする前記対象に、有効量の請求項１～２６のいずれか一項に記載のポリペプチドを投与することを含み、前記ポリペプチドが、検出可能な同位元素によって標識されており、且つ／又は検出可能な標識にコンジュゲートされている、方法。

【請求項４６】

前記検出可能な標識が、発色団、蛍光性基、生物発光基、化学発光基、又は放射性基を含む、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】

対象におけるガストリノーマを特性決定する方法であって、前記対象に、請求項２４に記載の化学修飾されたセクレチンポリペプチドを投与することと、前記対象におけるガストリンの増加を検出することとを含み、それにより前記対象におけるガストリノーマの存在又は不存在が決定される、方法。

【請求項４８】

前記修飾が、血漿成分への結合を増加させる、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項４９】

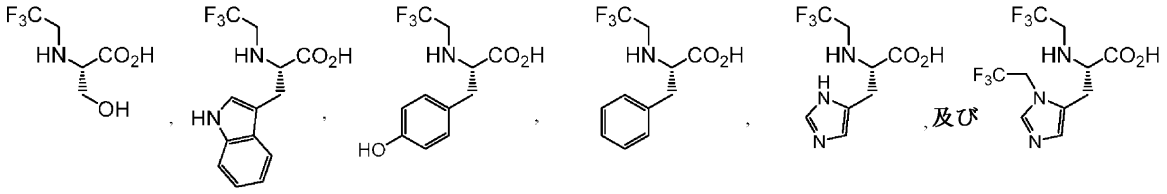
前記血漿成分が、ビタミンＤ３結合タンパク質、アルブミン、又はトランスサイレチンである、請求項４８に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項５０】

ＧＬＰ２ではない、請求項４８に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【請求項５１】

構造：



を有する誘導体化されたアミノ酸、その塩、又は溶媒和物を含む、請求項１に記載の化学修飾されたポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本願は、２０１５年１０月２８日に出願された以下の米国仮特許出願第６２／２４７，４９３号明細書の恩典を主張し、その内容全体は参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【０００２】

発明の背景

ポリペプチドは、治療剤として多くの関心を集めてきた。それらは、証明された生物活性を有し、その生物学的標的に対する非常に高い親和性及び優れた特異性を有し、組替え技法又は化学合成を利用して大規模に調製できる。しかし、ポリペプチドに基づく治療法は、乏しいインビボ安定性及び短いインビボ半減期などの主要な不利な点に直面する。ポリペプチドは、ポリペプチド鎖を、通常低減した機能を示す断片に切断するジペプチジルプロテアーゼ４（ＤＰＰ４）及びエンドペプチダーゼなどの数種のインビボペプチダーゼの基質である。さらに、ポリペプチドは、体内で化学的に修飾されることがあり、排泄及び／又は分解のためにマークされる。

【０００３】

ポリペプチドのタンパク質分解に対する不安定性を最低限にする試みは、限定的にのみ成功してきた。ポリペプチドのＮ末端アミノ基のアセチル化は、タンパク質分解速度を低

下させる全般的な効果を有するが、生物活性の目立った低下を伴う。さらに、Ｎ－アセチル基は依然として安定とはほど遠く、インビボで加水分解を受ける。ＤＰＰ４などの酵素に対する安定化は、標的切断部位にあるアミノ酸を置き換えることにより達成できるが、この修飾にも、ほとんどの場合に生物活性の低下が付随する。

【０００４】

発展性のある治療としてのペプチドの欠点、特に短い血漿半減時間は、標的化された化学修飾により対処されてきた。例えば、ペプチド鎖中の非天然アミノ酸の挿入は、新たなペプチドリード生成への通常の最初に通るアプローチである。しかし、生物活性のあるポリペプチドの主鎖における特定の位置での修飾は、許容できない活性の喪失をもたらすことがある。構造修飾のこのプロセスは、主として試行錯誤の問題でもある。化学合成及びペプチド単離の固有の低収率と相まって、標的化学修飾は非常に高価なアプローチである。

【０００５】

ＧＬＰ－１は、食物摂取に応答して腸内分泌細胞により分泌される強力な３１残基ペプチドであり、胃内容排出遅延及び満腹の誘導、グルコース摂取時のインスリン分泌、β細胞質量及び機能の増加、並びに付随する体重減少の顕著な性質を有する。しかし、そのインビボでの半減期は、内因性セリンプロテアーゼジペプチジルプロテアーゼ４（ＤＰＰ４）の作用により２分未満であり、そのため、ＧＬＰ－１はＩＩ型糖尿病の治療に不適である。重要な治療論として、エキセナチド、構造的ＧＬＰ－１アナログ、及び大きい脂質側鎖が加えられたＧＬＰ－１の誘導体であるリラグルチドの２種のＧＬＰ－１アナログのみが登場した。これらの薬物は、いずれもＧＬＰ－１のタンパク質分解安定性を改善しようとして開発された。

【０００６】

リラグルチドは、溶解状態で自己集合して七量体になり、増大したアルブミン結合を示して、ＤＰＰ４による加水分解による切断から自らを部分的に保護する。しかし、ＦＤＡに認可されたＧＬＰ－１ミメティクスの中でも、糖尿病患者の血糖を低下させ、体重減少を誘導するその卓越した能力にもかかわらず、リラグルチドは、毎日の注射が必要な比較的短時間作用型の薬物である。さらに、リラグルチドは、依然としてＤＰＰ４により著しく分解され、不活性化される。

【０００７】

誘導体Ｎ－アセチル－ＧＬＰ－１は、ＤＰＰ４分解に対してより安定であるが、活性がＧＬＰ－１自体の１０～５０分の１である。そのため、Ｎ－アセチル－ＧＬＰ－１は治療剤として使用することができない。さらに、Ｎ－アセチル化は、ＤＰＰ４に対するインビトロの安定性を付与するが、血清中に遍在するエキソペプチダーゼに対して効果的でないことがある。さらに、専用酵素により触媒される脱アセチル化がインビボで起こり得る。

【０００８】

ＧＬＰ－１の半減期をさらに延長させる追加のアプローチは、ポリペプチドをアルブミンなどの大きいキャリアタンパク質（アルビグルチド）又は免疫グロブリン（デュラグルチド）に融合させることに基づいてきた。しかし、恐らくＣＮＳへのアクセスの低下のため、これらの構成体は、体重減少の点でリラグルチドよりも効果が低い。或いは、ＧＬＰ－１の最後から２番目の残基（Ａｌａ８）がヘリックス誘導性の非標準のアミノ酸（α－アミノイソ酪酸、Ａｉｂ）に換えられた。対応する誘導体（タスポグルチド）は、注射部位反応に加えてエキセナチドのように抗体形成を引き起こしたため、臨床試験中に撤退された。

【０００９】

腸から栄養素を十分に吸収できないことから生じる衰弱性の病状である短腸症候群（ＳＢＳ）の患者のために、より効能のある治療法を開発する切迫した必要性がある。この希少疾患は、手術により小腸の大部分を失った患者に起こる。クローン病、外傷、先天性異常、及び悪性腫瘍を含む種々の根源的な病理がＳＢＳにつながり得る。短腸症候群は、重度の下痢、脱水、及び栄養失調を起こし、生存には静脈内留置カテーテルにより送達され

る非経腸栄養（ＰＮ）を要する。ＰＮの合併症には、敗血症、静脈血栓症、及び代謝性肝疾患がある。入院を含む米国内のＳＢＳ関連ＰＮの累積コストは、毎年ほぼ５０億ドルである。

【００１０】

手術後、残った腸が適応し、栄養素吸収が増加する最大２年の長期の期間がある。しかし、適応後の生理学的補償は、多くの場合、最低限の栄養所要量を満たすのに不十分である。研究努力は、この適応プロセスを増強する薬理作用のある薬剤の特定に集中してきた。その同種ＧＰＣＲ（ＧＬＰ－２Ｒ）を経て作用するグルカゴン様ペプチド－２（ＧＬＰ－２）の投与は、腸の上皮の増大を引き起こし、栄養素吸収の増加、バリア機能の増大、及び血流の増加をもたらす。

【００１１】

修飾されたＧＬＰ－２ペプチド、テデュグルチド又は「ガテックス（登録商標）」は、２０１２年にＳＢＳの治療用にＦＤＡに認可された。ガテックス（登録商標）は、２位における単一のアミノ酸変更を含み（Ｈｉｓ－Ａｌａの代わりにＨｉｓ－Ｇｌｙ）、それは、ジペプチジルペプチダーゼ－４（ＤＰＰ４）に対するそのポリペプチドの耐性を増大させ、そのインビボ半減期を７分から約３時間に延長する。ガテックス（登録商標）は重要であるが、治療的前進は限定的であった。５２週間の治療後、６８％のＳＢＳ患者は、そのＰＮレジメンを１週当たり少なくとも１日減少させることができた。この進歩にもかかわらず、５２名の治療された患者のうちの４名のみが完全にＰＮに依存しなくなり、３２％は、そのＰＮレジメンを１日／週すら減らすことができなかった。しかし、１患者あたりのガテックス（登録商標）のコストは約３０万ドル／年である。さらに、２位でのＧｌｙ残基の導入は、予期しない合成不純物の形成につながり（アスパルチミド汚染）、それは、合成をより長くよりコストのかかるものにする製造上の回避策を利用して避けなければならない。そのため、改善されたＧＬＰ－２アナログを含むより効果的／競合する薬物が、患者の生活の質を向上させ、治療コストを低減させるために、ＳＢＳのために極めて必要とされている。

【００１２】

ポリペプチドの生物活性に悪影響を与えずに、ポリペプチドのタンパク質分解に対する安定性を改善する新規方法を特定する必要性が当技術分野に存在する。本発明はこの必要性を満たす。

【発明の概要】

【００１３】

本発明は、その生物活性に対する悪影響がない増加したタンパク質分解安定性を特徴とする、化学修飾されたポリペプチド、その塩、又は溶媒和物に関する。いくつかの態様において、化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物であって、ポリペプチドは、以下の化学修飾：

（ｉ）ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つが独立して、置換されていてもよい$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{16}$アルキル、置換されていてもよい$Ｃ_{3}$～$Ｃ_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$Ｃ_{3}$～$Ｃ_{16}$アリール、置換されていてもよい$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよい$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{16}$アルキニルによって誘導体化されること；並びに

（ｉｉ）Ｎ末端アミノ基及びＮ末端第１内部アミド結合からなる群より選択される少なくとも１つのＮＨ基が、Ｘによって誘導体化されること（ここで、各Ｘは、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－$（ＣＲ_{2}）_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、－ＯＲ、アルコキシ、$ＮＨ_{2}$、置換されていてもよいＮＨ（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{16}$アルキル）、及び置換されていてもよいＮ（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{16}$アルキル）（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{16}$アルキル）からなる群より独立に選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよい$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{16}$アルキルから選択される）のうちの少なくとも１つを有し得、化学修飾されたポリペプチドは、対応する化学修飾さ

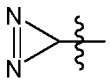
れていないポリペプチドと比較して、本質的に同じ生物活性を有し且つ／又はタンパク質分解に対してより耐性がある、化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物である。いくつかの態様において、タンパク質分解は、アシルペプチドヒドロラーゼ、ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、ＤＰＰ８、ＤＰＰ９、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、Ｓ９Ｂファミリーオリゴプロピルペプチダーゼ、並びにＤＰＰ４及び／又はＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼからなる群より選択される少なくとも１つによって触媒され得る。いくつかの態様において、化学修飾されていないポリペプチドは、インクレチンを含む。

【００１４】

化学修飾されたポリペプチドは、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より高い血清中安定性を有し得る。化学修飾されたポリペプチドは、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より長いインビボ半減期を有し得る。請求項１の化学修飾されたポリペプチドは、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より高い血液脳関門透過性又はより高い経口バイオアベイラビリティを有し得る。いくつかの態様において、修飾されたポリペプチドの半減期は、対応する化学修飾されていないポリペプチドに対して少なくとも１０倍増加され得る。いくつかの態様において、修飾されたペプチドは、対応する化学修飾されていないポリペプチドの生物活性の少なくとも約５％を保持し得る。

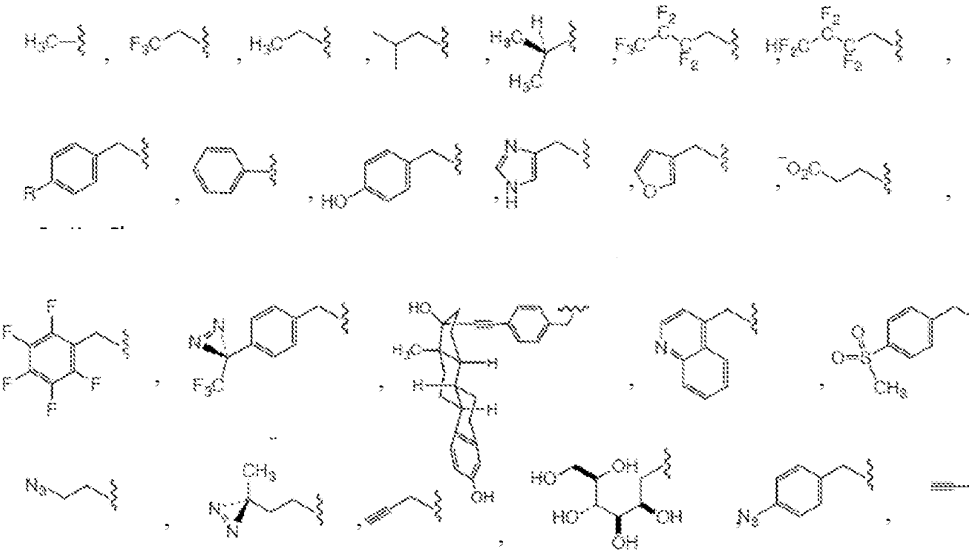
【００１５】

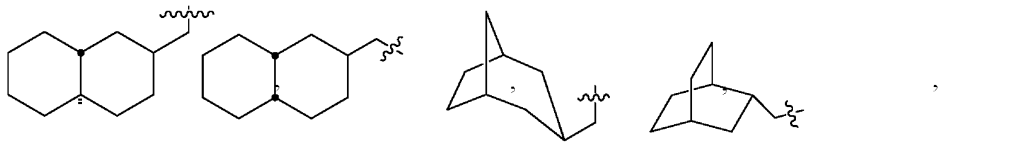
化学修飾されたものの多様な誘導体も本発明に含まれる。いくつかの態様において、ポリペプチドは、少なくとも１種の非置換$C_1$～$C_6$アルキル、非置換$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、非置換$C_2$～$C_{16}$アルケニル、非置換アリール、又は非置換$C_2$～$C_{16}$アルキニルによって誘導体化され得る。いくつかの態様において、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、及び／又はチオール基のうちの１つ又は複数は独立して、置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_1$～$C_{16}$アルキルアリール（例えば、ベンジルなど）、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルケニル、及び置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルキニルからなる群より独立に選択される第１置換基及び第２置換基によって誘導体化され得、第１置換基及び第２置換基は独立して、同一であるか又は同一でない。いくつかの態様において、Ｎ末端アミノ基は、置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルケニル、及び置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルキニルからなる群より独立に選択される第１置換基及び第２置換基によって誘導体化されており、第１置換基及び第２置換基は独立して、同一であるか又は同一でない。アルキル、及び／又はアルキルアリール、及び／又はシクロアルキル、及び／又はアリール、及び／又はアルケニル、及び／又はアルキルアリール、及び／又はアルキニル基は独立して、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、$C_2$～$C_{16}$アルキニル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、$C_1$～$C_6$アルコキシ、アジド、ジアジリル

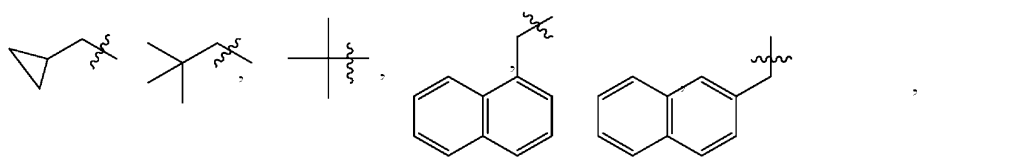


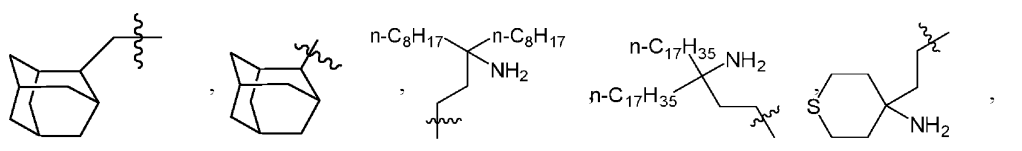
、－ＣＨＯ、１，３－ジオキソール－２－イル、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（$C_1$～$C_6$アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）$_2$からなる群より独立に選択される少なくとも１つによって置換され得、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又は$C_1$～$C_{16}$アルキルである。いくつかの態様において、アルキル、及び／又はアルキルアリール、及び／又はシクロアルキル、及び／又はアリール、及び／

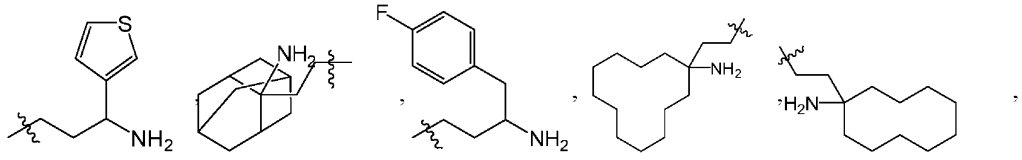
又はアルケニル、及び／又はアルキルアリール、及び／又はアルキニル基は、フッ素化されていても、全フッ素化されていてもよい。いくつかの態様において、アルキル基は、ハロゲン化された$C_1$～$C_{16}$アルキルである。いくつかの態様において、アルキル基は、２，２，２－トリフルオロエチルであり得る。いくつかの態様において、少なくとも１つ（例えば、２つ、３つ、４つ、５つなど）のアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、又はアルキニル基は、

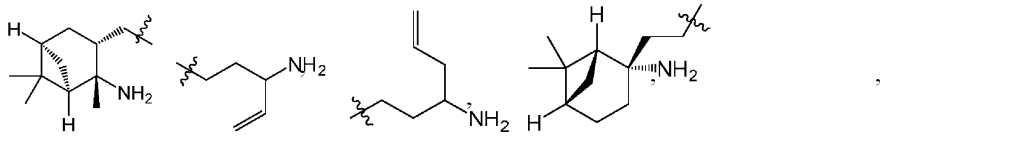


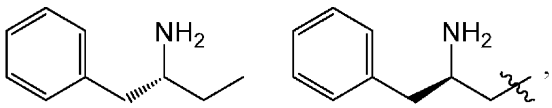


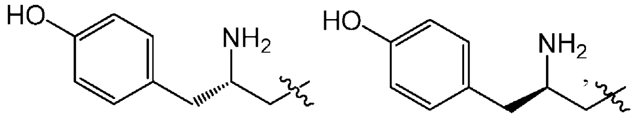


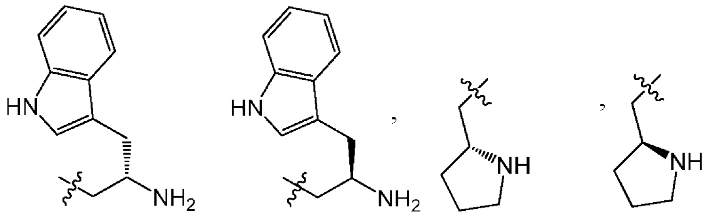


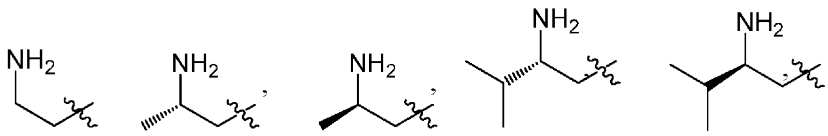


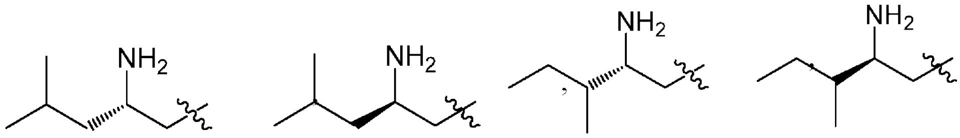


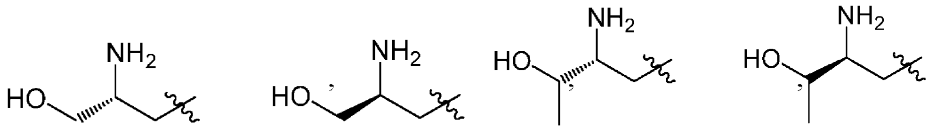

,

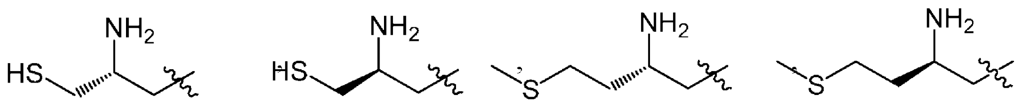

,

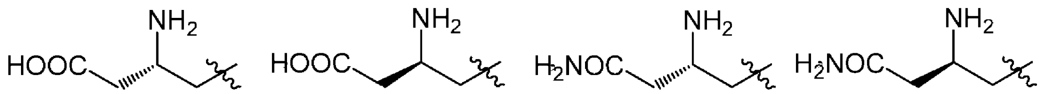

,

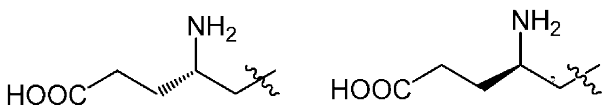

,

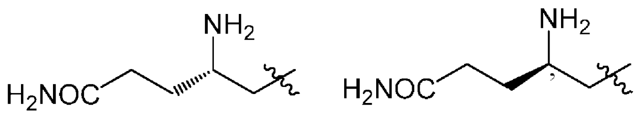

,

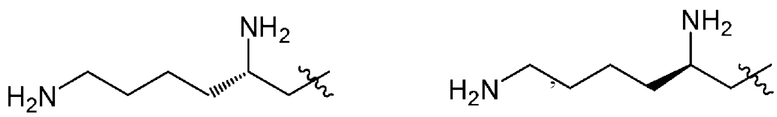

,

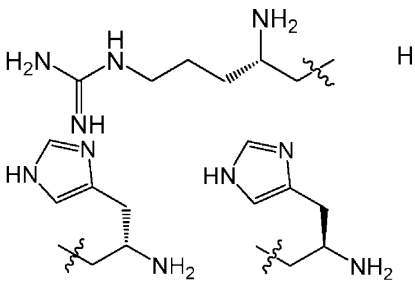
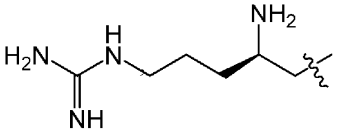

,

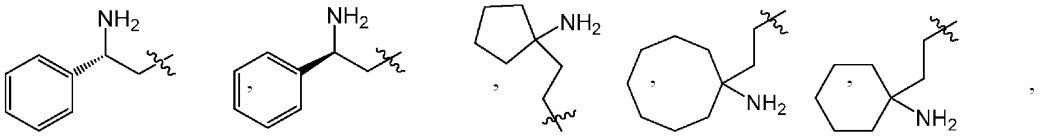
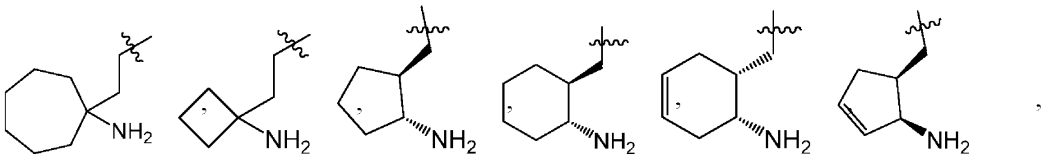
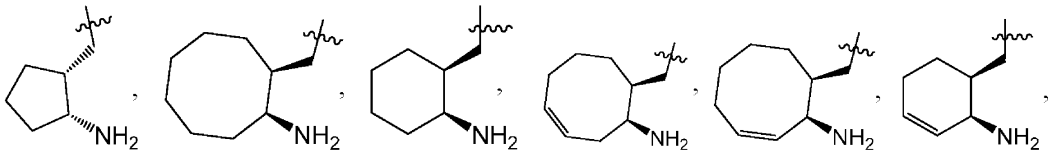
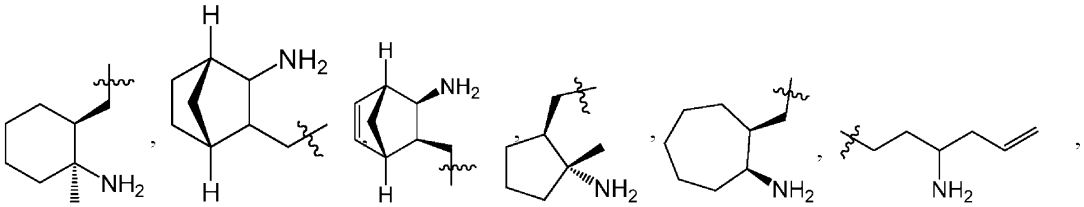

,

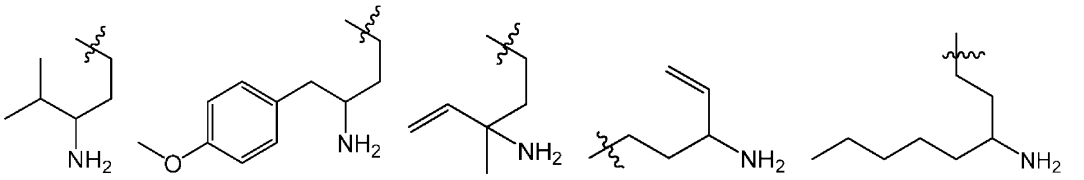
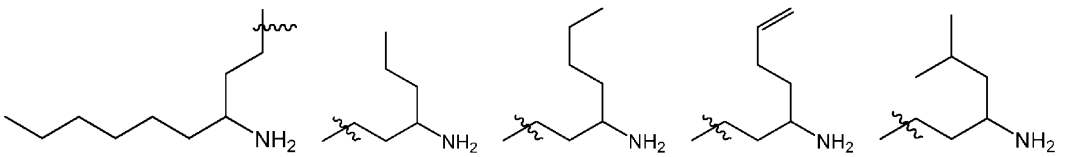
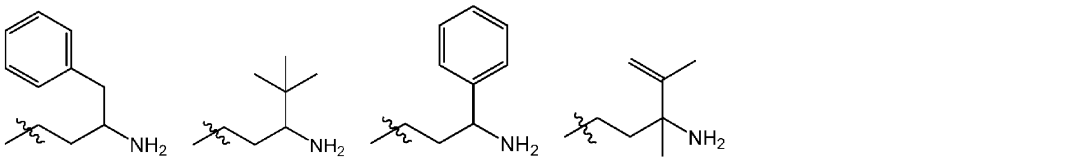

,


,


,

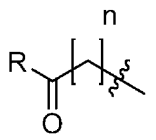
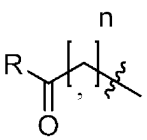
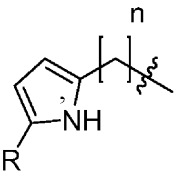
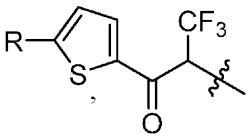
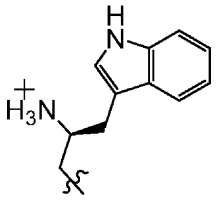
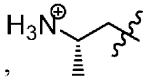
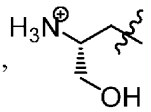
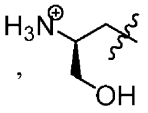
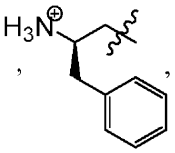
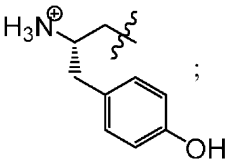




50

，　　，


，

，

，

，

，

，

，

，

，及び

；

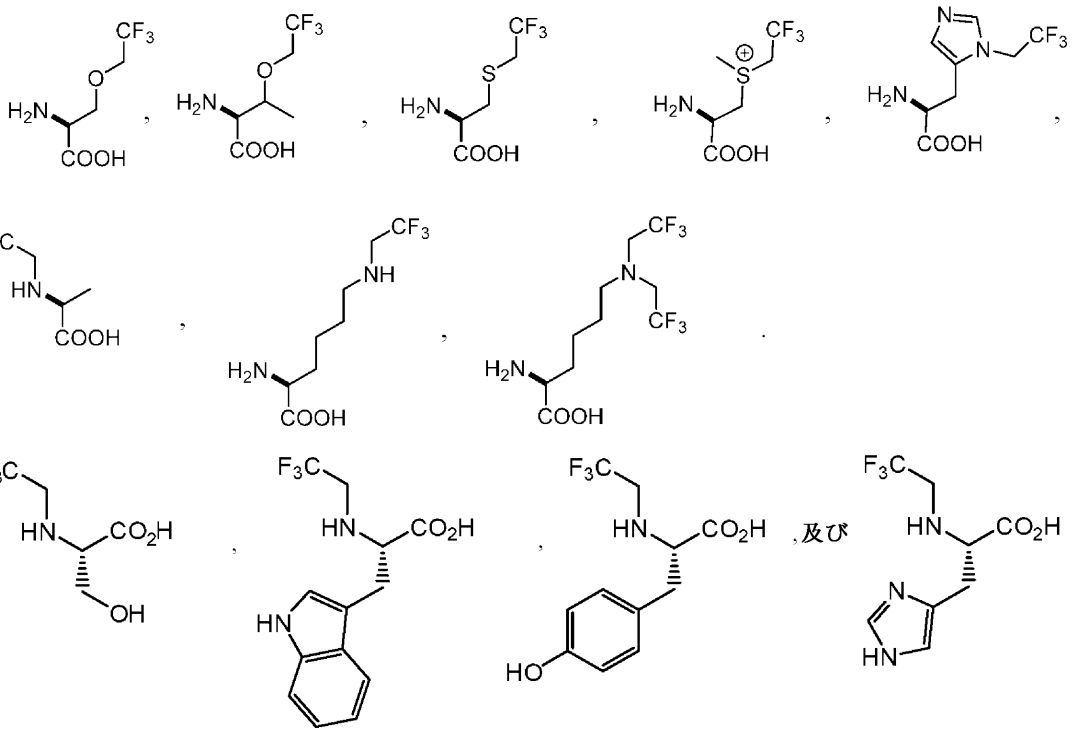
（式中、ｎは、１～６の範囲の整数であり、且つＲは、水素又は置換されていてもよいアルキル若しくはアリールである）からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、アルキル、及び／又はアルキルアリール、及び／又はシクロアルキル、及び／又はアリール、及び／又はアルケニル、及び／又はアルキルアリール、及び／又はアルキニル基は、２，２，２－トリフルオロ－１－エチル、２，２，３，３，３－ペンタフルオロ－１－プロピル、２，２，３，３，４，４，４－ヘプタフルオロ－１－ブチル、エチル、イソプロピル、ベンジル、置換されているベンジル、アダマンター１－イル－メチル、キノリン－４－イル－メチル、２－アミノ－１－プロピル、４－フェニル－ベンジル、１Ｈ－イミダゾール－４－イル－メチル、４－ヒドロキシ－ベンジル、４－［３－（トリフルオロメチル）－３Ｈ－ジアジリン］－ベンジル、及び（８Ｒ，９Ｒ，１３Ｓ，１４Ｒ）－３，１７－ジヒドロキシ－１３－メチル－７，８，９，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－デカヒドロ－６Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－１７－イル－エチニル－メチルからなる群より選択され得る。

【００１６】

Ｎ末端アミノ基に結合する基は、ポリペプチドが受容体に結合する、膜－水界面に近接した受容体上の結合ポケットを占有し得る。ポリペプチドの化学修飾は、特定の体積又は外形を有し得る。いくつかの態様において、ポリペプチドは、約２４０Å$^3$以下（例えば、約１９０Å未満など）の体積を占める基によって化学修飾され得る。化学修飾されたポリペプチドは、約３～約１００個のアミノ酸、又は約３～約４９個のアミノ酸、又は約８０～約１００個のアミノ酸を含み得る。

【００１７】

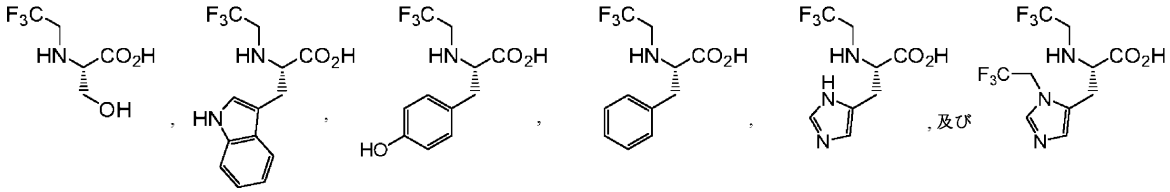
いくつかの態様において、少なくともＮ末端アミノ基は、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アリールアルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化され得る。いくつかの態様において、化学修飾されたポリペプチドである。いくつかの態様において、化学修飾されたポリペプチドは、アミノ酸又はアミノ酸残基が、



からなる群より選択される少なくとも１つのアミノ酸残基を含み得る。

【００１８】

いくつかの態様において、化学修飾されたポリペプチドは、構造：



を有する少なくとも１つの誘導体化されたアミノ酸、その塩、又は溶媒和物を含み得る。

【００１９】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、

ＧＬＰ－１

(H*AEGTFTS*DVS*S*YLEGQAAK*EFIAWLVK*GR)

；

エキセナチド

(H*GEGT*FT*S*DLS*KQM*EEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPPS*-$NH_2$)

；

リラグルチド

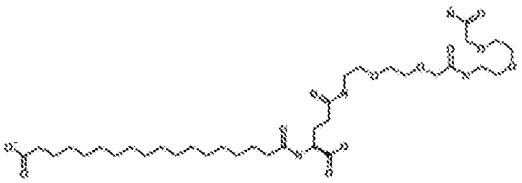
(H*AEGT*FT*S*DVS*S*Y*LEGQAA-($N^6$-パルミトイルグルタミル)K*EFIAWLVRGRG)

；

セマグルチド

(H*AibEGT*FT*S*DVS*S*Y*LEGQAA-(X)K*EFIAWLVRGRG)

（配列中、リジンのε－アミノ基に結合しているＸは、



である）；
タスポグルチド
(H*AibEGT*FT*S*DVS*S*YLEGQAAK*EFIAWLVK*AibR-$NH_2$)

；
リキシセナチド
(H*GEGT*FT*S*DLS*K*QM*EEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPS*K*K*K*K*K*K*-$NH_2$)

；
トリアゴニスト
(H*AibQGT*FT*S*D-(γ-E-$C_{16}$アシル)KS*K*YLDERAAQDFVQWLLDGGPS*S*GAPPPS*-$NH_2$)

；
エキセンディン
(H*GEGTFTS*DLS*KQMEEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPPS)

；
ＶＩＰ
(H*S*DAVFTDNYTRLRK*QMAVK*K*YLNS*ILN)

；
ＰＡＣＡＰ
(H*S*DGIFTDS*YS*RYRK*QMAVK*K*YLAAVLGK*RYKQRVK*NK*)

；
ＧＩＰ
(Y*AEGTFIS*DYS*IAMDK*IHQQDFVNWLLAQK*GK*K*NDWK*HNITQ)

；
Ｍｅｔ－エンケファリン
(Y*GGFM)

；
ＢＮＰ
(Y*PSKPDNPGEDAPAEDMARYYS*ALRHYINLITRQRY)

；
サブスタンスＰ
(R*PK*PQQFFGLM)

；
Ｔｙｒ－ＭＩＦ－１
(Y*LG)

；
Ｔｙｒ－Ｗ－ＭＩＦ－１
(Y*PWG)

；
グルカゴン
(h*sqgtftsdyskyldsrraqdfvqwlmnt)

；
成長ホルモン放出ホルモン（ｇｈｒｈ）；
下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（ＰＡＣＡＰ）ＡＤＣＹＡＰ１；
グルカゴン（ＧＣＧ）；
胃抑制ポリペプチド（ＧＩＰ）；
セクレチン（ＳＣＴ）；
血管作動性腸管ペプチド（Ｐｅｐｔｉｄ）（ＶＩＰ）；
ＯＸＭ（オキシントモジュリン）；
ＰＴＨ（副甲状腺ホルモン）；
ペプチドＹＹ３－３６及びペプチドＹＹ１－３６（ＰＹＹ）；
ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）；
ＶＩＰペプチド（血管作動性腸管ペプチド）；
ＧＬＰ－１＋ＧＩＰ；ＧＬＰ－１＋アミリン；ＧＬＰ－１＋ガストリン；ＧＬＰ－１＋エストロゲン；ＧＬＰ－１＋ＰＹＹ、ＧＬＰ－１＋コレシスチン（ｃｈｏｌｅｃｙｓｔｉｎ）キナーゼ（ＣＣＫ）からなる群より選択される少なくとも１つのデュアルアゴニスト；
ＧＬＰ－１Ｒ＋グルカゴン受容体のデュアルアゴニスト；
混合アゴニスト；
アルビグルチド；
デュラグルチド；
他のＧＬＰ－１Ｒアゴニスト；
アミリン；
ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、並びに／又はＤＰＰ４及び／若しくはＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼの他の基質；
他の修飾によって安定化されたＧＬＰ－１アナログ；あるいは
これらの配列のいずれかに対して少なくとも７５％の同一性を有する配列
からなる群より選択され得、＊によって印を付けられた残基のうちの少なくとも１つは、Ｒ又は炭化水素Ｒ（例えば、Ｃ$_{1\sim16}$アルキルなど）によってアルキル化（－Ｒ）又はアシル化された（－Ｃ（Ｏ）Ｒ）であり得る。
【００２０】
いくつかの態様において、化学修飾されたポリペプチドは、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）、ＰＹＹ３－３６、コレシストキニン、ＰＹＹ１－３６、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体１又は２、成長ホルモン放出因子、グルカゴン、エキセンディン、ＧＬＰ－１、胃抑制ペプチド、リラグルチド、プレアルブミン、ペプチドＨＩ－２７、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、及び血管作動性腸管ペプチド（ＶＩＰ）からなる群より選択され得、Ｎ末端アミノ基は、（ｉ）置換されていてもよいＣ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいアリールアルキル、置換されていてもよいＣ$_{3}$～Ｃ$_{16}$アリール、置換されていてもよいＣ$_{3}$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_{2}$～Ｃ$_{16}$アルケニル、及び置換されていてもよいＣ$_{2}$～Ｃ$_{16}$アルキニルからなる群より選択される１つ、又は（ｉｉ）置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、→Ｏ、－ＯＨ、アルコキシ、ＮＨ$_{2}$、ＮＨ（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及びＮ（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より選択される１つによって誘導体化され得、誘導体化は、ポリペプチドを、対応する化学修飾されていないタンパク質に対してポリペプチドの生

物活性を低下させることなく、アシルアミノ酸放出酵素、ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、ＤＰＰ８、ＤＰＰ９、全Ｓ９Ｂファミリーオリゴプロピルペプチダーゼ、並びにＤＰＰ４及び／又はＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼからなる群より選択される少なくとも１つによる分解に対して安定化させる。

【００２１】

化学修飾されたポリペプチドを含む薬学的組成物も提供される。いくつかの態様において、薬学的に許容できる組成物は、本明細書に記載される化学修飾されたポリペプチドのいずれも含み得る。

【００２２】

少なくとも１種の疾患又は障害を治療又は予防する方法も提供される。いくつかの態様において、方法は、少なくとも１種の化学修飾されたポリペプチドを、それを必要とする患者に投与することを含み得る。いくつかの態様において、方法は、本明細書に記載されるいずれかの化学修飾されたポリペプチドを含む薬学的組成物を投与することを含み得る。いくつかの態様において、疾患又は障害は、短腸症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、禁煙、神経変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、先天性高インスリン血症、及び／又は低血糖からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、疾患又は障害は、糖尿病、体重増加、肥満、及び／又は代謝症候群の群から選択され得る。

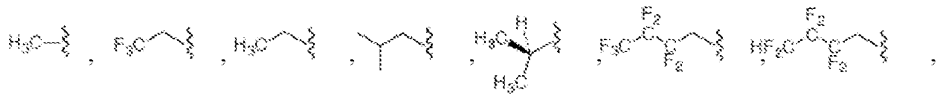
【００２３】

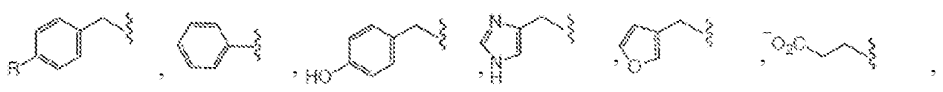
ポリペプチドのインビボ半減期を増加させる方法、及び／又はポリペプチドの血液脳関門透過性を改善する方法、及び／又はポリペプチドの経口バイオアベイラビリティを改善する方法も提供される。これらの変化（例えば、半減期を増加させる、透過性を改善する、バイオアベイラビリティを改善する）は、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較される。いくつかの態様において、これらの方法は、本明細書に記載されるいずれかの化学修飾を含み得る。いくつかの態様において、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、ポリペプチドのインビボ半減期を増加させる方法、及び／又はポリペプチドの血液脳関門透過性を改善する方法、及び／又は経口バイオアベイラビリティを改善する方法は、

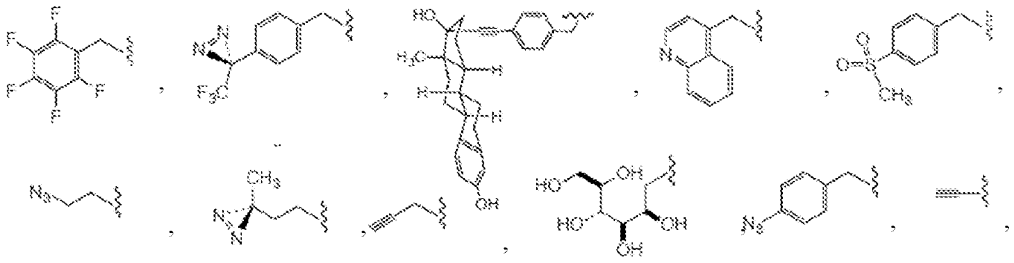
（ｉ）ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ基、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つの置換基を化学修飾することであって、各化学修飾は、置換基を、置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキル、置換されていてもよい$C_4$～$C_{16}$アリールアルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$アリール、置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルキニルによって誘導体化することを独立に含む、化学修飾すること、及び／又は

