

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-521594

(P2014-521594A)

(43) 公表日 平成26年8月28日(2014.8.28)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 14/575 (2006.01)	C07K 14/575	Z N A
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4 C084
A61P 3/10 (2006.01)	A61P 3/10	4 H045
A61P 3/04 (2006.01)	A61P 3/04	
A61P 9/10 (2006.01)	A61P 9/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-512117 (P2014-512117)	(71) 出願人	598133654 アミリン・ファーマシューティカルズ, リ ミテッド・ライアビリティ・カンパニー
(86) (22) 出願日	平成24年5月24日 (2012.5.24)		AMYLIN PHARMACEUTICALS, LLC
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月17日 (2014.1.17)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121, サンディエゴ, タウン センター
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/039440		ドライブ 9360
(87) 國際公開番号	W02012/162547		9360 Towne Centre D rive, San Diego, CA 92121 USA
(87) 國際公開日	平成24年11月29日 (2012.11.29)		
(31) 優先権主張番号	61/489, 951		
(32) 優先日	平成23年5月25日 (2011.5.25)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

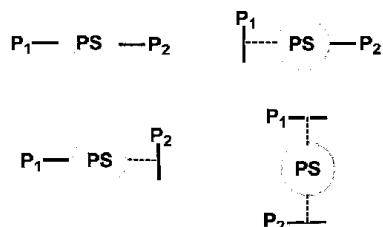
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート

(57) 【要約】

中心の水溶性ポリマースペーサーと結合している2種のペプチドホルモンを有する化合物およびその使用方法が提供される。

Fig. 1A



"Long Duration Dual Hormone Conjugate"

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I

P₁ - L₁ - P S - L₂ - P₂ (I)

の構造を有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート (L D D H C) 化合物であつて、

式中、

P₁ は、第 1 の生物活性を有するペプチドホルモンであり、P₂ は、第 2 の生物活性を有するペプチドホルモンであり、L₁ および L₂ は、独立に、結合またはリンカーであり、

10

P S は、30 ~ 80 kDa の範囲の分子量を有する水溶性ポリマースペーサーであり、ここで、

前記化合物は、生物学的アッセイにおいて、前記第 1 の生物活性を示し、

前記化合物は、生物学的アッセイにおいて、前記第 2 の生物活性を示す、化合物。

【請求項 2】

前記 P₁ が、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記 P₂ が、アミリン、プラムリンチド、ダバリンチドまたはその類似体もしくは誘導体である、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の化合物。

20

【請求項 4】

前記エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体が、エキセンディン - 4 、エキセンディン類似体 - 4 またはその誘導体である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5】

前記 P₁ が、1 ~ 39 個の残基を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

前記 P₁ が、1 ~ 28 個の残基を含む、請求項 5 に記載の化合物。

【請求項 7】

P₂ が、式 (II) の残基 1 ~ 37 のアミノ酸配列 (配列番号 31) :

X'-Xaa¹-Cys²-Asn³-Thr⁴-Ala⁵-Thr⁶-Cys⁷-Ala⁸-Thr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-Asn¹⁴-Ph¹⁵-Leu¹⁶-Val¹⁷-His¹⁸-Ser¹⁹-Ser²⁰-Xaa²¹-Asn²²-Phe²³-Xaa²⁴-Xaa²⁵-Xaa²⁶-Xaa²⁷-Xaa²⁸-Xaa²⁹-Thr³⁰-Xaa³¹-Val³²-Gly³³-Ser³⁴-Asn³⁵-Thr³⁶-Tyr³⁷-X (II)

30

を含み、

ここで、式 (II) に示されるアミノ酸の最大 55 % が欠失し、または異なるアミノ酸で置換されていてもよく、

X' が、水素、N 末端キヤップ基、P S との結合または P S とのリンカーであり、

Xaa¹ が、Lys または結合であり、

40

Xaa² が、Lys 、Cys または Asn であり、Xaa² が、Lys 、Cys または Gly であり、Xaa² が、Lys 、Cys または Pro であり、Xaa² が、Lys 、Cys または Ile であり、Xaa² が、Lys 、Cys または Leu であり、Xaa² が、Lys 、Cys または Pro であり、Xaa² が、Lys 、Cys または Pro であり、Xaa³ が、Lys 、Cys または Asn であり、

X が、適宜であり、存在する場合には、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミ

50

ノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、ヒドロキシル、PSとの結合またはPSとのリンカーであり、

前記PSが、連結アミノ酸残基、X'またはXの側鎖と、適宜、リンカーを介して、共有結合によって連結される、請求項1から6のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項8】

前記連結アミノ酸残基が、システインまたはリシンである、請求項7に記載の化合物。

【請求項9】

前記PSが、式(I1)の構造を含む化合物の11、24～29または31位のアミノ酸の側鎖と結合している、請求項7から8のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項10】

前記PSが、30～80kDaの質量を有する、請求項1から9のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項11】

前記PSが、35～60kDaの質量を有する、請求項10に記載の化合物。

【請求項12】

前記PSが、約40kDaの質量を有する、請求項10に記載の化合物。

【請求項13】

前記PSが、ポリエチレングリコールまたはその誘導体である、請求項1から12のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項14】

前記ポリエチレングリコールが、直鎖、分岐またはコーム(comb)型である、請求項13に記載の化合物。

【請求項15】

前記ポリエチレングリコールが、30～80kDaの質量を有する、請求項14に記載の化合物。

【請求項16】

前記ポリエチレングリコールが、35～60kDaの質量を有する、請求項15に記載の化合物。

30

【請求項17】

前記ポリエチレングリコールが、約40kDaの質量を有する、請求項16に記載の化合物。

【請求項18】

請求項1から17のいずれか一項に記載の化合物を、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物。

【請求項19】

対象において疾患または障害を治療するための方法であって、請求項1から18のいずれか一項に記載のポリペプチドコンジュゲートを、前記疾患または障害を治療するのに有効な量でそれを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項20】

前記疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、肥満症、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、鬱血性心不全、卒中、高コレステロール血症、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流、摂食障害、妊娠糖尿病、糖尿病性神経障害、肺高血圧症または不十分な臍臍細胞量である、請求項19に記載の方法。

40

【請求項21】

前記疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病または妊娠糖尿病である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記疾患または障害が、肥満症である、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

50

前記疾患または障害が、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、卒中、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流または肺高血圧症である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

前記疾患または障害が、脂質異常症または高コレステロール血症である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 25】

式 I



の構造を有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート (LDDHC) 化合物であつて、

10

式中、

P_1 は、第 1 の生物活性を有し、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体であり、

P_2 は、第 2 の生物活性を有し、アミリン、アミリン類似体またはその誘導体であり、

L_1 および L_2 は、独立に、結合またはリンカーであり、

PS は、30 ~ 80 kDa の範囲の分子量を有する水溶性ポリマースペーサーであり、ここで、

前記化合物は、生物学的アッセイにおいて、前記第 1 の生物活性を示し、

前記化合物は、生物学的アッセイにおいて、前記第 2 の生物活性を示す、化合物。

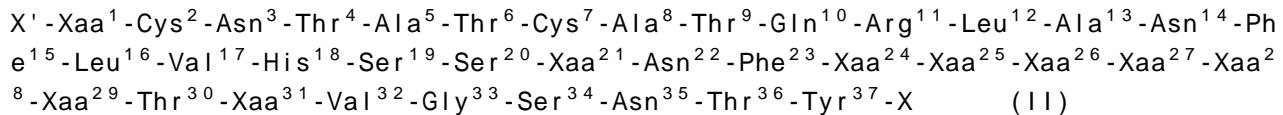
20

【請求項 26】

前記エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体が、エキセンディン - 4 、エキセンディン - 4 類似体またはその誘導体である、請求項 25 に記載の化合物。

【請求項 27】

P_2 が、式 (II) :



の残基 1 ~ 37 のアミノ酸配列 (配列番号 31) を含み、

ここで、式 (II) に示されるアミノ酸の最大 55 % が、欠失しているか、または異なるアミノ酸で置換されていてもよく、

30

式中、

X' が、水素、N 末端キャップ基、PS との結合または PS とのリンカーであり、

Xaa^1 が、Lys または結合であり、

Xaa^2 が、Lys、Cys または Asn であり、

Xaa^3 が、Lys、Cys または Gly であり、

Xaa^4 が、Lys、Cys または Pro であり、

Xaa^5 が、Lys、Cys または Ile であり、

Xaa^6 が、Lys、Cys または Leu であり、

Xaa^7 が、Lys、Cys または Pro であり、

Xaa^8 が、Lys、Cys または Pro であり、

Xaa^9 が、Lys、Cys または Pro であり、

Xaa^{10} が、Lys、Cys または Asn であり、

40

X が、適宜であり、存在する場合には、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、ヒドロキシル、PS との結合または PS とのリンカーであり、

ここで、

前記 PS が、適宜、リンカーを介して、連結アミノ酸残基、 X' または X の側鎖と共有結合によって連結している、請求項 25 から 26 のいずれか一項に記載の化合物。

50

【請求項 28】

前記 P S が、 30 ~ 80 kDa の質量を有する、請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 29】

前記 P S が、 35 ~ 60 kDa の質量を有する、請求項 25 から 28 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 30】

前記 P S が、 約 40 kDa の質量を有する、請求項 25 から 29 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 31】

請求項 25 から 30 のいずれか一項に記載の化合物を、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物。

【請求項 32】

対象において疾患または障害を治療するための方法であって、請求項 25 から 31 のいずれか一項に記載の化合物を、前記疾患または障害を治療するのに有効な量でそれを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 33】

前記疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、肥満症、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、鬱血性心不全、卒中、高コレステロール血症、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流、摂食障害、妊娠糖尿病、糖尿病性神経障害、肺高血圧症または不十分な臍臍細胞量である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病または妊娠糖尿病である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記疾患または障害が、肥満症である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記疾患または障害が、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、卒中、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流または肺高血圧症である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

前記疾患または障害が、脂質異常症または高コレステロール血症である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 38】

前記疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、鬱血性心不全、卒中、高コレステロール血症、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流、妊娠糖尿病、糖尿病性神経障害、肺高血圧症または不十分な臍臍細胞量であり、それを必要とする対象が、過体重、肥満、極度肥満であるか、または体重低減を必要としている、請求項 19 から 24 または 32 から 37 のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 39】

前記疾患または障害が、糖尿病、2型糖尿病、糖尿病性神経障害または不十分な臍臍細胞量であり、それを必要とする対象が、過体重、肥満、極度肥満であるか、または体重低減を必要としている、前記請求項に記載の方法または使用。

【請求項 40】

P 1 またはエキセンディン類似体が、[Leu^{1~4}]エキセンディン-4 または [Leu^{1~4}, Lys^{4~0}]エキセンディン-4 である、上記の請求項のいずれか一項に記載の化合物、組成物または方法。

【請求項 41】

P 2 またはアミリン類似体が、ダバリチドまたは [des-Lys¹] - ダバリンチドである、上記の請求項のいずれか一項に記載の化合物、組成物または方法。

10

20

30

40

50

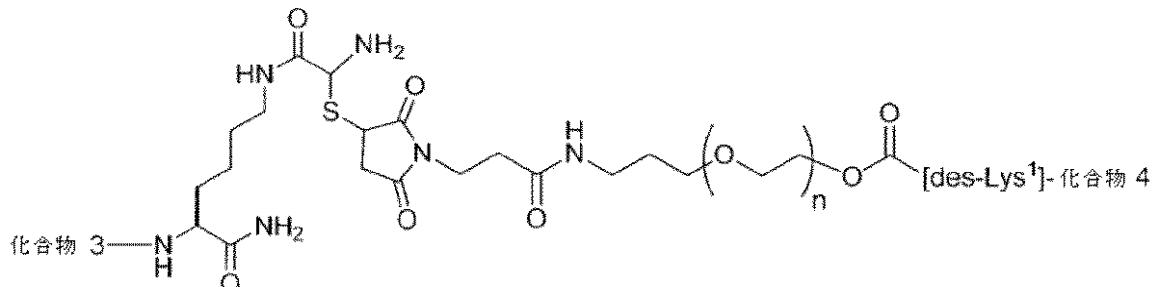
【請求項 4 2】

前記 P S が、ポリエチレングリコールまたはその誘導体であり、前記ポリエチレングリコールまたはその誘導体が直鎖である、上記の請求項のいずれか一項に記載の化合物、組成物または方法。

【請求項 4 3】

化合物またはポリペプチドコンジュゲートが、構造

【化 1】



[式中、

化合物 3 が、[Leu¹⁻⁴]エキセンディン-4（配列番号 7）であり、

化合物 4 が、ダバリンチド（配列番号 34）であり、

n が、約 900 である]

を有する化合物 14 である、上記の請求項のいずれか一項に記載の化合物、組成物または方法。

【請求項 4 4】

前記化合物が、1 μg ~ 1000 μg の1日用量で、または7 μg ~ 7000 μg の1週間用量で投与される、請求項 38 から 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記化合物が、10 μg ~ 500 μg の1日用量で、または70 μg ~ 3500 μg の1週間用量で投与される、前記請求項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記化合物が、50 μg ~ 500 μg の1日用量で、または350 μg ~ 3500 μg の1週間用量で投与される、前記請求項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記化合物が、100 μg ~ 400 μg の1日用量で、または100 μg ~ 350 μg の1週間用量で投与される、前記請求項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、2011年5月25日に出願された米国仮出願第 61/489,951 号の利益を主張する。

【0002】

「配列表」、表または ASCII テキストファイルとして提出されたコンピュータプログラムリスト添付書類の参照

2012年5月24日に作成された、ファイル 92494-838063_ST25.TXT、74,177 バイト、機械形式 IBM-PC、MS-Windows オペレーティングシステムで書かれた配列表が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

本出願は、水溶性ポリマースペーサーと組み合わせて複数のペプチドホルモンを含む化

10

20

30

40

50

合物に関する。具体的には、良好な作用の持続期間および高い効力、改善された安全性プロフィール(例えば、低い免疫原性、低い腎臓空胞形成)および/または毎週、月に2回もしくは毎月の投与および経口投与を含めた好都合な投薬レジメンを有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート(LDDHC)ならびにその使用方法が提供される。

【0004】

いずれかの理論に拘泥するものではないが、適宜、適当なスペーサーおよび/またはリンカーを介した、共有結合による結合または非共有結合による結合のいずれかによる2種以上のペプチドの化合物への組合せは、種々の疾患および障害を治療するために有用であると考えられる。ペプチドを組み合わせる例示的化合物および方法は、2006年8月11日に出願されたPCT公開出願番号WO2007/022123および2005年2月11日に出願されたWO2005/077072に記載されており、それらの各々は、その全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。このようなペプチドの組合せによって治療され得る例示的適応症として、I型およびII型の糖尿病、妊娠糖尿病、低血糖症、肥満症、過体重、パジェット病、骨粗しょう症および骨格組織の障害、心疾患、腎不全、急性および慢性冠動脈虚血、心不整脈、末梢血管疾患、高血圧症、肺高血圧症、子癇前症性中毒症、脂質異常症、インスリン抵抗性、細胞アポトーシス、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、卒中、胆嚢疾患、変形性関節症、睡眠時無呼吸、多囊胞性卵巣症候群、乳房、前立腺および結腸の癌、全身麻酔から起こる合併症、感染症、静脈瘤、黒色表皮腫、湿疹、運動不耐性、高コレステロール血症、胆石症、血栓塞栓性疾患ならびにシンドロームXが挙げられる。

10

20

30

【0005】

本明細書に引用された各特許、特許出願および刊行物は、その全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

適宜、リンカーを介して、水溶性ポリマースペーサーと結合している、各々、ホルモン活性を有する少なくとも2種のペプチドを含む長持続期間化合物(すなわち、「長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート」、「LDDHC」)が提供される。各ペプチドホルモンは、適した生物学的アッセイによって測定され得る生物活性を有する。その各ペプチドホルモンは、本明細書に記載されたLDDHC中にコンジュゲートされている場合には、生物活性、必ずしもそうではないが、効力を維持し、これは、コンジュゲーションの不在下で適した生物学的アッセイによって測定され得る。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

第1の態様では、式I



の構造を有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート(LDDHC)化合物であって、

式中、 P_1 は、第1の生物活性を有するペプチドホルモンであり、 P_2 は、第2の生物活性を有するペプチドホルモンであり、 L_1 および L_2 は、独立に、結合またはリンカーであり、PSは、30~80kDaの範囲の分子量を有する水溶性ポリマースペーサーであり、ここで、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第1の生物活性を示し、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第2の生物活性を示す、化合物が提供される。

40

【0008】

別の態様では、本明細書に記載されたLDDHCを、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。

【0009】

さらに別の態様では、対象において疾患または障害を治療するための方法が提供される。本方法は、本明細書に記載されたLDDHCを、疾患または障害を治療するのに有効な

50

量でそれを必要とする対象に投与することを含む。また、本明細書に記載される治療的使用のための医薬の製造における L D D H C の使用も含まれる。

【0010】

別の態様では、式 I



の構造を有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート (L D D H C) 化合物であって、

式中、 P_1 は、第 1 の生物活性を有し、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体であり、 P_2 は、第 2 の生物活性を有し、アミリン、アミリン類似体またはその誘導体であり、 L_1 および L_2 は、独立に、結合またはリンカーであり、 PS は、 30 ~ 80 kDa の範囲の分子量を有する水溶性ポリマースペーサーであり、ここで、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第 1 の生物活性を示し、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第 2 の生物活性を示す、化合物が提供される。