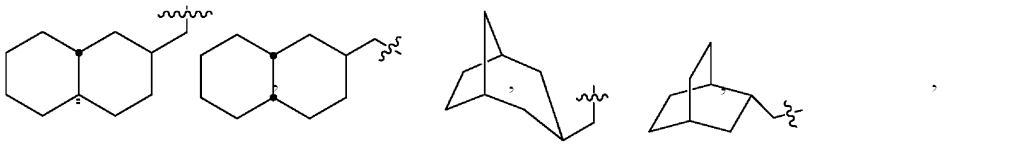
（ｉｉ）Ｎ末端アミノ基及びＮＨから選択される少なくとも１つの置換基を化学修飾することであって、置換基を基Ｘによって誘導体化することを独立に含む、化学修飾すること（ここで、Ｘは、それぞれの場合において独立して、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（$CR_2$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、アルコキシ、$NH_2$、ＮＨ（$C_1$～$C_{16}$アルキル）、及びＮ（$C_1$～$C_{16}$アルキル）（$C_1$～$C_{16}$アルキル）からなる群より選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキルから選択される）

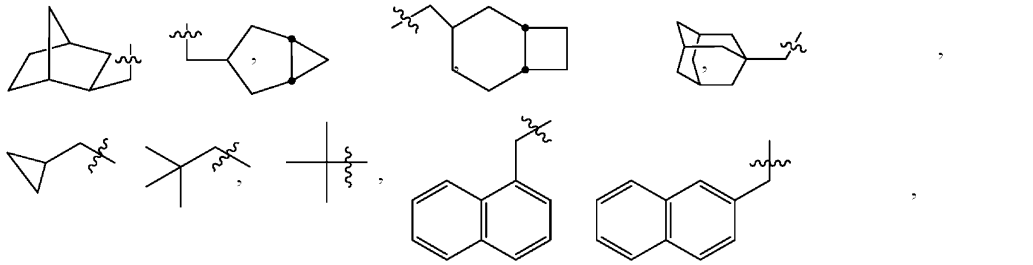
のうちの少なくとも１つを含み得る。いくつかの態様において、アルキル基は２，２，２－トリフルオロエチルである。いくつかの態様において、少なくとも１つのアルキル、シクロアルキル、アリール、アリールアルキル、アルケニル、又はアルキニル基は、



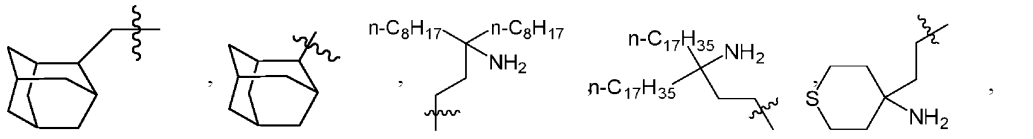


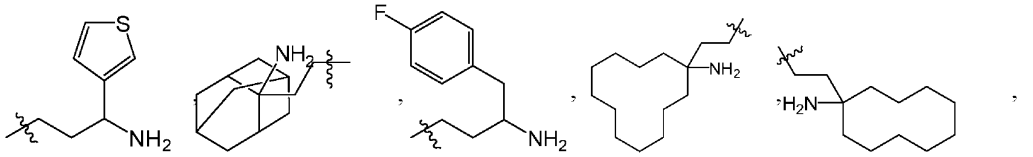


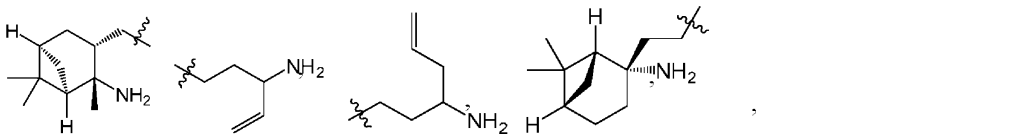


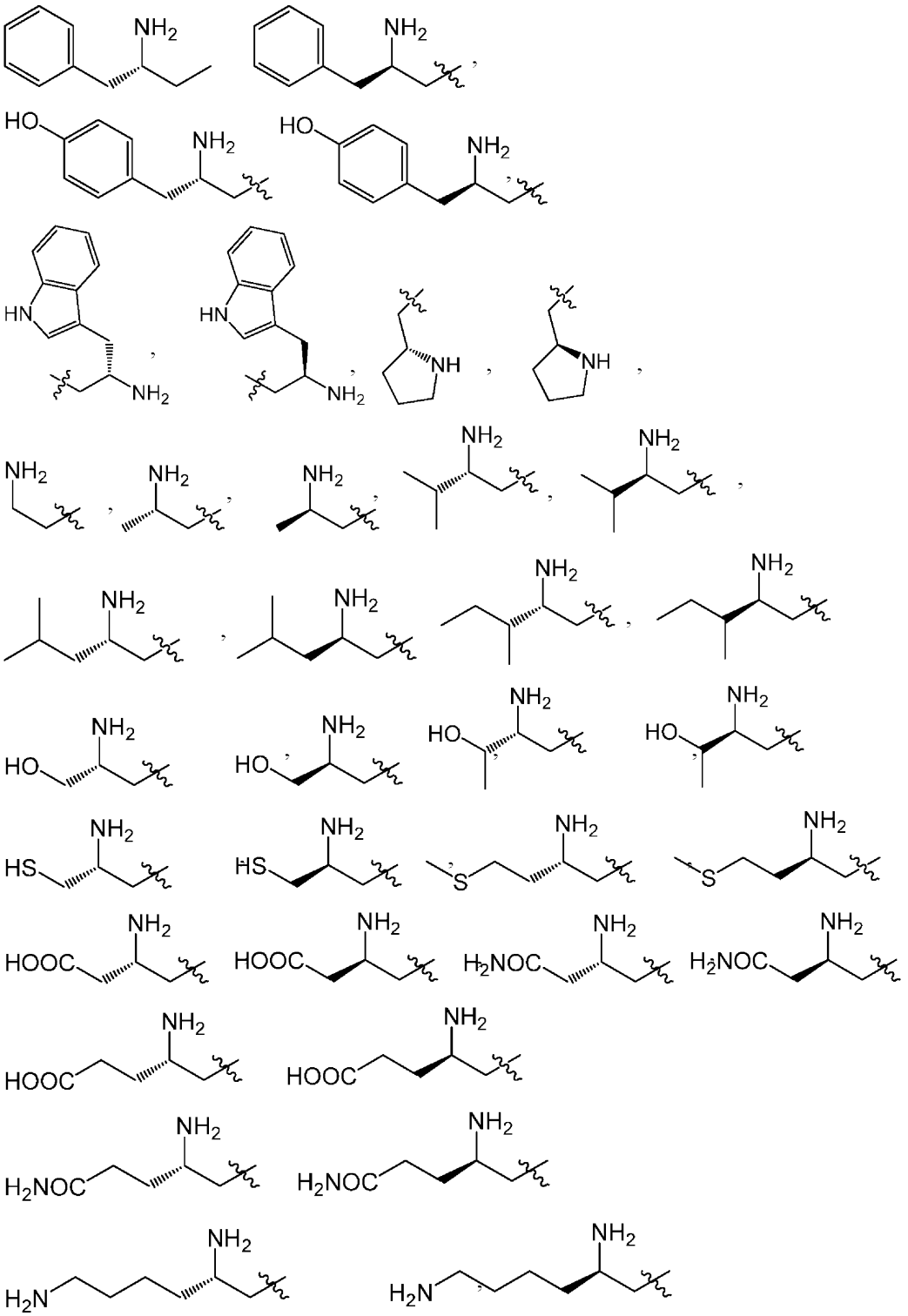


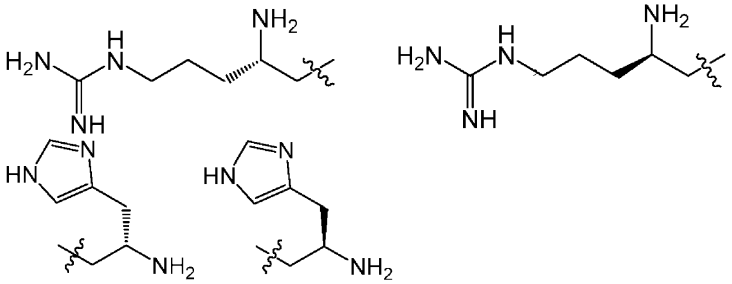




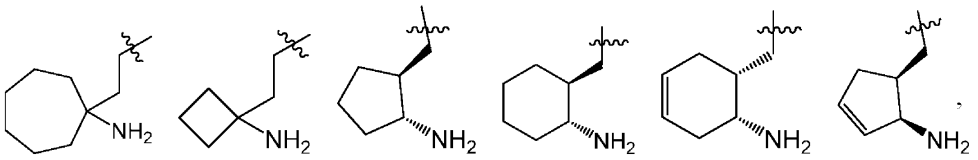


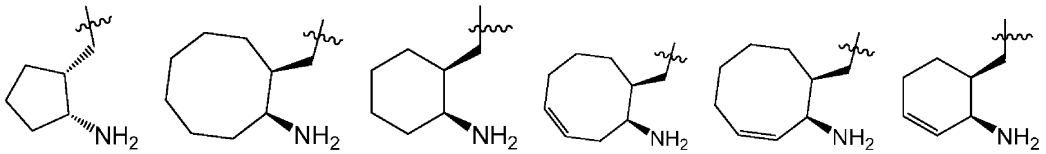


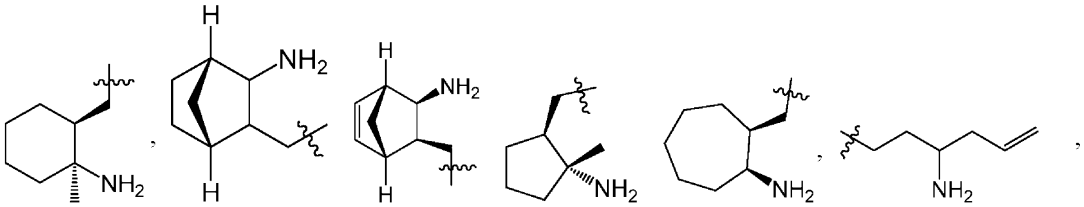


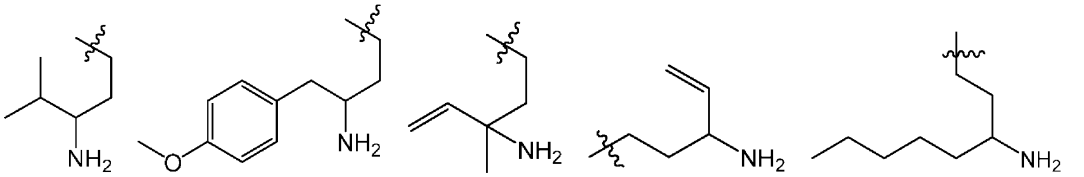


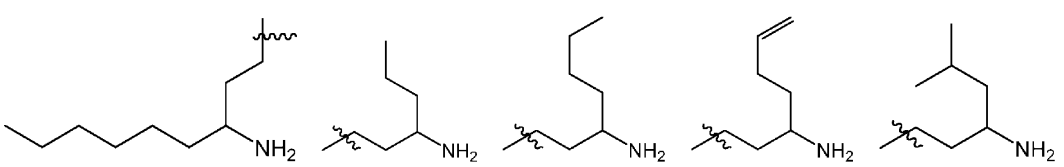


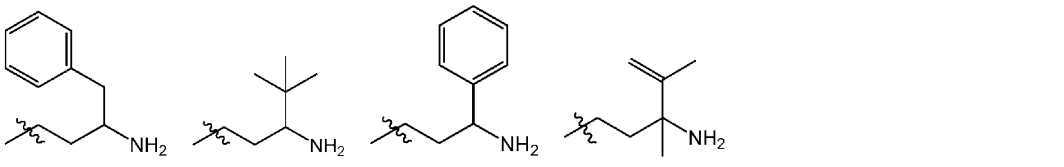




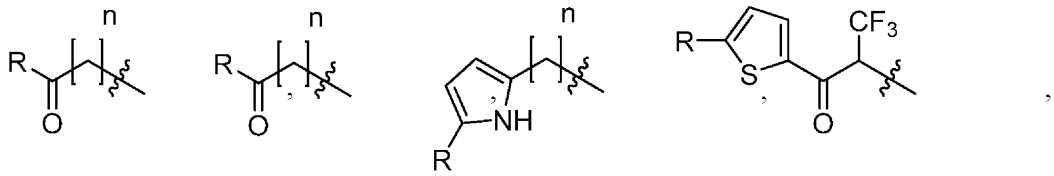


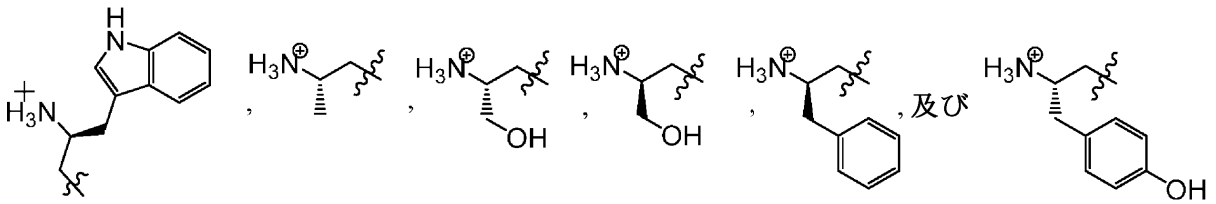




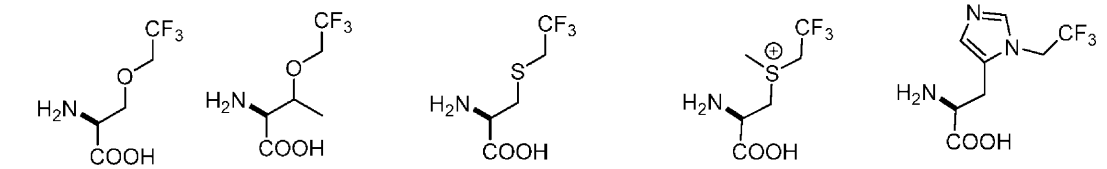


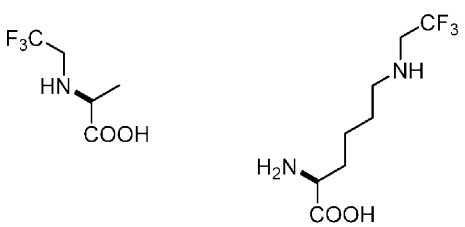
，　　，


，


，及び

（式中、「ｎ」は、１～６の範囲の整数であり、且つＲは、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアリール、又は置換されていてもよいアリールアクリルであり得る）からなる群より選択され得る。いくつかの態様において、少なくとも１つのアルキル、アリールアルキル、アリールシクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基は、２，２，２－トリフルオロ－１－エチル、２，２，３，３，３－ペンタフルオロ－１－プロピル、２，２，３，３，４，４，４－ヘプタフルオロ－１－ブチル、エチル、イソプロピル、ベンジル、置換されているベンジル、アダマンター１－イル－メチル、キノリン－４－イル－メチル、２－アミノ－１－プロピル、４－フェニル－ベンジル、１Ｈ－イミダゾール－４－イル－メチル、４－ヒドロキシ－ベンジル、４－［３－（トリフルオロメチル）－３Ｈ－ジアジリン］－ベンジル、及び（８Ｒ，９Ｒ，１３Ｓ，１４Ｒ）－３，１７－ジヒドロキシ－１３－メチル－７，８，９，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－デカヒドロ－６Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－１７－イル－エチニル－メチルからなる群より選択される。いくつかの態様において、ポリペプチドは、約２４０Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている。いくつかの態様において、ポリペプチドは、約５～約１００個のアミノ酸、又は約３～約４９個のアミノ酸、又は約８０～約１００個のアミノ酸を含み得る。いくつかの態様において、Ｎ末端アミノ基は、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アリールアルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化され得る。いくつかの態様において、ポリペプチドは、アミノ酸又はアミノ酸残基が、

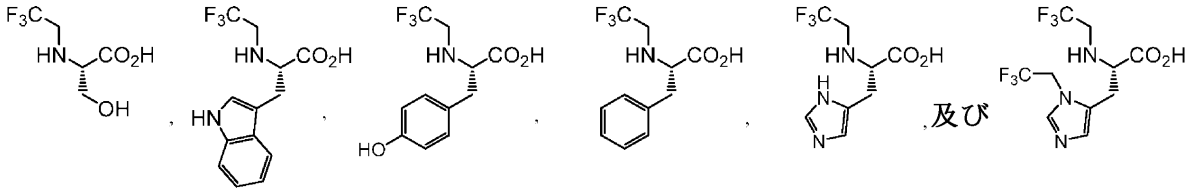




からなる群より選択され得る少なくとも１つのアミノ酸残基を含む。

【００２４】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、構造：



を有する誘導体化されたアミノ酸、その塩、又は溶媒和物を含む。

【００２５】

ポリペプチドを誘導体化する方法も提供される。いくつかの態様において、遊離アミノ基を含むポリペプチドを誘導体化する方法は、誘導体化されたアミノ酸を、誘導体化されたアミノ酸の遊離カルボン酸がポリペプチドの遊離アミノ酸とアミド結合を形成する条件下でポリペプチドと接触させることを含む。

【００２６】

対象内の細胞又は組織を画像化する方法も可能である。いくつかの態様において、対象内の細胞又は組織を画像化する方法は、それを必要とする対象に、有効量の化学修飾されたポリペプチドを投与することを含み、ポリペプチドは、検出可能な同位元素によって標識されており、且つ／又は検出可能な標識にコンジュゲートされている。いくつかの態様において、検出可能な標識は、発色団、蛍光性基、生物発光基、化学発光基、又は放射性基を含み得る。

【００２７】

本発明は、対象におけるガストリノーマを特性決定する方法も含む。いくつかの態様において、対象におけるガストリノーマを特性決定する方法は、化学修飾されたポリペプチド（例えば、化学修飾されたセクレチンポリペプチドなど）を対象に投与することと、対象におけるガストリンの増加を検出し、それにより対象におけるガストリノーマの存在又は不存在を明らかにすることとを含み得る。

【００２８】

いくつかの態様において、ポリペプチドの修飾は、血漿成分への結合を増加させる。いくつかの態様において、血漿成分は、ビタミンＤ３結合タンパク質、アルブミン、又はトランスサイレチンであり得る。いくつかの態様において、化学修飾されたポリペプチドは、ＧＬＰ２ではない。

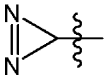
[本発明1001]

化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物であって、前記ポリペプチドが、以下の化学修飾：

（ｉ）前記ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第1内部アミド結合のＮＨ、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも1つが独立して、置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$アリール、置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルキニルによって誘導体化されること；並びに

（ｉｉ）前記Ｎ末端アミノ基及び前記Ｎ末端第1内部アミド結合からなる群より選択される少なくとも1つのＮＨ基が、Ｘによって誘導体化されること（ここで、各Ｘは、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（$CR_2$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、－ＯＲ、アルコキシ、$NH_2$、置換されていてもよいＮＨ（$C_1$～$C_{16}$アルキル）、及び置換されていてもよいＮ（$C_1$～$C_{16}$アルキル）（$C_1$～$C_{16}$アルキル）からなる群より独立に選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキルから選択される）のうちの少なくとも1つを有し、前記化学修飾されたポリペプチドが、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、本質的に同じ生物活性を有し且つ／又はタンパク質分解に対してより耐性がある、化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物。

[本発明1002]
前記タンパク質分解が、アシルペプチドヒドロラーゼ、ＤＰＰ4、ＤＰＰ2、ＤＰＰ8、ＤＰＰ9、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、Ｓ9Ｂファミリーオリゴプロピルペプチダーゼ、並びにＤＰＰ4及び／又はＤＰＰ2に対して50％以上の相同性を有するプロテアーゼからなる群より選択される少なくとも1つによって触媒される、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。
[本発明1003]
前記化学修飾されていないポリペプチドが、インクレチンを含む、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。
[本発明1004]
前記対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より高い血清中安定性を有する、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。
[本発明1005]
前記対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より長いインビボ半減期を有する、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。
[本発明1006]
前記対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、より高い血液脳関門透過性又はより高い経口バイオアベイラビリティを有する、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。
[本発明1007]
（ｉ）において、前記ポリペプチドが、少なくとも1つの非置換$C_1$～$C_6$アルキル、非置換$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、非置換$C_2$～$C_{16}$アルケニル、非置換アリール、又は非置換$C_2$～$C_{16}$アルキニルによって誘導体化されている、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。
[本発明1008]
（ｉ）において、前記ポリペプチドの前記Ｎ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、及び／又はチオール基のうちの1つ又は複数が独立して、置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルケニル、及び置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルキニルからなる群より独立に選択される第1置換基及び第2置換基によって誘導体化されており、前記第1置換基及び前記第2置換基が独立して、同一であるか又は同一でない、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。
[本発明1009]
（ｉ）において、前記Ｎ末端アミノ基が、置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルケニル、及び置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルキニルからなる群より独立に選択される第1置換基及び第2置換基によって誘導体化されており、前記第1置換基及び前記第2置換基が独立して、同一であるか又は同一でない、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。
[本発明1010]
（ｉ）において、前記アルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が独立して、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、$C_2$～$C_{16}$アルキニル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、$C_1$～$C_6$アルコキシ、アジド、ジアジリル



、－ＣＨＯ、1，3－ジオキソール－2－イル、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$（$C_1$～$C_6$アルキ

ル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）$_2$からなる群より独立に選択される少なくとも1つによって置換されており、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキルである、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明1011]

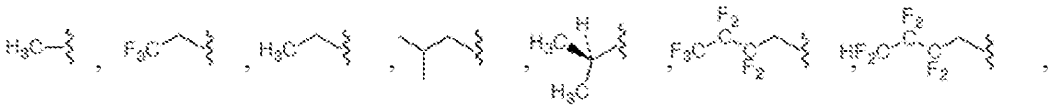
前記アルキル基が、ハロゲン化されたＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキルである、本発明1010の化学修飾されたポリペプチド。

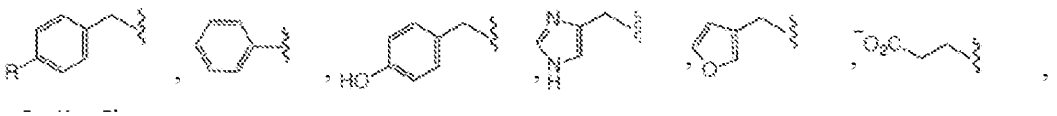
[本発明1012]

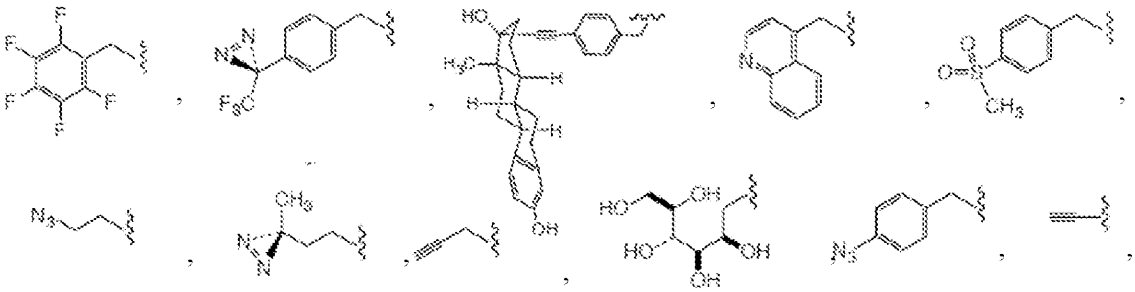
前記アルキル基が、2，2，2－トリフルオロエチルである、本発明1011の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明1013]

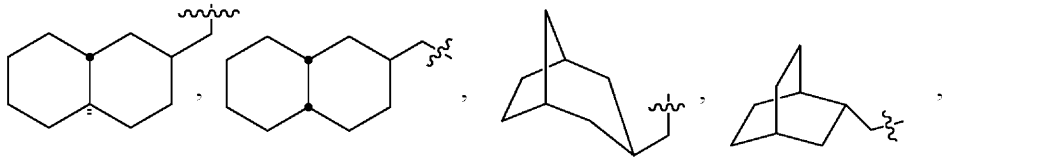
少なくとも1つのアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、又はアルキニル基が、

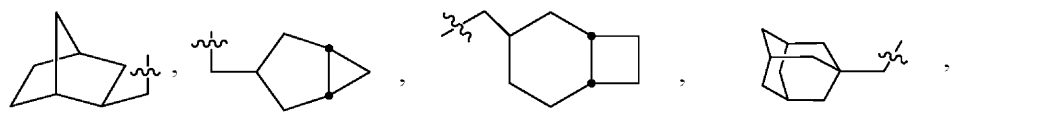


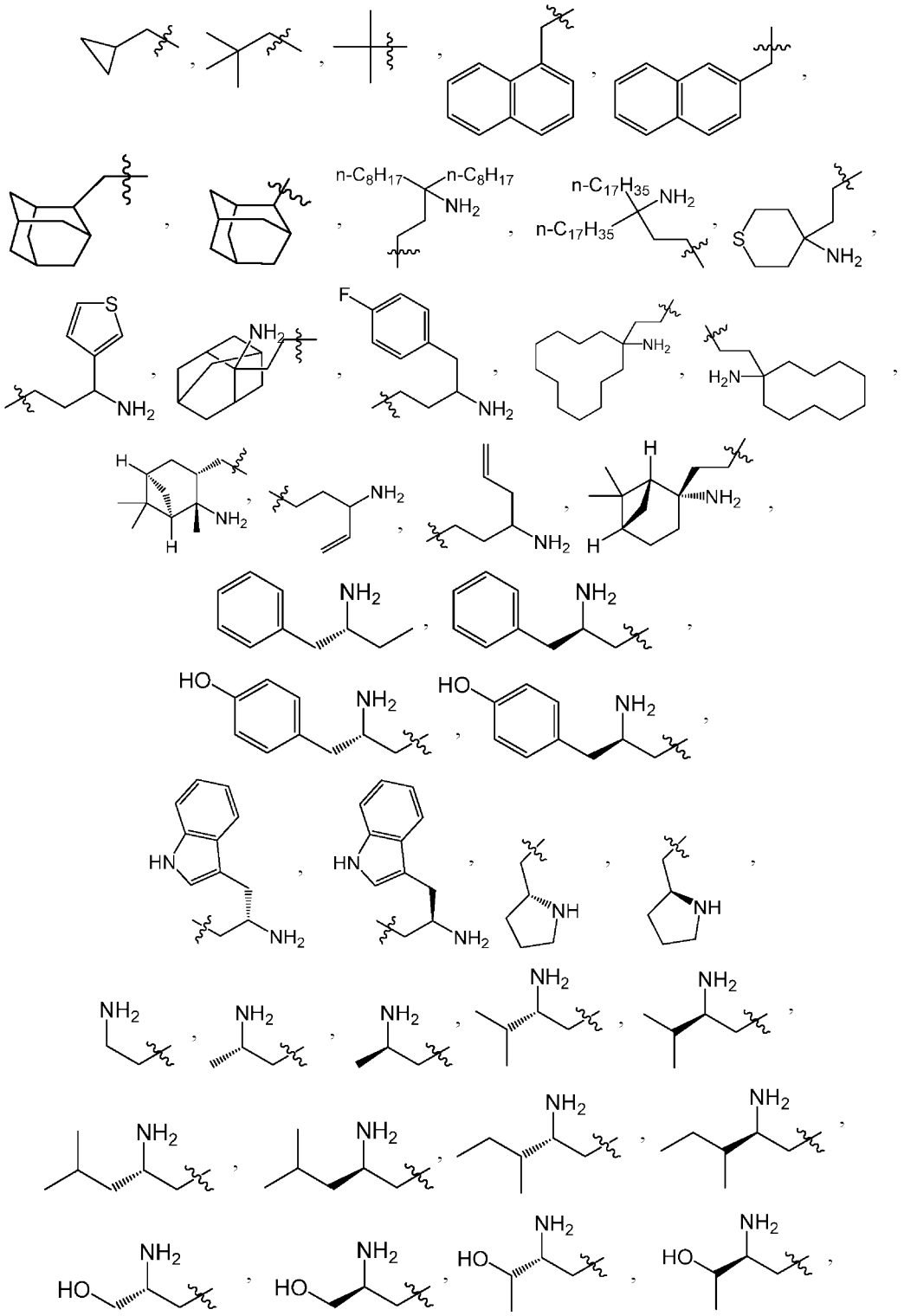


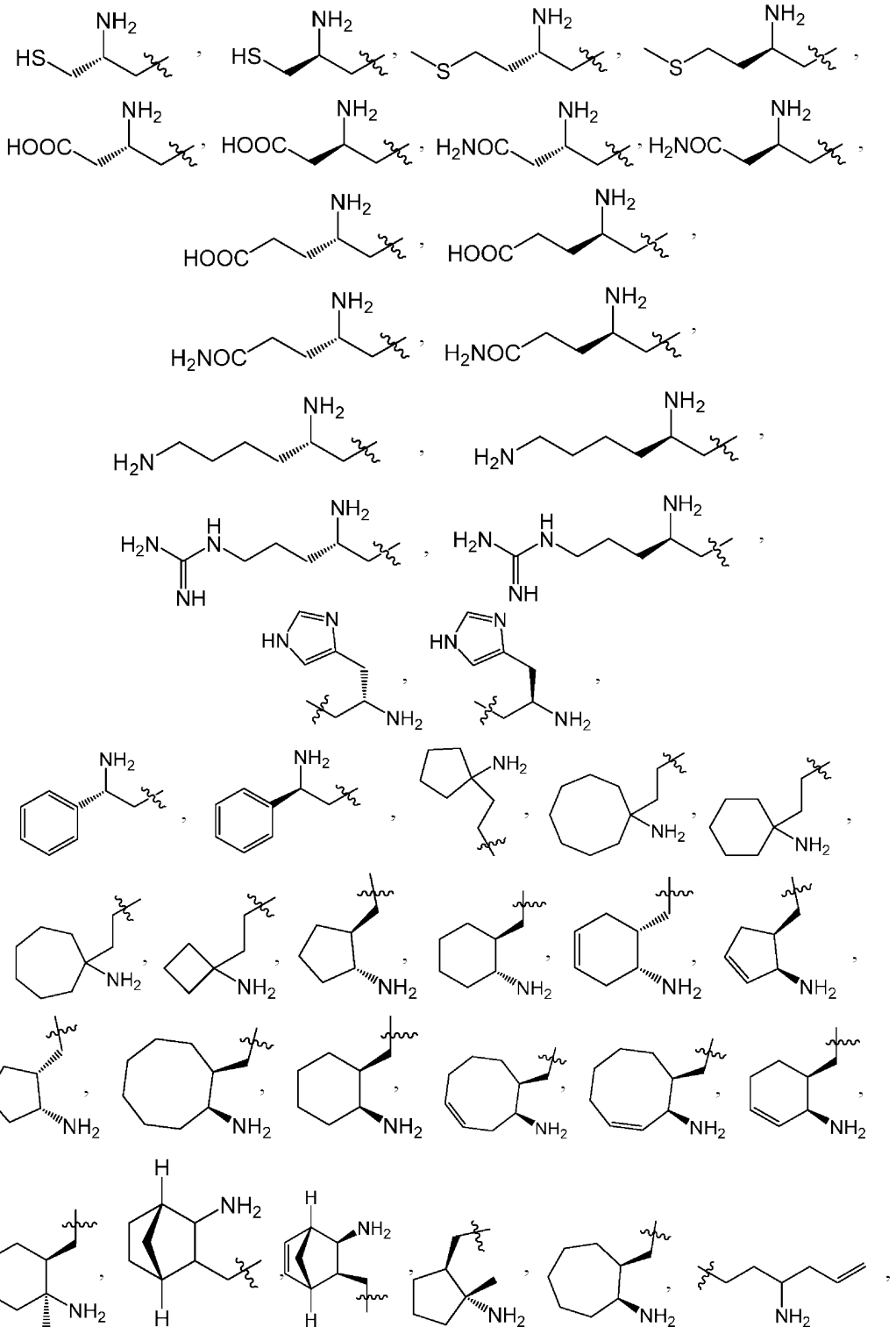


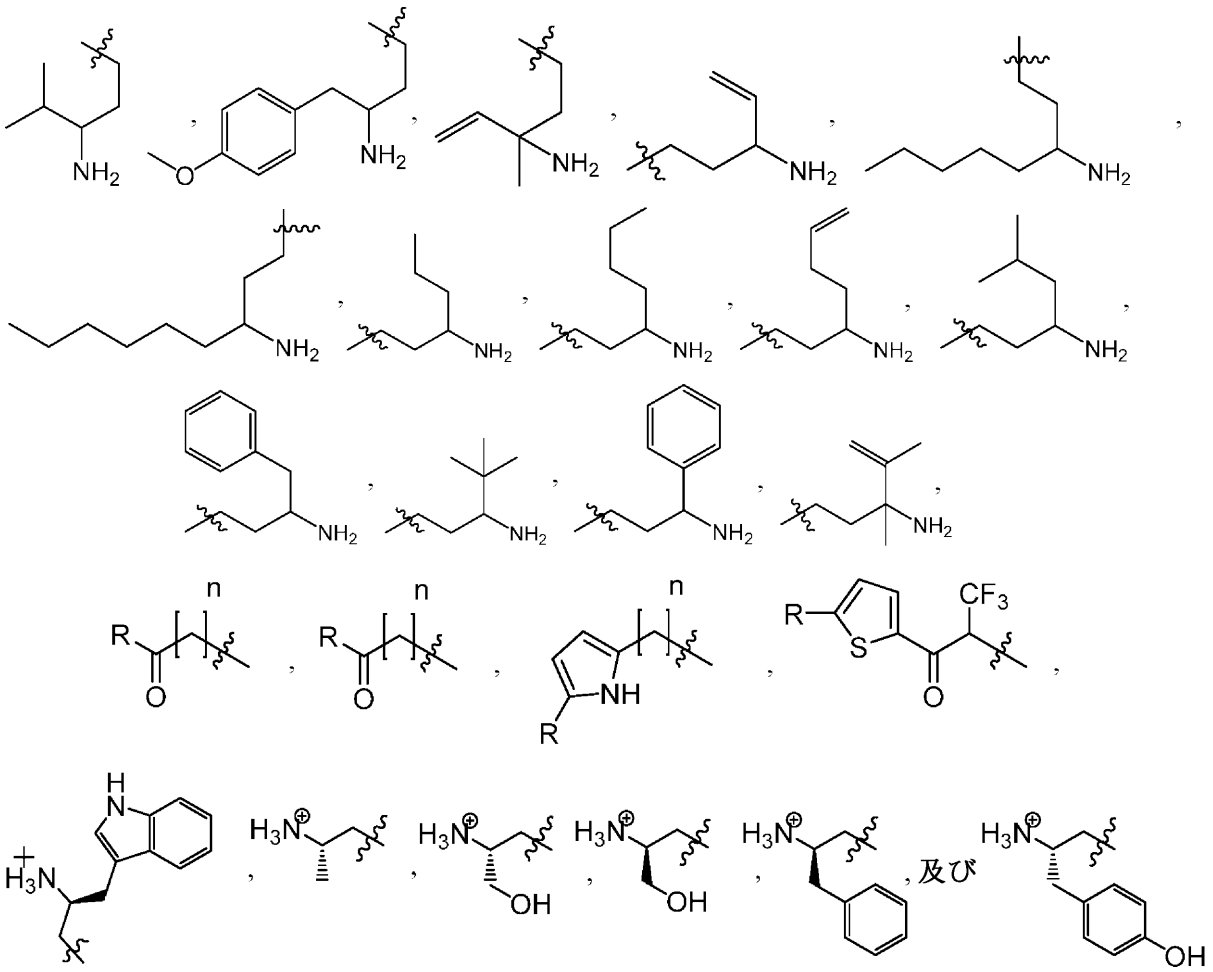












（式中、ｎは、１～６の範囲の整数であり、且つＲは、水素又は置換されていてもよいアルキル若しくはアリールである）からなる群より選択される、本発明１００１の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０１４]

少なくとも１つのアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が、２，２，２－トリフルオロ－１－エチル、２，２，３，３，３－ペンタフルオロ－１－プロピル、２，２，３，３，４，４，４－ヘプタフルオロ－１－ブチル、エチル、イソプロピル、ベンジル、置換されているベンジル、アダマンター１－イル－メチル、キノリン－４－イル－メチル、２－アミノ－１－プロピル、４－フェニル－ベンジル、１Ｈ－イミダゾール－４－イル－メチル、４－ヒドロキシ－ベンジル、４－［３－（トリフルオロメチル）－３Ｈ－ジアジリン］－ベンジル、及び（８Ｒ，９Ｒ，１３Ｓ，１４Ｒ）－３，１７－ジヒドロキシ－１３－メチル－７，８，９，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－デカヒドロ－６Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－１７－イル－エチニル－メチルからなる群より選択される、本発明１００１の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０１５]

約２４０Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている、本発明１００１の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０１６]

前記Ｎ末端アミノ基において、約１９０Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている、本発明１０１５の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０１７]

約３～約１００個のアミノ酸を含む、本発明１００１の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０１８]

約3～約49個のアミノ酸を含む、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。

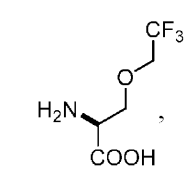
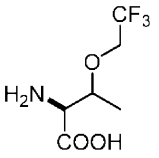
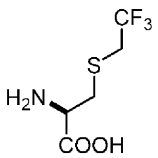
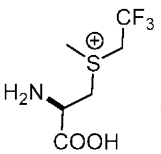
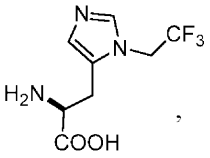
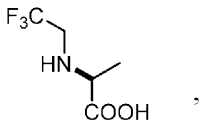
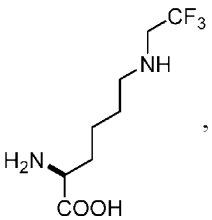
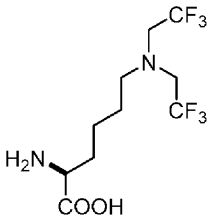
[本発明1019]

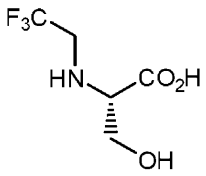
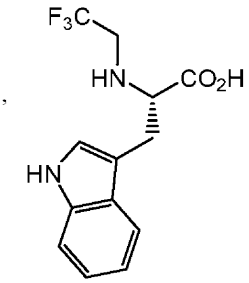
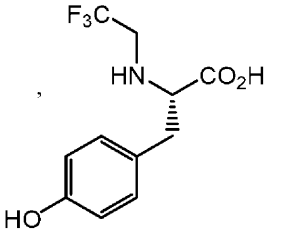
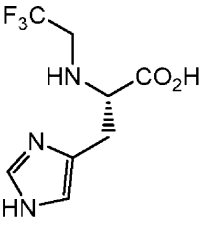
約80～約100個のアミノ酸を含む、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明1020]

少なくとも前記N末端アミノ基が、置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルキニルによって誘導体化されている、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明1021]


,

,

,

,

,

,

,

.


,

,

,及び


からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基を含む、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明1022]

前記ポリペプチドが、

ＧＬＰ－１
(H*AEGTFTS*DVS*S*YLEGQAAK*EFIAWLVK*GR)

;

エキセナチド
(H*GEGT*FT*S*DLS*KQM*EEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPPS*-$NH_2$)

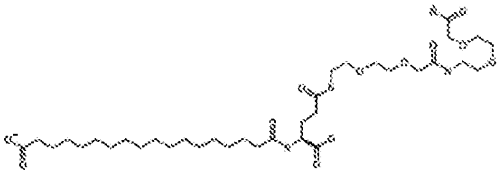
;

リラグルチド
(H*AEGT*FT*S*DVS*S*Y*LEGQAA-($N^6$- パルミトイルグルタミル)K*EFIAWLVRGRG)

;

セマグルチド
(H*AibEGT*FT*S*DVS*S*Y*LEGQAA-(X)K*EFIAWLVRGRG)

（配列中、リジンのε－アミノ基に結合したＸは、



である）；
タスポグルチド
(H*AibEGT*FT*S*DVS*S*YLEGQAAK*EFIAWLVK*AibR-$NH_2$)

；
リキシセナチド
(H*GEGT*FT*S*DLS*K*QM*EEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPS*K*K*K*K*K*K*K*-$NH_2$)

；
トリアゴニスト
(H*AibQGT*FT*S*D-(γ-E-$C_{16}$アシル)KS*K*YLDERAAQDFVQWLLDGGPS*S*GAPPPS*-$NH_2$)

；
エキセンディン
(H*GEGTFTS*DLS*KQMEEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPPS)

；
ＶＩＰ
(H*S*DAVFTDNYTRLRK*QMAVK*K*YLNS*ILN)

；
ＰＡＣＡＰ
(H*S*DGIFTDS*YS*RYRK*QMAVK*K*YLAAVLGK*RYKQRVK*NK*)

；
ＧＩＰ
(Y*AEGTFIS*DYS*IAMDK*IHQQDFVNWLLAQK*GK*K*NDWK*HNITQ)

；
Ｍｅｔ－エンケファリン
(Y*GGFM)

；
ＢＮＰ
(Y*PSKPDNPGEDAPAEDMARYYS*ALRHYINLITRQRY)

；
サブスタンスＰ
(R*PK*PQQFFGLM)

；
Ｔｙｒ－ＭＩＦ－１
(Y*LG)

；
Ｔｙｒ－Ｗ－ＭＩＦ－１
(Y*PWG)

；
グルカゴン
(H*SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT)

；
成長ホルモン放出ホルモン（ＧＨＲＨ）；
下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（ＰＡＣＡＰ）ＡＤＣＹＡＰ１；
グルカゴン（ＧＣＧ）；
胃抑制ポリペプチド（ＧＩＰ）；
セクレチン（ＳＣＴ）；
血管作動性腸管ペプチド（ＶＩＰ）；
ＯＸＭ（オキシントモジュリン）；
ＰＴＨ（副甲状腺ホルモン）；
ペプチドＹＹ３－３６及びペプチドＹＹ１－３６（ＰＹＹ）；
ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）；
ＶＩＰペプチド（血管作動性腸管ペプチド）；
ＧＬＰ－１＋ＧＩＰ；ＧＬＰ－１＋アミリン；ＧＬＰ－１＋ガストリン；ＧＬＰ－１＋エストロゲン；ＧＬＰ－１＋ＰＹＹ、ＧＬＰ－１＋コレシスチンキナーゼ（ＣＣＫ）からなる群より選択される少なくとも1つのデュアルアゴニスト；
ＧＬＰ－１Ｒ＋グルカゴンの受容体のデュアルアゴニスト；
混合アゴニスト；
アルビグルチド；
デュラグルチド；
他のＧＬＰ－１Ｒアゴニスト；
アミリン；
ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、並びに／又はＤＰＰ４及び／若しくはＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼの他の基質；
他の修飾によって安定化されたＧＬＰ－１アナログ；あるいは
前記配列のいずれかに対して少なくとも７５％の同一性を有する配列
からなる群より選択され、＊によって印を付けられた前記残基のうちの少なくとも1つが、Ｒによってアルキル化又はアシル化されている、本発明１００１の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０２３]
前記ポリペプチドの半減期が、前記対応する化学修飾されていないポリペプチドに対して少なくとも10倍増加している、本発明１００１の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０２４]
前記対応する化学修飾されていないポリペプチドの生物活性の少なくとも約５％を保持している、本発明１００１の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０２５]
副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）、ＰＹＹ３－３６、コレシストキニン、ＰＹＹ１－３６、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体1又は2、成長ホルモン放出因子、グルカゴン、エキセンディン、ＧＬＰ－１、胃抑制ペプチド、リラグルチド、プレアルブミン、ペプチドＨＩ－２７、ＰＡＣＡＰ、セクレチン、及び血管作動性腸管ペプチド（ＶＩＰ）からなる群より選択される化学修飾されたポリペプチドであって、
Ｎ末端アミノ基が、（ｉ）置換されていてもよい$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{16}$アルキル、置換されていてもよい$Ｃ_{3}$～$Ｃ_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{16}$アルケニル、及び置

換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルからなる群より選択される1つ、又は（ｉｉ）置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、→Ｏ、－ＯＨ、アルコキシ、ＮＨ$_2$、ＮＨ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及びＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より選択される1つ、によって誘導体化されており、

前記誘導体化が、前記ポリペプチドを、対応する化学修飾されていないタンパク質に対して前記ポリペプチドの生物活性を低下させることなく、アシルアミノ酸遊離酵素、ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、ＤＰＰ８、ＤＰＰ９、全Ｓ９Ｂファミリーオリゴプロピルペプチダーゼ、並びにＤＰＰ４及び／又はＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼからなる群より選択される少なくとも1つによる分解に対して安定化させる、

化学修飾されたポリペプチド。

[本発明１０２６]

本発明１００１～１０２５のいずれかの少なくとも1種のポリペプチドを含む、薬学的に許容できる組成物。

[本発明１０２７]

本発明１００１～１０２５のいずれかの少なくとも1種のポリペプチドを投与することを含む、少なくとも1種の疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、前記疾患又は障害が、短腸症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、禁煙、神経変性、アルツハイマー病、パーキンソン病、先天性高インスリン血症、低血糖、糖尿病、体重増加、肥満、及び代謝症候群からなる群より選択される、方法。

[本発明１０２８]

ポリペプチドのインビボ半減期を、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して増加させる方法であって、

（ｉ）前記ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第1内部アミド結合のＮＨ基、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも1つの置換基を化学修飾することであって、各化学修飾が、前記置換基を、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$アリール、置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化することを独立に含む、化学修飾すること、並びに

（ｉｉ）前記Ｎ末端アミノ基及び前記ＮＨから選択される少なくとも1つの置換基を化学修飾することであって、前記置換基を基Ｘによって誘導体化することを独立に含み、Ｘは、それぞれの場合において独立して、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（ＣＲ$_2$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、アルコキシ、ＮＨ$_2$、ＮＨ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及びＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキルから選択される、化学修飾することのうちの少なくとも1つを含む、方法。

[本発明１０２９]

ポリペプチドの血液脳関門透過性又は経口バイオアベイラビリティを、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して改善する方法であって、

（ｉ）前記ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第1内部アミド結合のＮＨ基、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも1つの置換基を化学修飾することであって、各化学修飾が、前記置換基を、置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_3$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_2$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化することを独立に含む、化学修飾すること、並びに

（ｉｉ）前記Ｎ末端アミノ基及び前記ＮＨから選択される少なくとも1つの置換基を化学修飾することであって、前記置換基を基Ｘによって誘導体化することを独立に含み、Ｘは、それぞれの場合において独立して、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（ＣＲ$_2$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、アル

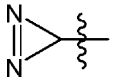
コキシ、$NH_2$、NH（$C_1$～$C_{16}$アルキル）、及びN（$C_1$～$C_{16}$アルキル）（$C_1$～$C_{16}$アルキル）からなる群より選択され、式中、Rは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキルから選択される、化学修飾することのうちの少なくとも1つを含む、方法。

[本発明1030]

（ｉ）において、前記ポリペプチドが、少なくとも1つの非置換$C_1$～$C_6$アルキル、非置換$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、非置換$C_2$～$C_{16}$アルケニル、又は非置換$C_2$～$C_{16}$アルキニルによって誘導体化される、本発明1027～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

（ｉ）において、前記アルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が独立して、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、$C_2$～$C_{16}$アルキニル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、$C_1$～$C_6$アルコキシ、アジド、ジアジリル



、－ＣＨＯ、1，3－ジオキソール－2－イル、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ヘテロシクリル、アリール、置換されていてもよいフェニルのヘテロアリール、置換されていてもよいベンジルのヘテロアリール、置換されていてもよい－（$CR_2$）$_{1～6}$－フェニルのヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（$C_1$～$C_6$アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）$_2$（式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又は$C_1$～$C_{16}$アルキルである）からなる群より独立に選択される少なくとも1つによって置換されている、本発明1027～1029のいずれかの方法。

[本発明1032]

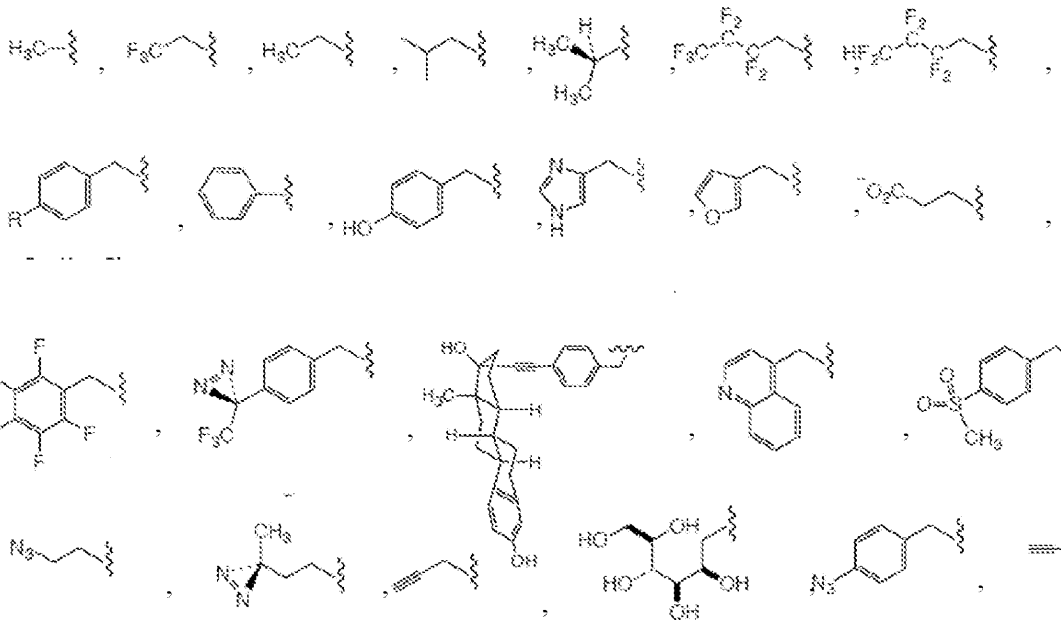
前記アルキル基が、ハロゲン化$C_1$～$C_6$アルキルである、本発明1033～1036のいずれかの方法。

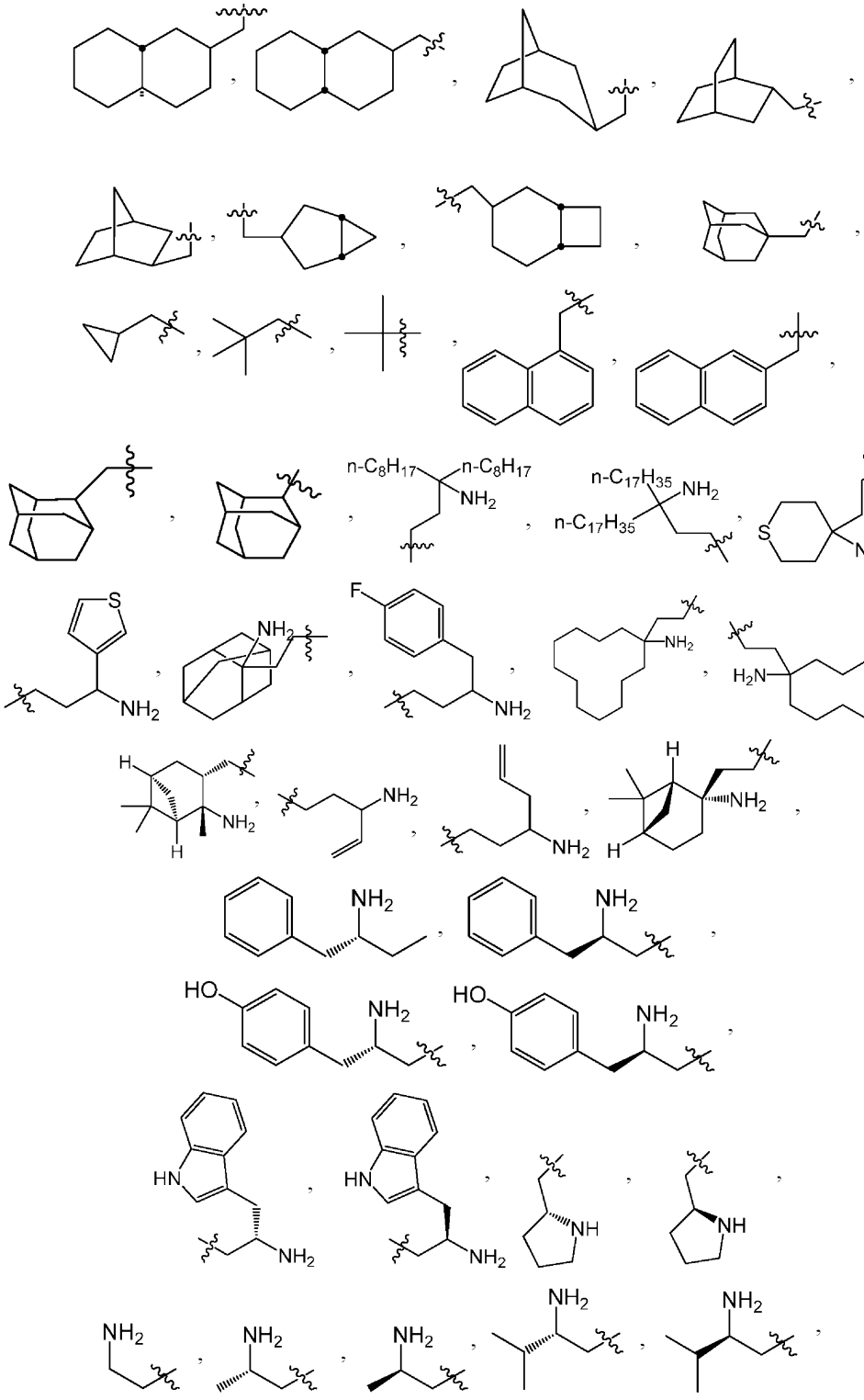
[本発明1033]

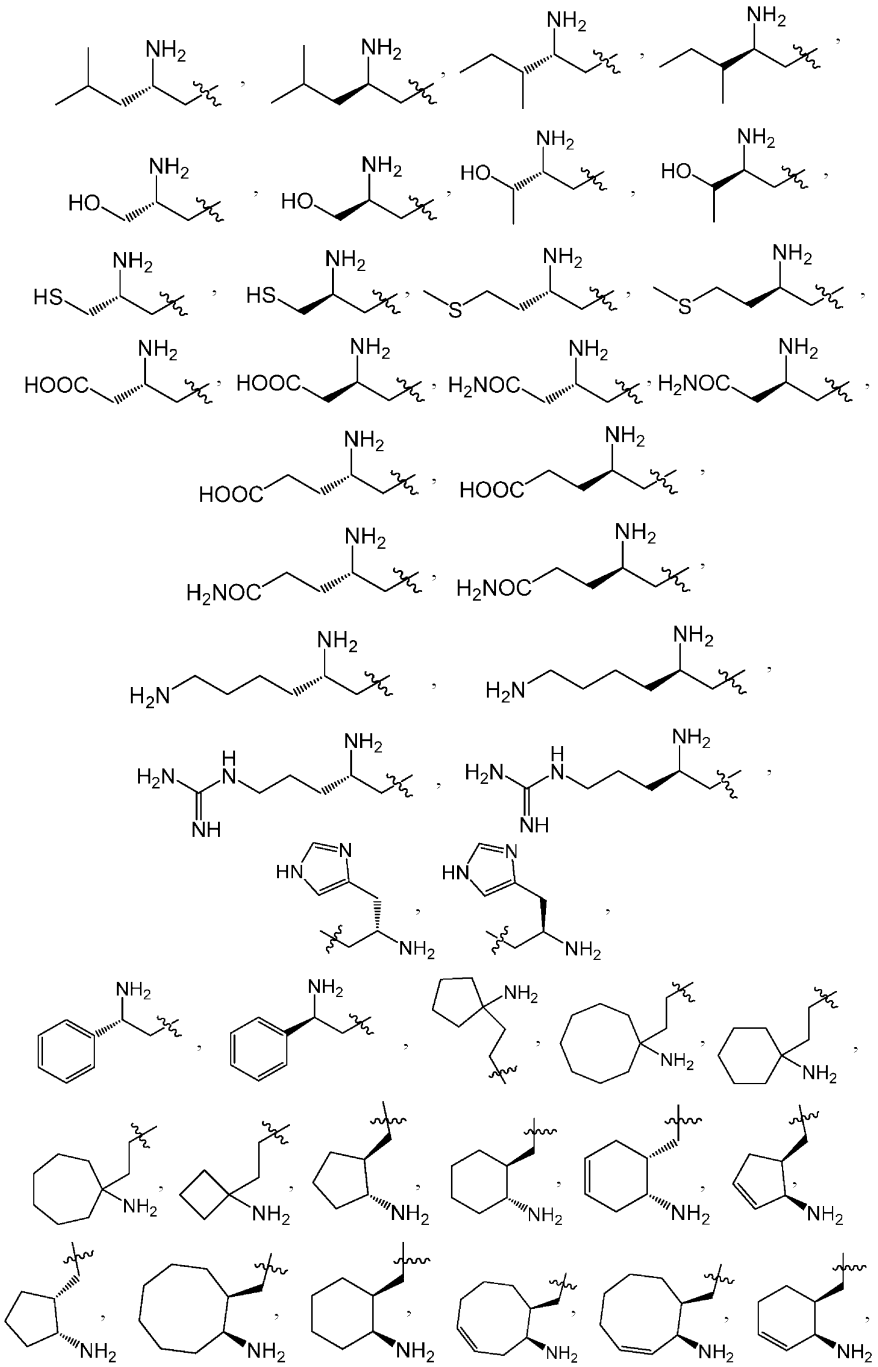
前記アルキル基が、2，2，2－トリフルオロエチルである、本発明1033～1036のいずれかの方法。

[本発明1034]

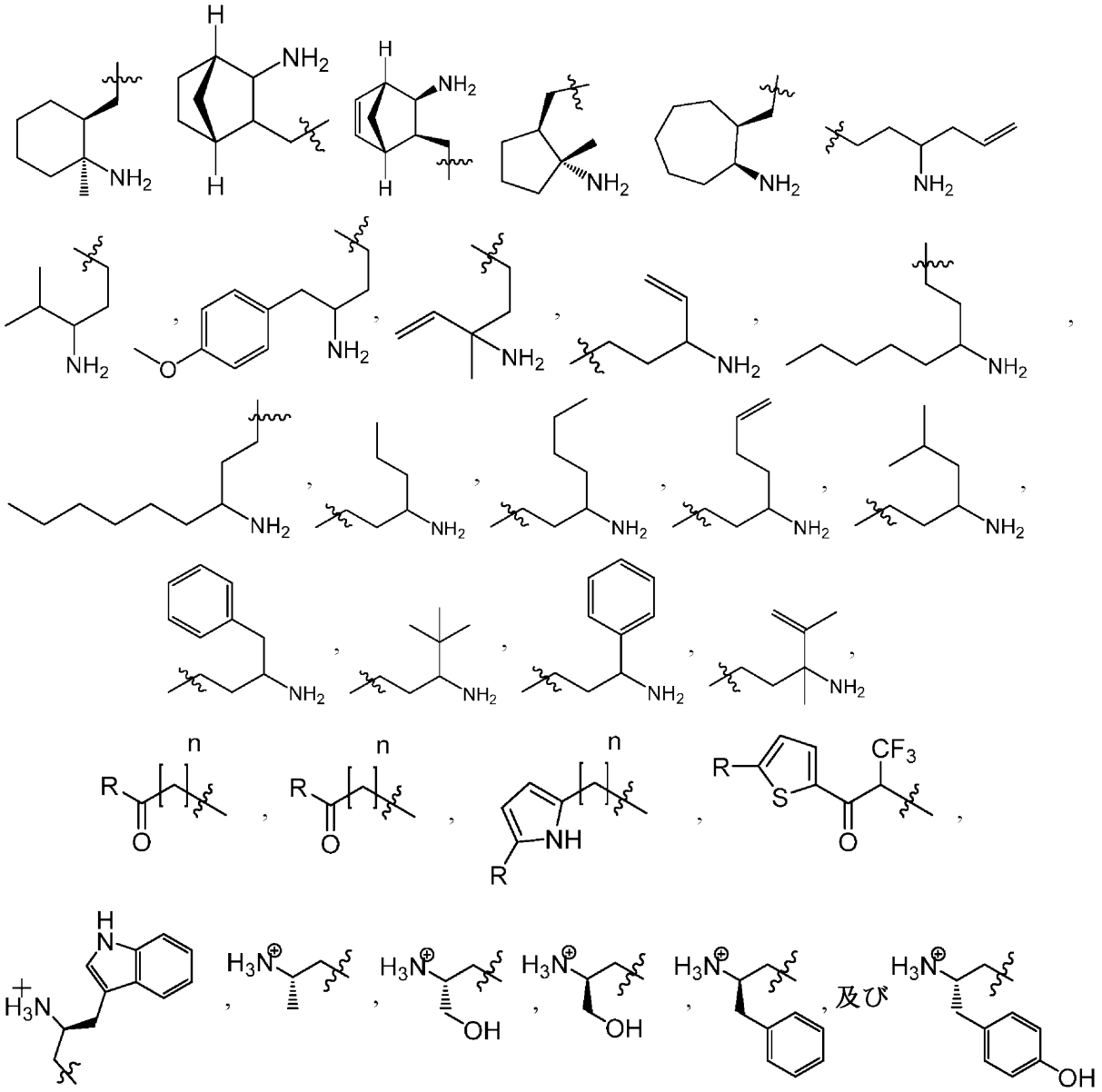
前記少なくとも1つのアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が、




n-C8H17
n-C8H17
NH2
n-C17H35
NH2
n-C17H35
S
NH2
S
NH2
F
NH2
NH2
H2N
H
NH2
H
NH2
NH2
NH2
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HN
NH2
HN
NH2
NH
NH
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2



, , , , .



（式中、ｎは、１～６の範囲の整数であり、且つＲは、置換されていてもよいアルキル又は置換されていてもよいアリールである）からなる群より選択される、本発明１０３３～１０３６のいずれかの方法。

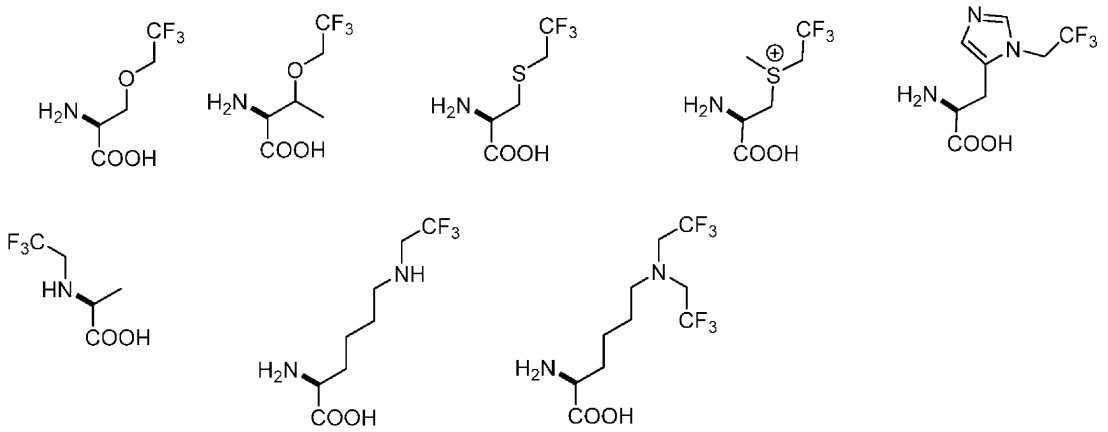
[本発明１０３５]

少なくとも1つのアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基が、２，２，２－トリフルオロ－１－エチル、２，２，３，３，３－ペンタフルオロ－１－プロピル、２，２，３，３，４，４，４－ヘプタフルオロ－１－ブチル、エチル、イソプロピル、ベンジル、置換されているベンジル、アダマンター１－イル－メチル、キノリン－４－イル－メチル、２－アミノ－１－プロピル、４－フェニル－ベンジル、１Ｈ－イミダゾール－４－イル－メチル、４－ヒドロキシ－ベンジル、４－［３－（トリフルオロメチル）－３Ｈ－ジアジリン］－ベンジル、及び（８Ｒ，９Ｒ，１３Ｓ，１４Ｒ）－３，１７－ジヒドロキシ－１３－メチル－７，８，９，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－デカヒドロ－６Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－１７－イル－エチニル－メチルからなる群より選択される、本発明１０２７～１０２９のいずれかの方法。

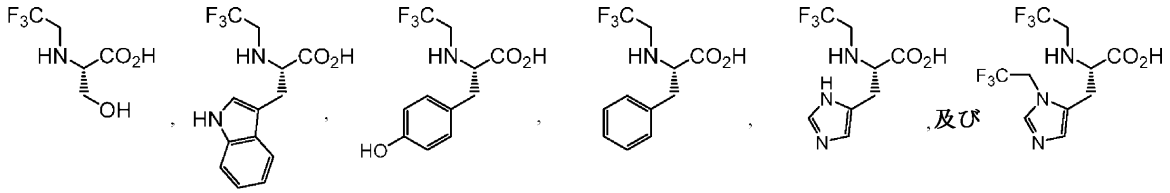
[本発明１０３６]

前記ポリペプチドが、約２４０Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている、本発明１０２７～１０２９のいずれかの方法。

[本発明1037]
前記ポリペプチドが、前記N末端アミノ基において、約240Å$^3$以下の体積を占める基によって化学修飾されている、本発明1027～1029のいずれかの方法。
[本発明1038]
前記ポリペプチドが、約5～約100個のアミノ酸を含む、本発明1027～1029のいずれかの方法。
[本発明1039]
前記ポリペプチドが、約3～約49個のアミノ酸を含む、本発明1027～1029のいずれかの方法。
[本発明1040]
前記ポリペプチドが、約80～約100個のアミノ酸を含む、本発明1027～1029のいずれかの方法。
[本発明1041]
少なくとも前記N末端アミノ基が、置換されていてもよい$C_1$～$C_{16}$アルキル、置換されていてもよい$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよい$C_2$～$C_{16}$アルキニルによって誘導体化される、本発明1027～1029のいずれかの方法。
[本発明1042]
前記ポリペプチドが、



からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基を含む、本発明1027～1029のいずれかの方法。
[本発明1043]
前記ポリペプチドが、構造：



を有する誘導体化されたアミノ酸、その塩、又は溶媒和物を含む、本発明1027～1029のいずれかの方法。
[本発明1044]
遊離アミノ基を含むポリペプチドを誘導体化する方法であって、本発明1043の誘導体化されたアミノ酸を、前記誘導体化されたアミノ酸の遊離カルボン酸が前記ポリペプチドの遊離アミノ酸とアミド結合を形成する条件下で前記ポリペプチドと接触させることを含む、方法。
[本発明1045]

対象内の細胞又は組織を画像化する方法であって、それを必要とする前記対象に、有効量の本発明1001～1026のいずれかのポリペプチドを投与することを含み、前記ポリペプチドが、検出可能な同位元素によって標識されており、且つ／又は検出可能な標識にコンジュゲートされている、方法。

[本発明1046]

前記検出可能な標識が、発色団、蛍光性基、生物発光基、化学発光基、又は放射性基を含む、本発明1045の方法。

[本発明1047]

対象におけるガストリノーマを特性決定する方法であって、前記対象に、本発明1024の化学修飾されたセクレチンポリペプチドを投与することと、前記対象におけるガストリンの増加を検出することとを含み、それにより前記対象におけるガストリノーマの存在又は不存在が決定される、方法。

[本発明1048]

前記修飾が、血漿成分への結合を増加させる、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明1049]

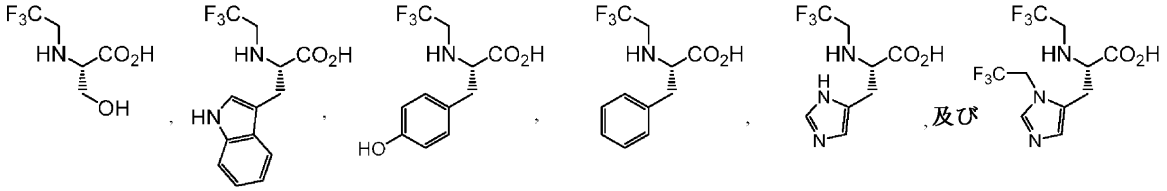
前記血漿成分が、ビタミンD3結合タンパク質、アルブミン、又はトランスサイレチンである、本発明1048の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明1050]

ＧＬＰ2ではない、本発明1048の化学修飾されたポリペプチド。

[本発明1051]

構造：




を有する誘導体化されたアミノ酸、その塩、又は溶媒和物を含む、本発明1001の化学修飾されたポリペプチド。

【図面の簡単な説明】

【００２９】

本発明の具体的な態様の以下の詳細な説明は、添付図面と共に読まれる場合によりよく理解されるであろう。本発明を説明する目的で、具体的な態様が図面に示されている。しかし、本発明が、図面に示されている態様の精密な配置及び道具に限定されないことが理解されるべきである。

【００３０】

【図１】図１は、ＳＰＰＳにおいて同じバッチの樹脂から同時に得られた天然及び修飾されたＧＬＰ－１バリアントのＨＰＬＣトレースを与える。２つの生成物は、試薬１ａによるＧＬＰ－１の直接樹脂上（ｄｉｒｅｃｔ　ｏｎ－ｒｅｓｉｎ）アルキル化（図２及び４参照）により観察され、１つ（Ｇ－４）または２つ（「ビス－Ｇ－４」）のいずれかのＣＨＣＦ$_3$基によるＧＬＰ－１のＮ末端装飾物に相当する。後者の場合、第２のアルキル化は、Ｈｉｓのπ窒素で起こる。ペプチドは、ＧＬＰ－１受容体に対してアッセイされる（図３）前に純度９５％超に精製された。図６による命名法は以下の通りである：Ｇ－１（未修飾ＧＬＰ－１）；Ｇ－２（Ａｃ－ＧＬＰ－１）；Ｇ－４（モノ－Ｃ２－ＧＬＰ－１）。「ビス－Ｃ２－ＧＬＰ－１」は、２つのＣＨ$_2$ＣＦ$_3$部分がＮ末端ヒスチジンに結合したＧＬＰ－１である。

【図２】図２は、例示的なフルオロアルキル化スキームの概略図を与える。三価ヨードニウム塩は遊離アミンと配位し、塩基を添加すると、アルキル化反応が引き起こされる。生じたトリフルオロエチル官能基は非反応性であり、その存在下において、側鎖の異なる化

学修飾を樹脂上でも樹脂から離れても実施できる。合成の最後に、ペプチドは樹脂から切断され、通常通り後処理される。

【図３】図３は、天然及びフルオロアルキル修飾されたＧＬＰ－１（図６による命名法では「Ｇ－４」）の例示的な安定性アッセイのデータを与える。簡潔に言うと、ＨＥＫ２９３細胞を、１ウェルあたり２～３×$10^3$細胞の密度で透明底の白色９６ウェルプレートに播種し、約８０％コンフルエントまで２日間増殖させた。次いで、リポフェクタミン試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用し、（１）ＧＰＣＲ（又はエンプティ発現ベクター）；（ｉｉ）ｃＡＭＰ応答配列－ルシフェラーゼレポーター遺伝子（$CRE_{6X}$－ｌｕｃ）、及び（ｉｖ）対照としてのβ－ガラクトシダーゼをコードするｃＤＮＡにより、細胞を一過性にトランスフェクトさせた。細胞を、選択されたペプチドアゴニストと共に又はなしで血清不含培地中において６時間インキュベートした。Ｓｔｅａｄｙｌｉｔｅ試薬（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）を使用してルシフェラーゼ活性を定量化した。次いで、酵素基質２－ニトロフェニルβ－ｄ－ガラクトピラノシドを加えた後、β－ガラクトシダーゼアッセイを実施した。３７℃での３０～６０分間のインキュベーション後、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘマイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を利用して４２０ｎＭでＯＤを測定することにより、基質切断を定量化した。上段：天然ＧＬＰ－１は、ＤＰＰ４とのインキュベーション後に分解され、ＤＰＰ４とのインキュベーションなしのＧＬＰ－１と比べて顕著な効力低下が生じている。下段：対照的に、Ｇ－４は、ＤＰＰ４により誘導される分解に対して耐性がある。

【図４】図４は、本発明の方法において有用な試薬の合成を示す概略図を与える。

【図５】図５は、ＧＬＰ－１が、ジペプチドＨＡをＮ末端から切断する酵素ＤＰＰ４により迅速に不活性化されることを示す画像の組を与える。左：アミノ末端ＨＡジペプチド断片を失った不活性ペプチドを示す図。右：ＤＰＰ４と共に３７℃で一晩インキュベートされたＧＬＰ－１及びＧ－４（酵素作用により変わらないＮ－トリフルオロエチルアナログ）のＥＳＩ　ＬＣ－ＭＳ分析。

【図６Ａ－１】図６Ａは、本発明の特定のアナログの化学構造の概略表示を与える。Ｘは、番号により表されるＮ末端での部分に対応する。全未修飾ペプチドはＸ＝１（水素に対応；例えば、未修飾ＧＬＰ－１＝Ｇ－１）を有する。本文及び他の図において使用される略記の命名法は以下の通りである：Ｇ－Ｘ（ＧＬＰ－１アナログ）；Ｉ－Ｘ（ＧＩＰアナログ）；ＧＣＧ－Ｘ（グルカゴンアナログ）；ＤＡ－Ｘ（デュアルアゴニストアナログ）；ＴＡ－Ｘ（トリアゴニストアナログ）；Ｌｉｒａ－Ｘ（リラグルチドアナログ）；ＥＸＥ－Ｘ（エキセンディンアナログ）；オキシ－Ｘ（オキシントモジュリンアナログ）；ＧＨ２９－Ｘ又はＧＨ４４－Ｘ（成長ホルモン放出ホルモンアナログ）。

【図６Ａ－２】図６Ａ－１の説明を参照のこと。

【図６Ａ－３】図６Ａ－１の説明を参照のこと。

【図６Ｂ－１】図６Ｂは、本発明のＧＬＰ－２アナログの化学構造の概略表示を与える。Ｘは、番号により表されるＮ末端での部分に対応する。Ｎ末端で修飾されていないペプチドは、Ｘ＝１（水素に対応；例えば、未修飾ＧＬＰ－２＝ＧＬＰ２－１）を有する。アナログのいくつかは、リジン置換及びこの部位での脂質－リンカー部分の結合によりさらに修飾されている。ＧＬＰ－２における当該修飾がなされる部位の例にはＬ１７及びＮ２４があり、結合の例にはｌ１、ｌ２、又はｌ３がある。ガテックスは、Ａ２Ｇ置換を含む既成のＧＬＰ－２ベースの薬物である。

【図６Ｂ－２】図６Ｂ－１の説明を参照のこと。

【図７】図７は、一晩のＤＰＰ４インキュベーションあり又はなしのリラグルチド及びＬｉｒａ－４（図６参照、Ｎ－トリフルオロエチル修飾されたリラグルチドに対応）の濃度反応曲線を示すグラフを与える。これらの条件下で９８％超のリラグルチドは分解されたが、Ｌｉｒａ－４は影響を受けないままであった。対応するＥＣ５０値はｐＭで示されている。

【図８】図８は、特定のＧＬＰ－１アナログの（ＤＰＰ４と共に又はなしでインキュベートされた）安定性アッセイの例示的な結果をまとめた表を与える。

【図９】図９Ａは、特定のＧＬＰ－１又はＧＩＰの（ＤＰＰ４、ＤＰＰ２又はＦＡＰと共に又はなしでインキュベートされた）安定性アッセイの例示的な結果をまとめた表を与える。天然のＧＬＰ－１（Ｇ－１）及びＧＩＰ（Ｉ－４）が酵素暴露により大幅な効力低下（ＥＣ５０の増加により反映される）を示す一方、対応するアルキル化アナログ（それぞれＧ４及びＩ４）は同じ条件下で安定である。

【図９Ａ】図９Ｂは、天然ＧＬＰ－２（ＧＬＰ２－１）がＤＰＰ４により分解される一方、トリフルオロエチル装飾されたアナログ（ＧＬＰ２－４）が分解に対して完全に耐性を有することを示す表を与える。ペプチドをビヒクル又は組換え型ＤＰＰ４と共にインキュベートした。次いで、ＧＬＰ２－１及びＧＬＰ２－４の段階希釈物を、ヒトＧＬＰ－２Ｒ及びｃＡＭＰ応答レポーター遺伝子をコードするｃＤＮＡによりトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞に適用した。ＤＰＰ４は、ＧＬＰ－２のＥＣ５０の大幅な増加（効力低下を示す）を誘導したが、それはＧＬＰ２－４誘導体には観察されなかった。

【図９Ｂ】図９Ｃは、選択されたＮ末端装飾がＧＬＰ－１において許容されることを示す表を与える。化合物の効力は、ＧＬＰ－１受容体及びｃＡＭＰ応答ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するＨＥＫ２９３細胞におけるバイオアッセイで評価した。

【図１０Ａ】図１０Ａ～１０Ｄは、アセチルＧＬＰ－１（＝「Ｇ－２」；図１０Ａ）、エチルＧＬＰ－１（＝「Ｇ－５」；図１０Ｂ）、イソブチルＧＬＰ－１（＝「Ｇ－６」；図１０Ｃ）及びＣ－フェニルＧＬＰ－１（＝「Ｇ－１１」；図１０Ｄ、図６の命名法）の（ＤＰＰ４と共に又はなしで一晩インキュベートされた）安定性アッセイを反映する一連のグラフを与える。「ＯＮ」：一晩インキュベーション。対応するＥＣ５０値はｐＭで示されている。

【図１０Ｂ】図１０Ａの説明を参照のこと。

【図１０Ｃ】図１０Ａの説明を参照のこと。

【図１０Ｄ】図１０Ａの説明を参照のこと。

【図１１】図１１は、例示的なＧＬＰ－１アナログを示す概略図を与える。括弧中の命名法は図６を指す。

【図１２】図１２は、未修飾ＧＩＰ対ＣＨＣＦ$_3$－ＧＩＰ（化合物Ｉ－４）の（ＤＰＰ４と共に又はなしでインキュベートされた）安定性アッセイの結果を示す一連のグラフを与える。未修飾ペプチドがＤＰＰ４により分解される一方、Ｉ－４はこの酵素に対して耐性がある。ＥＣ５０値はｐＭで示されている。

【図１３】図１３は、未修飾グルカゴン対ＣＨＣＦ$_3$－グルカゴン（化合物ＧＣＧ－４）の（ＤＰＰ４と共に又はなしでインキュベートされた）安定性アッセイの結果を示す一連のグラフを与える。未修飾ペプチドがＤＰＰ４により分解される一方、ＧＣＧ－４はこの酵素に対して耐性がある。ＥＣ５０値はｐＭで示されている。

【図１４】図１４は、未修飾エキセンディン（Ｅｘｅ）対ＣＨＣＦ$_3$－エキセンディン（化合物ＥＸＥ－４）の（ＤＰＰ４と共に又はなしでインキュベートされた）安定性アッセイの結果を示すグラフを与える。未修飾エキセンディンがＤＰＰ４分解に対して検出可能な感受性を示す一方、化合物Ｅｘｅ－４はこの酵素に対して完全に耐性がある。ＥＣ５０値はｐＭで示されている。

【図１５】図１５は、ＣＨＣＦ$_3$によりＮ末端で装飾されているトリアゴニスト（「Ｆ－ＴＡ」又は図６のＴＡ－４）が、ＧＬＰ－１、ＧＩＰ、及びグルカゴン受容体を類似の効力で同時活性化することを示すグラフを与える。ＥＣ５０値はｐＭで示されている。

【図１６】図１６は、セクレチンファミリーペプチドのＮ末端で見出されるアミノ酸に対してなされる修飾を示す概略図を与える。

【図１７】図１７は、種々の荷電した修飾の分子構造を示す概略図を与える。

【図１８】図１８は、ＧＬＰ－１（左図）対ＣＨＣＦ$_3$－ＧＬＰ－１（右図；図６中のＧ－４）の酵素分解に対する感受性を比較する一連のグラフを与える。これらのペプチドの活性を、酵素なし（対照）又はＤＰＰ４、ＤＰＰ９又はＦＡＰのいずれかと共に一晩インキュベーションした後、ＧＬＰ－１受容体を発現している細胞におけるルシフェラーゼアッセイにより測定した。未修飾ＧＬＰ－１とは対照的に、Ｇ－４誘導体は、酵素により誘

導される効力低下に対して耐性がある（濃度反応曲線の右側へのシフトがない）。
【図１９】図１９は、天然のＧＨＲＨ（上段）対ＣＨＣＦ$_3$－ＧＨＲＨ（「Ｃ２－ＧＨＲＨ」、下段、図６の化合物ＧＨ２９－４）の酵素分解に対する感受性を比較する一連のグラフを与える。新鮮なストックとして、又はＤＰＰ４と共に若しくはなしで一晩（Ｏ／Ｎ）のインキュベーション後に試験されたこれらのペプチドの活性を、ＧＨＲＨ受容体（ＧＨＲＨＲ）を発現している細胞におけるルシフェラーゼアッセイにより測定した。天然のＧＨＲＨとは対照的に、ＧＨ２９－４誘導体は、酵素により誘導される効力低下に対して耐性がある（濃度反応曲線の右側へのシフトがない）。
【図２０】図２０は、ＧＬＰ－２及びＧＬＰ－２Ｒの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）の相互作用のヘリカルホイール図を与える。予測される細胞外ドメインは灰色の楕円として示されている。黒の矢印は修飾された部位を指し、白の矢印は提案される将来の修飾を指す（アルギニン置換；リンカー及び脂質の結合；図６Ａ参照）。Ｌ１７Ｋ及びＮ２４Ｋ修飾／アシル化は、Ｎ末端修飾と組み合わせて既に試験された。脂質－リンカー部分を結合するための他の可能性のある修飾部位には、Ｉ１３位、Ｒ２０位、Ｉ２７位、及びＩ３１位がある。
【図２１】図２１は、天然のＧＬＰ－２はＤＰＰ４により分解される一方、トリフルオロエチル装飾されているアナログ（ＧＬＰ２－４）は分解に対して完全に耐性があることを示す一連のグラフを与える。ペプチドを組換え型ＤＰＰ４と共にインキュベートした。次いで、ＧＬＰ－２及びＧＬＰ２－４の段階希釈液を、ヒトＧＬＰ－２Ｒ及びｃＡＭＰ応答レポーター遺伝子をコードするｃＤＮＡによりトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞に加えた。ＤＰＰ４は、４０分の１を超えるＧＬＰ－２効力の低下を誘発し、９７％より多くのペプチドが分解したことを反映している。対照的に、ＧＬＰ２－４では効力低下が全く認められなかった。Ｎ＝４、平均＋ＳＥＭ。
【図２２】図２２Ａは、リラグルチドか、ＣＨＣＦ$_3$装飾されている誘導体Ｌｉｒａ－４のいずれかのボーラス注射後の血漿中での薬物の活性の時間依存的な低減を比較するグラフを与える。ラットは、いずれかの薬物のボーラス注射を中心カテーテルにより受け、それに続いて、示されている間隔後に連続採血及び受容体活性化作用のバイオアッセイによる血漿中での薬物の活性の測定を行った。注射直後の各ペプチドの効力を１００％と定義した。リラグルチドの血漿中残存は、Ｌｉｒａ－４のＣＨＣＦ$_3$修飾により延長される。
【図２２Ａ】図２２Ｂは、経口耐糖能試験後のＬｉｒａ－４の持続的な血糖降下活性を示す。マウスは、ビヒクル、Ｇ－４、リラグルチド又はＬｉｒａ－４のいずれか（バーの各群で左から右に表示）の皮下注射を受けた。３０分後及び５．５時間後、２回の連続的な経口グルコース負荷を強制経口投与により与えた。血糖値を薬物注射の直前（－３０分）及びグルコース負荷後の示されている時間間隔で測定した。化合物Ｇ－４の単回の注射は、第１のグルコース負荷後の血糖変動を弱め、数時間後に依然として活性があり、第２のグルコース曝露を弱めた。
【図２３】図２３Ａは、図６Ａに示されているフッ素化／アシル化されたＧＬＰ－２アナログであるＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４のインビボでの延長された生物活性を表すグラフを与える。この化合物のクリアランスを既存のＧＬＰ－２ベースの薬物ガテックスのクリアランスと比較した。化合物（１．２５μｇ）をマウスに皮下注射（ｓ．ｃ．）した。２４時間後に血漿を回収し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによりＧＬＰ－２Ｒアゴニスト活性に関して分析した。
【図２３Ａ】図２３Ｂ～Ｄは、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４（或いは、これらの図でｏＴＴｘ－８８と呼ばれる）が腸の粘膜成長を誘導することを示す。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに１日１回５日間、ビヒクル、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４又はガテックスのいずれかを、示されている投与量で皮下注射した。動物を６日目に犠死させ、それに続いて腸組織の分析を行った。図２３Ｂは、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４（ｏＴＴｘ－８８）が腸の重量を増大させることを表している。Ｎ＝６動物／群、平均±ＳＥＭ。＊ビヒクルに対してｐ＜０．０５。
【図２３Ｂ】図２３Ｃは、粘膜切片のヘマトキシリン及びエオシン染色により実施された