10

【0011】

上記および本明細書に記載の実施形態の各々では、化合物 14 は、最も好ましい化合物またはポリペプチドコンジュゲートである。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】図 1 A は、本明細書に記載される L D D H C 化合物の模式図を表し、 P_1 、 P_2 、 PS および適宜のリンカー L_1 および L_2 の位相幾何学的関係を示す。図 1 A ~ B 中の用語「 PS 」は、本明細書に記載された化合物について企図されるすべての適した水溶性ポリマースペーサーを代表すると理解される。図 1 B は、以下に記載されるような、水溶性ポリマースペーサーを有する「 T 」連結および「 C 末端」または「 N 末端」化合物の形成の模式図を表す。両図 1 A ~ 1 B において、破線は、ペプチド P_1 または P_2 のいずれかの側鎖と結合している、存在する場合にはリンカー、または結合を表す。 P_1 または P_2 のいずれかの主鎖と PS との間の結合が、適宜、リンカーを含み得ることは理解される。

20

【図 2】図 2 A は、実施例の節に記載されるような、 15 ml の Macrocap (商標) SP カラムを用いる化合物 14 の FPLC 精製から得られた画分の SDS PAGE 電気泳動結果を表す。図 2 B は、化合物 14 の Malaldi - TOF 質量スペクトルを表す。軸： x 軸： 19999.0 ~ 80002.0 (m/z) ； y 軸：強度%。図 2 C は、 3 μg および 10 μg での化合物 14 の SDS PAGE ゲル (NuPAGE (登録商標) 4 ~ 12% Bis - Tris ゲル) プロフィールを表す。

30

【図 3】図 3 A は、本明細書に記載される化合物の投与後時間にともなう、血糖における変化パーセントを表す。説明文：媒体 (中黒四角) ；化合物 1 (エキセンディン - 4) (中黒菱形) ； 3 nmol / kg の化合物 14 (中黒三角) 、 8 nmol / kg (中白四角) 、 25 nmol / kg (中白三角、先端上) 、 80 nmol / kg (中白三角、先端下) および 250 nmol / kg (中白菱形) ；「 * 」媒体対照に対して $p < 0.05$ (ANOVA 、ダネット試験)。図 3 B は、図 3 A の対象の毎日の体重の変化パーセント (処置前重量に対する) を表す。説明文：図 3 A についてと同様。

40

【図 4】図 4 A は、本明細書に記載された化合物の投与後時間にともなう、血糖における変化パーセントを表す。表された化合物は、 250 nmol / kg で投与した。説明文：媒体 (中黒四角) ；化合物 9 (「 + 」) ；化合物 8 (中白菱形) ；「 * 」媒体対照に対して $p < 0.05$ (ANOVA 、ダネット試験)。図 4 B は、図 4 A の対象の毎日の体重における変化パーセント (処置前重量に対する) を表す。説明文：図 4 A についてと同様。

【図 5】図 5 A は、本明細書に記載された化合物の投与後時間にともなう、血糖における変化パーセントを表す。説明文： 25 nmol / kg の化合物 11 (「 + 」) ； 80 nmol / kg の化合物 11 (菱形) ； 25 nmol / kg の化合物 14 (三角先端上) ； 80 nmol / kg の化合物 14 (三角先端下) ；「 * 」媒体対照に対して $p < 0.05$ (ANOVA 、ダネット試験)。点は、平均 ± SD (標準偏差) を表す。ペプチドは、 $t =$

50

0でベースラインサンプルの直後に、N I H / S w i s s 雌マウスにS C（皮下）注射した。サンプルは、1日目の間にt = 2、4および8時間で、次いで、5日目まで毎日採取した。血糖は、One Touch（登録商標）Ultra（登録商標）（LifeScan, Inc.、Milpitas、CA）を用いて測定した。図5Bは、図5Aの対象の毎日の体重の変化パーセント（処置前重量に対する）を表す。説明文：図5Aについてと同様。点は、平均±SDを表す。ペプチドは、t = 0でベースラインサンプルの直後に、N I H / S w i s s 雌マウスにS C（皮下）注射した。サンプルは、5日目まで毎日採取した。

【図6】図6Aは、本明細書に記載された化合物の投与後時間にともなう、血糖における変化パーセントを表す。2.5 nmol/kgの化合物1を除いて、すべての化合物は、25 nmol/kgで投与した。点は、平均±SDを表す。ペプチドは、t = 0でベースラインサンプルの直後に、N I H / S w i s s 雌マウスにS C（皮下）注射した。サンプルは、1日目の間にt = 2、4および8時間で、次いで、5日目まで毎日採取した。説明文：化合物1（菱形）；化合物5（「+」）；化合物7（四角）；化合物14（三角）；「*」媒体対照に対してp < 0.05（ANOVA、ダネット試験）。図6Bは、図6Aの対象の毎日の体重の変化パーセント（処置前重量に対する）を表す。説明文：図6Aについてと同様。点は、平均±SDを表す。ペプチドは、t = 0でベースラインサンプルの直後に、N I H / S w i s s 雌マウスにS C（皮下）注射した。サンプルは、5日目まで毎日採取した。

【図7】図7Aは、本明細書に記載された化合物の投与後の食餌誘導性肥満（DIO）ラットにおける累積的食物摂取を表す。すべての化合物（32 nmol/kg）の投薬は、0日目および7日目のS C注射によって行った。説明文：媒体（四角）；化合物7（三角先端上）；化合物6（三角先端下）；化合物6および化合物7の組合せ（菱形）；化合物14（丸）。図7Bは、図7Aの対象の毎日の体重変化パーセント（媒体補正された）を表す。説明文：図7Aについてと同様。図7B中の矢印は、注射の時間を示す。

【図8】図8は、図7A～7Bに表されるアッセイの生体重の変化の経時的推移を表す。説明文：図7Bについてと同様。実施例8を参照のこと。

【図9】図9Aは、薬物動態研究における示された用量での化合物14の体重（媒体補正された%）の変化の経時的推移を表す。説明文：媒体（四角）；0.5 mg/kgの化合物14（三角先端上）；1.5 mg/kgの化合物14（三角先端下）；3.0 mg/kgの化合物14（菱形）；矢印は、血液採取を示す。図9Bは、図9Aに提供されたデータに対応する薬力学（血漿データ）のヒストグラムを表す。各ヒストグラム群について、化合物14の濃度（「[化合物14]」）は、0.5、1.5および3.0 mg/kgの順になる。破線は、定量化の下限（LLOQ）を示す。15および21日目のバーの上の数字は、6のうち陽性サンプルの数を示す。

【図10】図10Aは、示された化合物の累積的食物摂取（ケージあたり、媒体補正されたパーセント）の経時的推移を表す。すべての化合物を、0～6日目にS C投与した。説明文：媒体（中黒丸）；10.95 mg/kgの化合物6（四角）；11.1 mg/kgの化合物7（「+」）；1.2 mg/kgの化合物14（三角先端下）；3.9 mg/kgの化合物14（三角先端上）；12.3 mg/kgの化合物14（菱形）。図10Bは、図10Aに記載された試験データの体重（媒体補正された）の変化パーセントを表す。説明文：図10Aについてと同様。実施例10を参照のこと。

【図11】試験化合物の単回注射の際の体重の経時的变化。実施例13を参照のこと。説明文：媒体（中黒四角）；化合物45（三角先端上）；化合物46（三角先端下）；化合物47（菱形）；化合物14a（中黒丸）；化合物14（中白四角）。実施例11を参照のこと。

【図12】図12Aは、試験化合物の単回注射の際の体重（媒体補正された）の経時的な変化パーセントを表す。実施例14を参照のこと。説明文：媒体（中黒四角）；化合物48（0.5 mg/kg）（三角先端上）；化合物48（1.5 mg/kg）（三角先端下）；化合物48（3.0 mg/kg）（菱形）；化合物14（1.5 mg/kg）（丸）

10

20

30

40

50

。図12Bは、3、7、14および20日目の血漿薬物レベルのヒストグラムを表す。各ヒストグラム群について、化合物は、(左から右)：化合物48(0.5mg/kg)；化合物48(1.5mg/kg)；化合物48(3.0mg/kg)；および化合物14(1.5mg/kg)の順に示されている。破線は、定量化の下限(LLQ)を示す。14および20日目のバーの上の数字は、6のうち陽性サンプルの数を示す。実施例14を参照のこと。

【図13】図13Aは、化合物69、73、72、70、74および媒体の本明細書に記載される毎日の体重変化パーセント(媒体補正された)結果を表す。図13Bは、化合物69、73、72、70、74および媒体の毎日の累積的食物摂取結果を表す。説明文(図13A～13B)：化合物69(四角)；化合物73(三角先端上)；化合物72(三角先端下)；化合物70(菱形)；化合物74(中白丸)；媒体(中黒丸)。実施例17を参照のこと。
10

【図14】図14Aは、DIOラットにおける2週間の、化合物74の週に2回のSC投薬および化合物49の連続投薬の比較のベースライン体重(媒体補正された)を表す。説明文：媒体(中黒丸)；化合物74(三角)；化合物49(四角)。図14Bは、DIOラットにおける4週間の、化合物71の週に1回のSC投薬および化合物49の連続注入の比較のベースライン体重(媒体補正された)の変化パーセントを表す。説明文：媒体(中黒丸)；化合物71(三角)；化合物49(四角)。実施例18を参照のこと。

【図15】図15Aは、化合物71の用量応答研究から得た毎日の累積的体重増加結果(ベースライン体重からの変化パーセント、媒体補正された)を表す。図15Bは、化合物71の用量応答研究から得た累積的な毎日の食物摂取結果を表す。説明文(図15A～15B)：媒体(四角)；12nmol/kg(三角先端上)；25nmol/kg(三角先端下)；50nmol/kg(菱形)；125nmol/kg(中黒丸)；250nmol/kg(中白四角)。実施例18を参照のこと。
20

【図16】図16Aは、化合物67の用量応答研究から得た体重の累積的变化パーセント(媒体補正された)を表す。説明文：媒体(四角)；80nmol/kgの化合物67(三角先端上)；160nmol/kgの化合物67(三角先端下)；320nmol/kgの化合物67(菱形)。図16Bは、化合物71、75および媒体の本明細書に記載される毎日の体重の変化パーセント(媒体補正された)を表す。説明文：媒体(暗い四角)；化合物71(明るい四角)；化合物75(三角)。実施例19を参照のこと。
30

【図17】図17Aは、化合物74、76、77、78および媒体の本明細書に記載される体重の毎日の変化パーセントを表す。図17Bは、化合物74、76、77、78および媒体の毎日の食物摂取結果を表す。説明文(図17A～17B)：化合物74(三角先端下)；化合物76(菱形)；化合物77(大きい中黒丸)；化合物78(中白四角)；媒体(小さい中黒丸)。実施例20を参照のこと。

【図18】図18Aは、化合物77の用量応答研究の、および化合物79との比較における毎日の体重変化パーセント(媒体補正された)結果を表す。図18Bは、化合物77の、および化合物79との比較における毎日の食物摂取結果を表す。説明文(図18A～18B)：化合物79、250nmol/kg(四角)；化合物77、250nmol/kg(三角先端上)；化合物77、125nmol/kg(三角先端下)；化合物77、62.5nmol/kg(菱形)；化合物77、31.25nmol/kg(大きい中黒丸)；媒体(小さい中黒丸)。実施例20を参照のこと。
40

【図19】図19Aは、7日にわたって決定された、試験化合物の125nmol/kgでの単回SC注射後の痩せたラットにおける毎日の体重変化パーセント(媒体補正された)を表す。図19Bは、試験期間の間の対応する累積的食物摂取変化パーセント(媒体補正された)を表す。説明文：媒体(中黒丸)；化合物77(中黒四角)；化合物80(菱形)；化合物81(中白丸)；化合物82(中白四角)；化合物83(三角先端上)；化合物84(三角先端下)。実施例21を参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0013】

I. 定義

本明細書において使用される略語は、化学および生物学の技術分野内でのその従来の意味を有する。本明細書において示される化学構造および式は、化学の技術分野において公知である化学結合価の標準ルールに従って構築される。

【0014】

置換基 (substituent group) が、左から右に書かれる、その従来の化学式によって特定される場合には、右から左に構造を書くことに起因する化学的に同一の置換基を等しく包含する、例えば、-CH₂O-は、-OCH₂-と等価である。

【0015】

用語「アルキル」とは、それ自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、直鎖（すなわち、非分岐）もしくは分枝鎖またはそれらの組合せを意味し、これらは完全飽和であっても、モノ不飽和またはポリ不飽和であってもよく、指定される炭素原子数を有する（すなわち、C₁～C₁₀は、1～10個の炭素を意味する）二価および多価ラジカルを含み得る。飽和炭化水素ラジカルの例として、それだけには限らないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、（シクロヘキシル）メチル、例えば、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルの相同体および異性体などといった基が挙げられる。不飽和アルキル基は、1つまたは複数の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例として、それだけには限らないが、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニルならびに高級相同体および異性体が挙げられる。アルコキシは、酸素リンカー(-O-)を介して分子の残部と結合しているアルキルである。

10

20

30

40

【0016】

用語「アルキレン」とは、それ自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、-CH₂CH₂CH₂CH₂-によって例示されるが、これに限定されないアルキルから誘導される二価ラジカルを意味する。通常、アルキル（またはアルキレン）基は、1～24個の炭素原子を有し、10個以下の炭素原子を有する基が好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」とは、短鎖アルキルまたはアルキレン基であり、一般に、8個以下の炭素原子を有する。用語「アルケニレン」とは、それ自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、アルケンから誘導される二価ラジカルを意味する。

【0017】

用語「ヘテロアルキル」とは、それ自体で、または別の用語と組み合わせて、別に示されない限り、少なくとも1個の炭素原子と、O、N、P、SiおよびSからなる群から選択される少なくとも1個のヘテロ原子とからなる安定な直鎖もしくは分枝鎖またはそれらの組合せを意味し、ここで、窒素および硫黄原子は、適宜、酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、適宜、四級化されていてもよい。ヘテロ原子（単数または複数）O、N、P、SおよびSiは、ヘテロアルキル基の内部の位置のいずれに置かれてもよく、またはアルキル基が分子の残部と結合している位置に置かれてもよい。例として、それだけには限らないが、-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=CH-N-OCH₃、-CH=CH-N(CH₃)-CH₃、-O-CH₃、-O-CH₂-CH₃、および-CNが挙げられる。最大2個のヘテロ原子が連続している場合もある、例えば、-CH₂-NH-OCH₃など。

【0018】

同様に、用語「ヘテロアルキレン」とは、それ自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-および-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-によって例示されるが、これに限定されないヘテロアル

50

キルから誘導される二価ラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基について、ヘテロ原子はまた、鎖の末端のいずれかまたは両方を占め得る（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基について、連結基の配向は、連結基の式が書かれている方向によって暗示されない。例えば、式 - C (O)₂ R ' - は、- C (O)₂ R ' - および - R ' C (O)₂ - の両方を表す。上記のように、ヘテロアルキル基は、本明細書において使用される場合、- C (O) R ' 、 - C (O) NR ' 、 - NR ' R ' 、 - OR ' 、 - SR ' および / または - SO₂ R ' などのヘテロ原子を介して分子の残部と結合している基を含む。「ヘテロアルキル」が列挙され、- NR ' R ' などといった特定のヘテロアルキル基の列挙が続く場合には、用語ヘテロアルキルおよび - NR ' R ' は重複しておらず、相互に排他的ではないことは理解されよう。むしろ、明確性を付加するために、特定のヘテロアルキル基が列挙される。したがって、用語「ヘテロアルキル」は、本明細書において、- NR ' R ' などといった特定のヘテロアルキル基を排除すると解釈されてはならない。

10

【0019】

用語「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」とは、それら自体で、またはその他の用語と組み合わせて、別に示されない限り、それぞれ、「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環状版を意味する。さらに、ヘテロシクロアルキルについては、ヘテロ原子は、複素環が分子の残部と結合している位置を占め得る。シクロアルキルの例として、それだけには限らないが、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、1 - シクロヘキセニル、3 - シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられる。ヘテロシクロアルキルの例として、それだけには限らないが、1 - (1 , 2 , 5 , 6 - テトラヒドロピリジル) 、1 - ピペリジニル、2 - ピペリジニル、3 - ピペリジニル、4 - モルホリニル、3 - モルホリニル、テトラヒドロフラン - 2 - イル、テトラヒドロフラン - 3 - イル、テトラヒドロチエン - 2 - イル、テトラヒドロチエン - 3 - イル、1 - ピペラジニル、2 - ピペラジニルなどが挙げられる。「シクロアルキレン」および「ヘテロシクロアルキレン」とは、単独または別の置換基の一部として、それぞれ、シクロアルキルおよびヘテロシクロアルキルから誘導される二価ラジカルを意味する。

20

【0020】

用語「ハロ」または「ハロゲン」とは、それら自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素原子を意味する。さらに、「ハロアルキル」などの用語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含むものとする。例えば、用語「ハロ (C₁ - C₄) アルキル」は、それだけには限らないが、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2 , 2 , 2 - トリフルオロエチル、4 - クロロブチル、3 - ブロモプロピルなどを含む。

30

【0021】

用語「アシル」とは、別に示されない限り、- C (O) R (式中、R は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールである) を意味する。

40

【0022】

用語「アリール」とは、別に示されない限り、单一環または一緒に縮合している（すなわち、縮合環アリール）か、または共有結合によって連結している複数の環であり得る（好ましくは、1 ~ 3 個の環）、ポリ不飽和、芳香族、炭化水素置換基を意味する。縮合環アリールとは、縮合環の少なくとも 1 個がアリール環である、一緒に縮合している複数の環を指す。用語「ヘテロアリール」とは、N、O および S から選択される 1 ~ 4 個のヘテロ原子を含有するアリール基（または環）を指し、ここで、窒素および硫黄原子は、酸化されていてもよく、窒素原子（単数または複数）は、四級化されていてもよい。したがって、用語「ヘテロアリール」とは、縮合環ヘテロアリール基（すなわち、縮合環の少なくとも 1 個が、複素芳香環である、一緒に縮合している複数の環）を含む。5 , 6 - 縮合環