組織学画像を与える。
【図２３Ｃ】図２３Ｄは、ビヒクル又はＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４（ｏＴＴｘ－８８）により処置されたマウス（１日あたりの投薬は２５μｇ／マウスであった）における絨毛の高さの定量化を示すグラフを与える。Ｎ＝６動物／群、平均±ＳＥＭ。＊＊ビヒクルに対してｐ＜０．０１。
【発明を実施するための形態】
【００３１】
発明の詳細な説明
本発明は、概して、未修飾ペプチドの生物活性を保持しながらタンパク質分解に耐える修飾されたペプチド、そのような修飾されたペプチドを合成する方法、及び修飾されたペプチドを特徴とする治療方法を提供する。
【００３２】
本発明は、少なくとも部分的に、ポリペプチドの特定の化学修飾が、その生物活性を著しく変えることなく、インビトロ又はインビボでタンパク質分解に対するその耐性を改善するという発見に基づくものである。
【００３３】
特定の態様において、化学修飾は、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、ポリペプチド中のＮ末端アミノ酸と次のアミノ酸との間で形成されるアミド結合（すなわちＮ末端第１内部アミド結合）のＮＨ、ポリペプチドの他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基の誘導体化を含み、ここで、誘導体化は、アルキル化、シクロアルキル化、アルケニル化、又はアルキニル化を含む。他の態様において、ポリペプチドを修飾する少なくとも１つのアルキル、アルケニル、又はアルキニル基のそれぞれは、独立に非置換又は置換されている。さらに他の態様において、ポリペプチドを修飾するアルキル、アルケニル、又はアルキニル基のうちの少なくとも１つは、インビボ代謝に対して不活性である。
【００３４】
特定の態様において、Ｎ末端アミノ基及び／又はＮ末端第１内部アミド結合のＮＨの化学修飾は、ＮＨのＮＸによる置換を含み、ここで、Ｘは、それぞれの場合において独立して、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（ＣＲ$_2$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、－ＯＲ、アルコキシ、ＮＨ$_2$、置換されていてもよいＮＨ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及び置換されていてもよいＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよいＣ$_1$～Ｃ$_6$アルキルから選択される。
【００３５】
特定の態様において、本発明の化学修飾されたポリペプチドは、対応する化学修飾されていないポリペプチドに比べて改善された性質を有し、ここで、性質は、ｌｏｇ Ｐ、ＣＮＳへの透過性、生体吸収、腎クリアランス、有効性（受容体刺激）、送達／製剤、貯蔵安定性（非プロテアーゼ媒介性）、溶解度、凝集／オリゴマー化する傾向が低いこと、チトクロムＰ４５０及び他の酵素に対する耐性、他の薬物（Ｃ４アゴニスト、メラノコルチンＭＣ４受容体、及び／又はセロトニンなど）と組み合わせて使用される能力、低減した免疫原性、投与経路、及び薬物動態パラメーターからなる群より選択される少なくとも１つである。
【００３６】
本開示が、本明細書に開示されている配列、及び本明細書に開示されている配列に少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性を有する配列を企図することが理解されるべきである。
【００３７】
本明細書に記載される通り、本発明は、最低限の化学修飾を利用して、ポリペプチドにおけるタンパク質分解耐性を増加させる新規方法を提供する。特定の態様において、２，２，２－トリフルオロエチル基がポリペプチド中のＮ末端アミノ基及び／又は他のアミノ

基、及び／又はチオール基、及び／又はチオエーテル基に化学結合される。化学修飾されたＮ末端アミノ基は、良好なタンパク質分解安定性を有することが知られているＮ末端アセチル化アナログと同様に生理学的ｐＨで荷電しない。２，２，２－トリフルオロエチル基は化学的に不活性である。アセチル基と異なり、２，２，２－トリフルオロエチル基は、インビボでの酵素プロセスにより除去されない。Ｎ－２，２，２－トリフルオロエチルＧＬＰ－１に関する例示的な結果は、細胞ベースのアッセイにおいて結合及び活性の低下が全くないことを示し、これは、活性がＧＬＰ－１と比べて約１０～５０分の１であるＮ－アセチル－ＧＬＰ－１と顕著に対照的である。

【００３８】

特定の態様において、本発明のＧＬＰ－１アナログは、低血糖のリスクが低く、心臓保護及び神経保護効果を有し、脳内のＧＬＰ－１Ｒを刺激して、投与された対象の食欲を低下させた。他の態様において、本発明のＧＬＰ－１アナログは、投与された対象において、体重の減少若しくは維持を促進し、又は体重増加を予防する。

【００３９】

定義

他に定義されない限り、本明細書に使用される全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者により通常理解される意味と同じ意味を全般的に有する。以下の参考文献は、本発明に使用される用語の多くの一般的な定義を当業者に与える：Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（２ｎｄ Ｅｄ．１９９４）；Ｔｈｅ Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｗａｌｋｅｒ，Ｅｄ．，１９８８）；Ｔｈｅ Ｇｌｏｓｓａｒｙ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，５ｔｈ Ｅｄ．，Ｒ．Ｒｉｅｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．（Ｅｄｓ．），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ（１９９１）；及びＨａｌｅ＆Ｍａｒｈａｍ，Ｔｈｅ Ｈａｒｐｅｒ Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９１）。一般的に、本明細書で使用される命名法並びに医薬、有機化学、及びポリマー化学における実験手法は、当技術分野において周知であり通常利用されているものである。

【００４０】

本明細書では、冠詞「１つの（ａ）」及び「１つの（ａｎ）」は、１つ又は２つ以上（すなわち少なくとも１つ）のその冠詞の文法的な対象を指す。例として、「要素」は、１つの要素又は２つ以上の要素を意味する。

【００４１】

本明細書では、用語「約」は、当業者により理解され、使用される状況である程度変わる。本明細書では、量、持続時間などの測定可能な値に言及する場合、用語「約」は、明示された値から±２０％又は±１０％、より好ましくは±５％、さらにより好ましくは±１％、なおより好ましくは±０．１％の変動を包含することが意味され、なぜなら、そのような変動は、開示されている方法を実施するのに適切であるからである。

【００４２】

本明細書では、用語「投与」は、あらゆる好適な方法により、本発明の化合物及び／又は組成物を対象に与えることを意味する。

【００４３】

本明細書では、用語「Ａｉｂ」は２－アミノイソ酪酸を指す。

【００４４】

本明細書では、単独又は他の用語と組み合わせて使用される用語「アルケニル」は、特記されない限り、述べられた数の炭素原子を有する安定なモノ不飽和又はジ不飽和の直鎖又は分岐鎖の炭化水素基を意味する。例には、ビニル、プロペニル（又はアリル）、クロチル、イソペンテニル、ブタジエニル、１，３－ペンタジエニル、１，４－ペンタジエニル、並びにより高級の同族体及び異性体がある。アルケンを表す官能基は－$CH_2$－$CH$＝$CH_2$により例示される。

【００４５】

本明細書では、単独又は他の用語と組み合わせて使用される用語「アルコキシ」は、特記されない限り、分子の残りの部分に酸素原子により結合する、先に定義された指定された数の炭素原子を有するアルキル基、例えば、メトキシ、エトキシ、１－プロポキシ、２－プロポキシ（イソプロポキシ）、並びにより高級の同族体及び異性体を意味する。好ましいものは、非限定的にエトキシ及びメトキシなどの（$C_1$～$C_3$）アルコキシである。

【００４６】

本明細書では、それ自体で又は別の置換基の一部としての用語「アルキル」は、特記されない限り、指定された数の炭素原子を有する（すなわち、$C_1$～$C_{10}$は、１～１０個の炭素原子を意味する）直鎖又は分岐鎖の炭化水素を意味し、直鎖、分岐鎖、又は環式置換基を含む。例には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、及びシクロプロピルメチルがある。最も好ましいのは、非限定的にエチル、メチル、イソプロピル、イソブチル、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、及びシクロプロピルメチルなどの（$C_1$～$C_6$）アルキルである。

【００４７】

本明細書では、単独又は他の用語と組み合わせて使用される用語「アルキニル」は、特記されない限り、述べられた数の炭素原子を有する安定な直鎖又は分岐鎖の炭素－炭素三重結合を有する炭化水素基を意味する。非限定的な例には、エチニル及びプロピニル、並びにより高級の同族体及び異性体がある。用語「プロパギル」は、$-CH_2-C\equiv CH$により例示される基を指す。用語「ホモプロパギル」は、$-CH_2CH_2-C\equiv CH$により例示される基を指す。用語「置換されているプロパギル」は、$-CR_2-C\equiv CR$により例示される基を指し、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ、アルキル、置換されているアルキル、アルケニル又は置換されているアルケニルであるが、但し、少なくとも１つのＲ基が水素でないことを条件とする。用語「置換されているホモプロパギル」は、$-CR_2CR_2-C\equiv CR$により例示される基を指し、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ、アルキル、置換されているアルキル、アルケニル、又は置換されているアルケニルであるが、但し、少なくとも１つのＲ基が水素でないことを条件とする。

【００４８】

「改善する」とは、疾患又は障害の発生又は進行を低減させる、抑制する、弱める、少なくする、阻止する、又は安定化することを意味する。

【００４９】

本明細書では、「アミノ酸」は、後掲の表に示されている通り、その正式名称、三文字略号、及びそれに対応する一文字略号により表される。アミノ酸の構造及びそれらの略語は、Ｓｔｒｙｅｒ，１９８８，“Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ”，３ｄ Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋなどの化学文献にも見出すことができる。

【００５０】

本明細書では、用語「芳香族」は、１つ又は複数の多価不飽和環を有し、芳香族性、すなわち（４ｎ＋２）非局在化π（パイ）電子を有する（式中、ｎは整数である）炭素環又は複素環を指す。

【００５１】

本明細書では、単独又は他の用語と組み合わせて使用される用語「アリール」又は「アレーン」は、特記されない限り、１つ又は複数の環（典型的には、１、２、又は３つの環）を含み、そのような環がビフェニルなどのペンダント方式で共に結合していても、ナフタレンなどの縮合していてもよい炭素環式芳香族系を意味する。例には、フェニル、アントラシル、及びナフチル（１－及び２－ナフチルを含む）がある。好ましいものは、フェニル及びナフチルであり、最も好ましいものはフェニルである。

【００５２】

本明細書では、用語「アリール－（$C_1$～$C_3$）アルキル」は、１～３炭素アルキレン

鎖がアリール基に結合した官能基、例えば、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－フェニル又は－ＣＨ$_2$－フェニル（ベンジル）を意味する。好ましいものは、アリール－ＣＨ$_2$－及びアリール－ＣＨ（ＣＨ$_3$）－である。用語「置換されているアリール－（Ｃ$_1$～Ｃ$_3$）アルキル」は、アリール基が置換されているアリール－（Ｃ$_1$～Ｃ$_3$）アルキル官能基を意味する。好ましいものは、置換されているアリール（ＣＨ$_2$）－である。同様に、用語「ヘテロアリール－（Ｃ$_1$～Ｃ$_3$）アルキル」は、１～３炭素アルキレン鎖がヘテロアリール基に結合している官能基、例えば、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－ピリジルを意味する。好ましいものは、ヘテロアリール－（ＣＨ$_2$）－である。用語「置換されているヘテロアリール－（Ｃ$_1$～Ｃ$_3$）アルキル」は、ヘテロアリール基が置換されているヘテロアリール－（Ｃ$_1$～Ｃ$_3$）アルキル官能基を意味する。好ましいものは、置換されているヘテロアリール－（ＣＨ$_2$）－である。

【００５３】

一局面において、対象に関連する用語「共投与される」及び「共投与」は、対象に、本発明の化合物及び／若しくは組成物、又はその塩を、本発明において企図される疾患のいずれかをやはり治療し得る化合物及び／又は組成物と共に投与することを指す。一態様において、共投与される化合物及び／又は組成物は、別々に又は単一の治療手段の一部としてあらゆる種類の組み合わせで投与される。共投与される化合物及び／又は組成物は、種々の固体製剤、ゲル剤、及び液体製剤の下で固体と液体の混合物として、及び液剤として、あらゆる種類の組み合わせで製剤化され得る。

【００５４】

本明細書では、用語「含む」、「含有する」、「有する」などは、米国特許法においてそれらに帰される意味を有し得、「包含する」、「包含している」などを意味し得る。同様に、「から本質的になる」は、米国特許法において帰される意味を有し得、用語は開放型であり、列挙されるものの基本的又は新規な特性が、列挙されるものより多いものの存在により変化しない限り、列挙されるものより多いものの存在を可能にするが、先行技術態様を除外する。

【００５５】

本明細書では、用語「組成物」又は「薬学的組成物」は、本発明において有用である少なくとも１種の化合物と薬学的に許容できる担体との混合物を指す。薬学的組成物は、対象への化合物の投与を容易にする。

【００５６】

本明細書では、それ自体又は別の置換基の一部としての用語「シクロアルキル」は、特記されない限り、指定された数の炭素原子を有する（すなわち、Ｃ$_3$～Ｃ$_6$は、３～６個の炭素原子からなる環基を含む環式基を意味する）単環式又は多環式鎖炭化水素を意味し、直鎖、分岐鎖、又は環式置換基を含む。本明細書では、用語「シクロアルキル」は、シクロアルケニル及びシクロアルキニル化合物をさらに含む。例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルがある。一例は、非限定的にシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシルなどの（Ｃ$_3$～Ｃ$_6$）シクロアルキルである。シクロアルキルは、デカリン、ビシクロデカン、ビシクロオクタン、ビシクロヘプタン、ビシクロヘキサン、アダマンチル、及び他の多環式アルキル基をさらに含む。

【００５７】

本明細書では、用語「δ」はデルタ（ｐｐｍ）を指す。

【００５８】

「減少/低減する」とは、少なくとも約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、又はそれを超える負の変化を意味する。

【００５９】

「検出する」は、検出すべき分析物の存在、非存在、又は量を特定することを指す。

【００６０】

「疾患」又は「障害」とは、細胞、組織、又は器官の正常な機能にダメージを与えるか

又は該機能を妨害するあらゆる病態を意味する。

【００６１】

本明細書では、「アシルペプチドヒドロラーゼ」とも呼ばれる用語「アシルアミノ酸遊離酵素」は、ヒトにおいてＡＰＥＨ遺伝子によりコードされる酵素を指す。その酵素はアシルペプチドヒドロラーゼであり、優先的には小さいアセチル化ペプチドからの末端アセチル化アミノ酸の加水分解を触媒する。

【００６２】

本明細書では、用語「ＤＭＳＯ」はジメチルスルホキシドを指す。

【００６３】

本明細書では、用語「ＤＰＰ２」はジペプチジルプロテアーゼ２を指す。

【００６４】

本明細書では、用語「ＤＰＰ４」はジペプチジルプロテアーゼ４を指す。

【００６５】

本明細書では、用語「ＤＰＰ８」はジペプチジルプロテアーゼ８を指す。

【００６６】

本明細書では、用語「ＤＤＰ９」はジペプチジルプロテアーゼ９を指す。

【００６７】

本明細書では、用語「ＦＡＰ」は線維芽細胞活性化タンパク質を指し、セプラーゼとしても知られる。

【００６８】

本明細書では、用語「Ｓ９Ｂファミリー」は全Ｓ９Ｂオリゴプロピルペプチダーゼを指す。

【００６９】

本明細書では、用語「ビタミンＤ結合タンパク質」はｇｃ－グロブリンを指す。ヒト血清アルブミン及びα－フェトプロテインと共に、アルブミン遺伝子ファミリーに属する。ビタミンＤ結合タンパク質は、血漿、腹水、脳脊髄液中、及び多くの細胞型の表面上に存在する多機能性タンパク質である。

【００７０】

本明細書では、「トランスフェリン」は、体液中の遊離鉄のレベルを制御する鉄結合血漿糖タンパク質を指す。ヒトトランスフェリンはＴＦ遺伝子によりコードされる。

【００７１】

本明細書では、用語「ＧＨＲＨ」は成長ホルモン放出ホルモンを指す。この遺伝子は、いくつかのグルカゴンファミリーのタンパク質をコードする。コードされたプレプロタンパク質は視床下部で産生され、切断されてソマトリベリンとして知られる成熟因子を生成し、それは脳下垂体からの成長ホルモン放出を刺激するように作用する。ソマトリベリンのバリアント受容体は数種の腫瘍に見出されており、これらの受容体のアンタゴニストは腫瘍の成長を阻害できる。例示的なＧＨＲＨアミノ酸配列はＮＣＢＩリファレンスナンバーＡＡＢ３７７５８．１で利用可能であり、以下に提供される。

```
  1 desaclqaae empnttlgcp atwdgllcwp tagsgewvtl pcpdffshfs sesgavkrdc
 61 titgwsepfp pypvacpvpl ellaeeesyf stvkiiytvg hsisivalfv aitilvalrr
121 lhcprnyvht qlfttfilka gavflkdaal fhsddtdhcs fstvlckvsv aashfatmtn
181 fswllaeavy lncllastsp ssrrafwwlv lagwglpvlf tgtwvsckla fedia
```

YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSR-アミド

YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL-アミド

【００７２】

本明細書では、用語「ＧＨＲＨＲ」は、成長ホルモン放出ホルモンの受容体を指す。

【００７３】

本明細書では、用語「ＧＬＰ－１」は、神経ペプチドでありプログルカゴン遺伝子の転写産物から誘導されるインクレチンである、グルカゴン様ペプチド－１を指す。生物活性

のある形態のＧＬＰ－１は、ＧＬＰ－１－（７－３７）及びＧＬＰ－１－（７－３６）ＮＨ$_2$である。これらのペプチドは、プログルカゴン分子の選択的切断から生じる。ＧＬＰ－１は強力な血糖降下ホルモンであり、グルカゴン分泌を抑制しながら、グルコースの上昇に応答して、膵臓のβ細胞を、ホルモンインスリンを放出するように誘導する。例示的なＧＬＰ－１アミノ酸配列は以下に与えられる。
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-COOH (GLP1 7-37酸)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-$NH_2$ (GLP-1 7-36アミド)

【００７４】
本明細書では、用語「ＧＬＰ－２」はグルカゴン様ペプチド－２を指す。ＧＬＰ－２は、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）を遊離するプロセスにおいてプログルカゴンの特異的な翻訳後タンパク質分解性切断により生じる。腸のＧＬＰ－２は、栄養素摂取時にＧＬＰ－１と同時に分泌される。ＧＬＰ－２の活性は、腸の成長、腸の機能の増大、骨破壊の減少、及び神経保護を含み得る。ＧＬＰ－２及び関連するアナログは、短腸症候群、クローン病、骨粗鬆症の治療法として、がん化学療法における補助療法としてあり得る。例示的なＧＬＰ－２アミノ酸配列は以下に与えられる。
HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD

【００７５】
本明細書では、用語「ＰＡＣＡＰ」は下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドを指す。
【００７６】
本明細書では、用語ＰＹＹ（ペプチドＹＹ３－３６及びまたＹＹ１－３６）は、ペプチドチロシンを指すか、或いは膵臓ペプチドＹＹ３－３６は、ヒトにおいてＰＹＹ遺伝子によりコードされているペプチドである。
【００７７】
本明細書では、用語「ＧＣＧ」はグルカゴンを指す。
【００７８】
本明細書では、用語「ＧＩＰ」は胃抑制ポリペプチドを指す。
【００７９】
本明細書では、用語「ＳＣＴ」はセクレチンを指す。
【００８０】
本明細書では、用語「ＶＩＰ」は血管作動性腸管ペプチドを指す。
【００８１】
「有効量」とは、未治療の患者に対して疾患の症状を改善するのに要する化合物の量を意味する。疾患の治療的処置のために本発明を実施するために使用される活性化合物の有効量は、投与の様式、対象の年齢、体重、及び全般的な健康により様々である。最終的には、担当医又は獣医が適切な量及び投与計画を決定する。そのような量は「有効」量と称される。
【００８２】
「断片」とは、ポリペプチド又は核酸分子の一部を意味する。この一部は、好ましくは、参照核酸分子又はポリペプチドの全長の少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、又は９０％を含む。断片は、約５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、又は１，０００ヌクレオチド又はアミノ酸を含み得る。
【００８３】
本明細書では、用語「ＧＬＰ－１」は、グルカゴン様ペプチド－１又はその配列に対し

て７５％同一性、好ましくは少なくとも９０％同一性を有するペプチドを指す。
【００８４】
本明細書では、用語「ＧＬＰ－２」は、グルカゴン様ペプチド－２又はその配列に対して７５％同一性、好ましくは少なくとも９０％同一性を有するペプチドを指す。
【００８５】
本明細書では、単独又は別の置換基の一部として利用される用語「ハロ」又は「ハロゲン」は、特記されない限り、フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素原子、好ましくは、フッ素、塩素、又は臭素、より好ましくは、フッ素又は塩素を意味する。
【００８６】
本明細書では、それ自体又は別の用語と組み合わされた用語「ヘテロアルキル」は、特記されない限り、述べられた数の炭素原子と、Ｏ、Ｎ、及びＳからなる群より選択される１つ又は２つのヘテロ原子とからなる安定な直鎖又は分岐鎖のアルキル基であって、その窒素及び硫黄原子が任意で酸化されていてもよく、その窒素ヘテロ原子が任意で四級化されていてもよい、直鎖又は分岐鎖のアルキル基を意味する。ヘテロ原子は、ヘテロアルキル基の残りの部分とそれが結合している断片との間を含む、ヘテロアルキル基のあらゆる部位に配置されていても、ヘテロアルキル基中の最も遠位の炭素原子に結合していてもよい。例には、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＯＨ、－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＮＨ－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$－Ｓ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、及び－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｓ（＝Ｏ）－ＣＨ$_3$がある。例えば、－ＣＨ$_2$－ＮＨ－ＯＣＨ$_3$、又は－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｓ－Ｓ－ＣＨ$_3$など、２つまでのヘテロ原子が連続していてもよい。
【００８７】
本明細書では、それ自体又は別の置換基の一部としての用語「複素環」又は「ヘテロシクリル」又は「複素環式」は、特記されない限り、炭素原子と、Ｎ、Ｏ、及びＳからなる群より選択される少なくとも１つのヘテロ原子とからなる非置換又は置換されている、安定な単環又は多環式複素環式環系であって、その窒素及び硫黄ヘテロ原子が任意で酸化されていてもよく、その窒素原子が任意で四級化されていてもよい、単環又は多環式複素環式環系を意味する。複素環式系は、特記されない限り、安定な構造を与えるあらゆるヘテロ原子又は炭素原子で結合していてもよい。複素環は、本質的に、芳香族でも、非芳香族でもあり得る。一態様において、複素環はヘテロアリールである。
【００８８】
本明細書では、用語「ヘテロアリール」又は「ヘテロ芳香族」は、芳香族性を有する複素環を指す。多環式ヘテロアリールは、部分飽和である１つ又は複数の環を含み得る。例には、テトラヒドロキノリン及び２，３－ジヒドロベンゾフリルがある。
【００８９】
非芳香族複素環の例には、単環式基、例えば、アジリジン、オキシラン、チイラン、アゼチジン、オキセタン、チエタン、ピロリジン、ピロリン、イミダゾリン、ピラゾリジン、ジオキソラン、スルホラン、２，３－ジヒドロフラン、２，５－ジヒドロフラン、テトラヒドロフラン、チオファン、ピペリジン、１，２，３，６－テトラヒドロピリジン、１，４－ジヒドロピリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、ピラン、２，３－ジヒドロピラン、テトラヒドロピラン、１，４－ジオキサン、１，３－ジオキサン、ホモピペラジン、ホモピペリジン、１，３－ジオキセパン、４，７－ジヒドロ－１，３－ジオキセピン、及びヘキサメチレンオキシドがある。
【００９０】
ヘテロアリール基の例には、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル（非限定的に２－及び４－ピリミジニルなど）、ピリダジニル、チエニル、フリル、ピロリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、ピラゾリル、イソチアゾリル、１，２，３－トリアゾリル、１，２，４－トリアゾリル、１，３，４－トリアゾリル、テトラゾリル、１，２，３－チアジアゾリル、１，２，３－オキサジアゾリル、１，３，４－チアジアゾリル、及び１，３，４－オキサジアゾリルがある。
【００９１】

多環式複素環の例には、インドリル（非限定的に３－、４－、５－、６－、及び７－インドリルなど）、インドリニル、キノリル、テトラヒドロキノリル、イソキノリル（非限定的に１－及び５－イソキノリルなど）、１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリル、シンノリニル、キノキサリニル（非限定的に２－及び５－キノキサリニルなど）、キナゾリニル、フタラジニル、１，８－ナフチリジニル、１，４－ベンゾジオキサニル、クマリン、ジヒドロクマリン、１，５－ナフチリジニル、ベンゾフリル（非限定的に３－、４－、５－、６－、及び７－ベンゾフリルなど）、２，３－ジヒドロベンゾフリル、１，２－ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾチエニル（非限定的に３－、４－、５－、６－、及び７－ベンゾチエニルなど）、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル（非限定的に２－ベンゾチアゾリル及び５－ベンゾチアゾリルなど）、プリニル、ベンゾイミダゾリル、ベンズトリアゾリル、チオキサンチニル、カルバゾリル、カルボリニル、アクリジニル、ピロリジジニル、及びキノリジジニルがある。

【００９２】

ヘテロシクリル及びヘテロアリール部分の上述の一覧は、代表的なものであり限定的ではないものとする。

【００９３】

「同一性」とは、対象の配列と参照配列との間のアミノ酸又は核酸の配列同一性を意味する。配列同一性は、典型的には、配列分析ソフトウェア（例えば、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ，１７１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．５３７０５、ＢＬＡＳＴ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＧＡＰ、又はＰＩＬＥＵＰ／ＰＲＥＴＴＹＢＯＸプログラム）を使用して測定される。そのようなソフトウェアは、相同性の程度を種々の置換、欠失、及び／又は他の修飾に割り付けることにより、同一又は類似の配列をマッチさせる。保存的置換は、典型的には、以下の群内の置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定する例示的アプローチにおいて、ＢＬＡＳＴプログラムを、$e^{-3}$～$e^{-100}$の確率スコアが密接に関連する配列を示すとして利用できる。

【００９４】

用語「含む」は、本明細書において、句「含むが限定されない」を意味するように使用され、それと互換的に使用される。

【００９５】

「増加する」とは、少なくとも約１０％、２５％、５０％、７５％、１００％、又はそれを超える正の変化を意味する。

【００９６】

本明細書では、用語「説明資料」は、本発明の組成物及び方法の有用性を伝えるために使用され得る刊行物、録音されたもの、図表、又はあらゆる他の表現媒体を含む。いくつかの例において、説明資料は、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、他のアミノ基、チオール基及び／又はチオエーテル基を特異的にアルキル化するのに有用なキットの一部であり得る。キットの説明資料は、例えば、本発明の組成物を収容する容器に添付しても、組成物を収容する容器と共に出荷してもよい。或いは、説明資料は、受取人が説明資料と組成物を協同して使用することを意図して、容器とは別に出荷してもよい。例えば、説明資料は、キットの使用のためのもの；組成物の使用のための説明書；又は組成物の製剤の使用のための説明書である。

【００９７】

用語「単離された」、「精製された」、又は「生物学的に純粋な」は、その天然の状態で見られる状態でそれに通常付随している成分を様々な程度で含んでいない材料を指す。「単離する」は、元の源又は環境からのある程度の分離を表す。「精製する」は、単離よ

りも高い程度の分離を表す。「精製された」又は「生物学的に純粋な」タンパク質は、不純物がタンパク質の生物学的性質に著しく影響せず、他の不利な結果を起こさないように他の材料を十分に含まない。すなわち、本発明の核酸又はペプチドは、それが細胞物質、ウイルス物質、又は組換え型ＤＮＡ技法により製造される場合には培地、又は化学合成される場合には化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まない場合、精製されている。純度及び均質性は、典型的には、分析化学技法、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又は高速液体クロマトグラフィーを利用して決定される。用語「精製された」は、核酸又はタンパク質が、電気泳動ゲルにおいて本質的に１本のバンドをもたらすことを表し得る。修飾、例えば、リン酸化又はグリコシル化を受け得るタンパク質では、異なる修飾は、異なる単離されたタンパク質をもたらし、それは別に分離され得る。

【００９８】

本明細書では、句「Ｎ末端第１内部アミド結合」は、ポリペプチドのＮ末端アミノ酸とポリペプチド中のその次のアミノ酸との間（すなわちポリペプチドのＮ末端から１番目の残基と２番目の残基との間）に形成されるアミド結合を指す。

【００９９】

本明細書では、「天然に存在するアミノ酸」は、表１に表される通りタンパク質中に天然に存在する２０種のアミノ酸（それに加えてシスチン）のＬ－異性体を含む。特記されない限り、本願で言及されるアミノ酸は全てＬ形態である。

【０１００】

（表１）タンパク質中に天然に存在する２０種のアミノ酸のＬ－異性体

| 正式名称 | 三文字略号 | 一文字略号 | 正式名称 | 三文字略号 | 一文字略号 |
|---|---|---|---|---|---|
| アラニン | Ala | A | ロイシン | Leu | L |
| アルギニン | Arg | R | リジン | Lys | K |
| アスパラギン | Asn | N | メチオニン | Met | M |
| アスパラギン酸 | Asp | D | フェニルアラニン | Phe | F |
| システイン | Cys | C | プロリン | Pro | P |
| シスチン | Cys-Cys | C-C | セリン | Ser | S |
| グルタミン酸 | Glu | E | スレオニン | Thr | T |
| グルタミン | Gln | Q | トリプトファン | Trp | W |
| グリシン | Gly | G | チロシン | Tyr | Y |
| ヒスチジン | His | H | バリン | Val | V |
| イソロイシン | Ile | I | | | |

【０１０１】

本明細書では、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、又は「タンパク質」は互換的に使用され、ペプチド結合により共有結合しているアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質又はペプチドは少なくとも２つのアミノ酸を含まなくてはならず、タンパク質又はペプチドの配列を構成できるアミノ酸の最大数に全く制限はない。ポリペプチドは、ペプチド結合により互いに結合している２つ以上のアミノ酸を含むあらゆるペプチド又はタンパク質を含む。本明細書では、その用語は、当技術分野において通常ペプチド、オリゴペプチド、及びオリゴマーとも称される短鎖と、例えば一般的に当技術分野においてタンパク質と称され、多くの種類がある長鎖のいずれも指す。「ポリペプチド」には、例えば、とりわけ、生物活性のある断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリアント、修飾されたポリペプチド、誘導体、アナログ、及び融合タンパク質がある。ポリペプチドには、天然のペプチド、組換え型ペプチド、合成ペプチド、又はそれらの組み合わせがある。環式でないペプチドは、Ｎ末端及びＣ末端を有する。Ｎ末端はアミノ基を有し、それは遊離であることも（すなわち$NH_2$基として）、（例えば、ＢＯＣ又はＦｍｏｃ基により）適切に保護されていること

もある。Ｃ末端はカルボキシル基を有し、それは遊離であることも（すなわちＣＯＯＨ基として）、（例えば、ベンジル又はメチルエステルとして）適切に保護されていることもある。環式ペプチドは、アミド結合により共有結合して環式構造を形成するため、必ずしも遊離のＮ又はＣ末端を有さない。

【０１０２】

本明細書では、用語「薬学的に許容できる」は、本発明において有用な化合物の生物活性又は性質を妨げず、比較的非毒性である担体又は希釈剤などの材料を指し、すなわち、材料は、望ましくない生物学的作用を起こさず、それが含まれる組成物の成分のいずれとも有害な方法で干渉せずに対象に投与できる。

【０１０３】

本明細書では、言葉「薬学的に許容できる塩」は、無機の酸又は塩基、有機の酸又は塩基を含む薬学的に許容できる非毒性の酸又は塩基から調製される、投与される化合物の塩、その溶媒和物、水和物、又はクラスレートを指す。本明細書に記載されるペプチドは、酸又は塩基により塩を形成し得、そのような塩は本発明に含まれる。一態様において、塩は薬学的に許容できる塩である。用語「塩」は、本発明の方法において有用である遊離の酸又は塩基の付加塩を包含する。用語「薬学的に許容できる塩」は、薬学用途において有用性を与える範囲内に毒性プロファイルを有する塩を指す。それでもなお、薬学的に許容できない塩は、高い結晶性などの性質を有し得、それは本発明の実施における有用性、例えば、本発明の方法において有用なペプチドの合成、精製、又は製剤のプロセスにおける有用性などを有する。

【０１０４】

好適な薬学的に許容できる酸付加塩は、無機酸からも有機酸からも調製できる。無機酸の例には、塩化水素酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸（硫酸塩及び硫酸水素塩を含む）、及びリン酸（リン酸水素塩及びリン酸二水素塩を含む）がある。適切な有機酸は、脂肪族、脂環式、芳香族、芳香脂肪族、複素環式、カルボン酸及びスルホン酸のクラスの有機酸から選択され得、その例には、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、グルクロン酸、マレイン酸、マロン酸、サッカリン酸、フマル酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、アントラニル酸、４－ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸、エンボン酸（パモ酸）、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パントテン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、２－ヒドロキシエタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、スルファニル酸、シクロヘキシルアミノスルホン酸、ステアリン酸、アルギン酸、β－ヒドロキシ酪酸、サリチル酸、ガラクタル酸、及びガラクツロン酸がある。

【０１０５】

本発明のペプチドの好適な薬学的に許容できる塩基付加塩には、例えば、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、及び亜鉛塩など、例えば、アルカリ金属、アルカリ土類金属、及び遷移金属塩を含む金属塩がある。薬学的に許容できる塩基付加塩には、塩基性アミン、例えば、Ｎ，Ｎ’－ジベンジルエチレン－ジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン（Ｎ－メチルグルカミン）、及びプロカインなどから製造される有機塩もある。これらの塩は全て対応するペプチドから、例えば、適切な酸又は塩基をペプチドと反応させることにより調製できる。

【０１０６】

本明細書での用語「予防する」又は「予防」は、薬剤又は化合物の投与が始まる時点で疾患又は病態と関連する症状を発していなかった対象においてそのような症状の発症を回避又は遅延することを意味する。疾患、病態、及び障害は、本明細書において互換的に使用される。

【０１０７】

本明細書では、用語「反応条件」は、反応を促進するために要求されるか、又は任意で要求される物理的処理、化学試薬、若しくはこれらの組み合わせを指す。反応条件の非限

定的な例は、電磁放射線、熱、触媒、化学試薬（非限定的に酸、塩基、求電子試薬又は求核試薬など）、及び緩衝剤である。

【０１０８】

「参照」とは、標準又は対照状態を意味する。

【０１０９】

「参照配列」は、配列比較の基準として使用される定義された配列である。

【０１１０】

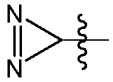
本明細書では、用語「対象」、「患者」、又は「個体」は、ヒトでも、非ヒト哺乳動物でも、鳥でもよい。非ヒト哺乳動物には、例えば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、及びネズミ科の哺乳動物などの家畜及びペットがある。好ましくは、対象はヒトである。

【０１１１】

本明細書では、用語「置換されている」は、原子又は原子団が、別の基に結合する置換基として水素に替わることを意味する。特記されない限り、本発明において列挙されているあらゆる基が置換され得る。

【０１１２】

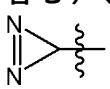
置換されているアルキル、アルケニル、アルキニル、又はシクロアルキル基では、置換基は、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、$C_2$～$C_{16}$アルキニル（－Ｃ≡ＣＨを含む）、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、$C_1$～$C_6$アルコキシ、アジド、ジアジリル



、－ＣＨＯ、１，３－ジオキソール－２－イル、ハロ、ハロアルキル（トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、及びフルオロメチルなど）、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ハロアルコキシ（トリフルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、及びフルオロメトキシなど）、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（$C_1$～$C_6$アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）$_2$（式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又は$C_1$～$C_6$アルキルである）からなる群より独立に選択される少なくとも１つを含む。

【０１１３】

置換されているアリール、アリール－（$C_1$～$C_3$）アルキル、及びヘテロシクリル基では、これらの基の環に適用される用語「置換されている」は、あらゆるレベルの置換、すなわち、そのような置換が許容される場合、一置換、二置換、三置換、四置換、又は五置換を指す。置換基は独立に選択され、置換は、任意の化学的に利用しやすい部位であり得る。一態様において、置換基の数は１～４個の間で様々である。別の態様において、置換基の数は１～３個の間で様々である。さらに別の態様において、置換基の数は１～２個の間で様々である。さらに別の態様において、置換基は、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、$C_2$～$C_{16}$アルキニル（－Ｃ≡ＣＨを含む）、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、$C_1$～$C_6$アルコキシ、アジド、ジアジリル



、－ＣＨＯ、１，３－ジオキソール－２－イル、ハロ、ハロアルキル（トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、及びフルオロメチルなど）、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ハロアルコキシ（トリフルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、及びフルオロメトキシなど）、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）

（Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$（Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）$_2$（式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又はＣ$_1$～Ｃ$_6$アルキルである）からなる群より独立に選択される。本明細書では、置換基がアルキル又はアルコキシ基である場合、炭素鎖は、分岐鎖でも、直鎖でも、環式でもよく、直鎖が好ましい。

【０１１４】

本明細書での用語「治療する」及び「治療」は、疾病又は病態の症状が対象により経験される頻度又は重症度を、薬剤又は化合物を対象に投与することにより低減させることを意味する。

【０１１５】

本開示を通して、本発明の種々の局面は、範囲形式で示され得る。範囲形式での記載は単に簡便さ及び簡潔さのためであり、本発明の範囲に対する確固とした限定と解釈されるべきでないことが理解されるべきである。したがって、範囲の記載は、全ての可能な部分範囲並びにその範囲内の個別の数値、及び適切な場合には範囲内の数値の部分整数を具体的に開示したと見なされるべきである。本明細書に提供される範囲は、範囲内の値の全てに関して簡略した表現であると理解される。例えば、１～５０の範囲は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、又は５０からなる群よりのあらゆる数、数の組み合わせ、又は部分範囲を含むと理解される。

【０１１６】

本明細書に提供されるあらゆる化合物、組成物、又は方法は、本明細書に提供される他の組成物及び方法のいずれかの１つ又は複数と組み合わせることができる。

【０１１７】

本発明の他の特徴及び利点は、その望ましい態様の以下の説明から及び特許請求の範囲から明らかであろう。

【０１１８】

ポリペプチド

一局面において、本発明は、化学修飾されたポリペプチドを提供し、ここで、化学修飾は、（ｉ）ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つが、独立に、アルキル化されるか、シクロアルキル化されるか、アルケニル化されるか、又はアルキニル化されること（ここで、各個別のアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基は独立して置換されていてもよい）；及び（ｉｉ）Ｎ末端アミノ基及びＮ末端第１内部アミド結合からなる群より選択される少なくとも１つのＮＨがＸによって誘導体化されること（ここで、各Ｘは、置換されていてもよいフェニル、→Ｏ（そのようにしてＮ－オキシドを生成する）、－ＯＨ、アルコキシ、ＮＨ$_2$、ＮＨ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及びＮ（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_1$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より独立に選択される）のうちの少なくとも１つを含む。

【０１１９】

特定の態様において、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及び／又はチオエーテル基は、それぞれ独立に、対応する置換されていてもよい基によってアルキル化されているか、シクロアルキル化されているか、アルケニル化されているか、又はアルキニル化されている。

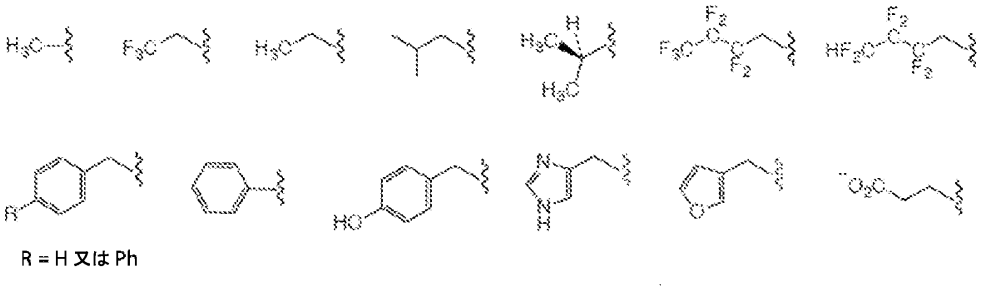
【０１２０】

特定の態様において、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、及び／又はチオール基のうちの１つ又は複数は、独立に、本明細書において企図される第１置換基及

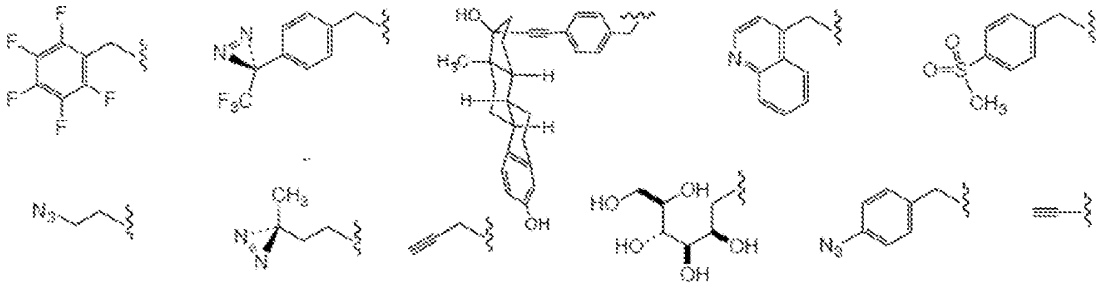
び第２置換基によってアルキル化されており、ここで、第１及び第２置換基は独立して、同一であるか又は同一でない。他の態様において、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、及び／又はチオール基のうちの１つ又は複数は、独立に、第１の置換されていてもよいＣ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル及び第２の置換されていてもよいＣ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキルによってアルキル化されており、ここで、第１及び第２のアルキルは独立して、同一であるか又は同一でない。さらに他の態様において、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、及び／又はチオール基のうちの１つ又は複数は、独立に、第１の置換されていてもよいメチル及び第２の置換されていてもよいメチルによってアルキル化されており、ここで、第１及び第２のメチルは独立して、同一であるか又は同一でない。さらに他の態様において、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、及び／又はチオール基のうちの１つ又は複数は、独立に、２つの置換されていてもよいＣ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキルによってアルキル化されている。さらに他の態様において、ポリペプチドのＮ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、及び／又はチオール基のうちの１つ又は複数は、独立に、２つのメチルによってアルキル化されている。さらに他の態様において、ポリペプチドの少なくともＮ末端アミノ基は、本明細書において企図される基によって誘導体化されており、ここで、その基は置換されているか又は非置換である。

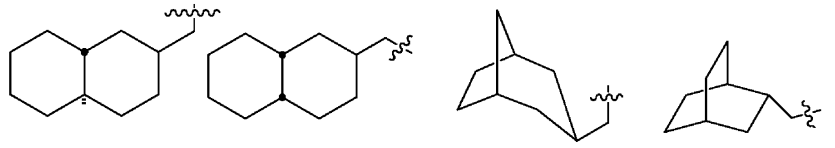
【０１２１】

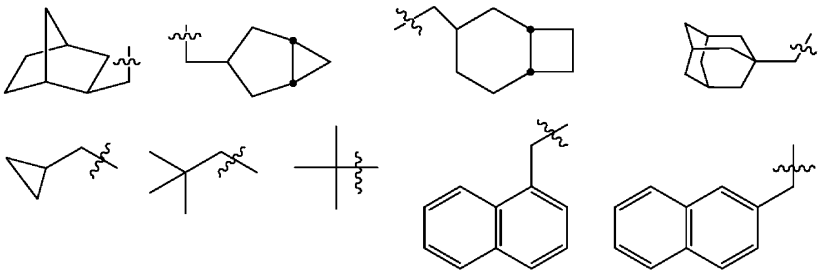
本発明において企図されるアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基の非限定的な例は、

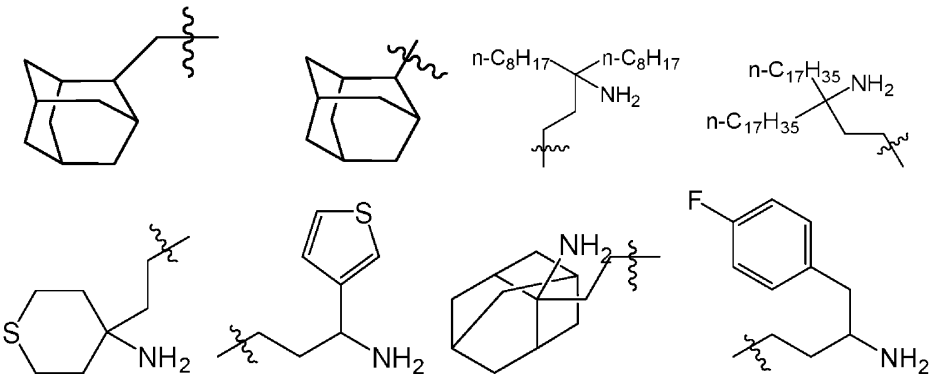


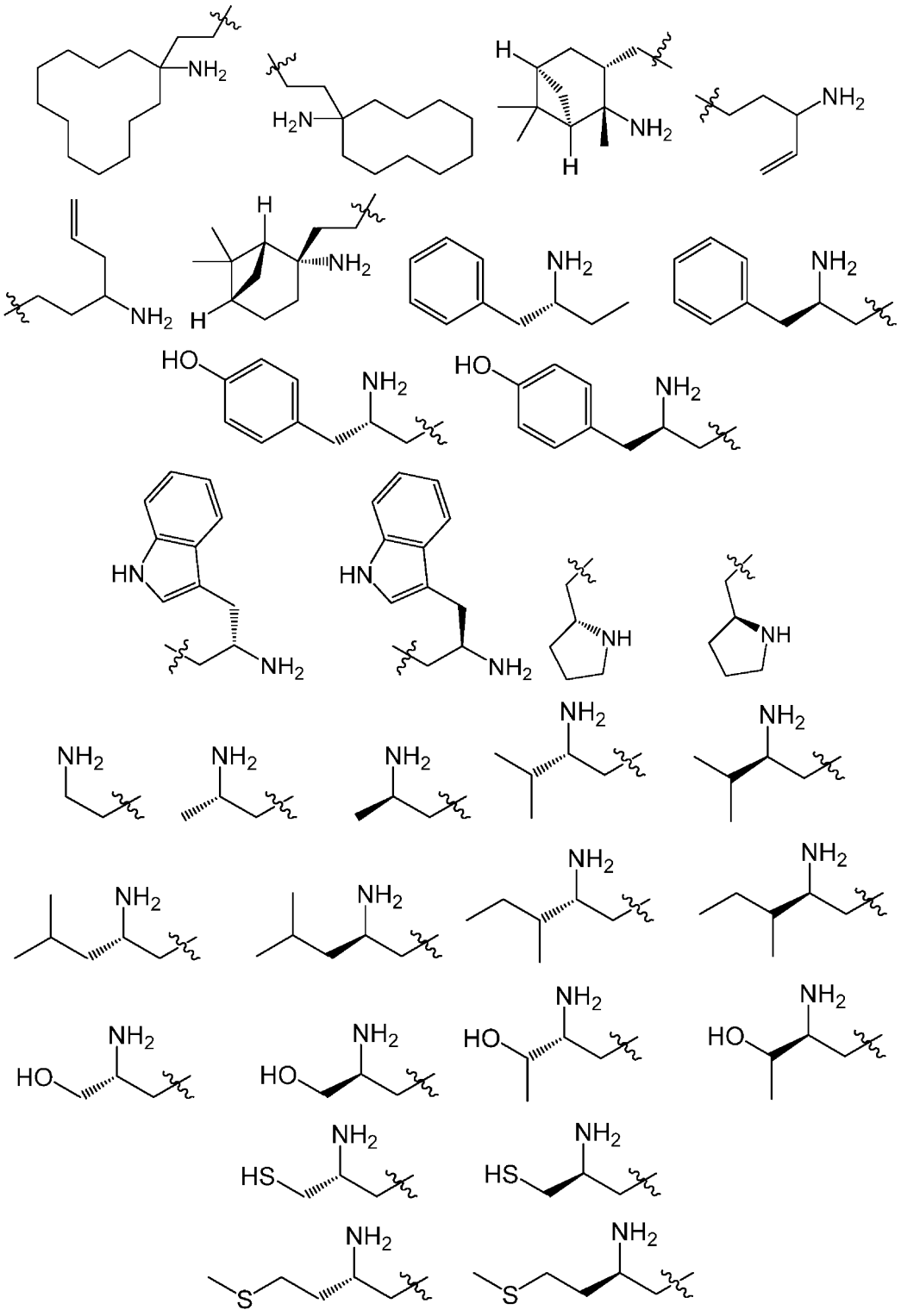
R = H 又は Ph

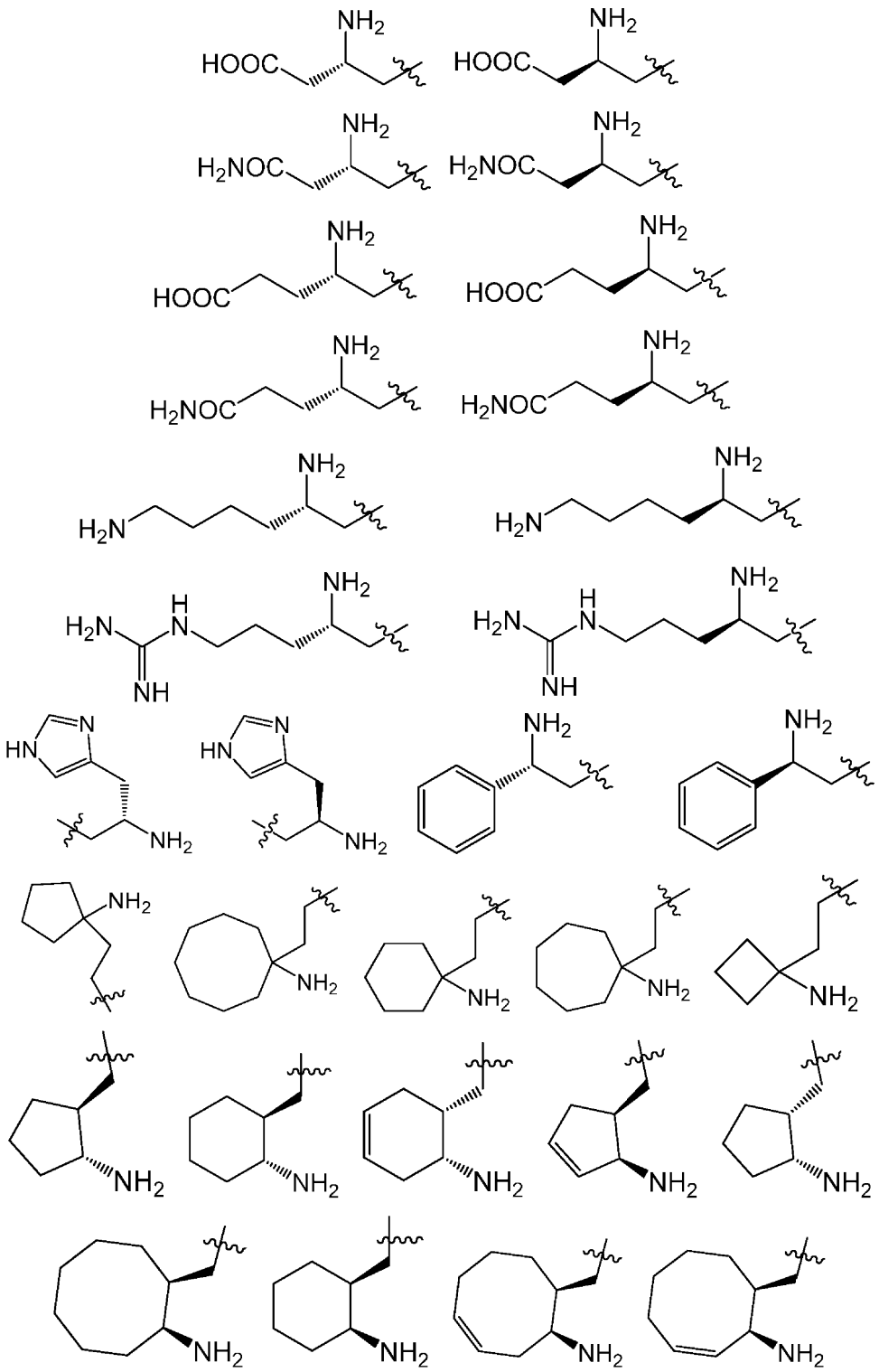


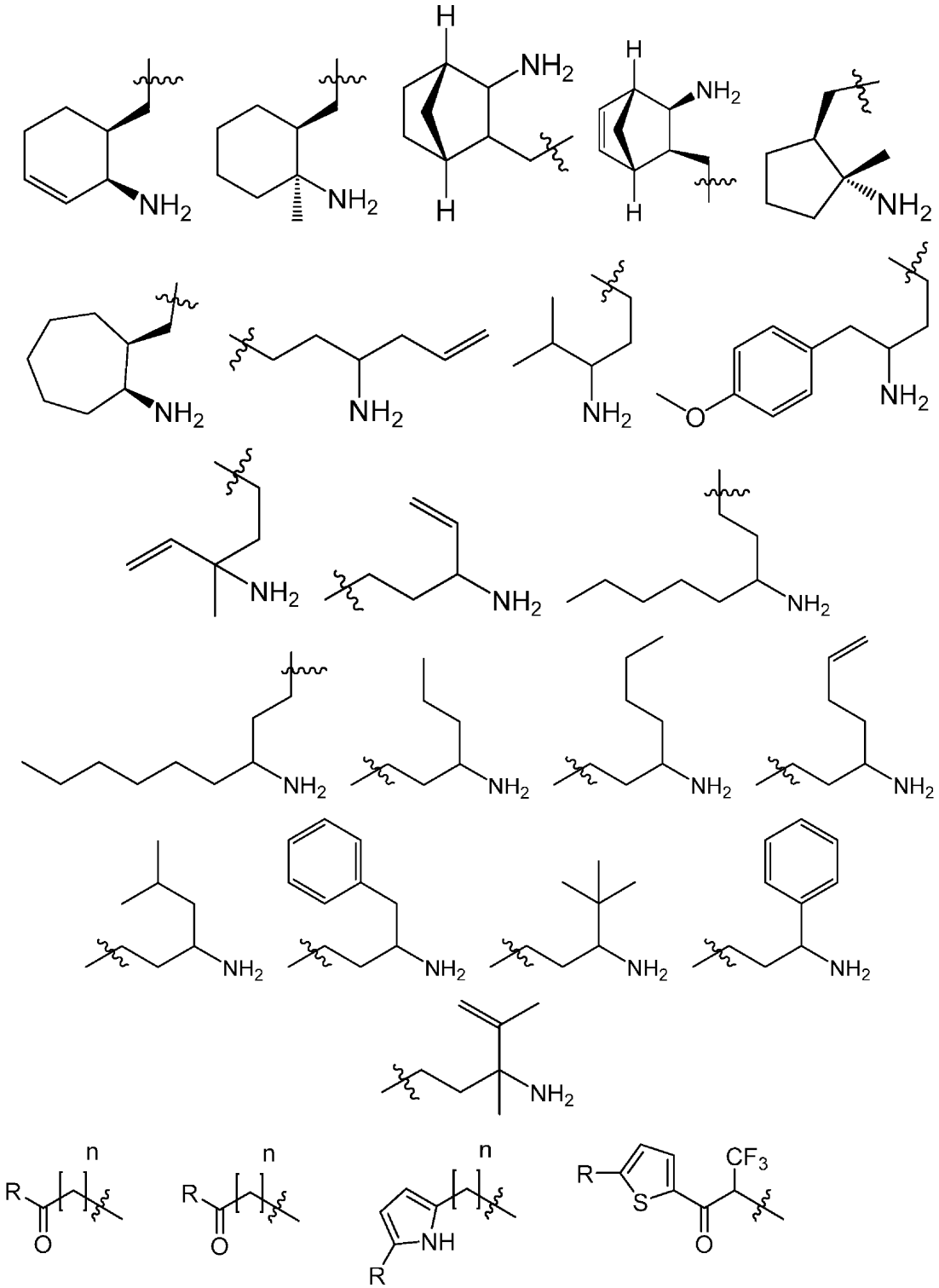







NH2
H2N
H
NH2
H
NH2
NH2
NH2
H
NH2
NH2
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HN
NH2
HN
NH2
NH
NH
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HO
NH2
HS
NH2
HS
NH2
S
NH2
S


NH2
HOOC
H2NOC
H2N
HN
N
H
NH

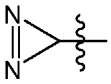


（式中、ｎは、１～６の範囲の整数であり、且つＲは、置換されていてもよいアルキル又はアリールである）を含む。

【０１２２】

どのような理論によっても限定されることを望まないが、Ｎ末端アミノ基に結合している基は、ポリペプチドが受容体に結合する膜－水界面に近接した受容体上の結合ポケットを占める。結合ポケットの寸法は受容体間で異なることが予測される。特定の態様において、ＧＬＰ－１のＮ－１－アダマンチル－メチル誘導体が誘導体化されていないＧＬＰ－１に匹敵する活性を有することが見出された事実により確認される通り、ＧＬＰ－１Ｒでは、結合ポケットは、およそ１９０Å$^3$以下の体積を有する。

【０１２３】
特定の態様において、本発明のポリペプチドは、ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、並びに／又はＤＰＰ４及び／若しくはＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有するプロテアーゼによるタンパク質分解活性に対して、対応する未修飾ポリペプチドよりも耐性がある。特定の態様において、本発明のポリペプチドは、対応する未修飾ポリペプチドよりも、エンドプロテアーゼ活性に対して耐性がある。さらに他の態様において、化学修飾されたポリペプチドは、ヒト血清中で、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも改善された全体的なタンパク質分解安定性を有する。
【０１２４】
特定の態様において、化学修飾されたポリペプチドは、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも改善されたインビボ半減期を有する。他の態様において、化学修飾されたポリペプチドは、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも改善された血液脳関門透過性を有する。さらに他の態様において、化学修飾されたポリペプチドは、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも改善された薬物動態を有する。
【０１２５】
特定の態様において、本発明において企図される化学修飾は、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、又は$C_2$～$C_{16}$アルキニルからなる群より選択される置換基を含み、それは、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、$C_2$～$C_{16}$アルキニル（－Ｃ≡ＣＨを含む）、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、$C_1$～$C_6$アルコキシ、アジド、ジアジリル



、－ＣＨＯ、１，３－ジオキソール－２－イル、ハロ、ハロアルキル（トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、及びフルオロメチルなど）、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ハロアルコキシ（トリフルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、及びフルオロメトキシなど）、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（$C_1$～$C_6$アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）$_2$からなる群より選択される少なくとも１つの基によって置換されていてもよく、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又は$C_1$～$C_{16}$アルキルである。他の態様において、企図されるアルキル基は少なくとも１つの場合において－$CH_2CF_3$である。
【０１２６】
本発明のポリペプチドは、当業者に公知のあらゆる方法を利用して調製できる。特定の態様において、ポリペプチドは、標準的なペプチド合成を利用して調製でき、ここで、化学修飾される残基のうちの少なくとも１つは、既にその化学修飾された形態で反応混合物に導入される。他の態様において、ポリペプチドは、標準的なペプチド合成を利用して調製でき、ここで、修飾された残基の全てが、既にその化学修飾された形態で反応混合物に導入される。さらに他の態様において、本発明のポリペプチド又はその断片は、インサイチューで化学修飾され、それによりＮ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、チオール基（システイン残基由来など）及び／又はチオエーテル基（メチオニン残基など）を、その基のアルキル化を促進する試薬と反応させる。生じた化学修飾されたポリペプチド又はその断片は、それ自体で治療的処置及び／又はさらなる化学反応に使用できる。或いは、生じた化学修飾されたポリペプチド又はその断片は、精製され、次いで治療剤として使用され、且つ／又はさらなる化学反応に供され得る。
【０１２７】
特定の態様において、ペプチドは、Ｆｍｏｃ化学を利用する標準的な自動ペプチド合成により組み立てられる。他の態様において、リジン側鎖アミノ基は、例えば$PhSiH_3$

及びＰｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$を使用して選択的に除去され得るアリルオキシカルボニル（ａｌｌｏｃ）基により保護される。さらに他の態様において、リジン側鎖アミノ基は、その後、既存の化学を利用して脂質に結合できる。

【０１２８】

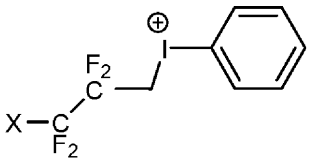
特定の態様において、ポリペプチド中の遊離一級アミノ基（Ｎ末端アミノ基など）をアルデヒド又はケトンと還元条件下（例えば、ボロヒドリドの存在下など）で反応させると、対応する誘導体化されたアミンが生じる。或いは、誘導体化されたアミノ酸は、別に調製され、必要に応じて、伸長するポリペプチド鎖と結合される。

【０１２９】

特定の態様において、ポリペプチドは、例えばＣＦ$_3$ＣＯ$_2$Ｈ：ＴＩＰＳ：Ｈ$_2$Ｏ（９５：２．５：２．５）を使用して樹脂から切断され、例えば逆相ＨＰＬＣを使用して精製され、例えばＥＳＩ及びＭＡＬＤＩ－ＭＳを使用して分析される。

【０１３０】

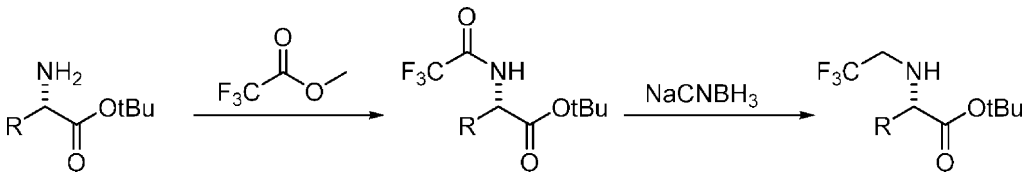
特定の態様において、ポリペプチドの少なくとも１つの遊離アミノ基、チオール基、及び／又はチオエーテル基は、２，２，２－トリフルオロエチル基により修飾される。そのような修飾は固相で実施され得、それにより、固定化されたポリペプチド又はその断片を（２，２，２－トリフルオロエチル）フェニルヨードニウム塩、（２，２，２－トリフルオロエチル）（１，３，５－トリ－Ｒ－フェニル）ヨードニウム塩（式中、ＲはＨ又はメチルである）などの２，２，２－トリフルオロエチルヨードニウム塩と反応させる。以下に示す塩は、－ＣＨ$_2$ＣＦ$_2$ＣＦ$_3$又は－ＣＨ$_2$ＣＦ$_2$ＣＦ$_2$Ｈを移す。



**2a** X = H
**2b** X = F

【０１３１】

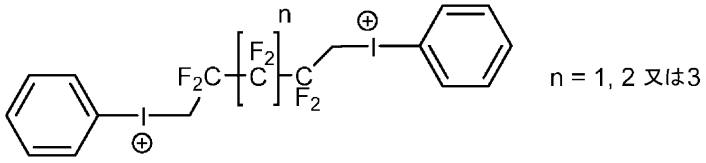
他の態様において、トリフルオロメチル基によるポリペプチドの修飾は、例えば、以下の非限定的な反応：




を利用して、固相でも液相でも実施できる。

【０１３２】

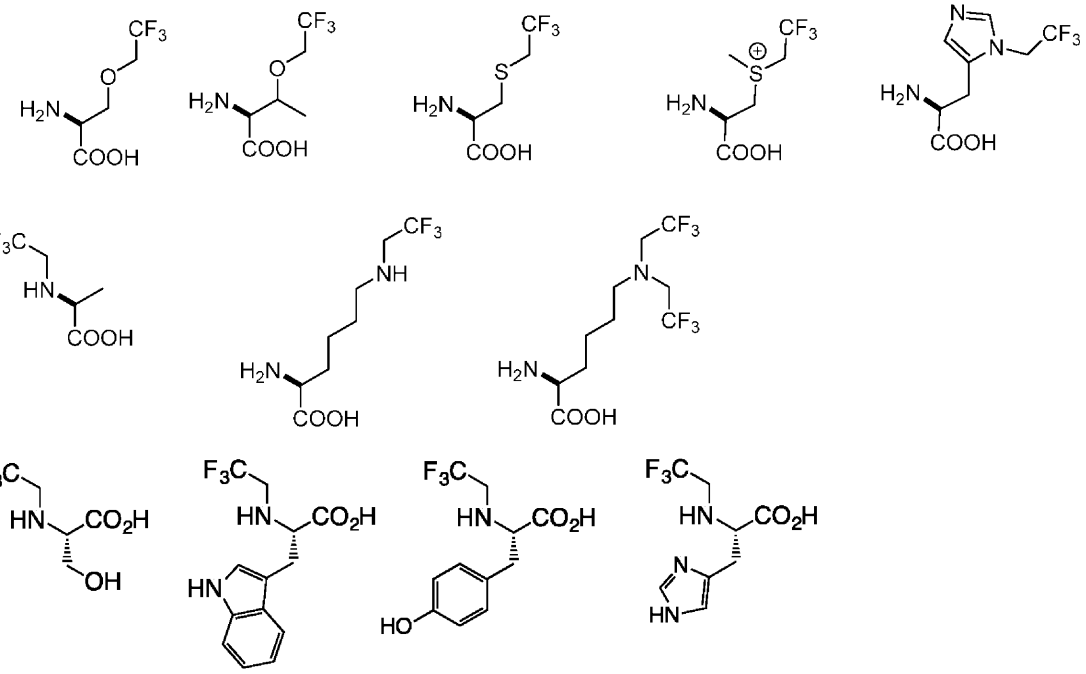
本発明は、本発明のポリペプチドの分子内及び／又は分子間架橋をさらに企図する。特定の態様において、ポリペプチドの遊離アミノ基、チオール基、及び／又はチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも２つの官能基は、




などのビス（ヨードニウム）塩を利用して架橋される。

【０１３３】

特定の態様において、本発明のポリペプチドは、以下の化学修飾されたアミノ酸：



のうちの少なくとも１つを含む（図２９）。

【０１３４】

特定の態様において、本発明の化学修飾されたポリペプチドは、以下の配列のうちの１つを含み、配列中、各ポリペプチドにおいて、アスタリスク（＊）により印が付けられた残基のうちの少なくとも１つが、本発明において企図される通りに化学修飾されており（Ａｉｂは２－アミノイソ酪酸を表す）、当該ポリペプチドは脂質付加されていてもよい。

ＧＬＰ－１：

H*AEGTFTS*DVS*S*YLEGQAAK*EFIAWLVK*GR

エキセナチド：

H*GEGT*FT*S*DLS*KQM*EEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPPS*-$NH_2$

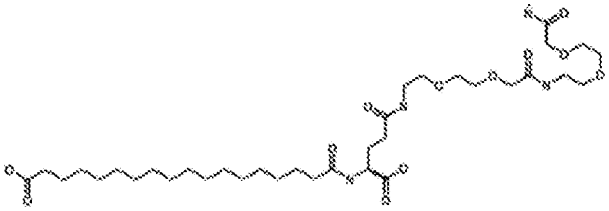
リラグルチド：

H*AEGT*FT*S*DVS*S*Y*LEGQAA-($N^6$-パルミトイルグルタミル)K*EFIAWLVRGRG

セマグルチド：

H*AibEGT*FT*S*DVS*S*Y*LEGQAA-(X)K*EFIAWLVRGRG

（式中、リジンのε－アミノ基に結合しているＸは、



である）

タスポグルチド：

H*AibEGT*FT*S*DVS*S*YLEGQAAK*EFIAWLVK*AibR-$NH_2$

リキシセナチド：

H*GEGT*FT*S*DLS*K*QM*EEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPS*K*K*K*K*K*K*-$NH_2$

**トリアゴニスト：**
H*AibQGT*FT*S*D-(γ-E-$C_{16}$アシル)KS*K*YLDERAAQDFVQWLLDGGPS*S*GAPPPS*-$NH_2$

**ＧＬＰ－２：**
H*ADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTK*ITD

**エキセンディン：**
H*GEGTFTS*DLS*KQMEEEAVRLFIEWLK*NGGPS*S*GAPPPS

**ＶＩＰ：**
H*S*DAVFTDNYTRLRK*QMAVK*K*YLNS*ILN

**ＰＡＣＡＰ：**
H*S*DGIFTDS*YS*RYRK*QMAVK*K*YLAAVLGK*RYKQRVK*NK*

**ＧＩＰ：**
Y*AEGTFIS*DYS*IAMDK*IHQQDFVNWLLAQK*GK*K*NDWK*HNITQ

**Ｍｅｔ－エンケファリン：**
Y*GGFM

**ＢＮＰ：**
Y*PSKPDNPGEDAPAEDMARYYS*ALRHYINLITRQRY

**サブスタンスＰ：**
R*PK*PQQFFGLM

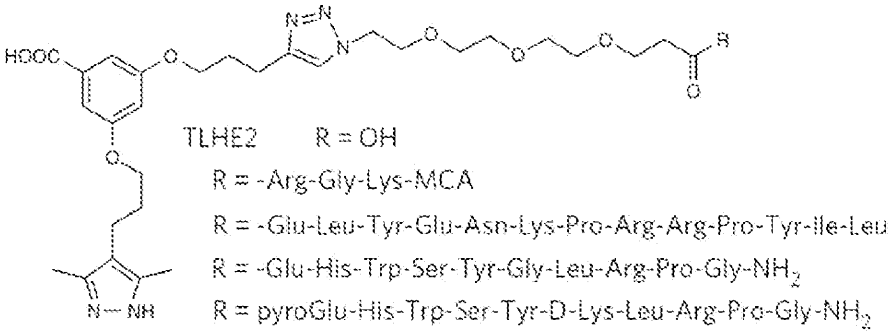
**Ｔｙｒ－ＭＩＦ－１：**
Y*LG

**Ｔｙｒ－Ｗ－ＭＩＦ－１：**
Y*PWG

**グルカゴン**
H*SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

**成長ホルモン放出ホルモン（ＧＨＲＨ）；**
**下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（ＰＡＣＡＰ）ＡＤＣＹＡＰ１；**
**グルカゴン（ＧＣＧ）；**
**胃抑制ポリペプチド（ＧＩＰ）；**
**セクレチン（ＳＣＴ）；**
**血管作動性腸管ペプチド（ＶＩＰ）；**
**ＯＸＭ（オキシントモジュリン）（ＧＬＰ－１Ｒ及びＧＩＰＲのデュアルアゴニスト）**
**ＰＴＨ（副甲状腺ホルモン）－－ｈＰＴＨ（１－３４）；**
**ＰＹＹ（ペプチドＹＹ３－３６、及びＹＹ１－３６も）；**
**ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）；**
**ＶＩＰペプチド（血管作動性腸管ペプチド）；**
**ＧＬＰ－１＋ＧＩＰ；ＧＬＰ－１＋アミリン；ＧＬＰ－１＋ガストリン；ＧＬＰ－１＋エ**

ストロゲン；ＧＬＰ－１＋ＧＬＰ－２のデュアルアゴニスト（例えば、Ｆｉｎａｎ，ｅｔａｌ．，２０１５，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．，Ｊｕｌ ４，ｐｉｉ：Ｓ０３０３－７２０７（１５）３００１２－５．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｍｃｅ．２０１５．０７．００３に詳述される通り）
ＧＬＰ－１Ｒ＋グルカゴンのデュアルアゴニスト、非限定的にＬＹ２９４４８７６／ＴＴ－４０１［Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ］；ＺＰ２９２９［Ｚｅａｌａｎｄ］；ＨＭ１２５２５Ａ［Ｈａｍｎｉ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ］；ＭＥＤＩ０３８２［ＭｅｄＩｍｍｕｎｅ］；ＳＡＲ４２５８９９［Ｓａｎｏｆｉ］；Ｇ５３０Ｌ／ＮＮ９０３０＋リラグルチド［Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ］；ＶＰＤ－１０７［Ｓｐｉｔｆｉｒｅ Ｐｈａｒｍａ］；ＭＯＤ－６０３０／１［Ｐｒｏｌｏｒ／ＯＰＫＯ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ］など；
混合アゴニスト、非限定的にＭＡＲ７０９／ＲＯ６８１１１３５［ＭＢ－２］；Ｃｐｄ８６｛Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ］；ＺＰ－ＤＩ－７０［Ｚｅａｌａｎｄ］；ＩＵＢ４４７［ＭＢ－２］；ＺＰ－ＧＧ－２３［Ｚｅａｌａｎｄ］；ＺＰ３０２２［Ｚｅａｌａｎｄ］など；
アルビグルチド（アルブミンに共有結合したＧＬＰ－１［ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ］）；
デュラグルチド（Ｆｃ抗体断片に結合したＧＬＰ－１／Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ）；
他のＧＬＰ－１Ｒアゴニスト、非限定的に：ＩＴＣＡ ６５０［Ｉｎｔａｒｃｉａ］；ＣＪＣ－１１３４－ＰＣ［ＣｏｎｊｕＣｈｅｍ］；Ｌａｎｇｌｅｎａｔｉｄｅ／ＨＭ１１２６０Ｃ［Ｈａｍｎｉ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ］；ＰＢ１０２３（Ｇｌｙｍｅｒａ）［ＰｈａｓｅＢｉｏ］；ＶＲＳ ８５９［Ｄｉａｒｔｉｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ］；ＴＴＰ０５４［Ｔｒａｎｓ Ｔｅｃｈ Ｐｈａｒｍａ］；ＺＹＯＧ１［Ｚｙｄｕｓ Ｃａｄｉｌａ］；ＮＮ９９２４／ＯＧ２１７ＳＣ［Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ］；ＮＮ９９２６／ＯＧ９８７ＧＴ［Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ］；ＮＮ９９２７／ＯＧ９８７ＳＣ［Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ］；ＡＲＩ－１７３２ＴＳ［Ａｒｉｓａｐｈ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ］など；
他のＤＰＰ４基質、非限定的に：ＧＨＲＨ；ＭＣＰ－３；ＭＣＰ－４；ＬＥＣ；エンドモルフィン１；エンドモルフィン２；Ｉ－ＴＡＣ；ＳＤＦ－１α；ＳＤＦ－１β；ＧＲＰ；ＰＡＣＡＰ３８；ＧＨ（１－４３）；ＣＡＲＴ（５５－１０２）；ＩＰ－１０；ＰＨＭ；グレリン；Ｇｒｏ－β；ＬＩＸ；膵臓ポリペプチド；エオタキシン；




（Ｐｅｎｃｈａｌａ，ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１１：７９３－８００より）
非限定的にビオチン化、ビタミン１２結合、及びＰ’修飾などの他の修飾により安定化されたＧＬＰ－１アナログ（例えば、Ｃｌａｒｄｙ－Ｊａｍｅｓ，ｅｔ ａｌ．，２０１３，ＣｈｅｍＭｅｄＣｈｅｍ，Ａｐｒ；８（４）：５８２－６．ｄｏｉ：１０．１００２／ｃｍｄｃ．２０１２００４６１．Ｅｐｕｂ ２０１２ Ｎｏｖ ３０；及びＨｅａｒｄ，ｅｔ ａｌ．，２０１３，Ｊ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ．，Ｎｏｖ １４；５６（２１）：８３３９－５１．ｄｏｉ：１０．１０２１／ｊｍ４００４２３ｐ．Ｅｐｕｂ ２０１３ Ｏｃｔ １６に詳述される通り）。
【０１３５】
本発明のポリペプチドは、１つ又は複数の立体中心を有することがあり、各立体中心は

、独立に（Ｒ）配置又は（Ｓ）配置のいずれかで存在し得る。一態様において、本明細書に記載されるポリペプチドは、光学活性な形態又はラセミ形態で存在する。本明細書に記載されるポリペプチドは、本明細書に記載される治療上有用な性質を有するラセミ形態、光学活性形態、位置異性形態、及び立体異性形態、又はそれらの組み合わせを含む。光学活性形態の調製は、非限定的な例として、再結晶化技法によるラセミ形態の分割、光学活性な出発物質からの合成、キラル合成、又はキラルな固定相を使用するクロマトグラフィーによる分離を含むあらゆる好適な方法で達成される。一態様において、１つ又は複数の異性体の混合物が、本明細書に記載される治療用ポリペプチドとして利用される。別の態様において、本明細書に記載される化合物は、１つ又は複数のキラル中心を含む。これらの化合物は、立体選択的合成、エナンチオ選択的合成、並びに／又はエナンチオマー及び／若しくはジアステレオマーの混合物の分離を含むあらゆる手段により調製される。ポリペプチド及びその異性体の分割は、非限定的な例として、化学的プロセス、酵素的プロセス、分別結晶化、蒸留、及びクロマトグラフィーを含むあらゆる手段により達成される。

【０１３６】

本明細書に記載される方法及び製剤は、本発明のいずれかのポリペプチドの構造を有するポリペプチドのＮ－オキシド（適切な場合）、結晶形（多形体としても知られる）、溶媒和物、非晶相、及び／又は薬学的に許容できる塩、並びに同じ種類の活性を有するこれらのポリペプチドの代謝物及び活性代謝物の使用を含む。溶媒和物は、水、エーテル（例えば、テトラヒドロフラン、又はメチルｔｅｒｔ－ブチルエーテル）、又はアルコール（例えば、エタノール）溶媒和物、アセタートなどを含む。特定の態様において、本明細書に記載されるポリペプチドは、水及びエタノールなどの薬学的に許容できる溶媒との溶媒和された形態で存在する。別の態様において、本明細書に記載される化合物は、溶媒和されていない形態で存在する。

【０１３７】

一態様において、本発明のポリペプチドは互変異性体として存在し得る。全互変異性体は、本明細書において列挙される化合物の範囲内に含まれる。

【０１３８】

一態様において、本明細書に記載される化合物はプロドラッグとして調製される。「プロドラッグ」は、インビボで親薬物に転化される薬物である。一態様において、インビボでの投与時、プロドラッグは、生物学的に、薬学的に、又は治療上活性のある形態のポリペプチドに化学的に転化する。別の態様において、プロドラッグは、１つ又は複数の工程又はプロセスにより酵素的に代謝されて、生物学的に、薬学的に、又は治療上活性のある形態のポリペプチドになる。

【０１３９】

一態様において、例えば、本発明のポリペプチドの芳香環部分上の部位は種々の代謝反応を受けやすい。芳香族環構造への適切な置換基の組み込みは、この代謝経路を低減させ、最低限にし、又はなくし得る。一態様において、代謝反応に対する芳香環の感受性を低減させるか又はなくすための適切な置換基は、単なる例として、重水素、ハロゲン、又はアルキル基である。

【０１４０】

本明細書に記載される化合物は、１つ又は複数の原子が、同じ原子番号を有し、天然に通常見られる原子質量又は質量数と異なる原子質量又は質量数を有する原子に置き換えられている同位体標識された化合物も含む。本明細書に記載されるポリペプチドに含めるのに好適な同位元素の例には、$^{2}$Ｈ、$^{3}$Ｈ、$^{11}$Ｃ、$^{13}$Ｃ、$^{14}$Ｃ、$^{36}$Ｃｌ、$^{18}$Ｆ、$^{123}$Ｉ、$^{125}$Ｉ、$^{13}$Ｎ、$^{15}$Ｎ、$^{15}$Ｏ、$^{17}$Ｏ、$^{18}$Ｏ、$^{32}$Ｐ、$^{35}$Ｓ、$^{111}$Ｉｎ、$^{99m}$Ｔｅｃ、$^{68}$Ｇａ、$^{18}$Ｆ、$^{64}$Ｃｕ、$^{125}$Ｉ、及び／又は$^{131}$Ｉがあるが、これらに限定されない。特定の態様において、同位体標識された化合物は、薬物及び／又は基質組織分布試験に有用である。別の態様において、重水素などのより重い同位元素による置換は、より高い代謝安定性（例えば、インビボ半減期の増加又は用量要件の減少）を与える。さらに別の態様において、$^{11}$Ｃ、$^{18}$Ｆ、$^{15}$Ｏ、及び$^{13}$Ｎなどの陽電子放

出同位元素による置換は、基質受容体占有率を調べる陽電子放出局所解剖学（ＰＥＴ）試験に有用である。同位体標識されたポリペプチドは、任意の好適な方法により、又は適切な同位体標識された試薬を、そうでなければ使用される非標識の試薬の代わりに使用するプロセスにより調製される。

【０１４１】

一態様において、本明細書に記載されるポリペプチドは、非限定的に発色団若しくは蛍光性部分、生物発光標識、又は化学発光標識の使用を含む他の手段により標識される。

【０１４２】

本発明は、少なくとも１種の本発明のポリペプチド及び薬学的に許容できる担体を含む薬学的組成物をさらに含む。

【０１４３】

特定の態様において、薬学的組成物は、本明細書において企図される疾患又は障害を治療するのに有用な少なくとも１種の追加の薬剤をさらに含む。特定の態様において、本発明のポリペプチドと追加の薬剤とは、組成物中に共に製剤化されている。

【０１４４】

塩

本明細書に記載されるポリペプチドは、酸又は塩基と塩を形成し得、そのような塩は本発明に含まれる。特定の態様において、塩は薬学的に許容できる塩である。用語「塩」は、本発明の方法において有用である遊離の酸又は塩基の付加塩を包含する。用語「薬学的に許容できる塩」は、薬学用途において有用性を与える範囲内で毒性プロファイルを有する塩を指す。薬学的に許容できない塩は、それでもなお高い結晶性などの性質を有し得、それは本発明の実施における有用性、例えば、本発明の方法において有用なポリペプチドの合成、精製、又は製剤のプロセスにおける有用性などを有する。

【０１４５】

好適な薬学的に許容できる酸付加塩は、無機酸からも有機酸からも調製できる。無機酸の例には、塩化水素酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸（硫酸塩及び硫酸水素塩を含む）、及びリン酸（リン酸水素塩及びリン酸二水素塩）がある。適切な有機酸は、脂肪族、脂環式、芳香族、芳香脂肪族、複素環式、カルボン酸、及びスルホン酸クラスの有機酸から選択でき、その例には、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、グルクロン酸、マレイン酸、マロン酸、サッカリン酸、フマル酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、アントラニル酸、４－ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸、エンボン酸（パモ酸）、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パントテン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、２－ヒドロキシエタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、スルファニル酸、シクロヘキシルアミノスルホン酸、ステアリン酸、アルギン酸、β－ヒドロキシ酪酸、サリチル酸、ガラクタル酸、及びガラクツロン酸がある。

【０１４６】

本発明のポリペプチドの好適な薬学的に許容できる塩基付加塩には、例えば、アンモニウム塩並びにアルカリ金属、アルカリ土類金属、及び遷移金属塩、例えば、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、及び亜鉛塩などの金属塩がある。薬学的に許容できる塩基付加塩は、塩基性アミン、例えば、Ｎ，Ｎ’－ジベンジルエチレン－ジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン（Ｎ－メチルグルカミン）、及びプロカインなどから製造される有機塩も含む。これらの塩の全ては、対応するポリペプチドから、例えば、適切な酸又は塩基を化合物と反応させることにより調製できる。

【０１４７】

方法

一局面において、本発明は、タンパク質分解酵素に対するポリペプチドのタンパク質分解耐性を、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも増加させる方法を含む。特

定の態様において、タンパク質分解酵素は、ＤＰＰ４、ＤＰＰ２、並びに／又はＤＰＰ４及び／若しくはＤＰＰ２に対して５０％以上の相同性を有する他のプロテアーゼである。

【０１４８】

別の局面において、本発明は、ポリペプチドの血清中安定性を、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも増加させる方法を含む。

【０１４９】

さらに別の局面において、本発明は、ポリペプチドのインビボ半減期を、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも改善する方法を含む。

【０１５０】

さらに別の局面において、本発明は、ポリペプチドの血液脳関門透過性を、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも改善する方法を含む。

【０１５１】

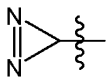
さらに別の局面において、本発明は、ポリペプチドの薬物動態の性質を、対応する化学修飾されていないポリペプチドよりも改善する方法を含む。

【０１５２】

特定の態様において、前記方法は、（ｉ）ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ基、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つの置換基を化学修飾すること（ここで、各化学修飾は、置換基を、置換されていてもよいアルキル、シクロアルキル、アルケニル、又はアルキニル基によって誘導体化することを独立に含む）、及び（ｉｉ）Ｎ末端アミノ基及びＮＨから選択される少なくとも１つの置換基を化学修飾することであって、置換基を基Ｘによって誘導体化することを独立に含む、化学修飾すること（ここで、Ｘは、それぞれの場合において独立して、→Ｏ、－ＯＨ、アルコキシ、$NH_2$、ＮＨ（$C_1$～$C_{16}$アルキル）、及びＮ（$C_1$～$C_{16}$アルキル）（$C_1$～$C_{16}$アルキル）からなる群より選択される）からなる群より選択される少なくとも１つを含む。