50

ヘテロアリーレンとは、一方の環が5員を有し、もう一方の環が6員を有し、少なくとも1個の環がヘテロアリール環である、一緒に縮合している2個の環を指す。同様に、6, 6-縮合環ヘテロアリーレンとは、一方の環が6員を有し、もう一方の環が6員を有し、少なくとも1個の環が、ヘテロアリール環である、一緒に縮合している2個の環を指す。また、6, 5-縮合環ヘテロアリーレンとは、一方の環が6員を有し、もう一方の環が5員を有し、少なくとも1個の環が、ヘテロアリール環である、一緒に縮合している2個の環を指す。ヘテロアリール基は、炭素またはヘテロ原子を介して分子の残部と結合され得る。アリールおよびヘテロアリール基の限定されない例として、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、ブリニル、2-ベンゾイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、および6-キノリルが挙げられる。上記のアリールおよびヘテロアリール環系各々の置換基は、以下に記載される許容される置換基の群から選択される。「アリーレン」および「ヘテロアリーレン」とは、単独または別の置換基の一部として、それぞれ、アリールおよびヘテロアリールから誘導される二価ラジカルを意味する。

10

20

30

40

50

【0023】

簡潔さのために、用語「アリール」とは、その他の用語（例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）と組み合わせて使用される場合には、上記で定義されるアリールおよびヘテロアリール環の両方を含む。したがって、用語「アリールアルキル」とは、炭素原子（例えば、メチレン基）が、例えば、酸素原子（例えば、フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-（1-ナフチルオキシ）プロピルなど）によって置き換えられているアルキル基を含めた、アリール基がアルキル基（例えば、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど）と結合しているラジカルを含むものとする。

【0024】

用語「オキソ」とは、本明細書において使用される場合、炭素原子と二重結合している酸素を意味する。

【0025】

用語「アルキルスルホニル」とは、本明細書において使用される場合、 $\text{R}'\text{S}(\text{O}_2)\text{R}'$ （式中、 R' は、上記で定義されるアルキル基である）を有する部分を意味する。 R' は、特定された数の炭素（例えば、「 $\text{C}_1\text{-C}_4$ アルキルスルホニル」）を有し得る。

【0026】

上記の用語の各々（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」）は、示されたラジカルの置換および非置換形態の両方を含む。各種類のラジカルの好みの置換基は、以下に提供されている。

【0027】

アルキルおよびヘテロアルキルラジカルの置換基（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニルおよびヘテロシクロアルケニルと呼ばれることが多い基を含む）は、0~(2m'+1)個（式中、m'は、このようなラジカル中の炭素原子の総数である）の範囲の数の、それだけには限らないが、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R'、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R'R'、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R'、-OC(O)NR'R'、-NR'C(O)R'、-NR-C(NR'R'R')=NR'、-NR-C(NR'R')=NR

、 - S (O) R' 、 - S (O)₂ R' 、 - S (O)₂ NR' R' 、 - NRSO₂ R' 、 - CN 、および - NO₂ から選択されるさまざまな基のうち 1 種または複数であり得る。R' 、 R'' 、 R''' および R'''' は各々、独立に、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール（例えば、1 ~ 3 個のハロゲンで置換されたアリール）、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基またはアリールアルキル基を指すことが好ましい。本明細書に記載された化合物が、2 個以上の R 基を含む場合には、例えば、R 基は各々、2 個以上のこれらの基が存在する場合に、各 R' 、 R'' 、 R''' および R'''' 基がそうであるように独立に選択される。R' および R'' が、同一窒素原子と結合している場合には、それらは、窒素原子と組み合わさって、4 、 5 、 6 または 7 員環を形成してもよい。例えば、- NR'R' として、それだけには限らないが、1 - ピロリジニルおよび 4 - モルホリニルが挙げられる。置換基の上記の考察から、当業者ならば、用語「アルキル」は、ハロアルキル（例えば、- CF₃ および - CH₂CF₃ ）およびアシル（例えば、- C(O)CH₃ 、 - C(O)CF₃ 、 - C(O)CH₂OCH₃ など）などの水素基以外の基と結合している炭素原子を含めた基を含むものとするということは理解されよう。

10

【0028】

アルキルラジカルについて記載された置換基と同様に、アリールおよびヘテロアリール基の置換基は、多様であり、0 ~ 芳香環系上の空の原子価の総数の範囲の数で、例えば： - OR' 、 - NR'R' 、 - SR' 、 - ハロゲン、 - SiR'R''R''' 、 - OCO(O)R' 、 - C(O)R' 、 - CONR'R' 、 - OCNR'R' 、 - NR'C(O)R' 、 - NR'-C(O)NR'R''' 、 - NR'C(O)₂R' 、 - NR-C(NR'R''R''') = NR''' 、 - NR-C(NR'R''') = NR''' 、 - S(O)R' 、 - S(O)₂R' 、 - S(O)₂NR'R' 、 - NRSO₂R' 、 - CN 、 - NO₂ 、 - R' 、 - N₃ 、 - CH(Ph)₂ 、フルオロ (C₁ - C₄) アルコキシ、およびフルオロ (C₁ - C₄) アルキルから選択され、ここで、R' 、 R'' 、 R''' および R'''' は、独立に、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリールおよび置換もしくは非置換ヘテロアリールから選択されることが好ましい。本明細書に記載された化合物が、2 個以上の R 基を含む場合には、例えば、R 基は各々、2 個以上のこれらの基が存在する場合に、R' 、 R'' 、 R''' および R'''' 基の各々がそうであるように独立に選択される。

20

30

【0029】

2 個以上の置換基は、連結して、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル基を形成してもよい。このようないわゆる環形成置換基は、通常、必ずしもそうではないが、環基本構造と結合して見られる。一実施形態では、環形成置換基は、基本構造の隣接するメンバーと結合している。例えば、環基本構造の隣接するメンバーと結合している 2 個の環形成置換基は、縮合環構造を作り出す。別の実施形態では、環形成置換基は、基本構造の単一のメンバーと結合している。例えば、環基本構造の単一のメンバーと結合している 2 個の環形成置換基は、スピロ環構造を作り出す。さらに別の実施形態では、環形成置換基は、基本構造の隣接していないメンバーと結合している。

40

【0030】

アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基のうち 2 個が、式 - T - C(O) - (CRR')_q - U - (式中、T および U は、独立に、- NR- 、 - O- 、 - CRR' - または一重結合であり、q は、0 ~ 3 の整数である) の環を形成してもよい。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基のうち 2 個が、式 - A - (CH₂)_r - B - (式中、A および B は、独立に、- CRR' - 、 - O- 、 - NR- 、 - S- 、 - S(O) - 、 - S(O)₂ - 、 - S(O)₂NR' - または一重結合であり、r は、1 ~ 4 の整数である) の置換基で置き換えられてもよい。そのように形成され

50

た新規環の一重結合のうち1つは、二重結合で置き換えられてもよい。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基のうち2個が、式 - (C R R ')_s - X ' - (C ' ' R ' ')_d - (式中、s および d は、独立に、0 ~ 3 の整数であり、X ' は、- O - 、- N R ' - 、- S - 、- S (O) - 、- S (O)₂ - または - S (O)₂ N R ' - である) の置換基で置き換えられてもよい。置換基 R 、 R ' 、 R ' ' および R ' ' ' は、独立に、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリールおよび置換もしくは非置換ヘテロアリールから選択されることが好ましい。

【 0 0 3 1 】

本明細書において使用される場合、用語「ヘテロ原子」または「環ヘテロ原子」は、酸素 (O) 、窒素 (N) 、硫黄 (S) 、リン (P) およびケイ素 (Si) を含むものとする。

【 0 0 3 2 】

「置換基 (substituent group) 」とは、本明細書において使用される場合、以下の部分：

(A) - O H 、 - N H₂ 、 - S H 、 - C N 、 - C F₃ 、 - N O₂ 、オキソ、ハロゲン、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリールならびに

(B) (i) オキソ、- O H 、 - N H₂ 、 - S H 、 - C N 、 - C F₃ 、 - N O₂ 、ハロゲン、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリールおよび

(i i) (a) オキソ、- O H 、 - N H₂ 、 - S H 、 - C N 、 - C F₃ 、 - N O₂ 、ハロゲン、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリールおよび

(b) オキソ、- O H 、 - N H₂ 、 - S H 、 - C N 、 - C F₃ 、 - N O₂ 、ハロゲン、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリールおよび非置換ヘテロアリールから選択される少なくとも1個の置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール

から選択される少なくとも1個の置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールおよびヘテロアリール

から選択される少なくとも1個の置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールおよびヘテロアリール
から選択される基を意味する。

【 0 0 3 3 】

「大きさが制限された置換基」または「大きさが制限された置換基 (substituent group) 」とは、本明細書において使用される場合、「置換基 (substituent group) 」について上記で記載された置換基のすべてから選択される基を意味し、ここで、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換 C₁ ~ C₂₀ アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の 2 ~ 20 員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換 C₄ ~ C₈ シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の 4 ~ 8 員のヘテロシクロアルキルである。

【 0 0 3 4 】

「低級置換基」または「低級置換基 (substituent group) 」とは、本明細書において使用される場合、「置換基 (substituent group) 」について上記で記載された置換基のすべてから選択される基を意味し、ここで、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換 C₁ ~ C₈ アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の 2 ~ 8 員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換 C₅ ~ C₇ シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロ

10

20

30

40

50

シクロアルキルは、置換もしくは非置換の5～7員のヘテロシクロアルキルである。

【0035】

用語「医薬上許容される塩」とは、本明細書に記載された化合物上に見られる特定の置換基に応じて、相対的に非毒性の酸または塩基を用いて調製される活性化合物の塩を含むものとする。本明細書に記載された化合物が、相対的に酸性の官能基を含有する場合には、ニートでか、または適した不活性の溶媒中で、このような化合物の中性形態を十分な量の所望の塩基と接触させることによって塩基付加塩を得ることができる。医薬上許容される塩基付加塩の例として、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノまたはマグネシウム塩または同様の塩が挙げられる。本明細書に記載された化合物が、相対的に塩基性の官能基を含有する場合には、ニートでか、または適した不活性の溶媒中で、このような化合物の中性形態を十分な量の所望の酸と接触させることによって酸付加塩を得ることができる。医薬上許容される酸付加塩の例として、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、炭酸一水素(monohydrogencarbonic)、リン酸、リン酸一水素、リン酸二水素、硫酸、硫酸一水素、ヨウ化水素酸または亜リン酸などの無機酸から誘導されるもの、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸(is butyric)、マレイン酸、マロン酸(masonic)、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、シュウ酸、メタンスルホン酸などの相対的に非毒性の有機酸から誘導される塩が挙げられる。また、アルギン酸などといったアミノ酸の塩およびグルクロン酸またはガラクトロン酸(galactunoric acids)などの有機酸の塩も含まれる(例えば、Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19参照のこと)。本明細書に記載されたある特定の化合物は、化合物が塩基または酸付加塩のいずれかに変換されることを可能にする、塩基性および酸性官能基の両方を含有する。

10

20

30

40

【0036】

したがって、本明細書に記載された化合物は、医薬上許容される酸を有するものなどの塩として存在し得る。一実施形態では、本明細書に記載された化合物および組成物は、このような塩を含む。このような塩の例として、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、メタンスルホン酸塩、硝酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩(例えば、(+)-酒石酸塩、(-)-酒石酸塩、トリフルオロ酢酸塩またはラセミ混合物を含めたそれらの混合物)、コハク酸塩、安息香酸塩およびグルタミン酸などのアミノ酸を有する塩が挙げられる。これらの塩は、当業者に公知の方法によって調製され得る。

【0037】

化合物の中性形態は、塩を、塩基または酸と接触させることおよび従来法で親化合物を単離することによって再生されることが好ましい。化合物の親形態は、極性溶媒における溶解度などの、ある物理的特性において種々の塩形態とは異なる。

【0038】

一実施形態では、塩は酢酸塩、塩酸塩またはトリフルオロ酢酸塩である。

【0039】

本明細書に記載されたある化合物は、溶媒和していない形態ならびに水和形態を含めた溶媒和形態で存在し得る。一般に、溶媒和形態は、溶媒和していない形態と等価であり、本明細書に記載された範囲内に包含される。本明細書に記載されたある化合物は、複数の結晶または非晶質形態で存在し得る。一般に、すべての物理的形態は、本明細書において企図される使用にとって等価であり、本明細書に記載された範囲内にあるものとする。

【0040】

本明細書に記載されたある化合物は、不斉炭素原子(光学中心)または二重結合を有し；ラセミ化合物、ジアステレオマー、互変異性体、幾何異性体および個々の異性体は、本明細書に記載された範囲内に包含される。本明細書に記載された化合物は、合成および/または単離するには不安定すぎると当技術分野で公知である化合物を含まない。

【0041】

本明細書に記載された化合物はまた、このような化合物を構成する原子のうち1個また

50

は複数で、天然にない割合の原子の同位体を含有し得る。例えば、化合物は、例えば、トリチウム (^3H)、ヨウ素 - 125 (^{125}I) または炭素 - 14 (^{14}C) などの放射性同位体で放射標識され得る。本明細書に記載された化合物のすべての同位体の変動は、放射性であろうとなかろうと、本明細書に記載された範囲内に包含される。