【０１５３】

特定の態様において、本発明は、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、又は$C_2$～$C_{16}$アルキニルの独立した存在を企図しており、それは、$C_1$～$C_{16}$アルキル、$C_3$～$C_{16}$シクロアルキル、$C_2$～$C_{16}$アルケニル、$C_2$～$C_{16}$アルキニル（－Ｃ≡ＣＨを含む）、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、$C_1$～$C_6$アルコキシ、アジド、ジアジリル



（メチルジアジリル又はトリフルオロメチルジアジリルを含む）、－ＣＨＯ、１，３－ジオキソール－２－イル、ハロ（トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、及びフルオロメチルなど）、シアノ、ニトロ、トリフリル、メシル、トシル、ハロアルコキシ（トリフルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、及びフルオロメトキシなど）、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、－ＳＲ、－Ｓ（＝Ｏ）（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$（$C_1$～$C_6$アルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（$C_1$～$C_6$アルキル）、－ＮＲＲ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＲＲ、－Ｎ（Ｒ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＲ）ＮＲＲ、及び－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＲ）$_2$（式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、Ｈ又は$C_1$～$C_6$アルキルである）からなる群より選択される少なくとも１つの基によって置換されていてもよい。他の態様において、企図されるアルキル基は少なくとも１つの場合において－$CH_2CF_3$である。

【０１５４】

さらに別の局面において、本発明は、疾患又は障害の治療又は予防を、それを必要とする対象において行う方法であって、治療上有効な量の少なくとも１種の本発明のポリペプチドを対象に投与することを含み、ポリペプチドは、任意で薬学的に有効な組成物として

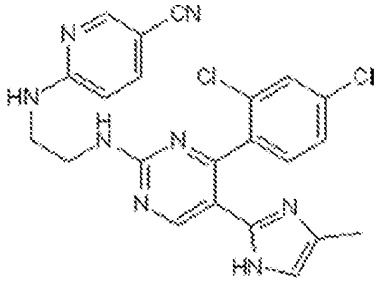
製剤化されている、方法を含む。特定の態様において、ポリペプチド又は組成物は、対象に、経口、直腸、粘膜（例えば、経口又は鼻腔内吸入により）、経粘膜、局所（経皮）、並びに静脈内、皮内、筋肉内、皮下、皮内、子宮内、硬膜外、及び脳室内注射から選択される少なくとも１つの経路により投与される。他の態様において、対象は、障害又は疾患を治療又は予防するのに有用な少なくとも１種の追加の薬剤をさらに投与される。さらに他の態様において、対象は哺乳動物である。さらに他の態様において、哺乳動物はヒトである。さらに他の態様において、疾患は、先天性高インスリン血症、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、短腸症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、及び禁煙である。

【０１５５】

別の局面において、本発明は、修飾された形態のＧＬＰ－２を、単独又はバルプロ酸及び／若しくはＣＨＩＲ９９０２１と組み合わせて含む治療用組成物並びにそのような組成物を使用して、短腸症候群、クローン病、腸の放射線障害、化学療法に誘発された腸炎、又は壊死性小腸結腸炎の治療のために、腸の細胞増殖を増加させ且つ／又は腸の成長を増大させる方法を提供する。

【０１５６】

ＣＨＩＲ９９０２１　６－［［２－［［４－（２，４－ジクロロフェニル）－５－（５－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）－２－ピリミジニル］アミノ］エチル］アミノ］－３－ピリジンカルボニトリル：



【０１５７】

さらに別の局面において、本発明は、対象内の細胞又は組織を画像化する方法を含む。特定の態様において、方法は、有効量の本発明のポリペプチドを、それを必要とする対象に投与することを含み、ポリペプチドは、検出可能な同位元素によって標識されており、且つ／又は検出可能な標識にコンジュゲートされている。他の態様において、検出可能な標識は、発色団、蛍光性基、生物発光基、化学発光基、又は放射性基を含む。さらに他の態様において、本発明のポリペプチドを使用して、インスリノーマ及び／又は膵神経内分泌腫瘍を画像化できる。

【０１５８】

製剤／投与

本発明の組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、及び／又は希釈剤を含み得、好適な方法により対象に投与され得る。本発明の組成物は、当技術分野において公知である任意の従来の方法に従って、経口剤形又は滅菌された注射用液剤を含む種々の形態で製剤化され得る。他の態様において、組成物は、吸入タイプの薬物送達系としても使用され得る。さらに他の態様において、本発明の組成物は、注射用液剤用に製剤化され得る。

【０１５９】

組成物は、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エアゾール剤、外用調合物、坐剤、及び滅菌された注射用液剤として製剤化され得る。当技術分野において公知である好適な製剤は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ　ＰＡ）に開示されている。本発明の組成物に含まれ得る担体、賦形剤、及び希釈剤には、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キ

シリトール、エリトリトール、マルチトール、スターチ、アラビアゴム、アルギネート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、水、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシル安息香酸プロピル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、又は鉱油がある。

【０１６０】

錠剤は、ポリビニルピロリドンなどの結合剤及び顆粒化剤、崩壊剤（例えば、架橋カルボキシメチルセルロースなどの膨潤性架橋ポリマー）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸塩）、保存剤（例えば、パラベン）、酸化防止剤（例えば、ＢＨＴ）、緩衝剤（例えば、リン酸又はクエン酸緩衝剤）、及びクエン酸塩／炭酸水素塩混合物などの発泡剤などの標準的な成分も含み得る。そのような賦形剤は周知であり、本明細書で詳細に議論される必要はない。カプセル製剤は、ハードゼラチン又はソフトゼラチンの種類のものであり、固体、半固体、又は液体形態の活性成分を含み得る。ゼラチンカプセルは、動物のゼラチンからでも、合成又は植物由来のその均等物からでも形成できる。固体剤形（例えば、錠剤、カプセル剤など）は、被覆されていても被覆されていなくてもよいが、典型的には、コーティング、例えば、保護膜コーティング（例えば、ワックス又はワニス）又は放出制御コーティングを有する。コーティング（例えば、オイドラギット（商標）タイプのポリマー）は、活性成分を消化管内の所望の位置で放出するように設計できる。そのため、コーティングは、消化管内の特定のｐＨ条件下で分解し、それにより化合物を胃又は回腸若しくは十二指腸中で選択的に放出するように選択できる。或いは又は追加的に、コーティングは、苦みのある薬物などの不快な味を隠す矯味剤として使用できる。コーティングは、糖又は不快な味を隠すことを促進する他の作用物質を含み得る。コーティングの代わりに又はコーティングに加えて、抗生物質は、放出制御剤、例えば、消化管中の様々な酸度又はアルカリ度の条件下で化合物を選択的に放出するように適合され得る放出遅延剤を含む固体マトリックス中にて提供され得る。或いは、マトリックス材料又は放出抑制コーティングは、剤形が消化管を通過するときに実質的に連続的に浸食される浸食性ポリマー（例えば、無水マレイン酸ポリマー）の形態をとり得る。さらなる選択肢として、活性化合物は、化合物の放出の浸透圧制御を与える送達系にて製剤化され得る。浸透圧放出及び他の遅延放出又は持続放出製剤は、当業者に周知の方法に従って調製され得る。医薬製剤は、期間全体の治療薬を単一の包装、通常、ブリスターパックに収容されている「患者用パック」で患者に提供され得る。患者用パックは、薬剤師がバルク供給物から患者の医薬品供給物を分ける従来の処方薬よりも、患者が、通常は患者の処方薬に存在しない、患者用パック中に収容されている添付文書に常にアクセスできる点で利点を有する。添付文書の封入が医師の指示への患者のコンプライアンスを改善することが示されている。各錠剤、カプセル剤、カプレット剤、丸剤などは、投与量が例えば本明細書で議論される通りである単一の投与量であり得るか、或いは、投与量は、２つ以上の錠剤、カプセル剤、カプレット剤、丸剤などであり得る。例えば、錠剤、カプセル剤などが１２５ｍｇであり、投与量が２５０ｍｇである場合、患者は、２つの錠剤、カプセル剤などを、投与に対して存在する各間隔で服用し得る。

【０１６１】

本発明の組成物は、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、又は界面活性剤など、通常使用される希釈剤又は賦形剤と共に製剤化され得る。経口投与用の固体製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、又はカプセル剤があり、そのような固体製剤は、組成物に加えて、少なくとも１種の賦形剤、例えば、スターチ、炭酸カルシウム、スクロース、ラクトース、又はゼラチンを含む。単純な賦形剤に加えて、ステアリン酸マグネシウム又はタルクなどの滑沢剤も使用され得る。経口投与用の液体製剤には、懸濁剤、液剤、乳剤、及びシロップ剤があり、多くの場合に使用される単純な希釈剤である水及び流動パラフィンに加えて、種々の賦形剤、例えば、湿潤剤、着香剤、芳香剤、及び保存剤を含み得る。

【０１６２】

非経口投与用の製剤には、滅菌された水溶液、非水溶液、懸濁液、乳液、凍結乾燥調合物、及び坐剤がある。非水性溶媒又は懸濁化剤として、プロピレングリコール、ポリエチ

レングリコール、オリーブ油などの植物油、又はオレイン酸エチルなどの注射用エステルが使用され得る。坐剤の基剤として、ウイテプゾール、マクロゴール、ツイン６１、カカオ脂、ラウリン脂、又はグリセロゼラチンが使用され得る。

【０１６３】

本発明の薬学的組成物の投与量は、患者の状態及び体重、疾患の重症度、薬物の種類、並びに投与経路及び期間により様々であり、当業者により好適に選択され得る。特定の効果のために、本発明の薬学的組成物は、０．０１～１００ｍｇ／ｋｇ／日の投与量で投与され得る。投与は、概して１日１～４回、例えば、１日１回、２回、３回、又は４回であり得る。２４時間の期間に投与される最大量は、１５００ｍｇまでであり得る。投与は、２～３０日、例えば、７、１０、又は１４日などの３～２１日の過程にわたり得る。当業者は、対象の体重及び全体的な健康状態並びに抗生物質を投与する目的により、投薬を調整できる。得られる反応に応じて、反復する過程の治療が進められ得る。

【０１６４】

本発明の組成物は、種々の経路により対象に投与され得る。全投与様式、例えば、経口的、直腸内、粘膜（例えば、経口又は鼻腔内吸入により）、経粘膜的、局所的（経皮）、又は静脈内、皮内、筋肉内、皮下、皮内、子宮内、硬膜外、若しくは脳室内注射によるものが企図される。

【０１６５】

特記されない限り、本明細書及び特許請求の範囲で使用される成分の量、分子量などの性質、反応条件などを表現する全ての数は、全ての場合に用語「約」により修飾されていると理解されるものとする。したがって、そうでないと示されない限り、以下の本明細書及び添付の特許請求の範囲で述べられる数値的パラメーターは、本発明により得られるように求められる所望の性質によって変わり得る概数である。少なくとも、均等物の主義の適用を特許請求の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメーターは、報告される有効桁数に照らして、通常の丸め技法を適用することによって少なくとも解釈されなくてはならない。

【０１６６】

本発明の広い範囲を述べる数値範囲及びパラメーターが概数であるにもかかわらず、具体例に述べられる数値は可能な限り精密に報告される。しかし、あらゆる数値は、本質的に、そのそれぞれの試験測定値に見られる標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を含む。

【０１６７】

どのような値及び範囲が本明細書に提供されようとも、これらの値及び範囲により包含される全ての値及び範囲が本発明の範囲内に含まれるように意図されることが理解されるであろう。さらに、これらの範囲内にある全ての値及び値の範囲の上限又は下限も本願により企図される。

【０１６８】

当業者は、定型的な実験を利用するのみで、本明細書に記載される具体的な手順、態様、特許請求の範囲、及び実施例の多くの均等物を認識するか又は確かめることができるであろう。そのような均等物は、本発明の範囲内にあり、本明細書に添付される特許請求の範囲により網羅されると考えられた。例えば、非限定的に反応時間、反応サイズ／体積、及び溶媒、触媒などの実験試薬、圧力、雰囲気の条件、例えば、窒素雰囲気、及び還元剤／酸化剤などを含む反応条件の、当技術分野で認識されている選択肢を用い且つ定型的な実験のみを利用した変更は、本願の範囲内にあることが理解されるべきである。

【０１６９】

以下の実施例は、本発明のアッセイ方法、スクリーニング方法、及び治療方法を製造及び使用する方法の完全な開示及び説明を当業者に与えるために述べられ、本発明者が本発明であると考えているものの範囲を限定するように意図されない。

【実施例】

【０１７０】

本発明は、ここで、以下の実施例に関連して説明される。これらの実施例は説明の目的のためにのみ与えられ、本発明はこれらの実施例に限定されず、むしろ本明細書に提供される教示の結果として明らかな全ての変形形態を包含する。

【０１７１】

特記されない限り、本明細書に記載される合成の出発物質は、商業的供給源又は公知の合成手順から得られ、さらに精製せずに使用された。

【０１７２】

動物：

２０～２４週齢のＣ５７ｂｌｋ６Ｊ野生型雄性マウスを使用して、グルコース代謝の改善に対するＧＬＰ１アナログの急性効果を調査する。マウスに通常食（ｃｈｏｗ　ｄｉｅｔ）を与え、試験の期間（８週間まで）個別に収容する。マウスをＧＬＰ－１アナログで処置し、耐糖能試験に供して治療成績を評価する。

【０１７３】

測定すべきパラメーターの統計的に有意な差異を検出するために、１実験条件及び１エンドポイントあたり１０匹のマウスを使用する。雄性マウスを、取扱い及び試験中のけんかを避けるために個別に収容する。２つのコホートのマウスを使用する：参照製品リラグルチドの作用のための投薬及び時間間隔を決定するための第１のコホートの４０匹のマウス（それぞれ１０匹のマウスの４つの実験群）、及び新たなＧＬＰ－１アナログの性質を決定するための第２のコホートの５０匹のマウス（それぞれ１０匹のマウスの５つの実験群）。

【０１７４】

全部で１３０匹のマウスをＧＬＰ２試験に使用する。５週齢雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスを実験前に１週間順応させる。動物にＧＬＰ－２アナログ（実験群）又はガテックス（登録商標）（対照群）を投与する。各化合物の４つの投与量を試験する。マウスを、注射を開始した後の２つの時点（６又は１０日）で安楽死させ、組織形態計測分析のために腸のセグメントを回収する。追加の群の動物（各化合物あたり１群）は、注射を開始した後、種々の時点でＰＥＴ／ＣＴイメージングを受ける。動物を１９～２２℃の一定の周囲温度及び４０～６０％の湿度の換気付きの施設に１２時間の明暗周期（７：００に点灯）で収容して維持する。

【０１７５】

活性及び安定性のアッセイ：

受容体結合及び細胞内シグナル伝達の細胞アッセイを本発明の化合物により実施した。簡潔に述べると、ＨＥＫ２９３細胞を、（ｉ）ＧＬＰ－１Ｒ（又はエンプティ発現ベクター）、（ｉｉ）$CRE_{6x}$－ＬＵＣレポーター遺伝子（受容体刺激により引き起こされるｃＡＭＰ産生を検知する）、及び（ｉｉｉ）β－ガラクトシダーゼ（トランスフェクション効率の対照として）をコードするｃＤＮＡにより一過性にトランスフェクトさせた。２４時間トランスフェクトした後、細胞を種々の濃度のペプチド（又は対照／ブランク）と共に無血清培地中で6時間インキュベートした。次いで、細胞を溶解させ、Ｓｔｅａｄｙ　Ｌｉｔｅ試薬（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を加え、ルシフェラーゼ活性をＴｏｐＣｏｕｎｔ　ＮＸＴ　ＨＴＳプレート照度計で測定する。色素基質（２－ニトロフェニルβ－Ｄ－ガラクトピラノシド）と共にさらにインキュベートした後、ウェル間のトランスフェクションのばらつきを補正する対照として、４２０ｎｍでの光学濃度を分光光度計により測定する。ＧＬＰ－１Ｒリガンド活性のＳ字状濃度反応曲線を計算して効力を決定する。

【０１７６】

濃度対ルシフェラーゼ活性をプロットすると、単一の工程で、結合（効力）とシグナル伝達（有効性）との組み合わせの定量的なパラメーターが生じた。細胞をＤＰＰ４処理ペプチド及び対照ペプチドにより４時間刺激した。ＤＰＰ４処理ペプチド：１０μｌの０．２６ｍＭペプチドを２μＬの緩衝液±ＤＭＳＯ中ＤＰＰ４により１８時間インキュベートした。対照ペプチド：１０μｌの０．２６ｍＭペプチドを緩衝液±ＤＭＳＯに加えた。最終ＤＭＳＯ濃度は全ペプチドで同じであり、全ペプチドをＤＰＰ４アッセイのために０．

２６ｍＭ濃度に希釈した。
【０１７７】
ＤＰＰ４によるペプチド不活性化の検出：
化合物を、組換え型ＤＰＰ４又はビヒクル（トリス緩衝液）の存在下において、一晩３７℃でインキュベートする。次いで、試料をＧＬＰ－１Ｒアゴニストアッセイで評価する。ＤＰＰ４により誘発されるペプチドのＮ末端切断が事実上完全な機能喪失を起こすため、影響を受けていないペプチドの減少は、対応する効力低下に反映される（ＤＰＰ４対ビヒクル処理；例えば、１０分の１の効力低下は９０％分解を示す）。この分析の例は図８に示されている。相補的評価をＥＳＩ　ＬＣ－ＭＳにより実施して（図６にある通り）、機能アッセイにおける効力の比較により検出するのに困難である潜在的な軽微な程度のＤＰＰ４媒介性の加水分解を検出する。
【０１７８】
実施例１：修飾されたグルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）
本明細書において示される通り、本発明は、ペプチドに遍在するタンパク質分解不安定性の問題を改善、予防、又は最低限にする方法を提供する。そのような方法は、化学修飾された新規ポリペプチドの調製を含む。
【０１７９】
特定の態様において、修飾は、少なくとも１つの２，２，２－トリフルオロエチル基をポリペプチド中のＮ末端アミノ基、他の遊離アミノ基、チオール基、及び／又はチオエーテル基に共有結合させることを含む。そのような修飾は、種々の合成基を使用して達成できる。非限定的な例において、この化学的な誘導体化は、迅速で効率よいフルオロアルキル化反応を利用して実施でき、それをグルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）の２つのアナログにより実証する。
【０１８０】
固相ペプチド合成により合成されたＧＬＰ－１を、樹脂結合している間に誘導体化して、予測可能であり且つよく行われているペプチドのアセチル化と同等な容易さ及びスピードで所望のトリフルオロエチルアナログをもたらした。ＧＰＬ－１自体に加えて、ＧＬＰ－１のＮ－アセチルアナログを対照として調製した。ＧＬＰ－１のビス－トリフルオロエチルアナログも得た。天然及び修飾されたＧＬＰ－１バリアントのＨＰＬＣトレースを図１に示す。この修飾に含まれる化学作用を図２に表す。
【０１８１】
２種の例示的な化学修飾されたペプチドを、単一の自動合成を利用して、対応する対照ポリペプチドと共に合成した。配列ＨＡＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＧＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲ－$NH_2$（ＧＬＰ－１　７－３６アミド）を固相Ｆｍｏｃ化学により自動合成装置で調製した。固体担体はＭＢＨＡ－Ｒｉｎｋアミド樹脂であり、０．３５ｍｍｏｌ／グラムをロードする。０．１ミリ当量の樹脂（２８０ｍｇ）から、粗製のＧＬＰ－１を有する６２９ｍｇの樹脂を得た。
【０１８２】
それぞれ理論上０．０１６ｍｍｏｌのＧＬＰ－１を有する３つの１００ｍｇ部分の誘導体化された樹脂を以下の通り処理した。
【０１８３】
部分１：ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中２０％ピペリジンによる脱保護；ＤＭＦによる洗浄；ジクロロメタン（ＤＣＭ）による洗浄；トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、トリイソプロピルシラン（ＴＩＰＳ）、及び水（９５／２．５／２．５）による切断；小さい体積への蒸発；及びエーテル中での結晶化は、凍結乾燥後に２６ｍｇの粗製ＧＬＰ－１を与えた。
【０１８４】
部分２：ＤＭＦ中２０％ピペリジンによる脱保護；ＤＭＦによる洗浄；ＤＭＦ（１０ｍＬ）中無水酢酸（１．５ｍＬ）及びジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ、０．１５ｍＬ）による処理；ＤＭＦによる洗浄；ＤＣＭによる洗浄；ＴＦＡ／ＴＩＰＳ／水９５／２

．５／２．５による切断；小さい体積への蒸発；及びエーテル中での結晶化は、凍結乾燥後に２１ｍｇの粗製Ｎ－アセチル－ＧＬＰ－１を与えた。

【０１８５】

部分３：ＤＭＦ中２０％ピペリジンによる脱保護；ＤＭＦによる洗浄；ＤＣＭによる洗浄；フェニル（トリフルオロエチル）ヨードニウムトリフルイミド１ａ（９ｍｇ、０．０１６ｍｍｏｌ、ＤＣＭ中、２ｍＬ）を３分間加える；次いで、コリジン（１０ｍｇ、０．０８ｍｍｏｌ、ＤＣＭ中、４ｍＬ）を５分間加える；次いで、ＤＭＦによる洗浄；ＤＣＭによる洗浄；ＴＦＡ／ＴＩＰＳ／水９５／２．５／２．５による切断；小さい体積への蒸発；及びエーテル中での結晶化は、凍結乾燥後に３０ｍｇの粗製Ｎ－トリフルオロエチル－ＧＬＰ－１を与えた。この粗製物質は、２，２，２－トリフルオロエチル－ＧＬＰ－１（図４）を主成分として、（ビス－２，２，２－トリフルオロエチル）－ＧＬＰ－ｌを微量成分として（ＥＳＩ／ＭＳによる）含んでいた。

【０１８６】

各粗製物質をＨＰＬＣにより精製した。分析ＨＰＬＣは、９６％を超える純度を示した。保持時間（Ｖｙｄａｃ　２１８ＴＰ１０４　Ｃ－１８カラム、２０分かけて溶媒Ａ中３５－５５％溶媒Ｂ）は、９．６分（ＧＬＰ－１）、１０．９分（Ｎ－アセチル－ＧＬＰ－１）、１１．６分（Ｎ－（２，２，２－トリフルオロエチル）－ＧＬＰ－ｌ）、及び１３．４分（（Ｎα，Ｎπ－ビス－２，２，２－トリフルオロエチル）－ＧＬＰ－１）であった。ＥＳＩ／ＭＳデータは純粋な化合物と一致した。溶媒Ａ＝９９％Ｈ２Ｏ、１％ＣＨ３ＣＮ、０．１％ＴＦＡ；溶媒Ｂ＝９０％ＣＨ３ＣＮ、１０％Ｈ２Ｏ、０．０７％ＴＦＡ。

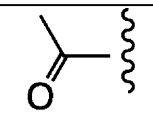
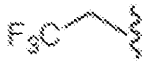
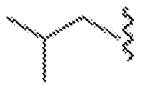
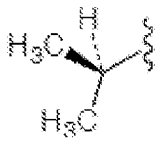
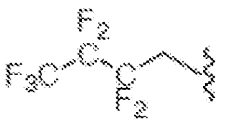
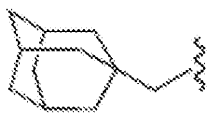
【０１８７】

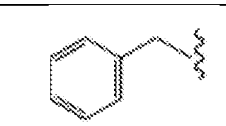
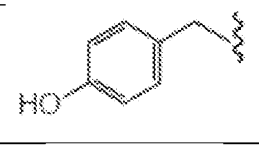
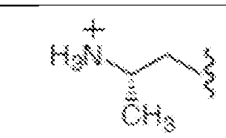
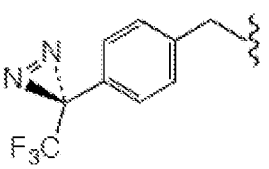
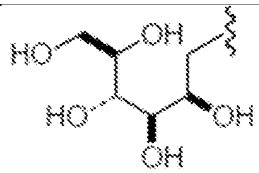
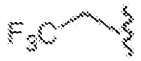
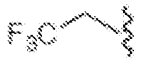
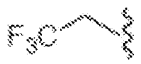
実施例２：ＤＰＰ４に対する感受性

化合物を組換え型ＤＰＰ４又はビヒクル（トリス緩衝液、ｐＨ８．０）の存在下において一晩３７℃でインキュベートした。次いで、試料を、本明細書の他の箇所に記載されている通り、ＧＬＰ１Ｒアゴニストアッセイで評価した。ＤＰＰ４により誘発されるペプチドのＮ末端切断が事実上完全な機能の喪失をもたらすため、影響を受けていないペプチドの減少は、対応する効力低下に反映される（ＤＰＰ４対ビヒクル処理；例えば、１０分の１の効力低下は９０％分解を示す）。非限定的な例を図３に示す。相補的評価をＥＳＩ　ＬＣ－ＭＳにより実施して、機能アッセイにおける効力の比較により検出するのが困難であり得る潜在的な軽微な程度のＤＰＰ４媒介性の加水分解を検出できる。

【０１８８】

（表２）アゴニスト効力及びＤＰＰ４媒介性の加水分解に対する感受性

| ポリペプチド | N末端アミノ修飾 | 受容体 | $EC_{50}$ (pM) | DPP4 切断 |
|---|---|---|---|---|
| GLP-1 | - | GLP-1R | 2.2 | +++ |
| |  | GLP-1R | 99.1 | - |
| |  | GLP-1R | 1.3 | - |
| |  | GLP-1R | 6.4 | - |
| |  | GLP-1R | 3.7 | - |
| |  | GLP-1R | 4.1 | - |
| |  | GLP-1R | 1.0 | - |
| |  | GLP-1R | 3.9 | - |

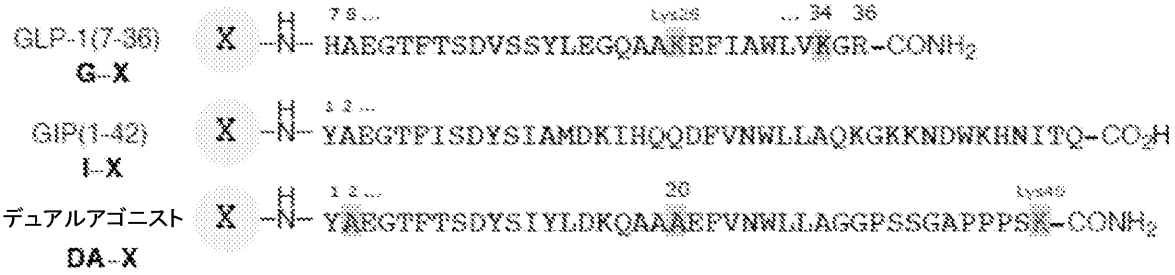
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| |  | GLP-1R | 4.4 | - |
| |  | GLP-1R | 1.0 | n.d. |
| |  | GLP-1R | 2.7 | n.d. |
| |  | GLP-1R | 2.6 | - |
| |  | GLP-1R | 123 | n.d. |
| |  | GLP-1R | 3.2 x $10^3$ | - |
| リラグルチド | - | GLP-1R | 1.2 | ++ |
| |  | GLP-1R | 1.7 | - |
| エキセナチド | - | GLP-1R | 1.1 | + |
| |  | GLP-1R | 1.2 | - |
| GIP | - | GIPR | 0.9 | +++ |
| |  | GIPR | 0.6 | - |

ＧＬＰ－１はＧＬＰ－１（７－３６）に対応し；ＧＩＰはＧＩＰ（１－４２）に対応する。n.d.＝未決定。

【０１８９】

本明細書において企図される非限定的な構成体をスキーム１（図６）に示し、Ｘは、本明細書において企図される化学修飾を表す：

スキーム1:




ＧＬＰ－１（７－３６）アミド：Ｘ＝Ｈ；
ＧＩＰ（１－４２）酸：Ｘ＝Ｈ；
デュアルアゴニスト：Ｘ＝Ｈであり、Ｌｙｓ４０がアシルＣ１６で誘導体化されており、Ａｌａ２及び／又はＡｌａ２０は独立に任意でＡｉｂである；
リラグルチド：残基３４＝Ａｒｇであり、残基３７＝グリシンであり、Ｌｙｓ２６がγ－Ｇｌｕ－Ｃ１６酸によりアシル化されている、ＧＬＰ（７－３７）酸。

【０１９０】

残基修飾のサイズ及び他の分子的性質の役割の評価：

受容体結合部位（リガンドに応じて塑性になり得る）を最もよく補完する分子パラメーターを確立するために、構成体をサイズ、疎水性、電荷、分極率、立体化学、及び電気陰性度などの種々の属性に関して試験する。ＧＬＰ－１中の認容された付加物（ａｐｐｅｎｄａｇｅ）の予測ｐＫａ値は、陽電荷が必須ではないことを示すものの、天然のリガンドは生理学的ｐＨで部分的に荷電している。結合された基が結合ポケット中に収容されると仮定して、Ｎ－ベンジル誘導体のアリール環の４位の置換基の電子吸引性及び電子供与性を変化させて電子的因子を評価する。

【０１９１】

受容体との残基相互作用の部位を特定するための光親和性プローブ：

ＧＬＰ－１及び関連ペプチドの同種受容体と直接相互作用するそれらのＮ末端領域は、結晶化又は架橋アプローチのいずれかを利用する構造特性解析から除外されてきた。後者の限界は、ＧＬＰ－１のその受容体への結合と適合性のあるＨｉｓ７の修飾を有する好適な光親和性プローブがないことである。そのようなツールを生成するために、天然のリガンドに類似な効力及び有効性を示す既に特性決定されたリガンドに対する適度の構造摂動を利用する。そのため、パラ－トリフルオロメチルジアジリンベンジル誘導体を調製した。この化合物は、完全なアゴニスト有効性を保ち、おそらくアリール基の４位での立体的かさ高さにより、効力はＧＬＰ－１の１２３分の１である。パラ－アジドベンジル及びメチルジアジリンエチル誘導体をさらに調製し、試験する。光活性基ジアジリン及びフェニルアジドは、その分光特性、及び反応性カルベン又はニトレンが生成されると非常に近接しているＣ－Ｈ結合に迅速に挿入するその能力のために選択される。特定の態様において、ポリペプチド構成体は、結合（例えば、リラグルチドにおける脂質付加）が十分に許容される部位、Ｌｙｓ２６に結合した別の親和性タグ（例えば、ビオチン）をさらに備えている。ＧＬＰ１Ｒを含む単離された細胞膜とのインキュベーション及び光架橋後、受容体－リガンド複合体はアフィニティー精製され、それに続いてプロテアーゼに消化される。次いで、標識の部位が、ゲル上でのＭＡＬＤＩ　ＭＳ又はＬＣ　ＥＳＩ－ＭＳのいずれかで実施すべき質量分析により特定される。

【０１９２】

本明細書に表されるデータは、様々な修飾が、受容体活性化作用を損なわずにリガンドのＮ末端で許容されることを表す。同時に、これらの変更は、ＤＰＰ４により媒介される加水分解作用に対する完全な保護を与える。全体として、これらの知見は、他のクラスＢＧＰＣＲに適用できる受容体活性化の構造決定因子を解明する新たな機会を開く。

【０１９３】

実施例３：ＤＰＰ４耐性アナログ

耐性アナログを、図６～１０、１２、１３、１４、１８、１９、及び２１に示す。リラグルチドのＤＰＰ４非感受性アナログ、ＧＬＰ－１のパルミトイル化された形態をＨｉｓ７残基の誘導体化により生成させる。パルミトイル化は、ペプチド多量体化を促進し、リラグルチドを部分的に保護する機構として可逆的血清アルブミン結合を増大させる。リラグルチド中のＨｉｓ７のＮ－アルキル化と脂質付加の潜在的な相乗効果を調査する。やはりアルブミン結合を増大し得る、ＧＬＰ－１アナログ中の別の脂質付加によるＨｉｓ７修飾（化合物「Ａ６」）も探査する。

【０１９４】

特定の態様において、ＧＬＰ－１及びアナログ中の末端Ｈｉｓ７の現在企図されている修飾は、アゴニスト活性を損なわずにＤＰＰ４による切断を選択的になくす。他の態様において、ＧＬＰ－１及びアナログ中の末端Ｈｉｓ７の現在企図されている修飾は、ＧＬＰ－１の天然の非ヘリカルＮ末端コンフォメーション並びに親和性及びアゴニスト機能にとって重要な受容体との相互作用を本質的に維持する。さらに他の態様において、ＧＬＰ－１及びアナログ中の末端Ｈｉｓ７の現在企図されている修飾は、ＧＬＰ－１Ｒリガンド結合ポケット対ＤＰＰ４による認識の詳細の探査を可能にし、異なる生体コンパートメントへのアクセス（例えば、口腔又は鼻腔内適用後の粘膜取り込み；今後の動向として、血液脳関門を越えることによる薬物誘発性体重減少を潜在的に最適化する）を容易にするポリペプチドの微調整も可能にする。

【０１９５】

本明細書に示される通り、リラグルチドは、実際に、ＤＰＰ４により大幅に不活性化される。改善された感度のよいバイオアッセイによる血清中の活性薬物レベルの評価は、従来のペプチド特異的なＲＩＡ／ＥＬＩＳＡ（産業において、例えば、リラグルチド及びエキセナチドの創薬中に典型的に使用される）に対する著しい技術的な進歩を呈する。従来のサンドイッチ免疫アッセイが、ペプチドの影響を受けていないＮ末端及びＣ末端を同時に検出する特異的抗体に依存するのに対し、本アプローチは、構造修飾にかかわらず、新たな強力なアゴニストに普遍的に適用可能である。

【０１９６】

インビトロ試験

天然ＧＬＰ－１による構造－機能分析の一部として、異なる化学属性を有する７種のアナログを作り出す。Ｈｉｓ７修飾を、リラグルチド又は代わりの脂質部分を有するアナログのいずれかに導入する。細胞ベースアッセイを利用して、ＧＬＰ－１Ｒでのこれらのペプチドの効力及び有効性を評価する。並行試験を利用して、インビトロでのＤＰＰ４への長期の暴露後の不活性化を定量化する。リラグルチドと直接比較する。強力な／安定なアナログをインビボ試験のために選択できる。

【０１９７】

インビトロ実験は、未修飾ＧＬＰ－１がＤＰＰ４分解を非常に受けやすいことを確認した。酵素との一晩のインキュベーション後、見かけの効力（ａｐｐａｒｅｎｔ　ｐｏｔｅｎｃｙ）は５００分の１未満に低減し、９９．８％より多くのペプチドが分解／不活性化されたことを示す。糖尿病薬として使用される脂質付加されたＧＬＰ－１アナログであるリラグルチドは、よりＤＰＰ４耐性があると報告されているが、それでもこの酵素によりインビボで分解される。実際に、リラグルチドは、ＤＰＰ４とのインキュベーション後に５０分の１を超える効力低下を起こすことが示され、９８％より多くのペプチドが分解されたことを示した。

【０１９８】

ＧＬＰ－１のＮ末端のＨｉｓ７は、ＧＬＰ－１Ｒ活性化において重要な役割を果たすが、同時にペプチド認識及びＤＰＰ４による分解を可能にする。Ｈｉｓ７での修飾は、ＧＬＰ－１の安定化のために実際的でないと考えられてきた。Ｈｉｓ７を置換又は例えばアセチル化により修飾する以前の試みは、ＤＰＰ４耐性を与えるが、アゴニスト効力の大幅な低下も起こす（図８、９、及び９ａ）。本機能アッセイは、このアナログが、ＧＬＰ－１

ｂの約５０分の１の効力低下と合わせて、ＤＰＰ４に対する安定性を有することを示した。

【０１９９】

しかし、本明細書で表される通り、本修飾は、ＧＬＰ－１の安定性を、そのアゴニスト機能を乱さずに選択的に増大させる。トリフルオロエチル、イソブチル、又はベンジルアナログは、事実上完全なＤＰＰ４耐性を与える一方、かろうじて検出可能である有意でない効力変化を起こした。

【０２００】

さらに、トリフルオロエチル化は、リラグルチド効力に影響しなかった。さらに、このアナログは、ＤＰＰ４分解に対する完全な耐性を示した。本発明において企図される残りのアナログは、類似のアッセイを利用して、アゴニスト活性及び酵素安定性に関して評価できる。そのようなアナログにはリラグルチドアナログ「Ａ６」があり、それは、顕著に高いアルブミン結合を付与する代わりの脂質部分をＲ２位に含む（脂質$l_2$）。Ａ６は、おそらくＤＰＰ４による残存するＡ６の分解によりリラグルチドと同程度に迅速に浄化される。

【０２０１】

ペプチドを、Ｆｍｏｃ化学を利用して標準的な自動化ペプチド合成により組み立てる。Ｌｙｓ２６を、$PhSiH_3$及び$Pd(PPh_3)_4$を利用して選択的に除去できるアリルオキシカルボニル（ａｌｌｏｃ）基により側鎖保護し、その後、既存の化学を利用して$R^2$位で$l_1$又は$l_2$に結合させる（図７）。$R^1$位でのＮ末端修飾を、対応するアルデヒド及び$NaBH_4$を利用して固相上での還元的アミノ化により導入する。トリフルオロエチル含有化合物（ＧＬＰ－１ｃ、ＭＧ１、及びＭＧ４；図７）の場合、ヒスチジン誘導体を独立に合成する。構成体を、$CF_3CO_2H$：ＴＩＰＳ：$H_2O$（９５：２．５：２．５）を使用して樹脂から切断し、逆相ＨＰＬＣを利用して精製し、ＥＳＩ及びＭＡＬＤＩ－ＭＳを利用して分析する。

【０２０２】

インビボ試験

一局面において、ＧＬＰ－１アナログによる血糖変動の弱まりを分析した（図２２Ａ）。図２１は、天然のＧＬＰ－２がＤＰＰ４により分解される一方、トリフルオロエチル装飾されているアナログ（ＧＬＰ２－４）が分解に対して完全に耐性があることを示す一連のグラフを与える。ペプチドを組換え型ＤＰＰ４と共にインキュベートした。次いで、ＧＬＰ－２及びＧＬＰ２－４の段階希釈液を、ヒトＧＬＰ－２Ｒ及びｃＡＭＰ応答レポーター遺伝子をコードするｃＤＮＡによりトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞に適用した。ＤＰＰ４は、４０分の１を超えるＧＬＰ－２効力の低下を誘発し、９７％より多くのペプチドが分解されたことを反映している。対照的に、ＧＬＰ２－４では効力低下が全く認められなかった。Ｎ＝４、平均＋ＳＥＭ。

【０２０３】

図２２Ａは、リラグルチドか$CHCF_3$装飾されている誘導体、Ｌｉｒａ－４のいずれかのボーラス注射後の血漿中での薬物の活性の時間依存性の低減を比較するグラフを与える。ラットは、中心カテーテルによりいずれかの薬物のボーラス注射を受け、それに続いて、示された間隔後の連続採血及び受容体活性化作用のバイオアッセイによる血漿中での薬物の活性の測定を実施した。注射直後の各ペプチドの効力を１００％と定義した。リラグルチドの血漿中残存は、Ｌｉｒａ－４の$CHCF_3$修飾により延長する。

【０２０４】

図２２Ｂは、経口耐糖能試験後のＬｉｒａ－４の持続した血糖降下活性を表す。マウスは、ビヒクル、Ｇ－４、リラグルチド又はＬｉｒａ－４（バーの各群中で左から右に表す）のいずれかの皮下注射を受けた。３０分後及び５．５時間後、２回の連続的な経口グルコース負荷を強制経口投与により適用した。血糖値を薬物注射の直前（－３０分）及びグルコース負荷後の示されている時間間隔で測定した。化合物Ｇ－４の単回の注射は、第１のグルコース負荷後に血糖変動を弱めたが、数時間後に依然として活性があり、第２のグ

ルコース曝露を弱めた。
【０２０５】
実施例４：修飾された形態のＧＬＰ－２
ＤＰＰ４耐性の増大は、ＧＬＰ－２のアミノ末端の単純な化学修飾を利用して達成できる。さらに、ＧＬＰ－２中のある部位は、活性を損なわずにアミノ酸置換（Ｌｅｕ１７からＬｙｓへ）及びパルミトイル化を許容する。これらの修飾は、図６Ｂに示される化合物ＧＬＰ－２　Ｌ１７Ｋ［Ｌ１－４］をもたらし、それはＧＬＰ－２と比べてＡｓｐ３→Ｇｌｕ置換を含む（図６Ａ）。脂質付加は、一般に、血清アルブミンへの結合を増加させる。特定の態様において、本発明のＧＬＰ－２アナログは、ＧＬＰ－２よりも改善されたプロテアーゼ耐性、減少した腎クリアランス、及び改善された薬物動態を有する（図１８）。他の態様において、本発明のＧＬＰ－２アナログを使用して、粘膜炎、放射線により誘発される腸の損傷、及びクローン病などの疾患を治療できる。
【０２０６】
本明細書において表される通り、新規の脂質付加された安定なＧＬＰ－２アナログを、安定なＧＬＰ－２に異なる脂質アンカーを連続的に導入することにより調製し、それぞれがプロトタイプ化合物、ＧＬＰ－２　Ｌ１７Ｋ［Ｌ１－４］中のパルミチン酸を置換する。対応するリガンドを、既存のインビトロ細胞ベースアッセイを利用して、Ｆ－ＧＬＰ２－パルムＧＬＰ－２　Ｌ１７Ｋ［Ｌ１－４］、及びガテックス（登録商標）と比較する。効力、有効性、プロテアーゼ耐性、アルブミン結合、及びオリゴマー形成を評価し、インビボ試験のための化合物の選択に利用する。ＧＬＰ－２アナログの腸の成長を促進する効果を、脂質付加された安定なＧＬＰ－２アナログ及びガテックス（登録商標）をマウスに皮下投与することにより評価する。ペプチドの有効性を、腸の重量、絨毛の高さ、及び陰窩の深さの定量化を含む組織形態計測分析を利用して評価する。さらに、増殖指数（Ｋｉ６７染色）及びグルコース取込み（ＰＥＴスキャニング）を測定する。
【０２０７】
Ｆ－ＧＬＰ２－パルムは、新規の高効力（$EC_{50}$＝４４±１３ｐＭ（平均±ＳＥＭ、ｎ＝４）、プロテアーゼ（ＤＰＰ４）耐性の脂質付加されたＧＬＰ－２ペプチドアナログである。ＬｅｕからＬｙｓへの置換を１７位（「Ｋ＊」と示す）で実施して、β－アラニンスペーサーによる脂質テール（パルミチン酸、「Ｃ１６」）のコンジュゲートを容易にする。ＤＰＰ４耐性を、トリフルオロメチル修飾されたＮ末端ヒスチジンの導入により付与した。
【０２０８】
実施例５：ＧＬＰ－１のＮ末端の修飾
以下の実験は、ＧＬＰ－１Ｒでの受容体活性化作用に基づく治療論の設計における継続的な課題：ＤＰＰ４に対する耐性を受容体活性化中の効力及び有効性の保持と組み合わせることに対処する（表３参照）。データは、ＧＬＰ－１／ＧＬＰ－１Ｒ系が、所望の性質の両方を示す広範囲の誘導体に対して耐性があることを証明した。最初に、ＧＬＰ－１アナログの作成に利用可能な構造空間を探査する。二方向からのアプローチを利用して、可能性のある候補の潜在的に大きい状況を狭くする（下文参照）。ＧＬＰ－１のＮ末端に位置するＨｉｓ７のα－アミンの化学装飾は、様々な官能基及び大きさにわたる。文献中の公知のＳＡＲ及び本明細書に表されるデータから、２、３の公知の要件がある：（ｉ）Ｈｉｓ７のメチルイミダゾール側鎖の存在が重要であること、（ｉｉ）Ｎ－アシル（Ｎ－アセチルを含む）誘導体は効力及び有効性を低下させること、（ｉｉｉ）窒素上の大きい極性の付加物は許容されないこと（例えば、Ｎ－マンニトール又はＮ－グルシトール）。それでもなお、データは、生理学的ｐＨでの荷電した基を含む様々な修飾が許容されることを表す。ここで、実践的なモデルは、ヒスチジンになされた化学変化を収容する、膜－水界面に近接した受容体上の結合ポケットを構想する。このポケットの正確な寸法及び精密な機能的構成（ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｍａｋｅｕｐ）は依然として定義されていないが、およそ２４０$Å^3$又はそれよりわずかに大きい体積を有するＧＬＰ－１Ｒ結合ボックスが仮定され得る（Ｎ－メチルアダマンチル誘導体Ｇ－１０の活性に基づく）。この仮定を