【0042】

記号

【化1】

~~~~~

は、化学部分の、分子または化学式の残部との結合点を表す。

10

## 【0043】

「オルソログ」および同様の用語は、ペプチドとの関連において、当技術分野で公知のように、オルソログをコードする遺伝子が、共通の祖先から進化した2種以上のペプチド遺伝子産物を指す。

## 【0044】

「類似体」とは、本明細書において、ポリペプチドとの関連において使用される場合、親化合物に対してアミノ酸の挿入、欠失、付加および/または置換を有する化合物を指す。類似体は、優れた安定性、溶解度、有効性、半減期などを有し得る。一実施形態では、類似体は、親化合物に対して、少なくとも45%、例えば、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらに高い配列同一性を有する化合物である。一実施形態では、類似体は、親化合物に対して、20、19、20、17、16、15、10、6、5、4、3、2、および/または1以下の挿入、欠失、付加および/または置換を有する。例示的親化合物として、エキセンディン-4、GLP-1、ラットアミリン、プラムリンチド、ダバリンチドおよび本明細書に記載されたその他の親化合物が挙げられる。付加は、PCT公開出願番号WO 2007/022123およびWO 2005/077072に開示されるような、エキセンディン-4「テール」もしくはカエルGLP-1「テール」またはその断片もしくは類似体などの伸長であり得る。例示的伸長として、KNGGPPSSGAPPPS(配列番号1)、PSSGAPPPS(配列番号2)、FIIEWLKNGGPPSSGAPPPS(配列番号3)およびPKKIRYS(配列番号4)ならびにその類似体が挙げられる。

20

## 【0045】

用語「誘導体」とは、ポリペプチドとの関連において、親またはその類似体のアミノ酸配列を有するが、そのアミノ酸側基、-炭素原子、末端アミノ基または末端カルボン酸基のうち1つまたは複数の化学的修飾をさらに有する分子を指す。化学的修飾として、それだけには限らないが、化学部分を付加すること、新規結合を作製することおよび化学部分を除去することが挙げられる。アミノ酸側基の修飾として、それだけには限らないが、リシン - アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジンまたはリシンのN - アルキル化、グルタミン酸またはアスパラギン酸のカルボン酸基のアルキル化およびグルタミンまたはアスパラギンの脱アミド化が挙げられる。末端アミノの修飾として、それだけには限らないが、デスアミノ、N - 低級アルキル、N - ジ - 低級アルキル、拘束されたアルキル(例えば、分岐、環状、縮合、アダマンチル)およびN - アシル修飾が挙げられる。末端カルボキシ基の修飾として、それだけには限らないが、アミド、低級アルキルアミド、拘束されたアルキル(例えば、分岐、環状、縮合、アダマンチル)アルキル、ジアルキルアミドおよび低級アルキルエステル修飾が挙げられる。さらに、側基または末端基の1個または複数が、通常の合成化学者に公知の保護基によって保護される場合もある。アミノ酸の -炭素は、モノ - またはジメチル化され得る。

40

## 【0046】

誘導体はまた、1つまたは複数の特定の部位で、個々のアミノ酸の立体化学が、反転されている(すなわち、(L)/Sから(D)/R)ポリペプチドも企図する。また、グリコシル化によって修飾された(例えば、Asn、Serおよび/またはThr残基で)ポ

50

リペプチドも企図される。本明細書に記載された化合物および方法において有用なポリペプチド成分はまた、本明細書に記載された親ペプチド（天然の、アゴニスト、類似体および誘導体）の生物学的に活性な断片であり得る。

【0047】

用語「同一性」、「配列同一性」などは、2種以上の核酸またはポリペプチド配列の比較との関連において、同一であるか、または当技術分野で公知の、配列比較アルゴリズム、例えば、BLASTまたはBLAST 2.0を使用して測定されるような、特定されたパーセンテージの同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチド（すなわち、比較ウインドウまたは指定された領域にわたって、最大一致を求めて比較およびアラインされた場合の、特定された領域にわたる、約50%同一性、好ましくは、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはより高い同一性）を有する2種以上の配列または部分配列を指す。この定義は、欠失および/または付加を有する配列、ならびに置換を有するもの、ならびに天然に存在するもの、例えば、多型または対立遺伝子変異体および人為的変異体を含む。好ましいアルゴリズムでは、当技術分野で公知のように、ギャップなどについて考慮される。配列比較のためには、通常、1種の配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて、部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用できるか、または代替パラメータを指定できることが好ましい。次いで、配列比較アルゴリズムによって、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する、試験配列の配列同一性パーセントが算出される。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith & Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, 1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444の類似性の検索法によって、これらのアルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. 中のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA）のコンピュータによる実施によって、または手作業によるアラインメントおよび目視検査によって実施できる。例えば、*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 補遺))参照のこと。

【0048】

配列同一性および配列類似性パーセントを決定するのに適しているアルゴリズムの好ましい例として、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムが挙げられ、これらは、Altschul et al., 1977, *Nuci. Acids Res.* 25:3389-3402およびAltschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0は、当技術分野で公知のように、本明細書に記載された核酸およびタンパク質またはペプチドの配列同一性パーセントを決定するために使用される。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationのウェブサイトを介して公的に利用可能である。このアルゴリズムは、まず、クエリー配列において、データベース配列中の同一の長さのワードとアラインされた場合に幾分か正の値の閾値スコアTにマッチするか、またはそれを満たす長さWの短いワードを同定することによって高スコアリング配列対（HSP）を同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる（Altschul et al., 同著）。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含有するより長いHSPを見出すための検索を開始するためのシードとして作用する。ワードヒットは、累積的アラインメントスコアが増大され得る限り、各配列に沿って両方向に伸長される。例えば、ヌクレオチド配列についての累積的スコアは、パラメータM（1対のマッチング残基についてのリワードスコア；常に>0）およびN（ミスマッチ残基についてのペナルティースコア；常に<0）を使用して算出される。アミノ酸配列については、累積的スコアを算出するためにスコアリング

10

20

30

40

50

マトリックスが使用される。各方向におけるワードヒットの伸長は、累積的アラインメントスコアがその最大達成値から分量  $X$  だけ減少する；1つもしくは複数の負のスコアを示す残基のアラインメントの蓄積のために累積的スコアが0以下になる；またはいずれかの配列の末端に到達する時点で停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列のための）は、デフォルトとして、11のワード長（W）、10の期待値（E）、M = 5、N = -4 および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列のためには、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長および10の期待値（E）および50のBLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915参照のこと）アラインメント（B）、10の期待値（E）  
10、M = 5、N = -4 および両鎖の比較を使用する。

#### 【0049】

2種のアミノ酸配列の、または2種の核酸の同一性または類似性パーセントを決定するには、最適比較目的で配列をアラインする（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適アラインメントのために、第1のアミノ酸または核酸配列の配列にギャップを導入してもよい）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同一または類似のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合には、分子は、その位置で同一または類似である。2種の配列間の同一性または類似性パーセントは、配列によって共有される同一または類似の位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一位置の数 / 位置の総数（例えば、重複位置）×100）。2種のアミノ酸の類似性は、当技術分野で公知のさまざまな方法によって評価され得る。例えば、非極性中性残基（例えば、Ala、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val）は、類似と考えることができ、同じく、酸性の電荷を有する極性（例えば、Glu、Asp）、塩基性の電荷を有する極性（例えば、Arg、His、Lys）および中性極性（例えば、Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr）残基も同様である。  
20

#### 【0050】

同一性および類似性は両方とも、容易に算出され得る。例えば、同一性パーセントの算出では、正確なマッチのみが数えられ得、ローカルアラインメントとは対照的にグローバルアラインメントが実施され得る。配列間の同一性または類似性を決定するためによく使用される方法として、例えば、Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073に開示されるものが挙げられる。同一性を決定するための例示的方法は、試験される配列間の最大マッチを与えるよう設計される。同一性および類似性を決定するための例示的方法はまた、市販のコンピュータプログラムにおいて提供される。2種の配列の比較のために利用される数学アルゴリズムの特定の例として、Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムおよび例えば、Karlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877と同様に改変されたアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。比較目的のためにギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるようにギャップ付きBLASTを利用してよい。あるいは、PSI-Blastを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施してもよい。BLAST、ギャップ付きBLASTおよびPSI-Blastプログラムを利用する場合には、当技術分野で公知のように、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用してもよい。さらに、FASTA法（Altschul et al., 1990, 同著）を使用してもよい。配列の比較にとって有用な数学アルゴリズムの別の特定の例として、Myers et al., 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージ（Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Res. 12(1):387）の一部であるALIGNプログラム（バーション2.0）に組み込まれている。同一性パーセントは、ベクターNTI（登録商標）（  
30  
40  
50  
I）

nitrogen; Carlsbad CA) 中の AlignX (登録商標) モジュールを用いる解析によって決定され得る。

【0051】

「肥満症」および「過体重」とは、普通に予測されるものよりも多い重量を有する哺乳類を指し、例えば、外見、当技術分野で公知の肥満度指数 (BMI)、ウエストとヒップ周りの比率、皮下脂肪厚、ウエスト周りなどによって決定され得る。疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention) (CDC) は、過体重を、25~29.9 の BMI を有する成人ヒトとして定義しており；肥満を、30 以上の BMI を有する成人ヒトとして定義している。肥満症の決定のためにはさらなる測定基準が存在する。例えば、CDC は、1.0 より大きいウエストとヒップの比率を有する人は過体重であると述べている。

10

【0052】

「除脂肪体重」とは、脂肪を含まない体重を指し、すなわち、総体重 - 体脂肪重量が、除脂肪体重である。除脂肪体重は、当技術分野で公知の、流体静力学的計量、コンピュータ化チャンバー、二重エネルギー X 線吸収測定法、皮膚キャリパー、磁気共鳴画像法 (MRI) および生体電気インピーダンス解析 (BIA) などの方法によって測定できる。

【0053】

「哺乳類」とは、一般に、毛皮または毛を有し、生児出生をその後代に与え、その後代に乳を与える温血動物を指す。哺乳類は、ヒト、コンパニオンアニマル (例えば、イヌ、ネコ)、家畜 (例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ)、野生動物などを含む。一実施形態では、哺乳類は、雌である。一実施形態では、哺乳類は、女性のヒトである。一実施形態では、哺乳類は、ネコまたはイヌである。一実施形態では、哺乳類は、糖尿病哺乳類、例えば、2型または1型糖尿病を有するヒトである。一実施形態では、哺乳類は、肥満糖尿病哺乳類、例えば、2型または1型糖尿病を有する肥満ヒトである。

20

【0054】

「断片」とは、ポリペプチドとの関連において、本明細書において、通例の化学的意味で、ポリペプチドの一部を指す。例えば、断片は、親ポリペプチドの 1 個または複数の残基の N 末端欠失または C 末端欠失に起因し得、および / または断片は、親ポリペプチドの 1 個または複数の残基の内部欠失に起因し得る。用語「親」とは、ポリペプチドとの関連において、通例の意味で、修飾、例えば、挿入、欠失および / または置換の前の参照構造として働くポリペプチドを指す。用語「コンジュゲート」とは、本明細書に記載されたコンジュゲートしているポリペプチドとの関連において、成分ポリペプチド、リンカーおよび水溶性ポリマースペーサー間の共有結合による連結の形成を指す。

30

【0055】

用語「長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート」、「LDDHC」などは、本明細書に記載される式 (I) の構造を有する化合物を指す。

【0056】

用語「ペプチド」および「ポリペプチド」とは、本明細書に記載された LDDHC との関連において、同義である。用語「ペプチド」とは、通例の意味で、アミド結合によって接続しているアミノ酸のポリマーを指す。用語「des - アミノ酸」、「des - AA」、「des Lys」、「des - Lys」などは、当技術分野で通例使用されるように、示されたアミノ酸の不在を指す。アミノ酸が「不在」であることは、不在のアミノ酸 (または官能基) の N 末端および C 末端側に以前に結合していた残基 (または官能基) が、一緒に結合するようになったことを意味する。用語「ペプチド成分」および「ポリペプチド成分」とは、本明細書に記載された LDDHC 内に含まれるポリペプチドを指す。

40

【0057】

本願を通じて、選択肢は、マーカッシュ群、例えば、2 種以上の可能性あるアミノ酸を含有する各アミノ酸位置で書かれているということは留意されるべきである。具体的には、マーカッシュ群の各メンバーは、別個に考えられなければならず、それによって別の実施形態を含み、マーカッシュ群は、単一の単位として読み取られてはならないということ

50

が企図される。

【0058】

本明細書において使用される場合、単数形の「不定冠詞」および「定冠詞」(「a」、「an」および「the」)は、別に示されるか、文脈から明確でない限り、複数の言及を含む。例えば、文脈から明らかであるように、「1種の」類似体は、1種または複数の類似体を含み得る。別に示されない限り、用語「約」とは、数値との関連において、数値の+/-10%を指す。

【0059】

I I . 化合物

用語「化合物」などは、本明細書に記載された化合物、組成物または方法にとって有用な化合物との関連において、長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート(「LDDHC」)を指すと理解される。出願人らは、あるペプチドは、直接的に、または適宜、短いリンカーを介して、もしくは比較的短いスペーサーを介して結合している場合に(すなわち、「短いペプチドコンジュゲート」)、例えば、適したアッセイにおける1種または複数のペプチドの効力の低減によって判断されるように、互いの生物活性に干渉し得るという問題を驚くべきことに観察した。用語「短い」とは、本明細書に記載されたリンカーおよび水溶性ポリマースペーサーの大きさとの関連において、短いペプチドコンジュゲート内に含まれるペプチドホルモン間で干渉が観察されるよう十分に小さい大きさを指す。出願人らはまた、このような短いハイブリッドペプチドコンジュゲートに、N末端もしくはC末端アミノ酸での、または内部もしくは末端アミノ酸の側鎖残基でのペグ化などの、当技術分野で公知の標準的なペグ化アプローチを適用することは、短いペプチドコンジュゲート内に含有される1種または複数のペプチドの効力を付加的に、またはさらに低減し得るという問題を驚くべきことに発見した。用語「ペグ化」とは、当技術分野で通例であるように、ポリエチレンギリコールの共有結合による付加を指す。

10

20

30

40

【0060】

用語「第1の生物活性を有する」、「第2の生物活性を有する」などは、ペプチドホルモンが、インビトロ(*in vitro*)で生化学的応答(例えば、受容体結合、cAMPシクラーゼ活性化など)および/またはインビボ(*in vivo*)で生理学的(すなわち、生物学的)応答(例えば、血糖の変化、体重の変化など)を誘発できることを意味する。したがって、用語「活性」とは、これらの関連では、特定の生化学的および/または生物学的变化を特徴とする特定の生化学的または生物学的応答を指す。用語「効力」、「完全な効力」、「低い効力」、「高い効力」などは、化合物の応答を誘発する能力を指す。例えば、高効力化合物は、化合物が等モル濃度で投与された場合に、低効力化合物よりも大きな応答を誘発する。用語「有効性」、「完全な有効性」、「低い有効性」、「高い有効性」などは、化合物の、その最大応答または比較化合物のものに対する、応答を誘発する能力を指す。

【0061】

適したアッセイにおける低減した効力によって判断されるような干渉が観察され得る例示的な短いペプチドコンジュゲートとして、ペグ化エキセンディン-4-アラニン-アラニン-アミリンの短いペプチドコンジュゲート(例えば、アミリンのN末端アミノ酸に、-アラニン-アラニンリンカーを介して連結されたエキセンディン-4のC末端アミノ酸)がある。したがって、本開示内容は、幾分かは、大きな、例えば、30~80kDaの、水溶性ポリマースペーサーの使用によってこのようなペプチドを物理的に分離することは、上記の問題の解決法を提供し、驚くべき優れた化合物(すなわち、LDDHC)をもたらすという驚くべき発見に基づいている。本明細書に記載されたLDDHCは、増大された作用の持続期間、高い効力、高い有効性、改善された安全性プロフィール(例えば、低い免疫原性、低い腎臓空胞形成)を含めた驚くべき優れた特性および/または毎週、月に2回もしくは毎月の投与および経口投与を含めたより好都合な投薬レジメンならびにその治療的使用方法を有する。

【0062】

第1の態様では、式I:

50

P<sub>1</sub> - L<sub>1</sub> - P S - L<sub>2</sub> - P<sub>2</sub> (I)

の構造を有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート (L D D H C) が提供される。

【0063】

式Iでは、P<sub>1</sub>は、第1の生物活性を有するペプチドホルモンである。P<sub>2</sub>は、第2の生物活性を有するペプチドホルモンである。L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は、独立に、結合またはリンカーホルモンである。P Sは、30～80kDaの範囲の分子量を有するペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーである。好ましい実施形態では、P Sは、非ペプチド性である。より好ましい実施形態では、P Sは、規定の大きさのポリエチレングリコールである。式Iの最も好ましい化合物は、化合物14である。

10

【0064】

一実施形態では、P Sは、ペプチドホルモンの一方または両方の生物活性が、参照コンジュゲートと比較して改善されるよう、L D D H C中に含まれるペプチドホルモンの長い作用の持続期間および物理的または機能的分離の両方を提供するのに十分な大きさのものである。用語「参照コンジュゲート」とは、スペーサーとしてのP Sを欠く、短いP Sスペーサーを含む、またはスペーサーとしてのP Sを欠くが参照コンジュゲート主鎖のペンドントアミノ酸側鎖に結合しているP Sを有する、本明細書に記載されるようなペプチドコンジュゲートを指す。

【0065】

一実施形態では、P Sは、30～80kDa、好ましくは、35～50kDaの範囲の大きさを有する。P<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>は、独立に、P<sub>1</sub>またはP<sub>2</sub>に沿ったN末端、C末端またはペンドント側鎖位置でL<sub>1</sub>またはL<sub>2</sub>と結合していてもよい。P<sub>1</sub>またはP<sub>2</sub>に沿った例示的結合部位として、それだけには限らないが、リシンアミノ酸残基のアミノ基またはシステイン残基のスルフヒドリル基が挙げられる。

20

【0066】

一実施形態では、L D D H Cは、適した生物学的アッセイにおいて、第1の生物活性も、第2の生物活性も両方示す。一実施形態では、第1および第2の生物活性は、同一である。一実施形態では、第1および第2の生物活性は異なっている。例示的生物活性として、本明細書に記載されるようなエキセンディン、アミリン、プラムリンチドまたはダバリンチドの生物活性が挙げられる。一実施形態では、L D D H Cは、適した生物学的アッセイにおいて、第1の生物活性または第2の生物活性のうちの1種を示す。

30

【0067】

一実施形態では、L D D H Cは、所望の臨床プロフィールを保持しながら、1日に1回、2日に1回、3日に1回、週に1回、月に2回、または毎月投与され得る。

【0068】

別の態様では、L D D H Cは、適したアッセイによって判断されるように、いずれかの親ペプチドと比較して、または親ペプチドの参照コンジュゲートと比較して、げっ歯類モデルにおいて有意に改善された半減期を有する。マウスまたはラットモデルでは、12時間より長い、好ましくは、少なくとも1日、2日、3日、4日または少なくとも5日またはそれより長い半減期が好ましく、ラットにおいて決定される少なくとも20時間、例えば、ラットにおける化合物14などの(例えば、図9を参照のこと)少なくとも22時間のt<sub>1/2</sub>が最も好ましい。静脈内(IV)または皮下(SC)末梢投薬を使用するブタ、サルまたはヒトでは、5時間より長い半減期が好ましく、12時間より長いことが好ましく、少なくとも1日、2日、3日、6日、7日またはさらにそれより長いことがより好ましい。

40

【0069】

当技術分野で公知であり、本明細書に記載されるように、マルチペプチド化合物を形成するためのペプチドホルモンの共有結合は、適したアッセイによって判断されるように、ペプチドホルモン単独の効力と比較して、そのペプチドホルモンのうち1種または複数の効力の低減をもたらし得る。「マルチペプチド化合物」とは、本明細書に記載されるよう

50

な、当技術分野で公知の、適宜、リンカーを介した複数のペプチドの共有結合に起因する化合物を指す。マルチペプチド化合物は、本明細書に記載されるような短い水溶性ポリマースペーサー；例えば、短いペプチドコンジュゲートをさらに含み得る。実際、このようなマルチペプチド化合物は、マルチペプチド化合物を形成する個々のペプチドの活性のうち1種または複数を欠いている（すなわち、効力を有さない）場合がある。

【0070】

対照的に、本明細書に記載されたLDDHCは、適したアッセイにおいて評価されるように、構成ペプチド（すなわち、式IのP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>）の個々の生物活性を維持し得ることを驚くべきことに見出した。水溶性ポリマースペーサー（PS）の大きさが、LDDHCを用いた場合に、特定の生物活性（すなわち、P<sub>1</sub>および/またはP<sub>2</sub>の）も観察されるかどうかを決定し得るということをさらに見出した。

10

【0071】

本明細書に記載されたLDDHCの要素として企図されるペプチドホルモンは、天然に存在するホルモンおよびその類似体および誘導体を含むと理解される。例示的ペプチドホルモンとして、以下に記載されるものが挙げられる。

【0072】

エキセンディン。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体である。一実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディンである。一実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン類似体である。一実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディンの誘導体である。本明細書に記載されたLDDHCおよび方法における使用に適したエキセンディン、エキセンディン類似体およびその誘導体として、参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる、WO 2007/022123 (PCT/US2006/031724、2006年8月11日に出願された)に記載された化合物が挙げられる。エキセンディンは、アメリカドクトカゲ(Gila monster)およびメキシコドクトカゲ(Mexican Bearded Lizard)、アリゾナ州およびメキシコ北部に内在する爬虫類の唾液分泌物中に見出されるペプチドである。エキセンディン-3は、ヘロダーマ・ホリダム(Heloderma horridum)(メキシコドクトカゲ(Mexican Bearded Lizard))の唾液分泌物中に存在し、エキセンディン-4は、ヘロダーマ・スペクタム(Heloderm suspectum)(アメリカドクトカゲ)の唾液分泌物中に存在する。Eng et al, 1990, J. Biol. Chem., 265:20259-62; Eng et al, 1992, J. Biol. Chem., 267:7402-7405を参照のこと。エキセンディン-3およびエキセンディン-4の配列は、それぞれ以下のとおりである：

20

HSDGTFTSDLQKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub> (配列番号5);

HGETFTSDLQKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub> (配列番号6)。

30

【0073】

Hargroveら(Regulatory Peptides, 2007, 141:113-119)は、天然エキセンディン-4と比較して14位に單一ヌクレオチド相違を有する全長C末端アミド化エキセンディン-4ペプチド類似体であるエキセンディン-4ペプチド類似体を報告した。[Leu<sup>1-4</sup>]エキセンディン-4の配列は、HGETFTSDLQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub> (配列番号7)である。別のエキセンディン-4ペプチド類似体は、14および28位にアミノ酸置換を有するエキセンディン-4の最初の32個のアミノ酸と、それに続く、非哺乳類(カエル)GLP1のC末端に由来する5アミノ酸配列のキメラである。この化合物は、配列: HGETFTSDLQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS (配列番号8)を有する。また、エキセンディン-4(1-28)、エキセンディン-4(1-29)およびエキセンディン-4(1-30)ならびにそれらのアミド化形態などのエキセンディン-4のC末端切断型である、生物学的に活性な形態も当技術分野で公知である。これらのエキセンディン類似体のすべてが、本明細書に記載されたLDDHCのポリペプチド成分として適している。一部の実施形態では、本明細書に記載されたポリペプチド成分中に、C末端アミドまたはその他のC末端キャップ部分が存在し得るということは理解される。

40

【0074】

50

エキセンディンは、グルカゴン様ペプチドファミリーのいくつかのメンバーに対して幾分かの配列類似性を有し、最高相同性、53%は、配列 H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R G (配列番号9)を有し、「GLP-1」と呼ばれるこもあり、膵臓細胞からのインスリン分泌を刺激するインスリン分泌性効果を有するGLP-1 [7-36]NH<sub>2</sub>に対してである (Goke et al, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 19650-55)。GLP-1はまた、膵臓細胞からのグルカゴン分泌を阻害するとも報告されている。例えば、Orskov et al, 1993, *Diabetes*, 42:658-61; D'Alessio et al, 1996, *J. Clin. Invest.*, 97:133-38を参照のこと。GLP-1は、胃内容排出 (Willms B, et al., 1996, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81:327-32; Wettergren A, et al., 1993, *Dig. Dis. Sci.*, 38:665-73) および胃酸分泌 (Schjoldager B T, et al, 1989, *Dig. Dis. Sci.*, 34:703-8; O'Halloran D J, et al., 1990, *J. Endocrinol.*, 126:169-73; Wettergren A, et al., 1993, *Dig. Dis. Sci.*, 38:665-73) を阻害すると報告されている。<sup>10</sup> そのカルボキシ末端にさらなるグリシン残基を有するペプチドGLP-1 [7-37]は、ヒトにおいてインスリン分泌を刺激すると報告されている。Orskov, et al., 1993, *Diabetes*, 42:658-61を参照のこと。その他の報告は、グルカゴン分泌の阻害 (Creutzfeldt W O C, et al., 1996, *Diabetes Care*, 19:580-6) および食欲制御において主張される役割 [Turton M D, et al., 1996, *Nature*, 379(6560):69-72] に関する。少なくとも幾分かGLP-1のインスリン分泌効果の原因であるといわれる膜貫通G-タンパク質アデニル酸シクラーゼ共役受容体は、細胞株からクローニングされたと報告されている (Thorens, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8641-45)。GLP-1は、刺激されたインスリン産生の増幅に対するその報告された作用のために、近年、重要な調査の焦点であった (Byrne, M. M., Goke, B., "Lessons from human studies with glucagon-like peptide-1: Potential of the gut hormone for clinical use". In: Fehmann, H. C., Goke, B., 1997, *Insulinotropic Gut Hormone Glucagon-Like Peptide 1*. Basel, Switzerland: Karger, 1997:219-33)。<sup>20</sup>

#### 【0075】

薬理学的研究は、エキセンディン-4は、あるインスリン分泌細胞に対して、インビトロでGLP-1受容体で、モルモット膵臓由来の分散した腺房細胞で、胃由来の壁細胞で作用し得るという報告につながり、ペプチドはまた、単離された胃において、ソマトスタチン放出を刺激し、ガストリン放出を阻害すると報告されている。例えば、Goke, et al., 1993, *J. Biol. Chem.* 268:19650-55; Schepp, et al., 1994, *Eur. J. Pharmacol.* 69:183-91; Eissele, et al., 1994, *Life Sci.* 55:629-34を参照のこと。エキセンディン-3およびエキセンディン-4は、膵臓腺房細胞におけるcAMP産生およびそれからのアミラーゼ放出を刺激すると見出されたと報告された (Malhotra, R. et al., 1993, *Regulatory Peptides* 41:149-56; Raufman, et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:21432-37; Singh, et al., 1994, *Regul. Pept.* 53:47-59)。<sup>30</sup> エキセンディン-4は、GLP-1よりも有意に長い作用の持続期間を有する。例えば、1つの実験では、糖尿病マウスにおけるエキセンディン-4によるグルコース低下は、数時間、用量に応じて、最大24時間持続すると報告された [Eng, J. 1996 *Diabetes* 45 (Suppl 2):152A (abstract 554)]。これらの分子のインスリン分泌活性に基づいて、真性糖尿病の治療および高血糖症の予防のためのエキセンディン-3およびエキセンディン-4の使用が提案されている (その全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Eng、米国特許第5,424,286号)。<sup>40</sup>

#### 【0076】

エキセンディンは、哺乳類GLP-1の種相同体ではないということを示した調査の結果は、アメリカドクトカゲ(*Gila monster*)からエキセンディン遺伝子をクローニングしたChen & Druckerによって報告された [*J. Biol. Chem.* 272:4108-15 (1997)]。アメリカドクトカゲ(*Gila monster*)はまた、哺乳類プログルカゴンに対して、エキセンディンよりも類似しているプログルカゴンの別個の遺伝子 (それからGLP-1がプロセシングされる)を有するという観察は、エキセンディンは、単にGLP-1の種相同<sup>50</sup>

体ではないということを示した。

【0077】

エキセンディンアゴニストを使用して胃腸運動を調節する方法が、米国特許第6,858,576号（すなわち、1996年8月8日に出願された米国出願番号第08/694,954号の一部継続である、1997年8月8日に出願された米国出願番号第08/908,867号に基づく）に記載されている。エキセンディンアゴニストを使用して食物摂取を低減する方法が、米国特許第6,956,026号（すなわち、1997年1月7日に出願された米国出願第60/034,905号、1997年8月7日に出願された同60/055,404号、1997年11月14日に出願された同60/065,442号および1997年11月14日に出願された同60/066,029号の利益を主張する、1998年1月7日に出願された米国出願番号第09/003,869号に基づく）に記載されている。10

【0078】

新規エキセンディンアゴニスト化合物は、WO99/07404（すなわち、1997年8月8日に出願された米国特許出願番号第60/055,404号の利益を主張する、1998年8月6日に出願されたPCT/US98/16387）に記載されている。その他の新規エキセンディンアゴニストは、WO99/25727（すなわち、1997年11月14日に出願された米国仮出願第60/065,442号の利益を主張する、1998年11月13日に出願されたPCT/US98/24210）に記載されている。さらにその他の新規エキセンディンアゴニストは、WO99/25728（すなわち、1997年11月14日に出願された米国仮出願第60/066,029号の利益を主張する、1998年11月13日に出願されたPCT/US98/24273）に記載されている。エキセンディンに関連した技術におけるその他の最近の進歩は、WO99/40788（すなわち、1998年2月13日に出願された米国出願第60/075,122号の優先権を主張する）に、また、WO00/41546およびWO00/41548（すなわち、1998年1月14日に出願された米国出願第60/116,380号の優先権を主張する）に記載されている。不安定性、毒性および反応性。同著。20

【0079】

ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、1～39個の残基を含む。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、1～28個の残基を含む。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン-4である。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン-4（1-28）である。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン-4（1-29）である。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン-4（1-30）である。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン-4（1-31）である。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン-4（1-32）である。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン-4類似体である。ある実施形態では、P<sub>1</sub>は、エキセンディン-4の誘導体またはエキセンディン-4類似体である。30

【0080】

本明細書に記載されたLDLH Cにとって有用なエキセンディンおよびエキセンディン類似体として、米国特許第7,223,725号（参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる）に記載された化合物、および以下の式（IV）の化合物：40

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Gly-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub>-Xaa<sub>13</sub>-Xaa<sub>14</sub>-Xaa<sub>15</sub>-Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Ala-Xaa<sub>19</sub>-Xaa<sub>20</sub>-Xaa<sub>21</sub>-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Xaa<sub>24</sub>-Xaa<sub>25</sub>-Xaa<sub>26</sub>-Xaa<sub>27</sub>-Xaa<sub>28</sub>

(IV)

（式中、Xaa<sub>1</sub>は不在、His、ArgまたはTyrであり、Xaa<sub>2</sub>は、不在、Ser、Gly、Ala、Thr、Val、Leu、LysまたはAspであり、Xaa<sub>3</sub>は、Ala、AspまたはGluであり、Xaa<sub>5</sub>は、AlaまたはThrであり、Xaa<sub>6</sub>は、Ala、Phe、Tyrであり、Xaa<sub>7</sub>は、ThrまたはSerであり、Xaa<sub>8</sub>は、Ala、SerまたはThrであり、Xaa<sub>9</sub>は、AspまたはGluであり、Xaa<sub>10</sub>は、Ala、Leu、Ile、ValまたはMetであり、Xaa<sub>11</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>12</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>13</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>14</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>15</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>16</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>17</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>18</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>19</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>20</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>21</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>22</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>23</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>24</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>25</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>26</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>27</sub>は、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>28</sub>は、AlaまたはLysであり）50

aまたはGlnであり、Xaa<sub>1-4</sub>は、Ala、Leu、Ile、ValまたはMetであり、Xaa<sub>1-5</sub>は、AlaまたはGluであり、Xaa<sub>1-6</sub>は、AlaまたはGluであり、Xaa<sub>1-7</sub>は、AlaまたはGluであり、Xaa<sub>1-9</sub>は、AlaまたはValであり、Xaa<sub>1-10</sub>は、AlaまたはArgであり、Xaa<sub>1-11</sub>は、AlaまたはLeuであり、Xaa<sub>1-12</sub>は、Ala、Phe、Tyrであり、Xaa<sub>1-13</sub>は、Ile、Val、LeuまたはMetであり、Xaa<sub>1-14</sub>は、Ala、GluまたはAspであり、Xaa<sub>1-15</sub>は、Ala、Trp、Phe、Tyrであり、Xaa<sub>1-16</sub>は、AlaまたはLeuであり、Xaa<sub>1-17</sub>は、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>1-18</sub>は、AlaまたはAsnである)が挙げられる。一実施形態では、式(IV)のペプチド成分は、C末端に結合している部分Z<sub>1</sub>をさらに含み、ここでZ<sub>1</sub>は、Gly、Gly-Gly(配列番号10)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>(配列番号11)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser(配列番号12)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser(配列番号13)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly(配列番号14)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala(配列番号15)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>(配列番号16)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>-Xaa<sub>37</sub>(配列番号17)、またはGly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>-Xaa<sub>37</sub>-Xaa<sub>38</sub>(配列番号18)であり、Xaa<sub>1-1</sub>、Xaa<sub>1-6</sub>、Xaa<sub>1-7</sub>およびXaa<sub>1-8</sub>は、独立に、Proであるか、または不在である。各エキセンディン類似体アゴニストが、C末端酸またはC末端アミンであり得ることは明確に企図される。本明細書に記載されたエキセンディン類似体のいずれか、およびその各々において、Xaa<sub>1</sub>に対応するヒスチジンの置換が、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N-アセチル-ヒスチジン、-フルオロメチル-ヒスチジン、-メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、des-アミノ-ヒスチジル(イミダゾプロピオニル)、-ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたは-カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかで行われているものも具体的に企図される。Xaa<sub>2</sub>のグリシンの置換が、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、1-アミノシクロペンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸または(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸のいずれかで行われている本明細書に記載されたエキセンディン類似体が、本明細書においてさらに具体的に企図される。

## 【0081】

一実施形態では、例示的化合物として、Xaa<sub>1</sub>が、HisまたはArgであり、Xaa<sub>2</sub>が、GlyまたはAlaであり、Xaa<sub>3</sub>が、AspまたはGluであり、Xaa<sub>5</sub>が、AlaまたはThrであり、Xaa<sub>6</sub>が、AlaまたはPheであり、Xaa<sub>7</sub>が、ThrまたはSerであり、Xaa<sub>8</sub>が、Ala、SerまたはThrであり、Xaa<sub>9</sub>が、AspまたはGluであり、Xaa<sub>10</sub>が、AlaまたはLeuであり、Xaa<sub>11</sub>が、AlaまたはSerであり、Xaa<sub>12</sub>が、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>13</sub>が、AlaまたはGlnであり、Xaa<sub>14</sub>が、AlaまたはLeuであり、Xaa<sub>15</sub>が、AlaまたはGluであり、Xaa<sub>16</sub>が、AlaまたはGluであり、Xaa<sub>17</sub>が、AlaまたはGluであり、Xaa<sub>19</sub>が、AlaまたはValであり、Xaa<sub>20</sub>が、AlaまたはArgであり、Xaa<sub>21</sub>が、AlaまたはLeuであり、Xaa<sub>22</sub>が、Pheであり、Xaa<sub>23</sub>が、Ile、Valであり、Xaa<sub>24</sub>が、Ala、GluまたはAspであり、Xaa<sub>25</sub>が、Ala、TrpまたはPheであり、Xaa<sub>26</sub>が、AlaまたはLeuであり、Xaa<sub>27</sub>が、AlaまたはLysであり、Xaa<sub>28</sub>が、AlaまたはAsnであり、Z<sub>1</sub>が、不在、Gly、Gly-Gly、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>-Xaa<sub>37</sub>、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>-Xaa<sub>37</sub>-Xaa<sub>38</sub>である)が挙げられる。一実施形態では、式(IV)のペプチド成分は、C末端に結合している部分Z<sub>1</sub>をさらに含み、ここでZ<sub>1</sub>は、Gly、Gly-Gly(配列番号10)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>(配列番号11)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser(配列番号12)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser(配列番号13)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly(配列番号14)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala(配列番号15)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>(配列番号16)、Gly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>-Xaa<sub>37</sub>(配列番号17)、またはGly-Gly-Xaa<sub>31</sub>-Ser-Ser-Gly-Ala-Xaa<sub>36</sub>-Xaa<sub>37</sub>-Xaa<sub>38</sub>(配列番号18)であり、Xaa<sub>1-1</sub>、Xaa<sub>1-6</sub>、Xaa<sub>1-7</sub>およびXaa<sub>1-8</sub>は、独立に、Proであるか、または不在である。各エキセンディン類似体アゴニストが、C末端酸またはC末端アミンであり得ることは明確に企図される。本明細書に記載されたエキセンディン類似体のいずれか、およびその各々において、Xaa<sub>1</sub>に対応するヒスチジンの置換が、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N-アセチル-ヒスチジン、-フルオロメチル-ヒスチジン、-メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、des-アミノ-ヒスチジル(イミダゾプロピオニル)、-ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたは-カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかで行われているものも具体的に企図される。Xaa<sub>2</sub>のグリシンの置換が、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、1-アミノシクロペンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸または(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸のいずれかで行われている本明細書に記載されたエキセンディン類似体が、本明細書においてさらに具体的に企図される。