試験し、この結合ボックス内の推定上の受容体－リガンド相互作用の性質を探査するために、５０種のＧＬＰ－１誘導体のライブラリーを調製し、大きさ、疎水性、電荷、極性、立体化学（Ｇ１７－２１）、及び分極率の基準を探査する。例示的なＧＬＰ－１誘導体を図６Ａに示す。

【０２０９】

実施例６：コンジュゲートの化学合成

ペプチドを、Ｆｍｏｃ化学を利用して標準的な自動化ペプチド合成により組み立てる。ＧＬＰ－１中のＬｙｓ２６を、$PhSiH_3$及び$Pd(PPh_3)_4$を使用して選択的に除去できるアリルオキシカルボニル（ａｌｌｏｃ）基により側鎖保護し、必要に応じて、その後、既存の化学を利用して脂質に結合する。Ｎ末端修飾（「Ｘ」、図６Ａ及び６Ｂ）を、対応するアルデヒド及び$NaBH_4$（８９）を使用して、固相上で還元的アミノ化により導入する。フルオロアルキル（Ｘ＝４、８、９）及びアジド（Ｘ＝２９、３２）官能基を含む化合物の場合、ヒスチジン誘導体を、以前に報告された手順を利用して独立に合成する（９０－９５）。構成体を、$CF_3CO_2H$：ＴＩＰＳ：$H_2O$（９５：２．５：２．５）を使用して樹脂から切断し、逆相ＨＰＬＣを利用して精製し、ＥＳＩ及びＭＡＬＤＩ－ＭＳを利用して分析する。

【０２１０】

実施例７：受容体とのＧＬＰ－１中のＨｉｓ７相互作用の部位を特定するための光親和性プローブ

ＧＬＰ－１及び関連ペプチドの、その同種受容体と直接相互作用するＮ末端領域は、結晶化又は架橋アプローチを利用する構造特性解析から除外されてきた。後者の重大な限界は、ＧＬＰ－１のその受容体への結合と適合性のあるＨｉｓ７の修飾を有する好適な光親和性プローブがないことである。そのようなツールを生成するために、天然のリガンドに類似な効力及び有効性を示すリガンドに対する構造摂動を行う。化合物Ｇ－２２は、完全な有効性を維持しながら、おそらくアリール基の４位での立体的かさ高さにより（図６Ａ）、未修飾ＧＬＰ－１に比べて顕著に低減した効力を示した。アゴニスト効力は、光プローブＧ－３０において保存され、それは、後者が未修飾ＧＬＰ－１の受容体との相互作用を繰り返すことを示唆する。架橋試験における検出を容易にするために、さらにビオチン部分をＧＬＰ－１中の残基Ｋ２６に結合させることができる。データは、この付加がＧＬＰ－１親和性に影響しないことを示し、同じ残基がリラグルチドのアシル化にも使用される事実と一致している（図６Ａ）。

【０２１１】

実施例８：Ｈｉｓ７のサイズ及び他の分子的性質の役割の推定

受容体結合部位（リガンドに応じて塑性になりそうな）を最もよく補完する分子パラメーターを確立するために、５０種の構成体をサイズ（Ｇ－２３、Ｇ－２４）、疎水性、電荷（Ｇ－１７、Ｇ－１８、Ｇ－２３、分極率（Ｇ－４、Ｇ－５、Ｇ－１２、Ｇ－１１、Ｇ－２７））、立体化学（Ｇ－１７、Ｇ－１８、Ｇ－２０、Ｇ－２１）、及び電気陰性度（Ｇ－４、Ｇ－８、Ｇ－９）などの種々の属性に関して試験する。ＧＬＰ－１において許容された付加物の予測される$pK_a$値は、陽電荷が必須でないことを示すものの、天然のリガンドは生理学的ｐＨで部分的に荷電している。「Ｘ」基が結合ポケット中に収容されると仮定して、Ｎ－ベンジル誘導体のアリール環の４位で置換基の電子吸引性及び電子供与性を変化させる［最も電子吸引性の$-NO_2$（ハメットσ＝０．８１）から最も電子供与性の$-N(CH_3)_2$（σ＝－０．８３）の範囲の合計で８種の化合物］。$log(EC_{50,X}/EC_{50,H})$対$\sigma_X$のプロットを使用して、傾きρ（安息香酸電離を基準とした置換基に対する平衡の感受性の尺度）を、熱力学的に評価されるパラメーターとして決定する。α－アミンの$pK_a$を６．９１であると推定し、Ｘ付加物の正体に応じていずれかの方向に変えることができる。

【０２１２】

（表３及び図８）アゴニスト効力及びＤＰＰ４媒介性の加水分解に対する感受性

| 化合物 | 受容体 | EC50 (pM) | DPP4 切断 |
|---|---|---|---|
| GLP-1 | GLP-1R | 2.2 | +++ |
| G-2 | GLP-1R | 99.1 | – |
| G-4 | GLP-1R | 1.3 | – |
| G-5 | GLP-1R | 8.4 | – |
| G-6 | GLP-1R | 3.7 | – |
| G-7 | GLP-1R | 4.1 | – |
| G-8 | GLP-1R | 1.6 | – |
| G-10 | GLP-1R | 3.9 | – |
| G-11 | GLP-1R | 4.4 | – |
| G-13 | GLP-1R | 1.6 | n.d. |
| G-14 | GLP-1R | 2.7 | n.d. |
| G-17 | GLP-1R | 2.6 | – |
| G-22 | GLP-1R | 28 | n.d. |
| G-30 | GLP-1R | 4.9 | n.d. |
| G-31 | GLP-1R | $3.2 \times 10^5$ | – |
| | | | |
| リラグルチド | GLP-1R | 1.2 | ++ |
| L-4 | GLP-1R | 1.7 | – |
| エキセナチド | GLP-1R | 1.1 | + |
| E-4 | GLP-1R | 1.2 | – |
| | | | |
| グルカゴン | GCGR | 3.4 | ++ |
| GCG-4 | GCGR | 2.3 | – |
| GCG-10 | GCGR | 410 | – |
| | | | |
| GIP | GIPR | 0.9 | +++ |
| I-4 | GIPR | 0.6 | – |

【０２１３】
実施例９：グルカゴンの安定性及び機能に対するアルキル化の影響
グルカゴンのＮ末端（Ｈｉｓ－Ｓｅｒ）は、ＧＬＰ－１（Ｈｉｓ－Ａｌａ）及びＧＩＰ（Ｔｙｒ－Ａｌａ）のいずれとも異なる。グルカゴンの最後から２番目の部位のセリン残基が、両インクレチンのいずれかに対してこのペプチドのＤＰＰ４感受性ペプチドを減少させるものの、グルカゴンはそれでもＤＰＰ４により分解され、Ｎ末端保護から利益を得てその半減期が延長されるであろう。データは、実験において、トリフルオロエチル基の結合が、アゴニスト効力を損なうことなくグルカゴンの完全なＤＰＰ４耐性を与えることを示した（図１３及び表３）。グルカゴン受容体は最近結晶化された（限定された分解能で、分子の一部のみ含む）が、しかし、グルカゴンのＮ末端がその同種ＧＰＣＲとどのように合うのか不明な点が残ったままである。ＧＩＰに関して概述された実験計画に従って、３０種の選択されたＮ末端装飾のいずれがグルカゴン受容体において許容されるかを決定し、試験すべき全３種のグルカゴンファミリーペプチドのアゴニストポケットの初期のプロファイル比較が可能になる。
【０２１４】
実施例１０：新規戦略は、生物活性を損なわずにＤＰＰ４分解に対して不応性であるＧＬＰ－２及び関連ペプチドの生成を可能にする。
データは、従来の修飾、Ａｌａ２Ｇｌｙ置換（ガテックスに適用される通り）が部分的なＤＰＰ４耐性のみを与えることを示した（表４）。受容体効力を維持しながら完全なＤＰＰ４耐性を付与するＮ末端修飾を特定することは重大な課題であった。この限界に対処するため、対応するペプチドのアミノ末端残基を候補部分の大きいライブラリーのメンバーにより装飾して、ＤＰＰ４感受性をなくすことができるような幅広く適用可能な戦略が開発された。概念実証を与えて、データは、約９７％の天然ＧＬＰ－２がＤＰＰ４により分解されるのに対し、フルオロエチルによるＨｉｓ１の装飾が完全な酵素耐性を付与することを示した（図２１）。ＤＰＰ４耐性を付与することに加えて、ＧＬＰ－２アナログのＮ末端でのフルオロエチル及び代わりの装飾は、安定性及びインビボ有効性を最適化する新規手段を与える。
【０２１５】
図２１は、天然ＧＬＰ－２がＤＰＰ４により分解される一方、トリフルオロエチル装飾

されているアナログが分解に対して耐性を有することを示すデータを示す。ペプチドを組換え型ＤＰＰ４と共にインキュベートした。次いで、ＧＬＰ－２及びＧＬＰ－２－４の段階希釈物を、ヒトＧＬＰ－２Ｒ及びｃＡＭＰ応答レポーター遺伝子をコードするｃＤＮＡにトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞に適用した。ＤＰＰ４は４０分の１を超えるＧＬＰ－２効力の低下を誘発し、９７％より多くのペプチドが分解されたことを反映する。対照的に、ＧＬＰ－２－４（図６Ａ）では効力低下は全く認められなかった。Ｎ＝４、平均＋ＳＥＭ。

【０２１６】

実施例１１：Ｎ末端安定化と組み合わせたＧＬＰ－２への脂質側鎖の結合は生物活性を延長する。

Ｎ末端トリフルオロエチル装飾に加えて、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４（図６Ａ）は、アルブミン結合を増大させ、腎クリアランスを減少させ、血漿中のペプチド保持をさらに延長する戦略としてリジン結合脂質部分も組み込む。データは、バイオアッセイにより、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４がインビトロでＤＰＰ４分解に対して不応性であることを示した。ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４の構造を図６Ａに示す。ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４を形成するために、ＧＬＰ－２をＮ末端トリフルオロエチル装飾、Ｌｅｕ１７Ｌｙｓ置換、及びβ－アラニンリンカーを介するＣ１６パルミチン酸エステルの結合により修飾する。

【０２１７】

さらに、データは、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４の延長した生物活性（ガテックスに対する）を示した。ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４は、マウスへの皮下（ｓ．ｃ．）注射の２４時間後で循環中に高レベルのままである。インビボでのガテックスに対するＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４の延長した生物活性を図２３に示す。化合物（１．２５μｇ）をマウスに皮下注射した。血漿を２４時間後に回収し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによりＧＬＰ－２Ｒアゴニスト活性に関して分析した。

【０２１８】

実施例１２：Ｌｙｓにコンジュゲートされる脂質をＧＬＰ－２に導入できる２つの部位の特定。

ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４において、１７位のアミノ酸を、効力も有効性も乱さずにリジンを導入できる部位（すなわちＬｅｕ１７Ｌｙｓ）と特定し、これは、先にまとめた通り薬物動態的性質を増大させるための脂質コンジュゲート部位を与える。代わりの部位を２４位で特定し、ここで、リジン置換（Ａｓｎ２４Ｌｙｓ）及び脂質付加が十分に許容される（図２０）。ＧＬＰ－２アナログの生物物理学的及び薬理学的性質がＮ末端装飾及び脂質付加の両方により修飾されるため、２４位の特定は、さらに最適化されたインビボ有効性を示し得る追加のＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４誘導体を生成させる手段を与える。図６Ａに示される化合物の特性を、インビトロで、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ及びＤＰＰ４により誘発される効力のシフトにより図２０に示される通りに明らかにした（ｎ＝３）。

【０２１９】

実施例１３：ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４が腸及び粘膜の成長を増大させることを示すインビボ試験。

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスへの５回の毎日の皮下（ｓ．ｃ．）注射後、プロトタイプ化合物ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４は、腸の重量を用量依存的に増加させた（図２３Ａ～２３Ｃ）。ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４は腸の重量を増大させる。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに１日１回５日間、ビヒクル、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４又はガテックスのいずれかを、示された投与量を皮下注射した。動物を６日目に犠死させ、それに続いて腸の重量を測定した。Ｎ＝６動物／群、平均±ＳＥＭ。＊ビヒクルに対してｐ＜０．０５。さらに、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４は、ＳＢＳの治療における有効性の予測因子である腸の粘膜に対する栄養作用を有する（図２３Ｂ及び２３Ｃ）。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに１日１回５日間、２５μｇのＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４又はビヒクルのいずれ

かを皮下注射した。６日目に動物を犠死させた。図２３Ｂは、粘膜切片のヘマトキシリン及びエオシン染色を示す。図２３Ｃは、絨毛高さの定量化を示す。Ｎ＝６動物／群、平均±ＳＥＭ。＊＊ビヒクルに対してｐ＜０．０１。

【０２２０】

実施例１４：ＧＬＰ－２アナログ薬理学的性質の比較。

ＧＬＰ－２Ｒを発現しているトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞によるインビトロアッセイを利用して、合成ＧＬＰ－２アナログの薬理学的特性を明らかにする。方法論は、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４の特性評価に適用されるものを並行処理する（評価基準としてのガテックスと共に並行してアッセイされる）。以下を試験する：（ｉ）効力及び有効性を決定するためのＧαｓ媒介性のシグナル伝達、並びに（ｉｉ）ＤＰＰ４耐性。

【０２２１】

ＨＥＫ２９３細胞を、ＧＬＰ－２Ｒ、ＣＲＥルシフェラーゼレポーター遺伝子、及びβ－ガラクトシダーゼコンストラクト（トランスフェクション効率の正規化を可能にする）をコードするｃＤＮＡにより一過性にトランスフェクトさせる。各ペプチドの有効性及び効力を図３６Ａに示されるように決定する。ＤＰＰ４耐性をＤＰＰ４の存在下対非存在下での一晩のインキュベーション（１６時間）後に試験し、受容体媒介性の機能を図２１Ａに示される通り評価する。ＤＰＰ４感受性のある対照として、ＧＬＰ－２を使用して並行実験を実施する。

【０２２２】

実施例１５：マウスにおけるＧＬＰ－２アナログ血漿安定性の比較。

ＤＰＰ４耐性に加えて、多くの他のパラメーターがインビボで化合物の薬物動態及び生物活性に影響する（他のプロテアーゼによる消化、アルブミン結合／オリゴマー化、及び腎臓ろ過を含む）。マウスにおける皮下（ｓ．ｃ．）注射後の血漿中のアゴニスト活性の段階的な低下を、ガテックス投与の臨床経路を模倣し、同じ投与様式が第２世代薬物のために使用されることを予想して追跡する。図２３に示されるように、１２．５μｇのガテックス、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ［Ｌ１］－４（対照）、又は提案された７種の新たな誘導体のそれぞれのいずれかを６週齢の雄性Ｃ５７／ＢＬ６マウスに皮下注射する（３匹の動物／化合物／時点）。マウスを２４時間後又は７２時間後に犠死させ、血漿試料を回収する。生物活性を、当技術分野において公知であり本明細書に記載される定型的な方法を利用して測定する。

【０２２３】

実施例１６：ＧＬＰ－２アナログ分析

図２３Ａ～Ｃは、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４（或いは、これらの図においてｏＴＴｘ－８８と呼ばれる）が腸の粘膜成長を誘導することを表す。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに１日１回５日間、ビヒクル、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４又はガテックスのいずれかを、示された投与量で皮下注射した。動物を６日目に犠死させ、それに続いて腸組織の分析を実施した。

【０２２４】

図２３Ａは、ＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４（ｏＴＴｘ－８８）が腸の重量を増大させることを示す。Ｎ＝６動物／群、平均±ＳＥＭ。＊ビヒクルに対してｐ＜０．０５。

【０２２５】

図２３Ｂは、粘膜切片のヘマトキシリン及びエオシン染色により実施された組織学の画像を与える。

【０２２６】

実施例１７：ＧＨＲＨアナログ（図６Ａ）

図１９は、天然のＧＨＲＨ対$CHCF_3$－ＧＨＲＨ（「Ｃ２－ＧＨＲＨ」、下段、図６中の化合物ＧＨ２９－４）の酵素分解の感受性を比較する一連のグラフを与える。これらのペプチドの活性を、新鮮なストックとして、又はＤＰＰ４と一緒の若しくはなしの一晩（Ｏ／Ｎ）のインキュベーション後に試験して、ＧＨＲＨ受容体（ＧＨＲＨＲ）を発現し

ている細胞におけるルシフェラーゼアッセイにより測定した。天然ＧＨＲＨとは対照的に、ＧＨ２９－４誘導体は、酵素により誘導される効力低下に対して耐性がある（濃度反応曲線の右へのシフトがない）。ＧＨＲＨアナログは、成長ホルモン分泌不全症（ＧＨＤ）による成長不全、性腺発育不全による女児における成長不全（ターナー症候群）、慢性腎疾患による思春期前の子供における成長遅滞、出生時体重及び／又は身長が－２ＳＤ未満であり４歳以降に取り戻し成長を示さなかった（最近一年内にＨＶ　ＳＤＳ＜０）在胎不当過小（ＳＧＡ）で生まれた小さい子供における成長障害（現在の身長ＳＤＳ＜－２．５及び親に関して調整された身長（ｐａｒｅｎｔａｌ　ａｄｊｕｓｔｅｄ　ｈｅｉｇｈｔ）ＳＤＳ＜－１）を治療するのに有用である。

【０２２７】

実施例１８：ＧＬＰ２のヘリカルホイールダイアグラムは、脂質付加に好適なアミノ酸残基の空間的同一性及び配向を示す。

脂質付加のための可能性のある位置を決定するために、アラニン突然変異誘発データを、予測されるＧＬＰ－２とＧＬＰ－２Ｒ相互作用データと共に分析した。ＮＭＲデータから、ＧＬＰ－２は、水溶媒系中で残基Ｐｈｅ６及びＩｌｅ２７間で、ミセル系中で残基Ｐｈｅ６及びＡｒｇ２４間でαヘリカル二次構造を有するようである。Ｃ末端で、ゆるいヘリカルセグメントがある一方、Ｎ末端からＳｅｒ６は完全に組織化されていない。３５。ＧＬＰ－２構造の大部分がα－ヘリカルであるため、ヘリカルホイールダイアグラムを構成して、残基の位置及び性質を可視化した（図２０）。アミノ酸配列を、らせんの１巻きあたり３．６個のアミノ酸を有する二次構造により各アミノ酸を直前のものから１００°にしてらせん軸の周りにプロットする。各残基の性質を色により示して、パターンの確認を可能にする。

【０２２８】

ＧＬＰ－１との公知のＧＬＰ－１Ｒ細胞外ドメイン表面相互作用を利用し、ＧＬＰ－１及びＧＬＰ－２のヘリカルホイールダイアグラムを比較することにより、ＧＬＰ－２Ｒの細胞外ドメイン表面を見積もることができる。これは、ＧＬＰ－２結合界面がヘリックスの疎水性面であるＬｅｕ１７とＬｙｓ３０との間で起こるというＮＭＲ観察結果と相関している。３５。水素結合が、ＧＬＰ－２のＡｓｐ２１及びＬｙｓ３０と、ＧＬＰ－２Ｒ残基、Ｔｈｒ７２、Ａｓｐ１０１、及びＡｓｐ１５１のＥＣＤとの間で形成する可能性がある。３５。さらに、Ｌｅｕ１７、Ａｌａ１８、Ａｌａ１９、Ｐｈｅ２２、Ｉｌｅ２３、Ｔｒｐ２５、Ｉｌ２７、及びＴｈｒ２９の暴露は、ＧＬＰ－２とＧＬＰ－２Ｒとの間の疎水性相互作用を可能にし得る。３５。Ｌｅｕ１７からＡｌａへの突然変異誘発は、ＧＬＰ－２Ｒ結合の減少を全く示さなかったが、ＧＬＰ－２Ｒ活性化の低減を示した。４５。しかし、リジンへの突然変異後のこの部位でのアシル化は、効力を維持することがわかった。４５，１６７。特に、Ｌｅｕ１７Ｌｙｓ修飾を有し、β－アラニンリンカー及びパルミチン酸がε－アミンに結合しているＧＬＰ－２は、ルシフェラーゼアッセイにより測定して天然ＧＬＰ－２に類似の効力を有した。１６７。そのため、ＧＬＰ－２のアシル化の第１の位置選定は、Ｌ１７Ｋ修飾後に１７番目の残基で実施した。Ａｒｇ２４は、ＧＬＰ－２ＲのＥＣＤから離れたらせん表面に存在し、ＧＬＰ－２の結合又は効力に大幅には影響しないため、Ａｒｇ２４もリジンへの修飾後のアシル化のための対象であった。

【０２２９】

ＧＬＰ－２の種々のアナログは、異なるリンカー及び脂質による１７番目の部位でのアシル化によっても製造できる。ＧＬＰ－２の疎水性は、水へのその溶解度を制限するが、元の構成体中のβ－アラニンリンカーによって改善されない。将来的に溶解度を改善するには、２つのオリゴエチレングリコール（ＯＥＧ）リンカー及びγ－グルタミン酸を採用できる。セマグルチドの試験から、この修飾もアルブミン結合を改善するであろう。目標は、血清アルブミンとＧＬＰ－２Ｒとの平衡を最適化して、よりよい循環及び耐久性を可能にすることであり、他の脂質の探索が必要とされる。

【０２３０】

実施例１９：アナログ安定性

本発明のアナログは、種々のプロテアーゼに対して耐性がある。図１８は、ＧＬＰ－１（左図）対ＣＨＣＦ$_3$－ＧＬＰ－１（右図；図６中のＧ－４）の酵素分解に対する感受性を比較する一連のグラフを与える。酵素なし（対照）又はＤＰＰ４、ＤＰＰ９若しくはＦＡＰのいずれかと一緒の一晩のインキュベーション後のこれらのペプチドの活性を、ＧＬＰ－１受容体を発現している細胞におけるルシフェラーゼアッセイにより測定した。未修飾ＧＬＰ－１とは対照的に、Ｇ－４誘導体は、酵素により誘導される効力低下に対して耐性がある（濃度反応曲線の右側へのシフトがない）。

【０２３１】

本発明のアナログは、インビトロでプロテアーゼに耐性があるだけでなく、インビボでもリラグルチドに比べて耐性を示す。図２２は、リラグルチド又はＣＨＣＦ$_3$装飾されている誘導体、Ｌｉｒａ－４のいずれかのボーラス注射後の血漿中での薬物の活性の時間依存性の低減を比較するグラフを与える。

【０２３２】

ラットは、中心カテーテルによりいずれかの薬物のボーラス注射を受け、それに続いて、示された間隔後の連続採血及び受容体活性化作用のバイオアッセイによる血漿中での薬物の活性の測定を行った。注射直後の各ペプチドの効力を１００％と定義した。リラグルチドの血漿中残存は、Ｌｉｒａ－４のＣＨＣＦ$_3$修飾により延長される。

【０２３３】

図２２Ａは、経口耐糖能試験後のＬｉｒａ－４の持続性の血糖降下活性を表す。マウスは、ビヒクル、Ｇ－４、リラグルチド又はＬｉｒａ－４のいずれか（バーの各群中で左から右に表す）の皮下注射を受けた。３０分後及び５．５時間後、２回の連続的な経口グルコース負荷を強制経口投与により適用した。血糖値を薬物注射直前（－３０分）及びグルコース負荷後に示された時間間隔で測定した。化合物Ｇ－４の単回の注射は、第１のグルコース負荷後に血糖変動を弱め、数時間後に依然として活性があり、第２のグルコース曝露を弱めた。

【０２３４】

図２３Ａは、図６Ａに示されるフッ素化／アシル化されたＧＬＰ－２アナログであるＧＬＰ２－Ｌ１７Ｋ（ｌ１）－４のインビボでの延長された生物活性を表すグラフを与える。この化合物のクリアランスを既存のＧＬＰ－２ベースの薬物であるガテックスのクリアランスと比べた。化合物（１．２５μｇ）をマウスに皮下（ｓ．ｃ．）注射した。２４時間後に血漿を回収し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによりＧＬＰ－２Ｒアゴニスト活性に関して分析した。

【０２３５】

本明細書において上記で記載される結果を、以下の方法及び材料を利用して得た。

【０２３６】

インビトロ試験

異なる脂質アンカーをプロトタイプ化合物、Ｆ－ＧＬＰ２－パルムに、それぞれパルミチン酸を置換して連続的に導入する。対応する化合物の薬理学的特性を明らかにし、Ｆ－ＧＬＰ２－パルム及びガテックス（登録商標）と比較する。特定の態様において、脂質付加は、効力、有効性、アルブミン結合、細胞との相互作用、オリゴマー形成、及びプロテアーゼ耐性に影響し得る。本発明において企図される例示的な脂質には、ミリスチン酸、ステアリン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、及びリノール酸がある。鎖中のシス不飽和のために、これらの脂質は、膜内でのより高い二次元拡散速度並びにアルブミン及び細胞膜へのその結合におけるより速いｋｏｆｆを有する。

【０２３７】

これらの脂質付加されたペプチドを生成させ、ヒスチジンを修飾する全方法論は、以下に十分に確立されている。

【０２３８】

ＧＬＰ－２Ｒを発現しているトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞を使用するインビトロアッセイを使用して、合成の脂質付加された構成体の薬理学的特性を明らかにする

。評価基準として、アッセイは、プロトタイプの脂質付加された安定なＧＬＰ－２アナログ（Ｆ－ＧＬＰ２－パルム）を含む。

【０２３９】

効力及び有効性を評価するＧαｓシグナル伝達：ＨＥＫ２９３細胞を、ＧＬＰ－２Ｒ、ＣＲＥルシフェラーゼレポーター遺伝子、及びα－ガラクトシダーゼコンストラクト（トランスフェクション効率の正規化を可能にする）をコードするｃＤＮＡにより一過性にトランスフェクトさせる。各脂質付加されたペプチドの有効性及び効力を決定する。

【０２４０】

洗浄耐性活性（Ｗａｓｈ　ｒｅｓｉｓｔａｎｔ　ａｃｔｉｖｉｔｙ）／アルブミン結合：脂質付加されたペプチドは、細胞膜への結合と、循環しているタンパク質（例えば、アルブミン）との結合の平衡にある。リラグルチドの薬物としての成功は、部分的にアルブミンに結合するその能力に帰せられ、それにより、多数の薬理学的パラメーターを有利に変える。ＧＰＣＲペプチドリガンド、プロテアーゼ耐性ケメリン（「安定ケメリン」）を使用する研究を実施して、細胞膜とアルブミンとの間の平衡を反映する感受性アッセイを確立した（図１１）。試験は、リガンドの脂質付加及び／又は媒体中のアルブミンの存在が細胞への結合平衡をどのように変えるかを評価することを可能にする（受容体媒介性のシグナル伝達をリガンドのアベイラビリティの指標として使用する；図１２）。安定なケメリン（脂質付加されていない）では、リガンド添加後の洗浄が活性を顕著に低減させた（図１２、パネルＡ）。脂質付加された安定なケメリン（媒体中にアルブミンなし）では、洗浄にもかかわらず活性は持続し、膜のアンカリング（ａｎｃｈｏｒｉｎｇ）を反映している（図１２、パネルＢ）。脂質付加された安定なケメリンと媒体中のアルブミンでは、洗浄が活性を低減させる傾向があり（図１２、パネルＣ）、アルブミンへの脂質付加されたリガンド結合を反映し、洗浄によるリガンドの喪失（及びその後のシグナル伝達の低減）をもたらす。この方法では、ＣＭＫＬＲ１発現細胞をリガンドと共に４時間インキュベートした。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを利用して、Ｇαｉ結合二次メッセンジャーシグナル伝達をモニターした。「洗浄」：リガンド添加の１５分後、細胞を３回洗浄した。追加の４時間のインキュベーション後、ルシフェラーゼ活性を測定した。アルブミン相互作用試験では、生理学的濃度のアルブミン（４．５ｇ／ｄＬ）を細胞培地に溶解させた。このアッセイは、脂質付加されたペプチドが細胞膜とアルブミンとの間でどのように平衡に達するかの感度の良い指標を与える。

【０２４１】

ＤＰＰ４耐性（図１３）：脂質付加されたペプチドをプロトタイプ、Ｆ－ＧＬＰ２－パルムと比較する。ＤＰＰ４の存在下対非存在下での一晩のインキュベーション（１６時間）後、受容体媒介性の機能を本明細書の他の箇所に示す通り評価する。ＤＰＰ４に感受性のある対照として、ＧＬＰ－２を使用して並行実験を行う。ＤＰＰ４アッセイと同様に、Ｆ－ＧＬＰ２－パルム及び天然ＧＬＰ－２（８１μＭ）をＤＰＰ４（２７．５μｇ／ｍｌ）と共に又はなしで一晩３７℃でプレインキュベートした。一晩のプレインキュベーション後、リガンドの段階希釈物を調製し、ＧＬＰ－２Ｒ発現細胞に４時間加えた。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを利用して、Ｇαｓ結合二次メッセンジャーシグナル伝達をモニターした。

【０２４２】

多量体形成：脂質付加された安定なＧＬＰ－２は皮下投与することができる。脂質付加されたＧＬＰ－１（リラグルチド）は、緩徐な吸収を可能にする七量体を形成する。脂質付加されたＧＬＰ－２アナログのこの特徴を調査するために、分析的沈降平衡試験を実施して、溶解状態の見かけの分子量を決定する。化合物を５～１００μＭの範囲で、Ｂｅｃｋｍａｎ　ＸＬ－Ｉ分析用超遠心機で３種の異なるロータースピードにおいて調査する。平衡は、連続する吸光度スキャンが重ね合わせることができる場合、完了していると判断する。トリプトファンの存在により、２７５ｎｍでのモニタリングができる。データを単一の理想的な種のモデルにフィットさせる。必要に応じて他の平衡（例えば、モノマー⇔ｎ量体）を含めることができる。

【０２４３】
種間の違い：種の違いが、受容体により媒介される機能を潜在的に変え得ることを承認して、脂質付加された安定なＧＬＰ－２アナログをマウス及びヒトの受容体の両方で試験する。
【０２４４】
インビボ試験
ＧＬＰ－２化合物の腸の成長を促進する効果を評価するために、脂質付加された安定なＧＬＰ－２アナログをマウスに皮下投与する。組織形態計測分析、増殖指数、及び腸の機能評価をガテックス（登録商標）と比較して評価する。
【０２４５】
ＧＬＰ－２の投与は、腸の増殖、粘膜上皮表面の拡大、及び栄養素吸収の増大をもたらす。多数の齧歯動物モデルが、ＧＬＰ－２、ガテックス（登録商標）、及び他のＧＬＰ－２アナログの消化管に対する効果を評価するのに利用されてきた。非常に有益であるが単純明快なあるモデルは、ＧＬＰ－２又は安定なアナログの野生型マウスへの１日２回の投与を含む。ＧＬＰ－２による対応する実験を、１日２回投与して１０日の期間にわたって実施した。小腸重量の有意な増加が６日後に見られた。ガテックス（登録商標）のマウスへの毎日の投与も大腸と小腸との両方の重量の有意な増加（体重に対して正規化）を示した。ＧＬＰ－２アナログにより増加した追加のパラメーターには、小腸の上皮高さ（陰窩に加えて絨毛の高さ）及び特に絨毛の低めの部分における増殖指数があった。マウスモデルを利用すると、脂質付加された安定なＧＬＰ－２アナログ及びガテックス（登録商標）の生理学的効果の直接比較が可能である。
【０２４６】
組織形態計測／増殖指数。７匹のＣ５７／Ｂ６マウスの群を各条件（薬物／時点）で試験する。化合物を、１００μｌ皮下注射として、１日２回１２時間の間隔で６日間及び１０日間投与する。初期投薬を、２５μｇのガテックス（登録商標）に相当するように調整し（モル当量）、それは６日で腸の成長を引き起こすのに非常に効果的である。１０日の時点は、最大効果を定義する。次いで、マウスを安楽死させ、秤量する。小腸及び大腸を取り除き、ＰＢＳで流し、及び腸のセグメントの長さ／湿重量を記録する。多くの既存の指数を使用して、検討中のＧＬＰ－２アナログのインビボ有効性を評価する。組織形態計測分析（図１４）には、腸の重量／厚さ、絨毛の高さ、及び陰窩の深さの定量化が含まれる。増殖指数には、Ｋｉ６７染色及び分裂指数が含まれる（図１５）。
【０２４７】
薬物活性の持続期間を評価するために、６日の期間にわたり、各薬物（２種の脂質付加されたＧＬＰ－２アナログ及び対照としてのガテックス（登録商標））を７匹のマウスの３群に皮下投与する。第１群は、毎日投与（６回の投与）を受け、第２群は２日毎に薬物を受け取り（３回の投与）、第３群は３日毎に薬物を受け取る（２回の投与）。動物を犠死させ、分析する。
【０２４８】
安定化された脂質付加されたＧＬＰ－２アナログに反応した腸の代謝機能の変化を、２－デオキシ－２［$^{18}$Ｆ］－Ｄ－グルコース、「［１８Ｆ］ＦＤＧ」をトレーサーとして陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）を利用して決定する。ＧＬＰ－２アナログの投薬スケジュールを組織形態計測分析に基づいて選択する。一晩絶食したマウスに２ｍＣｉ／ｋｇの［$^{18}$Ｆ］ＦＤＧを尾静脈注射により投与する。注射後５０分にマウスにイソフルランで麻酔をかけ、ｍｉｃｒｏＰＥＴ　Ｆｏｃｕｓ　２２０スキャナー（Ｓｉｅｍｅｎｓ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ　ＵＳＡ，Ｉｎｃ．，Ｍａｌｖｅｒｎ，ＰＡ）を使用して画像化し、それに続いて全身ＣＴスキャン（ポータブルのＣｅｒｅＴｏｍ　ＣＴスキャナー；ＮｅｕｒｏＬｏｇｉｃａ　Ｉｎｃ．，Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）を実施する。ＰＥＴとＣＴ画像を重ねて、各腸の切片のＦＤＧ取込みを正確に計算する。ガテックス（登録商標）と直接比較する。
【０２４９】

薬物の効力によっては、ＰＥＴが十分な分解能を与えない可能性がある。この状況が起こる場合、体内分布をＰＥＴイメージングの代りに使用する。体内分布試験において、ＦＤＧの投与後（ＰＥＴイメージングに記載されたものに類似な方法を利用する）、マウスを安楽死させ、腸のセグメントを回収し、秤量し、迅速にガンマカウンターに移して放射能を測定する。［$^{18}$Ｆ］ＦＤＧ組織取込みレベルを、組織１グラムあたりの注射された投与量のパーセンテージとして表す。

【０２５０】

健康な上皮再生を促進することと、早期の腺腫又はがんの成長を加速させることとの間には区別がある。動物試験において、組織学的切片を異常な成長に関して調査する。

【０２５１】

本明細書に引用されたあらゆる特許、特許出願、及び刊行物の開示は、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【０２５２】

本発明が具体的な態様に関連して開示されてきたが、本発明の他の態様及び変形形態も本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱せずに当業者により想到され得ることは明らかである。添付される特許請求の範囲は、そのような態様及び均等な変形形態の全てを含むように解釈されるものとする。

【０２５３】

配列情報

SEQUENCE LISTING

〈110〉 TUFTS UNIVERSITY
TUFTS MEDICAL CENTER
〈120〉 NOVEL POLYPEPTIDES WITH IMPROVED PROTEOLYTIC STABILITY, AND
METHODS OF PREPARING AND USING SAME
〈150〉 US 62/247,493
〈151〉 2015-10-28
〈160〉 33
〈170〉 PatentIn version 3.5
〈210〉 1
〈211〉 30
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (30)..(30)
〈223〉 unmodified or amidation
〈400〉 1
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30
〈210〉 2
〈211〉 39
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (39)..(39)
〈223〉 unmodified or amidation
〈400〉 2
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35
〈210〉 3
〈211〉 31
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 3
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30
〈210〉 4
〈211〉 31
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (2)..(2)
〈223〉 2-Aminoisobutyric acid
〈400〉 4
His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30
〈210〉 5
〈211〉 30
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈220〉
〈221〉 MOD_RES

〈222〉 (2)..(2)
〈223〉 2-Aminoisobutyric acid
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (29)..(29)
〈223〉 2-Aminoisobutyric acid
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (30)..(30)
〈223〉 unmodified or amidation
〈400〉 5
His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Xaa Arg
20 25 30
〈210〉 6
〈211〉 44
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (44)..(44)
〈223〉 unmodified or amidation
〈400〉 6
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40
〈210〉 7
〈211〉 39
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (2)..(2)
〈223〉 2-Aminoisobutyric acid
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (39)..(39)
〈223〉 unmodified or amidation
〈400〉 7
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15
Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35
〈210〉 8
〈211〉 28
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 8
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25
〈210〉 9
〈211〉 38
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 9
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30
Gln Arg Val Lys Asn Lys
35
〈210〉 10
〈211〉 42
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 10
Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys
1 5 10 15
Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys
20 25 30
Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
35 40
〈210〉 11
〈211〉 5
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 11
Tyr Gly Gly Phe Met
1 5
〈210〉 12
〈211〉 36
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 12
Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
1 5 10 15
Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
20 25 30
Arg Gln Arg Tyr
35
〈210〉 13
〈211〉 11
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 13
Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met
1 5 10
〈210〉 14
〈211〉 4
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 14
Tyr Pro Trp Gly
1
〈210〉 15
〈211〉 29
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 15
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

〈210〉 16
〈211〉 235
〈212〉 PRT
〈213〉 Homo sapiens
〈400〉 16

Asp Glu Ser Ala Cys Leu Gln Ala Ala Glu Glu Met Pro Asn Thr Thr
1 5 10 15
Leu Gly Cys Pro Ala Thr Trp Asp Gly Leu Leu Cys Trp Pro Thr Ala
20 25 30
Gly Ser Gly Glu Trp Val Thr Leu Pro Cys Pro Asp Phe Phe Ser His
35 40 45
Phe Ser Ser Glu Ser Gly Ala Val Lys Arg Asp Cys Thr Ile Thr Gly
50 55 60
Trp Ser Glu Pro Phe Pro Pro Tyr Pro Val Ala Cys Pro Val Pro Leu
65 70 75 80
Glu Leu Leu Ala Glu Glu Glu Ser Tyr Phe Ser Thr Val Lys Ile Ile
85 90 95
Tyr Thr Val Gly His Ser Ile Ser Ile Val Ala Leu Phe Val Ala Ile
100 105 110
Thr Ile Leu Val Ala Leu Arg Arg Leu His Cys Pro Arg Asn Tyr Val
115 120 125
His Thr Gln Leu Phe Thr Thr Phe Ile Leu Lys Ala Gly Ala Val Phe
130 135 140
Leu Lys Asp Ala Ala Leu Phe His Ser Asp Asp Thr Asp His Cys Ser
145 150 155 160
Phe Ser Thr Val Leu Cys Lys Val Ser Val Ala Ala Ser His Phe Ala
165 170 175
Thr Met Thr Asn Phe Ser Trp Leu Leu Ala Glu Ala Val Tyr Leu Asn
180 185 190
Cys Leu Leu Ala Ser Thr Ser Pro Ser Ser Arg Arg Ala Phe Trp Trp
195 200 205
Leu Val Leu Ala Gly Trp Gly Leu Pro Val Leu Phe Thr Gly Thr Trp
210 215 220
Val Ser Cys Lys Leu Ala Phe Glu Asp Ile Ala
225 230 235

〈210〉 17
〈211〉 29
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (29)..(29)
〈223〉 unmodified or amidation
〈400〉 17

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg
20 25
〈210〉 18
〈211〉 44
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈220〉
〈221〉 MOD_RES
〈222〉 (44)..(44)
〈223〉 unmodified or amidation
〈400〉 18
Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15
Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
20 25 30
Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
35 40
〈210〉 19
〈211〉 31
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 19
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30
〈210〉 20
〈211〉 33
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 20
His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30
Asp
〈210〉 21
〈211〉 13
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 21
Glu Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
1 5 10
〈210〉 22
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 22
Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10
〈210〉 23
〈211〉 40
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 23
Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys
1 5 10 15
Gln Ala Ala Ala Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
35 40
〈210〉 24
〈211〉 39
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 24
His Ala Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15
Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35
〈210〉 25
〈211〉 37
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