10

20

30

40

50

Ser - Gly - Ala - Xaa<sub>3</sub> - Xaa<sub>3</sub> - Xaa<sub>3</sub> であり、 Xaa<sub>3</sub>、 Xaa<sub>3</sub>、 Xaa<sub>3</sub> および Xaa<sub>3</sub> が、独立に、 Pro であるか、または不在であるが、ただし、 Xaa<sub>3</sub>、 Xaa<sub>5</sub>、 Xaa<sub>6</sub>、 Xaa<sub>8</sub>、 Xaa<sub>10</sub>、 Xaa<sub>11</sub>、 Xaa<sub>12</sub>、 Xaa<sub>13</sub>、 Xaa<sub>14</sub>、 Xaa<sub>15</sub>、 Xaa<sub>16</sub>、 Xaa<sub>17</sub>、 Xaa<sub>19</sub>、 Xaa<sub>20</sub>、 Xaa<sub>21</sub>、 Xaa<sub>24</sub>、 Xaa<sub>25</sub>、 Xaa<sub>26</sub>、 Xaa<sub>27</sub> および Xaa<sub>28</sub> のうち 3 以下が Ala である、上記の式のものが挙げられる。各エキセンディン類似体アゴニストが、 C 末端酸または C 末端アミンであり得ることは明確に企図される。上記のエキセンディン類似体のいずれか、およびその各々において、位置 Xaa<sub>1</sub> に対応するヒスチジンの置換が、 D - ヒスチジン、デスマミノ - ヒスチジン、 2 - アミノ - ヒスチジン、 - - ヒドロキシ - ヒスチジン、ホモヒスチジン、 N - - アセチル - ヒスチジン、 - フルオロメチル - ヒスチジン、 - メチル - ヒスチジン、 3 - ピリジルアラニン、 2 - ピリジルアラニン、 4 - ピリジルアラニン、 4 - イミダゾアセチル、 des - アミノ - ヒスチジル (イミダゾプロピオニル) 、 - ヒドロキシ - イミダゾプロピオニル、 N - ジメチル - ヒスチジルまたは - カルボキシ - イミダゾプロピオニルのいずれかで行われているものも具体的に企図される。 Xaa<sub>2</sub> のグリシンの置換が、 D - Ala、 Val、 Leu、 Lys、 Aib、 (1 - アミノシクロプロピル) カルボン酸、 (1 - アミノシクロブチル) カルボン酸、 1 - アミノシクロペンチル) カルボン酸、 (1 - アミノシクロヘキシル) カルボン酸、 (1 - アミノシクロヘプチル) カルボン酸または (1 - アミノシクロオクチル) カルボン酸のいずれかで行われている本明細書に記載されたエキセンディン類似体が、本明細書においてさらに具体的に企図される。

10

20

20

30

40

50

#### 【0082】

その他の例示的エキセンディン類似体として、化合物 2 - 23 としてその中で同定される WO 99 / 25727 に示されるものが挙げられる。別の実施形態によれば、 Xaa<sub>1</sub> が、 Leu、 Ile または Val、より好ましくは、 Leu であり、および / または Xaa<sub>2</sub> が、 Trp、 Phe または Tyr、より好ましくは、 Trp または Phe である化合物が提供される。これらの化合物は、インビトロおよびインビボの両方で、ならびに化合物の合成の際に酸化分解をあまり受けないと考えられている。

#### 【0083】

本明細書に記載された LDHC にとって適したエキセンディン類似体のさらなる例として、2003年3月4日に公開された米国特許第 6528486 号 (参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる) に記載されるものが挙げられる。具体的には、エキセンディン類似体として、適宜、 34 ~ 39 位に 1 ~ 5 の間の欠失、および前記エキセンディンと共有結合によって結合している 4 ~ 20 個のアミノ酸単位のペプチド配列の C 末端伸長を有し、前記ペプチド伸長配列中の各アミノ酸単位が、 Ala、 Leu、 Ser、 Thr、 Tyr、 Asn、 Gln、 Asp、 Glu、 Lys、 Arg、 His および Met からなる群から選択される、エキセンディン - 4 に対して少なくとも 90 % の相同意を有するエキセンディンまたはエキセンディン類似体からなるものが挙げられる。より好ましくは、伸長は、 4 ~ 20 個のアミノ酸残基の、例えば、 4 ~ 15 個の範囲の、より好ましくは、 4 ~ 10 個の範囲の、特に、 4 ~ 7 個の範囲のアミノ酸残基、例えば、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 または 10 個のアミノ酸残基のペプチド配列であり、 6 個のアミノ酸残基が好ましい。最も好ましくは、米国特許第 6528486 号によれば、伸長ペプチドは、少なくとも 1 個の Lys 残基を含有し、 3 ~ 7 個のリシンがさらにより好ましく、 6 個のリシンがさらに最も好ましい。

#### 【0084】

本明細書に記載された LDHC にとって有用なさらなる例示的エキセンディン類似体として : HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK [des-<sup>36</sup>Pro] エキセンディン - 4 (1-39)-Lys<sub>6</sub> (配列番号 19) ; KKKKKKHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK (H-Lys<sub>6</sub>-[des-<sup>36</sup>Pro] エキセンディン - 4 (1-39)-Lys<sub>6</sub>) (配列番号 20) ; HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLWLKNGGPSSGAS (H-[des-<sup>36</sup>Pro, <sup>37, 38</sup>Pro] エキセンディン - 4 (1-39)-NH<sub>2</sub>) (配列番号 21) ; KKKKKKHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAS (H-(Lys)<sub>6</sub>-[des-<sup>36</sup>Pro, <sup>37, 38</sup>Pro] エキセ

ンディン-4(1-39)(配列番号22)；NEEEEEEHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAS(H-Asn-(Glu)<sub>5</sub>-[des<sup>36</sup>Pro, <sup>37,38</sup>Pro]エキセンディン-4(1-39)(配列番号23)；HGE GTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGASKKKKK([des<sup>36</sup>Pro, <sup>37,38</sup>Pro]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)<sub>6</sub>)(配列番号24)；KKKKKKHGE GTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGASKKKKK(H-(Lys)<sub>6</sub>-[des<sup>36</sup>Pro, <sup>37,38</sup>Pro]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)<sub>6</sub>)(配列番号25)；およびDEEEEEEHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGASKKKKK(Asn-(Glu)<sub>5</sub>-[des<sup>36</sup>Pro, <sup>37,38</sup>Pro]エキセンディン-4(1-39)-(Lys)<sub>6</sub>)(配列番号26)が挙げられる。

## 【0085】

当技術分野で通例であるように、アミノ酸の反復は、反復数を示す下付き数字によって示され得る；すなわち、Lys<sub>6</sub>、(Lys)<sub>6</sub>などは、ヘキサリシリ(配列番号27)を指す。当業者には明らかであるように、一部の文脈では、下付き数字はまた、配列内の残基の位置を示す場合もある；例えば、「A A<sub>1</sub> A A<sub>2</sub> A A<sub>3</sub>」とは、ポリペプチド配列のアミノ酸1～3を指す。上記のエキセンディン類似体のいずれかおよびその各々において、1位に対応するヒスチジンの置換が、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N-アセチル-ヒスチジン、-フルオロメチル-ヒスチジン、-メチル-ヒスチジン、3-ピリジルアラニン、2-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、4-イミダゾアセチル、des-アミノ-ヒスチジル(またはイミダゾプロピオニル)、-ヒドロキシ-イミダゾプロピオニル、N-ジメチル-ヒスチジルまたは-カルボキシ-イミダゾプロピオニルのいずれかで行われているものが、具体的に企図される。2位のグリシンの置換が、D-Ala、Val、Leu、Lys、Aib、(1-アミノシクロプロピル)カルボン酸、(1-アミノシクロブチル)カルボン酸、1-アミノシクロベンチル)カルボン酸、(1-アミノシクロヘキシリ)カルボン酸、(1-アミノシクロヘプチル)カルボン酸または(1-アミノシクロオクチル)カルボン酸のいずれかで行われている本明細書に記載されたエキセンディン類似体が、本明細書においてさらに具体的に企図される。

## 【0086】

本明細書に記載されたLD DHCにとって有用なエキセンディン類似体のさらなる例として、公開PCT出願WO2004035623(参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる)に記載されたもの、特に、天然に存在するアミノ酸を含んでなり、エキセンディン-4(1-39)の対応する位置を参照して、特に、位置<sup>1-3</sup>G1n、<sup>1-4</sup>Met、<sup>2-5</sup>Trpまたは<sup>2-8</sup>Asnに、少なくとも1つの修飾されたアミノ酸残基を有するエキセンディン類似体を記載するものがある。さらなるこのような類似体は、少なくとも1個のLysアミノ酸、より好ましくは、6個または7個のLysアミノ酸単位などの少なくとも5個のLysアミノ酸単位を含む1～7個のアミノ酸C末端伸長をさらに含む。

## 【0087】

本明細書に記載されたLD DHCにとって有用なエキセンディン類似体のなおさらなる例として、エキセンディンまたはエキセンディン類似体のN末端部分に、その領域中に高い-ターン特徴を生じるよう修飾されたアミノ酸残基を有するエキセンディン類似体を記載する、公開PCT出願WO/2010/120476(参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる)に記載されたものがある。例えば、類似体は、立体構造的に拘束された領域を作製することによって、アミノ酸残基His<sub>1</sub>Gly<sub>2</sub>Gl<sub>3</sub>を模倣するよう設計され、エキセンディン-4または本明細書に記載されたその他の類似体において修飾として使用され得る、His<sub>1</sub>Gly<sub>2</sub>Gl<sub>3</sub>に、チアゾリジン-プロリンペプチドミメティックを含有するエキセンディン類似体が挙げられる。

## 【0088】

エキセンディンのいずれかまたはその各々において、具体的に企図される本明細書に記載されたエキセンディン類似体および式として、1位に対応するヒスチジンの置換が、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、N-アセチル-ヒスチジン、-フルオロメチル-ヒス

10

20

30

40

50

チジン、 - - メチル - ヒスチジン、 3 - ピリジルアラニン、 2 - ピリジルアラニン、 4 - ピリジルアラニン、 4 - イミダゾアセチル、 d e s - アミノ - ヒスチジル (イミダゾプロピオニル) 、 - - ヒドロキシ - イミダゾプロピオニル、 N - ジメチル - ヒスチジルまたは - カルボキシ - イミダゾプロピオニルのいずれかで行われているものがある。例えば、企図されるエキセンディン類似体として、 H i s <sup>1</sup> 位置が修飾されている化合物が挙げられ、 ( 4 - イミダゾアセチル ) エキセンディン - 4 、 ( d e s - アミノ - ヒスチジル ) エキセンディン - 4 ( または ( イミダゾプロピオニル ) エキセンディン - 4 ) 、 ( - - ヒドロキシ - イミダゾプロピオニル ) エキセンディン - 4 、 ( N - ジメチル - ヒスチジル ) エキセンディン - 4 および ( - カルボキシ - イミダゾプロピオニル ) エキセンディン - 4 がある。 2 位のグリシンの置換が、 D - A l a 、 V a l 、 L e u 、 L y s 、 A i b 、 ( 1 - アミノシクロプロピル ) カルボン酸、 ( 1 - アミノシクロブチル ) カルボン酸、 1 - アミノシクロペンチル ) カルボン酸、 ( 1 - アミノシクロヘキシル ) カルボン酸、 ( 1 - アミノシクロヘプチル ) カルボン酸または ( 1 - アミノシクロオクチル ) カルボン酸のいずれかで行われている本明細書に記載されたエキセンディンまたはエキセンディン類似体が、本明細書においてさらに具体的に企図される。

## 【 0 0 8 9 】

アミリンアゴニスト化合物。「アミリンアゴニスト化合物」として、天然アミリンペプチド、アミリン類似体ペプチドおよびアミリンアゴニスト活性を有するその他の化合物( 例えは、小分子 ) が挙げられる。「アミリンアゴニスト化合物」は、天然供給源に由来するものであっても、合成であっても、組換え D N A 技術に由来するものであってもよい。アミリンアゴニスト化合物は、アミリンアゴニスト受容体結合活性を有し、アミノ酸( 例えは、天然、非天然またはそれらの組合せ ) 、ペプチドミメティック、化学部分などを含み得る。用語「ミメティック」、「ペプチドミメティック(peptidomimetic)」、「ペプチドミメティック(peptide mimetic)」などは、通例の意味で、天然親ペプチドの生物学的作用( 単数または複数 ) をアゴナイズまたはアンタゴナイズできる非ペプチド性構造要素を含有する化合物を指す。当業者ならば、アミリン受容体結合アッセイを使用してか、またはヒラメ筋アッセイにおいてアミリンアゴニスト活性を測定することによってアミリンアゴニスト化合物を認識するであろう。アミリンアゴニスト化合物は、その開示内容全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 5,686,411 号および米国公開第 2008/0176804 号において記載されるものなどのアミリン受容体結合アッセイにおいて、約 200 n M 以下、約 100 n M 以下または約 50 n M 以下の I C <sub>50</sub> を有し得る。用語「 I C <sub>50</sub> 」とは、通例の意味で、生物学的または生化学的機能を阻害する化合物の半数阻害濃度を指す。したがって、受容体結合研究との関連において、 I C <sub>50</sub> とは、特定された受容体から既知リガンドの半量と競合する試験化合物の濃度を指す。アミリンアゴニスト化合物は、本明細書に、また米国特許第 5,686,411 号に記載されるものなどのヒラメ筋アッセイにおいて、約 20 n M 以下、約 15 n M 以下、約 10 n M 以下または約 5 n M 以下の E C <sub>50</sub> を有し得る。用語「 E C <sub>50</sub> 」とは、通例の意味で、当技術分野で公知の、ベースライン応答と最大応答の間の中間の応答を誘導する化合物の有効濃度を指す。アミリンアゴニスト化合物は、 [ 25, 28, 29 P r o ] ヒト - アミリン( プラムリンチド ) に対して少なくとも 90 % または 100 % の配列同一性を有し得る。アミリンアゴニスト化合物は、ダバリンチドなどの、アミリン( 例えは、ヒトアミリン、ラットアミリンなど ) およびカルシトニン( 例えは、ヒトカルシトニン、サケカルシトニンなど ) のペプチドキメラであり得る。さらなる適した、例示的アミリンアゴニスト化合物はまた、その開示内容全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国公開第 2008/0274952 号に記載されている。

## 【 0 0 9 0 】

アミリン。ある実施形態では、 P <sub>2</sub> は、アミリン、アミリン類似体またはその誘導体である。一実施形態では、 P <sub>2</sub> は、アミリンである。一実施形態では、 P <sub>2</sub> は、アミリン類似体である。一実施形態では、 P <sub>2</sub> は、アミリンの誘導体である。本明細書に記載された

10

20

30

40

50

化合物および方法において使用するのに適した、アミリン、アミリン類似体およびその誘導体として、参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる、WO 2007/022123 (2006年8月11日に出願されたPCT/US2006/031724) に記載された化合物が挙げられる。アミリンは、栄養素の摂取に応じてインスリンと同時に分泌される、膵臓細胞によって合成されるペプチドホルモンである。アミリンの配列は、哺乳類種中で高度に保存されており、当技術分野で公知の、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、カルシトニン、インターメジンおよびアドレノメデュリンに対して構造的類似性を有する。アミリンの血糖調節作用は、栄養素によって刺激されるグルカゴン分泌の抑制によって循環におけるグルコース出現速度を調節することおよび胃内容排出を減速することによって、インスリンのそれを補完する。インスリンによって治療されている糖尿病の患者では、プラムリンチド、ヒトアミリンの合成等効力類似体が、不適当に上昇される食後グルカゴン分泌を抑制することおよび胃内容排出を減速することによって食後グルコース変動幅を低減する。ラットアミリン、ヒトアミリンおよびプラムリンチドの配列は以下のとおりである：

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY(配列番号28);  
 KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGA1SSTNVGSNTY(配列番号29);  
 KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGP1LPPTNVGSNTY(配列番号30)。

【0091】

一実施形態では、P<sub>2</sub>ポリペプチド成分は、以下の式(II)の残基1～37のアミノ酸配列(配列番号31)を含み、ここで、式(II)に示されるアミノ酸の最大55%が欠失し、または異なるアミノ酸で置換されていてもよい：

X'-Xaa<sup>1</sup>-Cys<sup>2</sup>-Asn<sup>3</sup>-Thr<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Thr<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>-Ala<sup>8</sup>-Thr<sup>9</sup>-Gln<sup>10</sup>-Arg<sup>11</sup>-Leu<sup>12</sup>-Ala<sup>13</sup>-Asn<sup>14</sup>-Ph e<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup>-Val<sup>17</sup>-His<sup>18</sup>-Ser<sup>19</sup>-Ser<sup>20</sup>-Xaa<sup>21</sup>-Asn<sup>22</sup>-Phe<sup>23</sup>-Xaa<sup>24</sup>-Xaa<sup>25</sup>-Xaa<sup>26</sup>-Xaa<sup>27</sup>-Xaa<sup>28</sup>-Xaa<sup>29</sup>-Thr<sup>30</sup>-Xaa<sup>31</sup>-Val<sup>32</sup>-Gly<sup>33</sup>-Ser<sup>34</sup>-Asn<sup>35</sup>-Thr<sup>36</sup>-Tyr<sup>37</sup>-X (II)。

【0092】

式(II)では、X'は、水素、N末端キャップ基、ペプチド性もしくは非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーとの結合またはペプチド性もしくは非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーとのリンカーである。Xaa<sup>1</sup>は、Lysまたは結合であり、Xaa<sup>2</sup>は、Lys、CysまたはAsnであり、Xaa<sup>2</sup>は、Lys、CysまたはGlyであり、Xaa<sup>2</sup>は、Lys、CysまたはProであり、Xaa<sup>2</sup>は、Lys、CysまたはIleであり、Xaa<sup>2</sup>は、Lys、CysまたはLeuであり、Xaa<sup>2</sup>は、Lys、CysまたはProであり、Xaa<sup>2</sup>は、Lys、CysまたはAsnである。

【0093】

さらに、式(II)に関して、変数Xは、C末端官能基(例えば、C末端キャップ)を表す。したがって、Xは、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、ヒドロキシル、ペプチド性もしくは非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーとの結合またはペプチド性もしくは非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーとのリンカーである。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、適宜、リンカーを介して、共有結合によって、連結アミノ酸残基、X'またはXの側鎖と連結している。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、適宜、リンカーを介して、共有結合によって、ポリペプチド成分の主鎖原子と連結している。式(II)の残基1～37の配列を有するポリペプチド成分のC末端が、官能基Xでキャップされている場合には、Xは、それによってC末端アミドを形成するアミンであることが好ましい。式(II)によるポリペプチド成分を含めた本明細書に記載されたポリペプチド成分のN末端は、共有結合によって、それだけには限らないが、アセチル基を含めたさまざまな官能基と連結してもよい。用語「N末端キャップ基」とは、通例

の意味で、当技術分野で公知のように、ポリペプチド、例えば、置換もしくは非置換アシリ、置換もしくは非置換アシリオキシ、シップ塩基などのN末端窒素と共有結合によって結合している部分を指す。一実施形態では、N末端官能基X'は、当技術分野で公知のアミン保護基、好ましくは、Fmocである。

【0094】

一実施形態では、式(I1)の残基1~37のアミノ酸の最大5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%またはさらに55%が、式(I1)によるポリペプチド成分において欠失または置換されている。一実施形態では、ポリペプチド成分は、式(I1)に示されるアミノ酸配列に対して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19またはさらに20のアミノ酸置換を有する。一実施形態では、ポリペプチド成分は、式(I1)に示されるアミノ酸配列に対して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18またはさらに19の欠失を有する。

【0095】

一実施形態では、ポリペプチドコンジュゲートのポリペプチド成分は、式(I1)によるアミノ酸配列の残基1~37に関して定義された配列同一性を有する配列を有する。

【0096】

一実施形態では、本明細書に記載されたポリペプチド成分と式(I1)の残基1~37の間の配列同一性は、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらに高い。一実施形態では、本明細書に記載されたポリペプチド成分と、式(I1)の残基1~37の間の配列同一性は、45%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%または90%~100%の範囲にある。一実施形態では、式(I1)の残基1~37に示されるアミノ酸の最大55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%またはさらにそれ未満が、欠失していてもよく、または異なるアミノ酸で置換していてもよい。一実施形態では、配列同一性は、範囲75%~100%内である。一実施形態では、配列同一性は、範囲75%~90%内である。一実施形態では、配列同一性は、少なくとも75%である。一実施形態では、配列同一性は、少なくとも90%である。一実施形態では、コンジュゲートのポリペプチド成分は、式(I1)の残基1~37の配列を有する。

【0097】

一実施形態では、ポリペプチド成分は、化合物12の配列を有する。一実施形態では、ポリペプチド成分は、化合物6の配列を有する。一実施形態では、ポリペプチド成分は、式(I1)の配列に関して、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を有する。「保存的アミノ酸置換」とは、通例の意味で、側鎖で類似の生化学的特性(例えば、親水性、疎水性(hydrophobicity)、電荷の種類、ファン-デル-ワールス半径など)を有するアミノ酸の置換を指す。「非保存的アミノ酸置換」とは、通例の意味で、側鎖で非類似の生化学的特性を有するアミノ酸の置換を指す。

【0098】

本明細書に示されたポリペプチド成分のいずれかに関する配列同一性の算出(例えば、式(I1)の残基1~37に見出される)では、比較されるべき配列は、いずれのN末端(すなわち、X')またはC末端(すなわち、X)官能基が存在しそうが、本明細書に開示されたアミノ酸にわたってとられるということは理解される。アミノ酸の側鎖と共有結合によって連結しているペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーの存在は、配列同一性の算出には重要ではないということはさらに理解される。例えば、式(I)の任意の位置で置換され、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーとさらに結合しているリシンは、配列同一性算出の目的のためのリシンである。

【0099】

式(I1)の残基1~37の配列を含めたポリペプチドは、アミリンおよびカルシトニ

10

20

30

40

50

ンまたはその類似体のキメラ組合せであると考えられ得る。

【0100】

一実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、2～37位のアミノ酸残基が、リシン残基またはシスティン残基で置換されており、リシン残基またはシスティン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結しており、アミノ酸番号付けがラムリンチドのアミノ酸番号付けと一致する、配列番号3を有するラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

10

【0101】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、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、31、32、33、34、35、36または37位のうちいずれか1つのアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

20

【0102】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、18、21、24～29、31、34または35位のうちいずれか1つのアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

20

【0103】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、21位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

30

【0104】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、24位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

40

【0105】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、25位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプ

50

チド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

【0106】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、26位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

10

【0107】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、27位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

【0108】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、28位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

20

【0109】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、29位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

30

【0110】

別の実施形態では、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、31位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサー、例えばポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。一実施形態では、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーは、ポリエチレングリコールポリマーである。

40

【0111】

別の態様では、式I



の構造を有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート（L D D H C）化合物であって、

式中、P<sub>1</sub>は、第1の生物活性を有し、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体であり、P<sub>2</sub>は、第2の生物活性を有し、アミリン、アミリン類似体またはその誘導体であり、L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は、独立に、結合またはリンカーであり、PSは、30~

50

80 kDa の範囲の分子量を有する水溶性ポリマースペーサーであり、ここで、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第1の生物活性を示し、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第2の生物活性を示す、化合物が提供される。

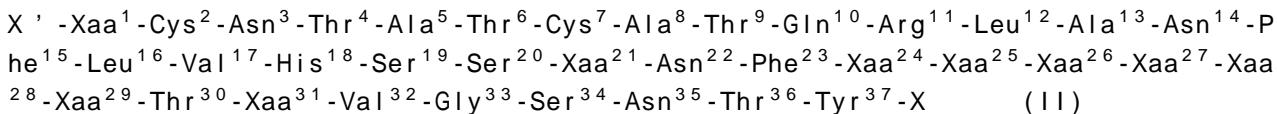
【0112】

一実施形態では、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体は、エキセンディン-4、エキセンディン-4類似体またはその誘導体である。一実施形態では、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体は、エキセンディン-4である。一実施形態では、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体は、エキセンディン-4類似体である。一実施形態では、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体は、エキセンディン-4誘導体である。式Iの最も好ましい化合物は、化合物14である。

10

【0113】

一実施形態では、P<sub>2</sub>が、式(I1)：



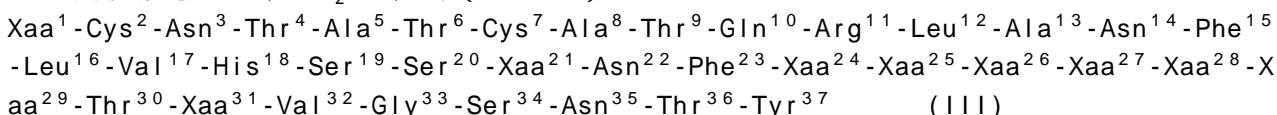
の残基1～37のアミノ酸配列(配列番号31)を含み、

ここで、式(I1)に示されるアミノ酸の最大55%が、欠失しているか、または異なるアミノ酸で置換されていてもよく、式中、X'が、水素、N末端キャップ基、PSとの結合またはPSとのリンカーであり、Xaa<sup>1</sup>が、Lysまたは結合であり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはAsnであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはGlyであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはProであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはIleであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはLeuであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはProであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはProであり、Xaa<sup>3</sup>が、Lys、CysまたはAsnであり、Xが、適宜であり、存在する場合には、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、ヒドロキシル、PSとの結合またはPSとのリンカーであり、ここで、PSが、適宜、リンカーを介して、連結アミノ酸残基、X'またはXの側鎖と共有結合によって連結している。

20

【0114】

一実施形態では、P<sub>2</sub>が、式(I1I)：



の残基1～37のアミノ酸配列(配列番号31)を含み、

ここで、式(I1I)に示されるアミノ酸の最大55%が、欠失しているか、または異なるアミノ酸で置換されていてもよい。式(I1I)に加えて、Xaa<sup>1</sup>が、Lysまたは結合であり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはAsnであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはGlyであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはProであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはIleであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはLeuであり、Xaa<sup>2</sup>が、Lys、CysまたはProであり、Xaa<sup>3</sup>が、Lys、CysまたはAsnである。一実施形態では、式(I1I)のN末端は、部分X'と共に結合によって結合しており、ここで、X'は、N末端キャップ基、PSとの結合またはPSとのリンカーである。一実施形態では、式(I1I)のC末端は、部分Xと共に結合によって結合しており、ここで、Xは、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換

30

40

50

アリールアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、PSとの結合またはPSとのリンカーである。一実施形態では、PSが、適宜、リンカーを介して、連結アミノ酸残基、X'またはXの側鎖と共有結合によって連結している。

## 【0115】

一実施形態では、PSは、30~80kDa、30~70kDa、30~60kDa、35~60kDa、好ましくは、35~50kDaの範囲の分子量を有する。一実施形態では、PSは、約40kDaの分子量を有する。

## 【0116】

ダバリンチド。ある実施形態では、P<sub>2</sub>は、ダバリンチド、ダバリンチド類似体またはその誘導体である。一実施形態では、P<sub>2</sub>は、ダバリンチドである。一実施形態では、P<sub>2</sub>は、ダバリンチド類似体である。一実施形態では、P<sub>2</sub>は、ダバリンチドの誘導体である。「AC-2307」としても知られるダバリンチドは、種々の疾患適応症の治療において有用な強力なアミリンアゴニストである。本明細書に記載された化合物および方法において使用するのに適したダバリンチド類似体および誘導体については、それらの各々は、その全体がすべての目的のために参考により本明細書に組み込まれる、WO2006/083254およびWO2007/114838を参考のこと。ダバリンチドは、アミリンもしくはカルシトニンおよびその類似体のN末端ループ領域、カルシトニンもしくはその類似体の-ヘリックス領域の少なくとも一部の-ヘリックス領域またはアミリン-ヘリックス領域およびカルシトニン-ヘリックス領域もしくはその類似体の一部を有する-ヘリックス領域ならびにアミリンもしくはカルシトニンのC末端テール領域を有するキメラペプチドである。ヒトカルシトニン、サケカルシトニンおよびダバリンチドの配列は以下のとおりである：

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP(配列番号32);  
CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP(配列番号33);  
KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY(配列番号34)。

## 【0117】

ある実施形態では、P<sub>2</sub>は、1~37個の残基を含む。ある実施形態では、P<sub>2</sub>は、アミリン、プラムリンチドまたはダバリンチドである。ある実施形態では、P<sub>2</sub>は、アミリン類似体またはプラムリンチドもしくはダバリンチドの類似体である。ある実施形態では、P<sub>2</sub>は、アミリンもしくはアミリン類似体の誘導体、プラムリンチドもしくはプラムリンチド類似体の誘導体またはダバリンチドもしくはダバリンチド類似体の誘導体である。

## 【0118】

リンカー。用語「リンカー」などは、本明細書に記載されたLDHC中のポリペプチド成分および水溶性ポリマースペーサー成分の結合との関連において、順に、結合に利用可能な結合価を有するポリペプチド成分(例えば、P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>)と、結合に利用可能な結合価を有する水溶性ポリマースペーサー(例えば、PS)と共有結合によって結合している二価の種(-L-)を意味する。ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、側鎖残基(例えば、リシン、システイン、アスパラギン酸およびその相同体)であることが好都合である。一実施形態では、ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、リシンまたはシステイン残基の側鎖である。一実施形態では、ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、N末端アミンである。一実施形態では、ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、C末端カルボキシレートである。本明細書において使用される場合、用語「連結アミノ酸残基」とは、適宜、リンカーを介して、水溶性ポリマースペーサーが結合しているアミノ酸を意味する。

## 【0119】

ある実施形態では、L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>のいずれか一方または両方が結合である。結合ではない場合は、L<sub>1</sub>またはL<sub>2</sub>の化学構造は重要ではないが、その理由は、L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>が主に、本明細書に記載されたLDHCの一部の実施形態の薬理学的活性の最適化において有用であり得るスペーサーとして働くからである。リンカーL<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は、独立

10

20

30

40

50

に、同一であっても、異なっていてもよい。

【0120】

一実施形態では、リンカー  $L_1$  および  $L_2$  は、独立に、当技術分野で公知の、結合、-C(O)-、-NH-、-O-、-S-、-S-S-、-OCO-、-OCONH-、-NHC(=O)-、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換アルケニレン、置換もしくは非置換ウレタン、置換もしくは非置換アルキルアミド、置換もしくは非置換アルキルスルホン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンなどである。

【0121】

一実施形態では、リンカー  $L_1$  および  $L_2$  は、独立に、結合、 $R^1$  置換もしくは非置換アルキレン、 $R^1$  置換もしくは非置換アルケニレン、 $R^1$  置換もしくは非置換ウレタン、 $R^1$  置換もしくは非置換アルキルアミド、 $R^1$  置換もしくは非置換アルキルスルホン、 $R^1$  置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、 $R^1$  置換もしくは非置換シクロアルキレン、 $R^1$  置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。 $R^1$  は、 $R^2$  置換もしくは非置換アルキル、 $R^2$  置換もしくは非置換ヘテロアルキル、 $R^2$  置換もしくは非置換シクロアルキル、 $R^2$  置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、 $R^2$  置換もしくは非置換アリールまたは  $R^2$  置換もしくは非置換ヘテロアリールである。 $R^2$  は、 $R^3$  置換もしくは非置換アルキル、 $R^3$  置換もしくは非置換ヘテロアルキル、 $R^3$  置換もしくは非置換シクロアルキル、 $R^3$  置換もしくは非置換アリールまたは  $R^3$  置換もしくは非置換ヘテロアリールである。 $R^3$  は、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリールまたは非置換ヘテロアリールである。

【0122】

一実施形態では、リンカーは、多官能性アミノ酸、例えば、それだけには限らないが、アラニン、リシンおよびその相同体、ならびにアスパラギン酸およびその相同体である。用語「多官能性」とは、アミノ酸との関連において、アミノ酸のアミノおよび/またはカルボキシル官能基に加えて、反応して結合を形成し得る側鎖官能基を指す。多官能性アミノ酸の例示的官能基として、アミン、カルボキシルおよびスルフヒドリル官能基が挙げられる。

【0123】

一実施形態では、リンカーは、二価ヘテロ原子を含む。一実施形態では、リンカーは、-O-、-S-、-S-S-、-OCO-、-OCONH- および -NHC(=O)-、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであるか、またはそれを含む。代表的なリンカーとして、ペプチド性または非ペプチド性水溶性ポリマースペーサーおよびポリペプチド成分と結合している、-O-、-S-、-S-S-、-OCO-、-OCONH- および -NHC(=O)-、アミドおよび/またはウレタン結合が挙げられる。

【0124】

一実施形態では、リンカーは、ポリペプチド成分の主鎖官能基（部分）のアミノ酸側鎖と水溶性ポリマースペーサー上の官能基間の直接化学コンジュゲーションから得られる。この種のコンジュゲーションの例示として、当技術分野で周知のように、標準固相合成法によって達成されるアミド結合の形成がある。本明細書に記載されたリンカーは、例示であり、本発明の範囲内のリンカーは、はるかに長いものであり得、その他の残基を含み得る。

【0125】

一実施形態では、リンカー  $L_1$  および  $L_2$  は独立に、構造  $-L_A-L_B-$ （式中、連結要素  $L_A$  および  $L_B$  は、各々独立に、二価ヘテロ原子、-O-、-S-、-S-S-、-

10

20

30

40

50

O C O - 、 - O C O N H - および - N H C O N H - 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレン、置換もしくは非置換ヘテロアリーレンまたは置換もしくは非置換 P E G である)を有する。一実施形態では、 $L^A$  および  $L^B$  は、各々独立に、 - O C O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - C O - 、 - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - N H C O - 、 - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - 、 - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - C O N H - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - 、 - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - 、 - S O<sub>2</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - 、 - S O<sub>2</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - S - (式中、「n」は独立に、各出現で 1 ~ 5 である)である。「連結要素」とは、リンカーの共有結合によって結合している要素(例えば、 $L^A$  および  $L^B$ )を指す。

【0126】

10

一実施形態では、リンカーは、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンのうち 2 種以上を含む。

【0127】

一実施形態では、連結要素  $L^A$  および  $L^B$  は、独立に、結合、R<sup>4</sup>置換もしくは非置換アルキレン、R<sup>4</sup>置換もしくは非置換アルケニレン、R<sup>4</sup>置換もしくは非置換ウレタン、R<sup>4</sup>置換もしくは非置換アルキルアミド、R<sup>4</sup>置換もしくは非置換アルキルスルホン、R<sup>4</sup>置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、R<sup>4</sup>置換もしくは非置換シクロアルキレン、R<sup>4</sup>置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。R<sup>4</sup>は、R<sup>5</sup>置換もしくは非置換アルキル、R<sup>5</sup>置換もしくは非置換ヘテロアルキル、R<sup>5</sup>置換もしくは非置換シクロアルキル、R<sup>5</sup>置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、R<sup>5</sup>置換もしくは非置換アリールまたはR<sup>5</sup>置換もしくは非置換ヘテロアリールである。R<sup>5</sup>は、R<sup>6</sup>置換もしくは非置換アルキル、R<sup>6</sup>置換もしくは非置換ヘテロアルキル、R<sup>6</sup>置換もしくは非置換シクロアルキル、R<sup>6</sup>置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、R<sup>6</sup>置換もしくは非置換アリールまたはR<sup>6</sup>置換もしくは非置換ヘテロアリールである。R<sup>6</sup>は、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリールまたは非置換ヘテロアリールである。

20

【0128】

30

一実施形態では、リンカー  $L_1$  および  $L_2$  は独立に、構造 - O C O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - C O - 、 - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - N H C O - 、 - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - 、 - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - C O N H - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - 、 - O - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - 、 - S O<sub>2</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - 、 - S O<sub>2</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>n</sub> - S - (式中、「n」は独立に、各出現で 1 ~ 5 である)を有する。

【0129】