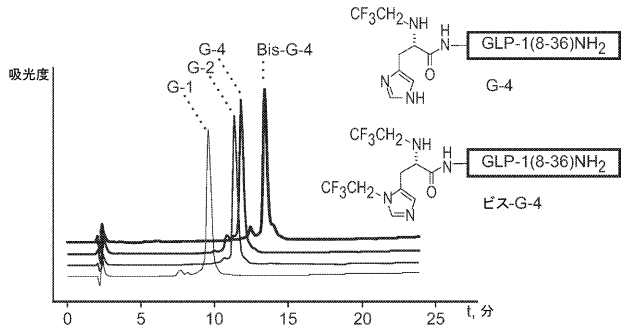
〈400〉 25
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30
Arg Asn Asn Ile Ala
35
〈210〉 26
〈211〉 33
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 26
His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30
Asp
〈210〉 27
〈211〉 33
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 27
His Ala Glu Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Lys Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30
Asp
〈210〉 28
〈211〉 33
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 28
His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Lys Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30
Asp
〈210〉 29
〈211〉 29
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 29
Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
1 5 10 15
Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25
〈210〉 30
〈211〉 41
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 30
Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys Ile
1 5 10 15
His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys Lys
20 25 30
Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
35 40
〈210〉 31
〈211〉 28
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
〈400〉 31
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg
1 5 10 15
Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25
〈210〉 32
〈211〉 38
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 32
Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
20 25 30
Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35
〈210〉 33
〈211〉 38

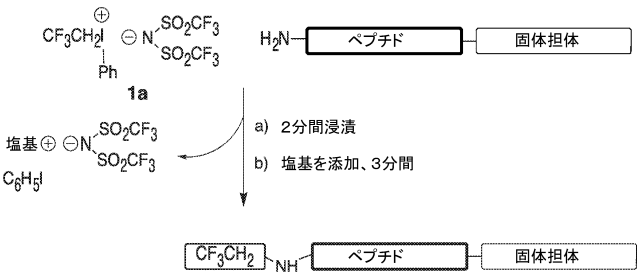
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
〈400〉 33

Ala Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
1 5 10 15
Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Gly Gly Pro Ser Ser
20 25 30
Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

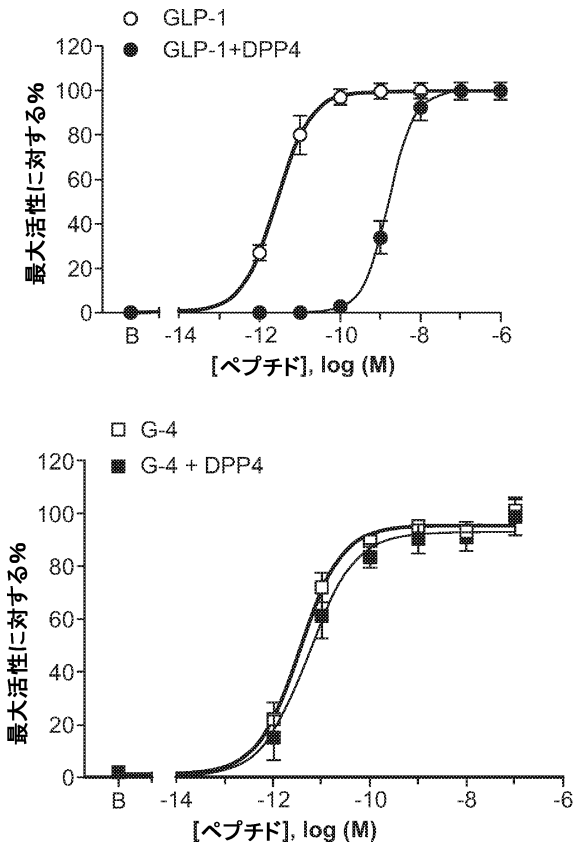
【図面】
【図１】



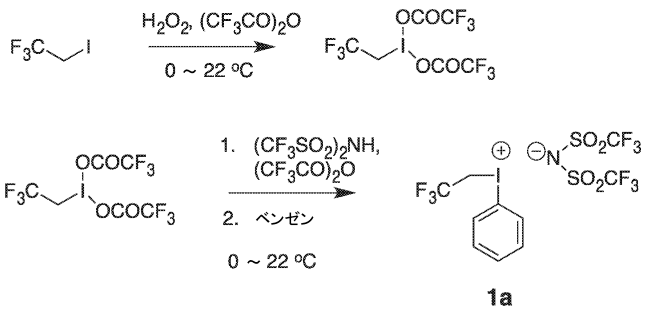

【図２】



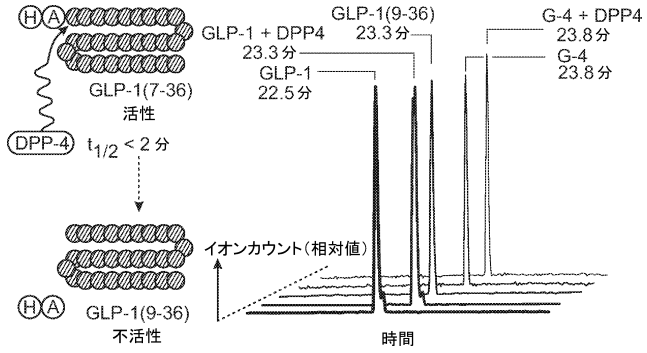
【図３】


GLP-1
GLP-1+DPP4
最大活性に対する%
[ペプチド], log (M)
G-4
G-4 + DPP4
最大活性に対する%
[ペプチド], log (M)

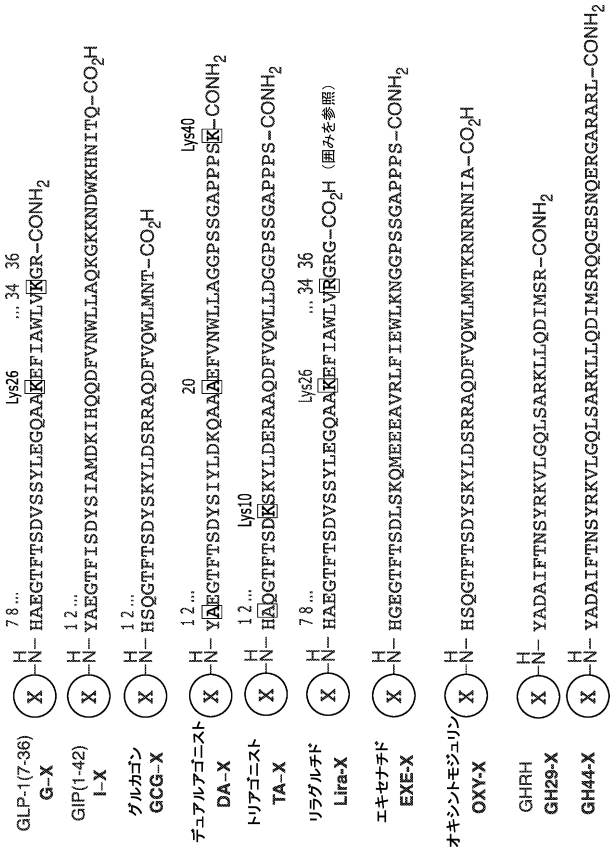
【図４】


1a

【図５】


GLP-1(7-36)
活性
DPP-4
GLP-1(9-36)
不活性
GLP-1 + DPP4
GLP-1
GLP-1(9-36)
G-4 + DPP4
G-4
イオンカウント（相対値）
時間

【図６Ａ－１】


GLP-1(7-36) G-X
GIP(1-42) I-X
グルカゴン GCG-X
デュアルアゴニスト DA-X
トリアゴニスト TA-X
リラグルチド Lira-X
エキセナチド EXE-X
オキシントモジュリン OXY-X
GHRH GH29-X
GH44-X

【図６Ａ－２】



【図６Ａ－３】

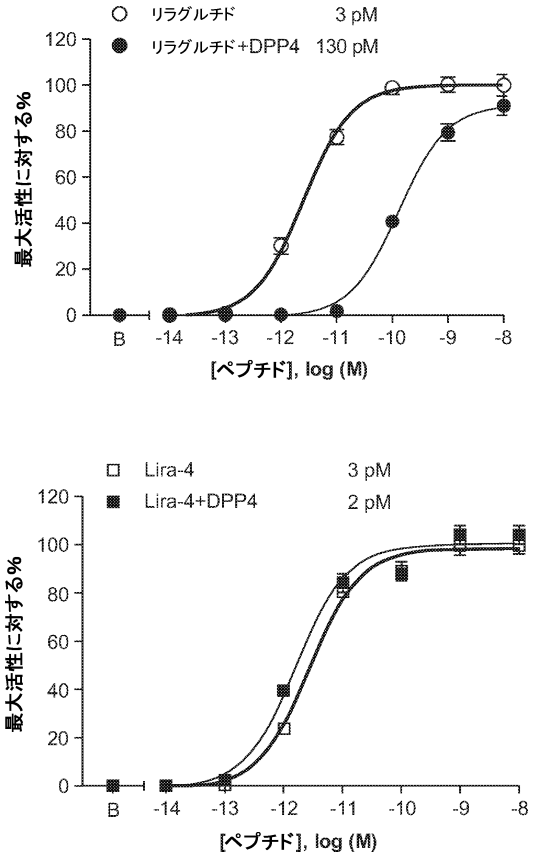



【図６Ｂ－１】




【図６Ｂ－２】

【図７】




【図８】

| 化合物の識別 | | データ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 一般名 | 図6での化合物番号 | 実験 | log (EC50) | log(EC50)の標準誤差 | EC50 (pM) | 測定回数 |
| GLP-1 | G-1 | 新鮮 | -11.66 | 0.10 | 2.2 | 4 |
| | | 一晩 | -11.50 | 0.23 | 3.1 | 4 |
| | | DPP4 | -9.00 | 0.52 | 1005.2 | 4 |
| エチル GLP1 | G-5 | 新鮮 | -11.20 | 0.14 | 6.4 | 3 |
| | | 一晩 | -11.35 | 0.23 | 4.5 | 3 |
| | | DPP4 | -11.22 | 0.13 | 6.0 | 3 |
| イソブチル GLP-1 | G-6 | 新鮮 | -11.43 | 0.09 | 3.7 | 3 |
| | | 一晩 | -11.34 | 0.13 | 4.5 | 3 |
| | | DPP4 | -11.32 | 0.12 | 4.8 | 3 |
| ベンジル GLP-1 | G-11 | 新鮮 | -11.36 | 0.02 | 4.4 | 3 |
| | | 一晩 | -11.41 | 0.08 | 3.9 | 3 |
| | | DPP4 | -11.35 | 0.10 | 4.4 | 3 |
| マンニトール GLP-1 | G-31 | 新鮮 | -7.49 | 0.10 | 32163 | 2 |
| | | 一晩 | -7.53 | 0.09 | 29718 | 2 |
| | | DPP4 | -6.91 | 0.12 | 123543 | 2 |
| アダマンチル GLP-1 | G-10 | 新鮮 | -11.41 | 0.17 | 3.9 | 2 |
| | | 一晩 | -11.51 | 0.25 | 3.1 | 2 |
| | | DPP4 | -11.51 | 0.05 | 3.1 | 2 |
| イソプロピル GLP-1 | G-7 | 新鮮 | -11.39 | 0.39 | 4.1 | 3 |
| | | 一晩 | -11.38 | 0.51 | 4.2 | 2 |
| | | DPP4 | -10.95 | 0.43 | 11.1 | 2 |
| 2-アミノプロピル GLP-1 | G-17 | 新鮮 | -11.58 | 0.11 | 2.6 | 2 |
| | | 一晩 | -11.18 | 0.47 | 6.6 | 2 |
| | | DPP4 | -10.94 | 0.29 | 11.4 | 2 |
| ビフェニル GPL-1 | G-11p | 新鮮 | -10.81 | 0.24 | 15.31 | 2 |
| | | 一晩 | -11.14 | 0.00 | 7.19 | 1 |
| | | DPP4 | -10.91 | 0.00 | 12.40 | 1 |
| C3F7CH2 GLP-1 | G-8 | 新鮮 | -12.01 | 0.18 | 0.99 | 2 |
| | | 一晩 | -11.81 | 0.00 | 1.55 | 1 |
| | | DPP4 | -11.49 | 0.00 | 3.23 | 1 |
| CF3CH2 GLP-1 | G-4 | 新鮮 | -11.89 | 0.10 | 1.29 | 3 |
| | | 一晩 | -11.45 | 0.10 | 3.50 | 3 |
| | | DPP4 | -11.26 | 0.15 | 5.40 | 3 |
| CF3CH2-グルカゴン | GCG-4 | 新鮮 | -11.48 | 0.11 | 3.3 | 4 |
| | | 一晩 | -11.39 | 0.25 | 4.1 | 4 |
| | | DPP4 | -11.50 | 0.21 | 3.1 | 4 |
| エキセンディン | EXE-1 | 新鮮 | -11.96 | 0.03 | 1.1 | 3 |
| | | 一晩 | -11.89 | 0.17 | 1.3 | 3 |
| | | DPP4 | -11.62 | 0.06 | 2.4 | 3 |
| CF3CH2-エキセンディン | EXE-4 | 新鮮 | -11.92 | 0.08 | 1.2 | 3 |
| | | 一晩 | -11.74 | 0.10 | 1.8 | 3 |
| | | DPP4 | -11.72 | 0.02 | 1.9 | 3 |
| リラグルチド | Lira-1 | 新鮮 | -11.92 | 0.20 | 1.2 | 3 |
| | | 一晩 | -11.55 | 0.26 | 2.8 | 4 |
| | | DPP4 | -9.95 | 0.17 | 111.4 | 4 |
| CF3CH2-リラグルチド | Lira-4 | 新鮮 | -11.76 | 0.04 | 1.7 | 3 |
| | | 一晩 | -11.38 | 0.36 | 4.1 | 3 |
| | | DPP4 | -11.43 | 0.07 | 3.7 | 3 |

【図９】

| 化合物の識別 | | データ | |
|---|---|---|---|
| 一般名 | 図6での番号 | 実験 | EC50 (pM) |
| GIP | I-1 | 対照一晩 | 1.6 |
| | | +DPP4 | 750 |
| | | +DPP9 | 653 |
| | | +FAP | 11 |
| CF3CH2-GIP | I-4 | 対照一晩 | 0.7 |
| | | +DPP4 | 1.6 |
| | | +DPP9 | 2.8 |
| | | +FAP | 3.8 |
| GLP-1 | G-1 | 対照一晩 | 9.1 |
| | | +DPP4 | 9391 |
| | | +DPP9 | 5055 |
| | | +FAP | 642 |
| CF3CH2-GLP-1 | G-4 | 対照一晩 | 2.6 |
| | | +DPP4 | 1.9 |
| | | +DPP9 | 2.7 |
| | | +FAP | 3.1 |

【図９Ａ】

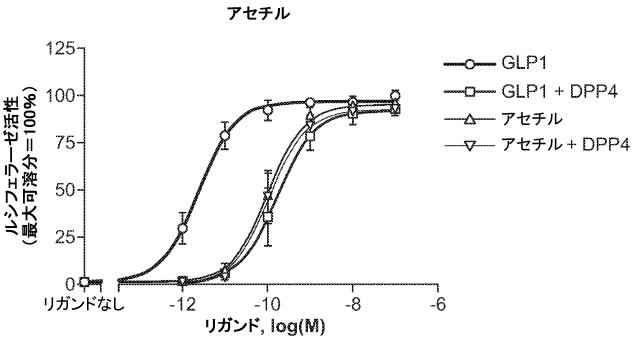
| 化合物の識別 | | データ | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 一般名 | 図6Aでの番号 | 実験 | 平均 | SEM | pM | n |
| GLP-2 | GLP2-1 | 新鮮 | -10.41 | 0.16 | 38.7 | 4 |
| | | 一晩 | -10.42 | 0.09 | 38.4 | 4 |
| | | DPP4 | -8.40 | 0.03 | 4003.5 | 3 |
| CF3CH2-GLP2 | GLP2-4 | 新鮮 | -11.13 | 0.14 | 7.4 | 3 |
| | | 一晩 | -11.05 | 0.15 | 9.0 | 2 |
| | | DPP4 | -11.05 | 0.05 | 8.9 | 2 |

【図９Ｂ】

| 化合物の識別 | | データ |
|---|---|---|
| 一般名 | 図6での番号 | EC50 (pM) |
| GLP-1 | G-4 | 2.5 |
| CF3-ジアジリン | G-22 | 32 |
| ブチル-ジアジリン | G-30 | 5.5 |
| 4-メチルイミダゾール | G-14 | 3 |
| D-セリナール | G-19 | 22 |
| L-セリナール | G-18 | 4 |
| L-フェニルアラニナール | G-21 | 3 |
| D-フェニルアラニナール | G-20 | 10 |

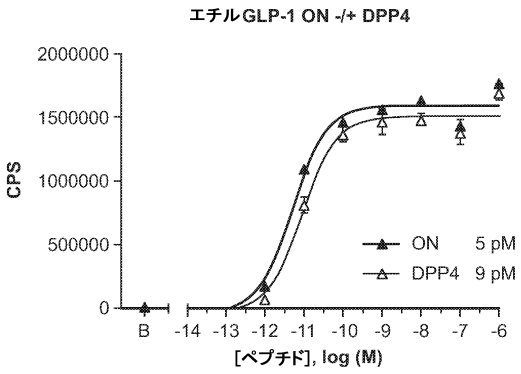
【図１０Ａ】



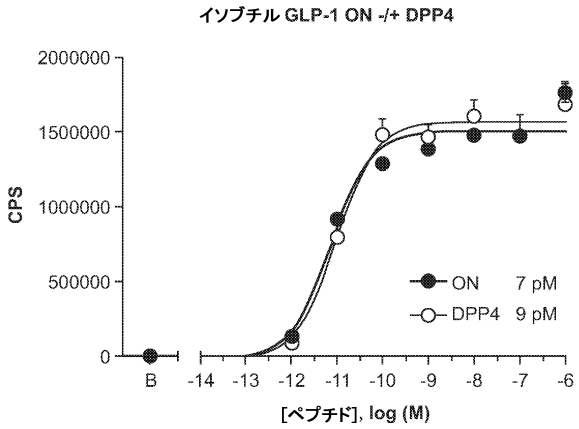

【図１０Ｂ】



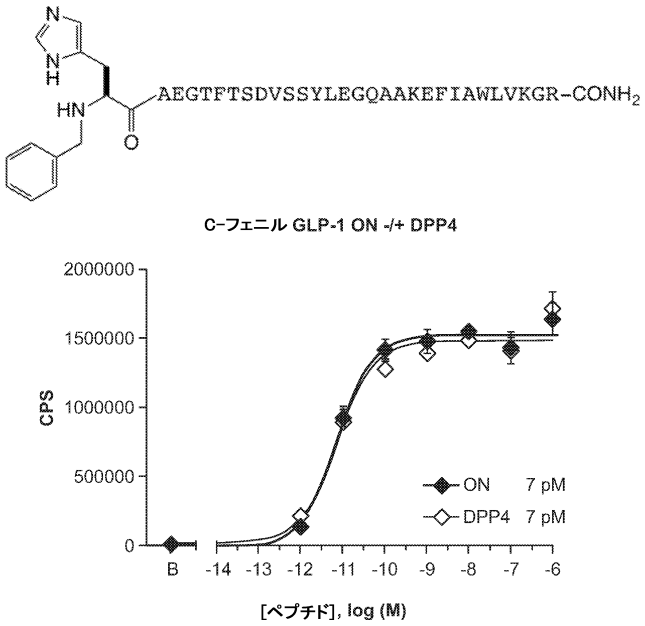




【図１０Ｃ】

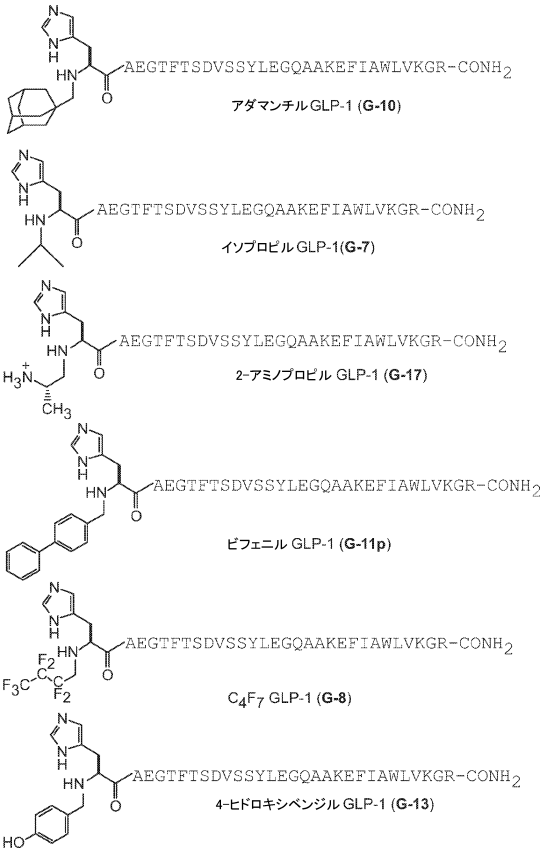


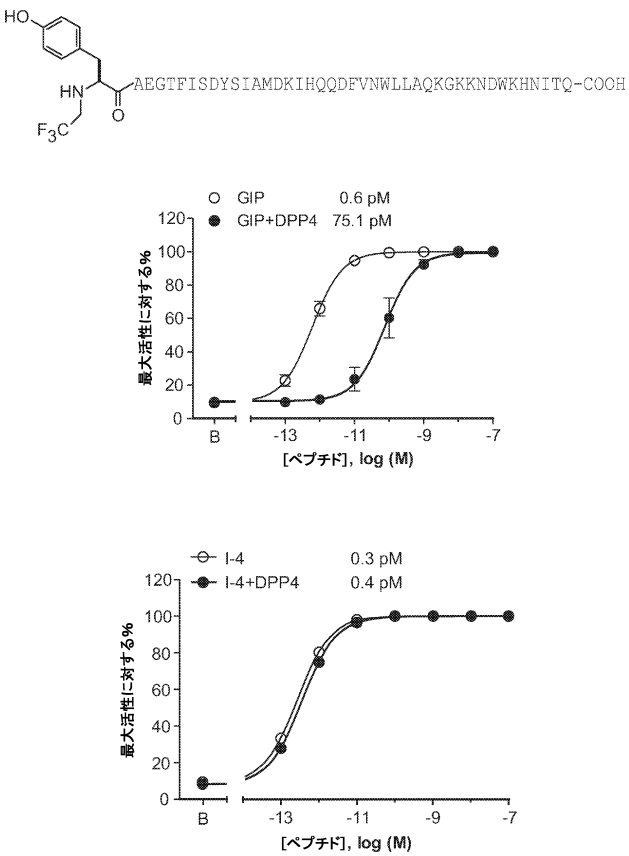
【図１０Ｄ】



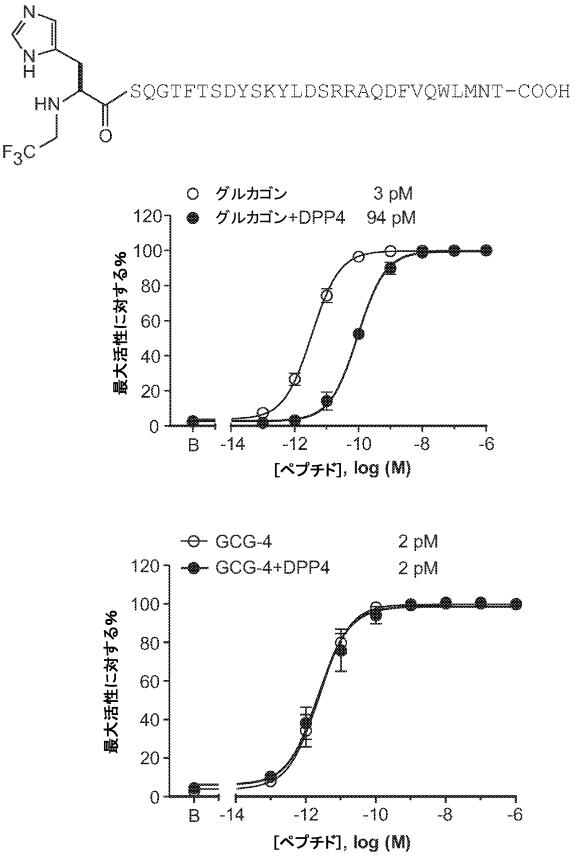

【図１１】




【図１２】

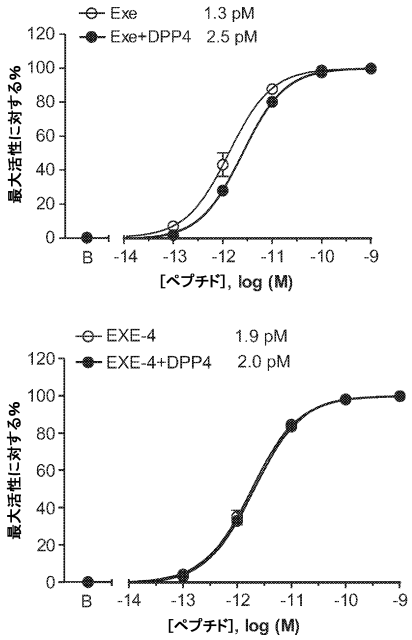



【図１３】

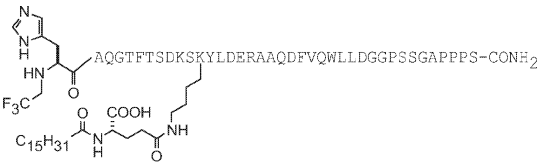


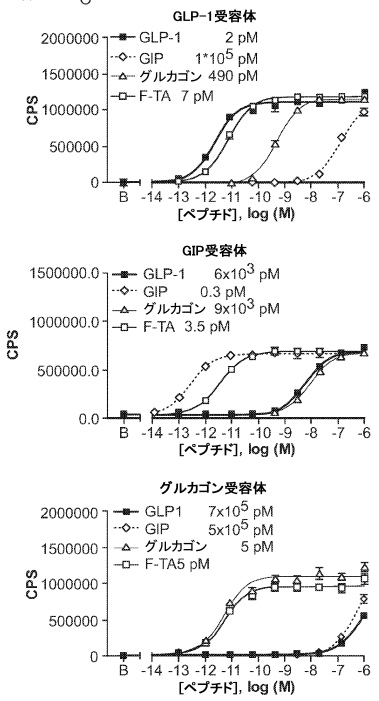
【図１４】



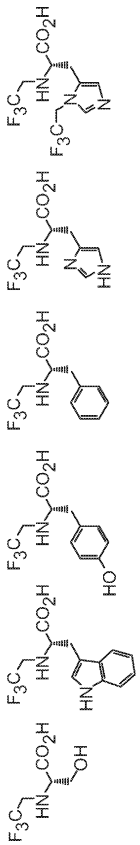




【図１５】

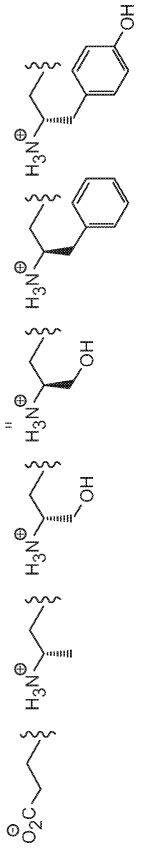


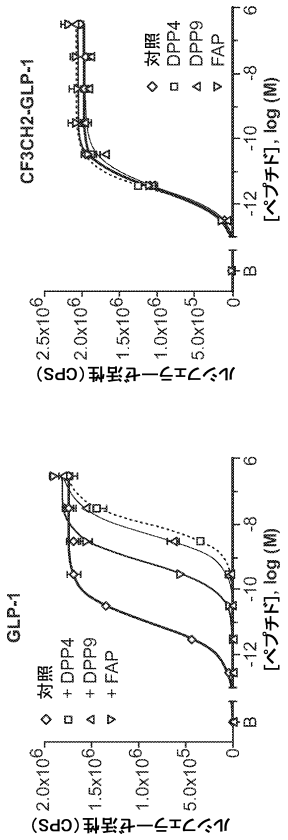

【図１６】



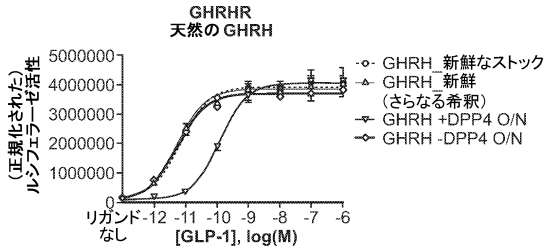
【図１７】



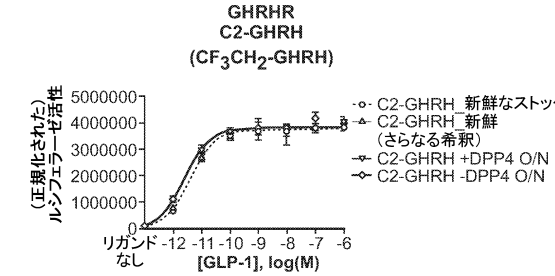
【図１８】




【図１９】

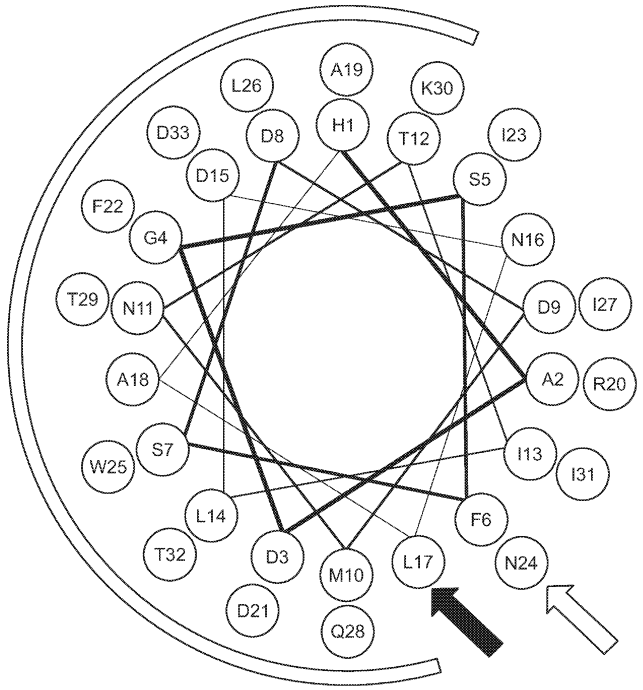



| | GHRH_新鮮なストック | GHRH_新鮮(さらなる希釈) | GHRH +DPP4 O/N | GHRH -DPP4 O/N |
|---|---|---|---|---|
| LogEC50 | -11.17 | -11.26 | -9.907 | -11.25 |
| EC50 | 6.793e-012 | 5.500e-012 | 1.239e-010 | 5.683e-012 |

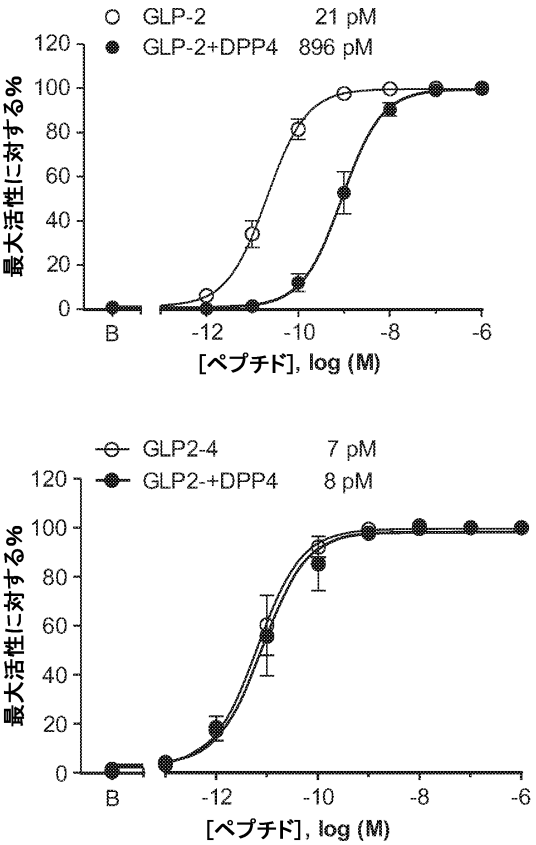



| | C2-GHRH_新鮮なストック | C2-GHRH_新鮮(さらなる希釈) | C2-GHRH +DPP4 O/N | C2-GHRH -DPP4 O/N |
|---|---|---|---|---|
| LogEC50 | -11.37 | -11.38 | -11.62 | -11.55 |
| EC50 | 4.244e-012 | 4.194e-012 | 2.411e-012 | 2.835e-012 |

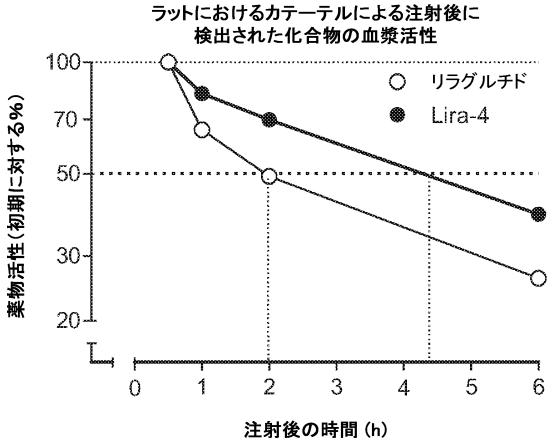
【図２０】



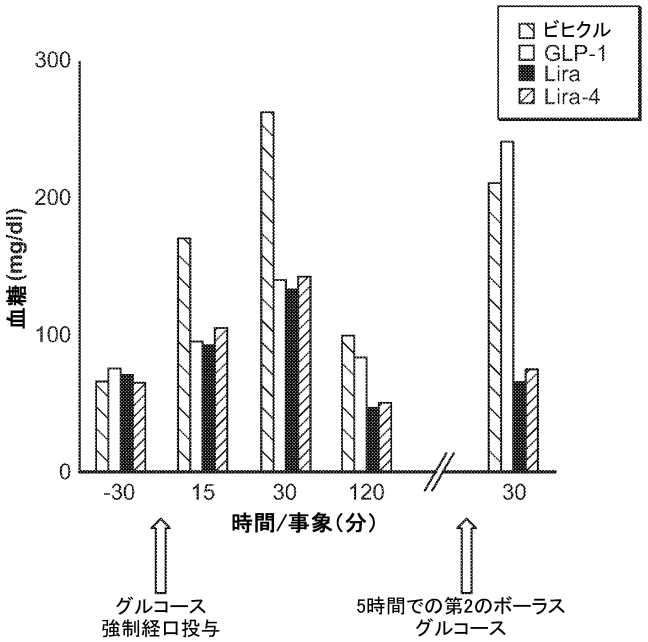

【図２１】



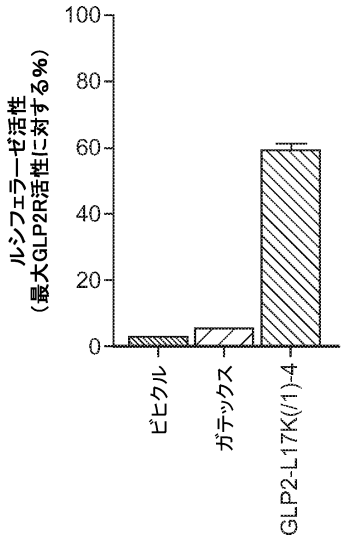
【図２２】



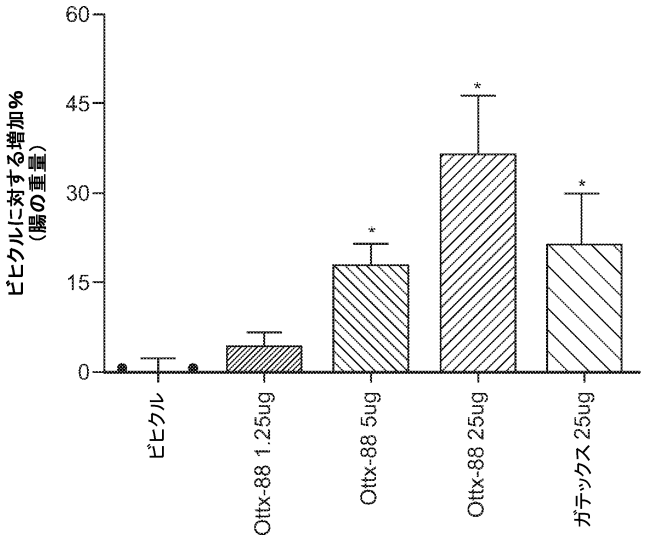

【図２２Ａ】



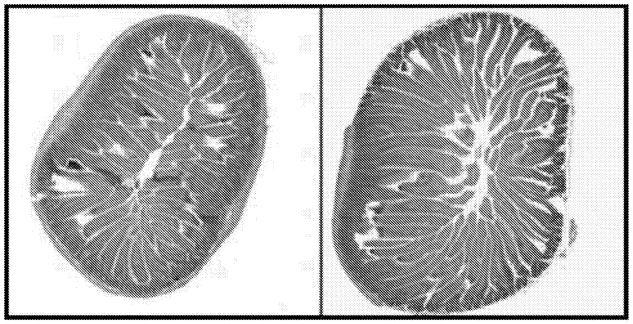

【図２３】



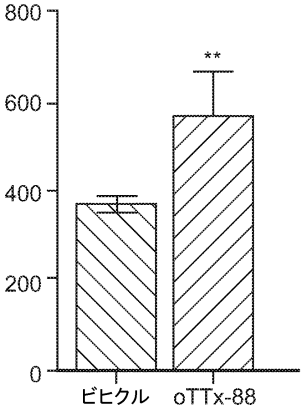

【図２３Ａ】



【図２３Ｂ】




【図２３Ｃ】




【配列表】

<u>２０２３１００７２２０００００１．ａｐｐ</u>

【手続補正書】
【提出日】令和5年5月22日(2023.5.22)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物であって、前記ポリペプチドが、以下の化学修飾：
（ｉ）前記ポリペプチドのＮ末端アミノ基、Ｎ末端第１内部アミド結合のＮＨ、他の遊離一級アミノ基、チオール基、及びチオエーテル基からなる群より選択される少なくとも１つが独立して、置換されていてもよいＣ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル、置換されていてもよいＣ$_{3}$～Ｃ$_{16}$シクロアルキル、置換されていてもよいＣ$_{3}$～Ｃ$_{16}$アリール、置換されていてもよいＣ$_{2}$～Ｃ$_{16}$アルケニル、又は置換されていてもよいＣ$_{2}$～Ｃ$_{16}$アルキニルによって誘導体化されること；並びに
（ｉｉ）前記Ｎ末端アミノ基及び前記Ｎ末端第１内部アミド結合からなる群より選択される少なくとも１つのＮＨ基が、Ｘによって誘導体化されること（ここで、各Ｘは、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよい－（ＣＲ$_{2}$）$_{1～6}$－フェニル、→Ｏ、－ＯＨ、－ＯＲ、アルコキシ、ＮＨ$_{2}$、置換されていてもよいＮＨ（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル）、及び置換されていてもよいＮ（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル）（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキル）からなる群より独立に選択され、式中、Ｒは、それぞれの場合において独立して、水素又は置換されていてもよいＣ$_{1}$～Ｃ$_{16}$アルキルから選択される）
のうちの少なくとも１つを有し、前記化学修飾されたポリペプチドが、対応する化学修飾されていないポリペプチドと比較して、本質的に同じ生物活性を有し且つ／又はタンパク質分解に対してより耐性がある、化学修飾されたポリペプチド又はその塩若しくは溶媒和物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】
20231007220000001.xml

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | FI | | |
|---|---|---|---|---|
| *C07K* | *14/575(2006.01)* | C07K | 14/575 | |
| *C07K* | *14/605(2006.01)* | C07K | 14/605 | |
| *C07K* | *14/645(2006.01)* | C07K | 14/645 | |
| *C07K* | *14/635(2006.01)* | C07K | 14/635 | |
| *C07K* | *14/60 (2006.01)* | C07K | 14/60 | |
| *C07K* | *14/595(2006.01)* | C07K | 14/595 | |
| *C07K* | *14/70 (2006.01)* | C07K | 14/70 | |
| *C07K* | *14/76 (2006.01)* | C07K | 14/76 | |
| *C12Q* | *1/02 (2006.01)* | C12Q | 1/02 | |
| *C12Q* | *1/04 (2006.01)* | C12Q | 1/04 | |
| *A61K* | *38/29 (2006.01)* | A61K | 38/29 | |
| *A61K* | *38/25 (2006.01)* | A61K | 38/25 | |
| *A61K* | *38/16 (2006.01)* | A61K | 38/16 | |
| *A61K* | *47/54 (2017.01)* | A61K | 47/54 | |
| *A61P* | *1/00 (2006.01)* | A61P | 1/00 | |
| *A61P* | *3/06 (2006.01)* | A61P | 3/06 | |
| *A61P* | *1/16 (2006.01)* | A61P | 1/16 | |
| *A61P* | *25/00 (2006.01)* | A61P | 25/00 | |
| *A61P* | *25/28 (2006.01)* | A61P | 25/28 | |
| *A61P* | *25/16 (2006.01)* | A61P | 25/16 | |
| *A61P* | *3/10 (2006.01)* | A61P | 3/10 | |
| *A61P* | *3/04 (2006.01)* | A61P | 3/04 | |
| *A61P* | *3/00 (2006.01)* | A61P | 3/00 | |
| *A61K* | *49/00 (2006.01)* | A61K | 49/00 | |
| *A61K* | *51/08 (2006.01)* | A61K | 51/08 | 200 |
| *A61K* | *38/06 (2006.01)* | A61K | 38/06 | |
| *A61K* | *38/07 (2006.01)* | A61K | 38/07 | |
| *A61K* | *38/08 (2019.01)* | A61K | 38/08 | |
| *A61K* | *38/10 (2006.01)* | A61K | 38/10 | |
| *G01N* | *33/53 (2006.01)* | G01N | 33/53 | Y |
| *G01N* | *33/536(2006.01)* | G01N | 33/536 | D |
| | | G01N | 33/536 | B |

(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 クマル クリシュナ
アメリカ合衆国 ０２１５５ マサチューセッツ州 メドフォード バロウ ホール タフツ ユニバーシティー内
(72)発明者 モンタナリ ヴィットリオ
アメリカ合衆国 ０２１５５ マサチューセッツ州 メドフォード バロウ ホール タフツ ユニバーシティー内

(72)発明者　ビーインボーン マーティン
アメリカ合衆国 ０２１１１ マサチューセッツ州 ボストン ワシントン ストリート ８００ タフツ メディカル センター内
(72)発明者　ラマン ベンカタ
アメリカ合衆国 ０２１５５ マサチューセッツ州 メドフォード バロウ ホール タフツ ユニバーシティー内