一実施形態では、本明細書に記載された置換された基は、少なくとも 1 個の置換基 (substituent group) で置換されている。より具体的には、一実施形態では、本明細書に記載されたリンカーまたは連結要素内の置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレンまたは置換ヘテロアリーレンは各々、少なくとも 1 個の置換基 (substituent group) で置換されている。その他の実施形態では、これらの基のうち少なくとも 1 個またはすべてが、少なくとも 1 個の大きさが制限された置換基 (substituent group) で置換されている。あるいは、これらの基のうち少なくとも 1 個またはすべてが、少なくとも 1 個の低級置換基 (substituent group) で置換されている。

40

【0130】

本明細書に記載されたリンカーのその他の実施形態では、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換 C<sub>1</sub> ~ C<sub>20</sub> アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の 2 ~ 20 員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換 C<sub>4</sub> ~ C<sub>8</sub> シクロアルキルであり、各置換も

50

しくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の4～8員のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アルキレンは、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の2～20員のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換シクロアルキレンは、置換もしくは非置換C<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の4～8員のヘテロシクロアルキレンである。一実施形態では、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2～8員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換C<sub>5</sub>～C<sub>7</sub>シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の5～7員のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アルキレンは、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の2～8員のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換シクロアルキレンは、置換もしくは非置換C<sub>5</sub>～C<sub>6</sub>シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の5～7員のヘテロシクロアルキレンである。

10

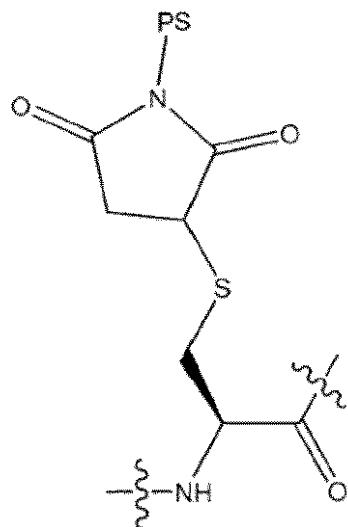
## 【0131】

一実施形態では、水溶性ポリマースペーサーは、当技術分野で公知のリンカー、例えば、それだけには限らないが、以下に示されるシステイン連結した水溶性ポリマースペーサー（PSS）を介して本明細書に記載されたLDDHCと結合している。

20

## 【0132】

## 【化2】



30

## 【0133】

ある実施形態では、リンカーは、1個または複数のアミノ酸残基、通常、約1～約50個のアミノ酸残基、好ましくは、1～20個のアミノ酸残基、より好ましくは、約1～10個のアミノ酸残基であり得る。好ましくは、必ずしもそうではないが、リンカー中のアミノ酸残基は、20種の標準的な（すなわち、生理的）アミノ酸、より好ましくは、システイン、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよび／またはセリンの間に由来するものである。さらにより好ましくは、ペプチジルリンカーは、ペプチド結合によって連結しているグリシン、セリンおよびアラニンなどの立体障害のない大部分のアミノ酸で構成されている。存在する場合には、インビボで循環における迅速なタンパク質分解ターンオーバーを避けるペプチジルリンカーが選択されることも望ましい。これらのアミノ酸の一部は、当業者によって十分に理解されるように、グリコシル化されていてもよい。

40

## 【0134】

50

その他の実施形態では、リンカーのアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリシンから選択される。好ましくは、リンカーは、グリシンおよびアラニンなどの立体障害のない大部分のアミノ酸で構成されている。したがって、好ましいリンカーとして、ポリグリシン、ポリセリンおよびポリアラニンまたはこれらのいずれかの組合せが挙げられる。ある実施形態では、当技術分野で公知の - アミノ酸(例えば、 - a l a )がリンカー中に含まれる。例示的リンカーとして、nが1~20、好ましくは、1~10、より好ましくは、1~4である( - a l a )<sub>n</sub>が挙げられる。

#### 【0135】

一部の例示的ペプチジルリンカーとして、ポリ(Gly)<sub>1~8</sub>、特に、(Gly)<sub>3</sub>、(Gly)<sub>4</sub>(配列番号35)、(Gly)<sub>5</sub>(配列番号36)、(Gly)<sub>6</sub>(配列番号37)および(Gly)<sub>7</sub>(配列番号38)ならびに(Gly)<sub>4</sub>Ser(配列番号39)のポリマー、(Gly-Ala)<sub>2~4</sub>(配列番号40)およびポリ(Ala)<sub>2~8</sub>(配列番号41)のポリマーがある。ペプチジルリンカーのその他の特定の例として、(Gly)<sub>5</sub>Lys(配列番号42)および(Gly)<sub>5</sub>LysArg(配列番号43)が挙げられる。

10

#### 【0136】

リンカーのその他の特定の例として、(Gly)<sub>3</sub>Lys(Gly)<sub>4</sub>(配列番号44)；(Gly)<sub>3</sub>AsnGlySer(Gly)<sub>2</sub>(配列番号45)；(Gly)<sub>3</sub>Cys(Gly)<sub>4</sub>(配列番号46)；およびGlyProAsnGlyGly(配列番号47)が挙げられる。

20

#### 【0137】

その他の好ましいリンカーとして、GGGGGS(配列番号39)、GGGGS(GGGGGS(配列番号48)、GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(配列番号49)および以下の実施例において使用された任意のリンカーが挙げられる。

#### 【0138】

一実施形態では、リンカーは、以下のペプチドリンカー配列：GGEGGG(配列番号50)、GGEFGGG(配列番号51)、GEEEG(配列番号52)、GEEE(配列番号53)、GGDG(配列番号54)、GDDG(配列番号55)、GDDDG(配列番号56)、GDDD(配列番号57)、GGGGSDDSDGGSDGEDGGGGS(配列番号58)、WEWEW(配列番号59)、FEFEF(配列番号60)、EEEW(配列番号61)、EEEFF(配列番号62)、WWEEEWW(配列番号63)、またはFFEEEFF(配列番号64)を含む。

30

#### 【0139】

その他の実施形態では、リンカーは、可能性あるリン酸化部位、例えば、X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>YX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>G(式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>4</sub>およびX<sub>5</sub>は各々独立に、任意のアミノ酸残基である)；X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>G(式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>4</sub>およびX<sub>5</sub>は各々独立に、任意のアミノ酸残基である)；またはX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>G(式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>4</sub>およびX<sub>5</sub>は各々独立に、任意のアミノ酸残基である)を構成する。

#### 【0140】

別の実施形態では、リンカーは、マレイミド、ヨードアセトアミド(iodoacetaamide)またはチオエステル、官能化された半減期延長部分とのコンジュゲーションのための、システィンまたはホモシスティン残基またはその他の2-アミノ-エタンチオールまたは3-アミノ-プロパンチオール部分を含有する。

40

#### 【0141】

別の有用なペプチジルリンカーとして、ランダムなGly/Ser/Thr配列を含む大きな、可動性リンカー、例えば：およそ1kDaの大きさのポリエチレングリコール(P EG)分子であると推定される、GSGSATGGSGSTASSGSGSAT(配列番号65)またはHGSATGGSGSTASSGSGSAT(配列番号66)がある。あるいは、有用なペプチジルリンカーは、強固なヘリックス構造を形成する当技術分野で公知のアミノ酸配列(例えば、強固なリンカー：-AEEAAAKEAAAKEAAAKAGG-、配列番号67)を含んでなり得る。さらに、ペプチジルリンカーはまた、式-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-の6個の炭素の脂肪族分子などの非ペプチジルセグメントも含み得る

50

。ペプチジルリンカーは、本明細書に記載されたような誘導体を形成するよう変更され得る。

【0142】

適宜、非ペプチジルリンカーはまた、PS部分を、本明細書に記載されたLDHClのペプチド部分とコンジュゲートするためにも有用である。例えば、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-C(O)-[式中、s=2~20]などのアルキレンリンカーが使用され得る。一実施形態では、本明細書に記載されたLDHClにとって有用なアルキレンリンカーとして、R<sup>1</sup>が本明細書に記載されるとおりであるR<sup>1</sup>置換または非置換アルキレンがある。

【0143】

これらのアルキレンリンカーは、低級アルキル(例えば、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)低級アシル、ハロゲン(例えば、Cl、Br)、CN、NH<sub>2</sub>、フェニルなどといった任意の立体障害のない基によってさらに置換され得る。例示的非ペプチジルリンカーとして、当技術分野で公知のような、および/または本明細書に記載されたPEGリンカーがある。好ましくは、このような非ペプチジルリンカーは、独立に、0.5kDa以下、1kDa以下および2kDa以下であり、直鎖であることが好ましい。

【0144】

一実施形態では、式(I)中のL<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>と組み合わされる水溶性ポリマースペーサーPS(すなわち、L<sub>1</sub>-PS-L<sub>2</sub>)は、35~85kDa、35~75kDa、35~60kDa、好ましくは、35~50kDaの範囲の組み合わされた分子量を有する。一実施形態では、L<sub>1</sub>-PS-L<sub>2</sub>は、約35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50kDaの分子量を有する。

【0145】

水溶性ポリマースペーサー。用語「水溶性ポリマースペーサー」(PS)とは、式(I)のLDHClとの関連において、本明細書に記載された方法にとって有用である(例えば、注射に適している)よう、水溶液において十分に可溶性であるペプチド性または非ペプチド性ポリマーを指す。一実施形態では、PSは、LDHClが、当技術分野で公知のように、注射の際にデポーを形成しないよう選択される。一実施形態では、PSは、LDHClが、注射の際にデポーを形成するように選択される。

【0146】

一実施形態では、水溶性ポリマースペーサーの大きさの範囲は、30~80kDa、30~70kDa、30~60kDa、35~60kDaおよびさらに35~50kDaである。一実施形態では、スペーサーは、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、60kDa、70kDaおよびさらに80kDaである。式(I)中の部分PSとして使用するのに適した非ペプチド性ポリマーとして、それだけには限らないが、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメトキシ-ポリエチレングリコール(mPEG)、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリビニルアルコールを含めた当技術分野で公知の種々の化合物が挙げられる。直鎖PEGは、最も好ましいPSである。直鎖PEGは、直鎖PEGと同一分子量のコーム様PEGおよび分岐PEGと比較して優れた効果を提供した(データは示されていない)。PSおよびL<sup>1</sup>およびL<sup>2</sup>の組み合わされた分子量は、L<sup>1</sup>またはL<sup>2</sup>の両方またはいずれかが存在する場合には、15~85kDa、好ましくは、25~85kDa、25~75kDa、30~65kDaおよびさらに30~60kDaである。

【0147】

ポリペプチドの誘導体化に有用なPEG分子は、通常、当技術分野で公知のように、直鎖、分岐およびWarwick[すなわち、PolyPEG(登録商標)]クラスのPEGに分類される。それとは反対に明確に示されない限り、本明細書に記載されたPEG部分は、直鎖PEGである。用語「2アーム分岐」、「Y型」(yPEG)などは、当技術

10

20

30

40

50

分野で公知のように、分岐PEG部分を指す。用語「Warwick」は、PEGとの関連において、「コード」または「コード型」PEGとしても知られ、当技術分野で公知のように、主鎖、通常、ポリ(メタクリレート)と結合しているさまざまなマルチアームPEGを指す。

【0148】

一実施形態では、式I中の部分PSとして使用するのに適した非ペプチド性ポリマーとして、置換または非置換PEG、置換または非置換モノメトキシ-ポリエチレングリコール、置換または非置換デキストラン、置換または非置換セルロース、置換または非置換ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、置換または非置換プロピレングリコールホモポリマー、置換または非置換ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、置換または非置換ポリオキシエチル化ポリオールおよび置換または非置換ポリビニルアルコールが挙げられる。

10

【0149】

一実施形態では、PSは一価である。一実施形態では、式(I)中の部分PSとして使用するのに適した非ペプチド性ポリマーとして、置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリールおよび置換ヘテロアリールが挙げられ、これらは順に、置換もしくは非置換PEG、置換もしくは非置換モノメトキシ-ポリエチレングリコール、置換もしくは非置換デキストラン、置換もしくは非置換セルロース、置換もしくは非置換ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、置換もしくは非置換プロピレングリコールホモポリマー、置換もしくは非置換ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、置換もしくは非置換ポリオキシエチル化ポリオールおよび/または置換もしくは非置換ポリビニルアルコールで置換される。

20

【0150】

一実施形態では、PSは二価である。一実施形態では、式I中の部分PSとして使用するのに適した非ペプチド性ポリマーとして、非置換または置換アルキレン、非置換または置換ヘテロアルキレン、非置換または置換シクロアルキレン、非置換または置換ヘテロシクロアルキレン、非置換または置換アリーレンおよび非置換または置換ヘテロアリーレンが挙げられ、置換されている場合には、これらは、順に、置換または非置換PEG、置換または非置換モノメトキシ-ポリエチレングリコール、置換または非置換デキストラン、置換または非置換セルロース、置換または非置換ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、置換または非置換プロピレングリコールホモポリマー、置換または非置換ポリオキシエチル化ポリオールおよび置換または非置換ポリビニルアルコールで置換される。

30

【0151】

さらなる適した水溶性ポリマーまたはその混合物として、N連結型またはO連結型炭水化物、糖(例えば、キトサン、キサンタンガム、セルロースおよびその誘導体、アカシアガム、カラヤガム、グアーガム、カラギーナンならびにアガロースなどの種々の多糖)およびリン酸が挙げられる。

【0152】

ポリエチレングリコール(タンパク質を誘導体化するために使用してきたPEGの形態を含む)は、モノ-(C<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>アルキル)-、アルコキシ-またはアリールオキシ-ポリエチレングリコールおよびモノメトキシ-ポリエチレングリコールを含む。

40

【0153】

非ペプチド性スペーサーPSは、非免疫原性、生物学的に不活性および親水性であり得る。さらに、好ましいリンカーは、生物学的に活性なポリペプチド性基に所望の特性を伝達できる。このような特性として、そのそれぞれの受容体に対するP<sub>1</sub>および/もしくはP<sub>2</sub>の親和性を有意に低減することのない、またはインビボ効力を有意に低減することのない、免疫原性の低減、溶解度の増大および/または身体からのクリアランス速度の低減が挙げられる。

【0154】

50

いずれかの理論に拘泥するものではないが、水溶性部分 PS は、コンジュゲートされていない親ペプチドのいずれかもしくは両方のものに少なくとも匹敵するか、またはスペーサーとして PS を有さない参照コンジュゲート中のペプチドのいずれかもしくは両方のもの（本明細書において開示される）よりも、またはスペーサーとして PS を有さないが、参照コンジュゲートの主鎖のペプチドのアミノ酸側鎖で結合している PS を有する参照コンジュゲート（本明細書において開示される）よりも優れている、ペプチドのいずれかもしくは両方の生物活性（または効力または有効性）を改善、回復または維持するよう LDHC 中のペプチドホルモンを十分に分離するよう機能すると考えられる。

#### 【0155】

いずれかの理論にさらに拘泥するものではないが、水溶性部分 PS は、半減期延長部分として機能すると考えられる。「半減期延長部分」とは、それが結合しているコンジュゲートの生物活性の持続期間を増大する部分を指す。生物活性の持続期間の測定は、当技術分野で公知の任意の適した方法またはアッセイによって実施され得る。具体的には、これは、式（I）について示されるような化合物中に含まれるペプチドのコンジュゲートされていない形態と比較して、タンパク質分解もしくはその他の活性低下性化学修飾によってインビボ分解を防止するか、もしくは軽減する、インビボ半減期もしくはそれだけには限らないが、吸収速度の増大などのその他の薬物動態特性を増大する、毒性を低減する、免疫原性を低減する、溶解度を改善する、生物活性および／もしくは対象とする標的に関する融合タンパク質の標的選択性を増大する、ならびに／または製造可能性を増大する部分である。一実施形態では、半減期延長部分は、医薬上許容されるものである。半減期延長部分は、LDHC が、インビボで腎濾過によるクリアランスを低減するのに十分な水力学的大きさを達成するよう選択されるべきである。例えば、実質的に直鎖、分岐鎖または樹状の形態であるポリマー高分子である半減期延長部分が選択され得る。あるいは、半減期延長部分は、インビボで、問題の本発明の組成物が、血漿タンパク質と結合して、複合体を形成するよう、このように形成された複合体が、実質的な腎クリアランスを避けるか、または低減するよう選択され得る。使用され得る例示的半減期延長部分として、PEG またはポリプロピレングリコールなどのポリアルキレングリコール化合物が挙げられる。その他の適当なポリアルキレングリコール化合物として、以下の種類の荷電または中性ポリマーが挙げられる：デキストラン、コロミン酸またはその他の炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマーおよびビオチン誘導体。

#### 【0156】

驚くべきことに、LDHC はまた、本明細書に開示されるような、インビボにおいて腎臓における望ましくない空胞を形成する低減された傾向を有し得る。

#### 【0157】

本明細書に記載された化合物中の PS として有用である半減期延長部分の他の例として、エチレングリコールのコポリマー、プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（例えば、ポリリジンまたはポリオルニチン）、デキストラン<sub>n</sub>-ビニルピロリドン、ポリ<sub>n</sub>-ビニルピロリドン、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレンオキシドポリマー、エチレンオキシドポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖または分岐グリコシル化鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、部分が水溶性でありながら 30 ~ 80 kDa である長鎖疎水性脂肪族基が挙げられる。コンジュゲートされている場合には、本明細書に記載されたような半減期延長部分は、直接的に本明細書に記載された化合物のアミノ酸残基とか、または適宜、ペプチド化合物のアミノ酸残基と共有結合によって結合している、ペプチジルもしくは非ペプチジルリンカー（それだけには限らないが、芳香族またはアリールリンカーおよび本明細書に記載されたリンカーを含む）と共有結合によって結合している。

#### 【0158】

一実施形態では、式 I の水溶性ポリマースペーサーは、30 ~ 80 kDa の範囲の分子

10

20

30

40

50

量を有するポリエチレングリコール(PEG)分子である。一実施形態では、大きさの範囲は、30～80kDa、30～70kDa、30～60kDa、35～60kDaまたは35～50kDaである。一実施形態では、PEG水溶性スペーサーは、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、60kDa、70kDaおよびさらに80kDaである。

【0159】

一実施形態では、水溶性スペーサーの多分散は、当技術分野で公知の方法によって測定されるように約1.2未満である。一実施形態では、多分散は、約1.01～約1.20の範囲にある。一実施形態では、多分散は、約1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10、1.11、1.12、1.13、1.14、1.15、1.16、1.17、1.18、1.19またはさらに1.20である。

【0160】

活性化PEGの調製およびその生物学的に活性なペプチドとのコンジュゲーションのための技術は、当技術分野で周知である[例えば、米国特許第5,643,575号、同5,919,455号、同5,932,462号および同5,990,237号; Thompson et al., PEGylation of polypeptides、EP0575545B1; Petit, Site specific protein modification、米国特許第6,451,986号および同6,548,644号; S. Herman et al., Poly(ethylene glycol) with reactive endgroups: I. Modification of proteins、J. Bioactive Compatible Polymers、10:145-187 (1995); Y. Lu et al., PEGylated peptides III: Solid-phase synthesis with PEGylating reagents of varying molecular weight: synthesis of multiply PEGylated peptides、Reactive Polymers、22:221-229 (1994); A.M. Felix et al., PEGylated Peptides IV: Enhanced biological activity of site-directed PEGylated GRF analogs、Int. J. Peptide Protein Res.、46:253-264 (1995); A.M. Felix, Site-specific polyethylene glycol)ylation of peptides、ACS Symposium Series 680(poly(ethylene glycol)): 218-238 (1997); Y. Ikeda et al., Polyethylene glycol derivatives, their modified peptides, methods for producing them and use of the modified peptides、EP0473084B1; G.E. Means et al., Selected techniques for the modification of protein side chains, in: CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden Day, Inc., 219 (1971)を参照のこと]。

【0161】

PEG-アルデヒドまたはPEG-アルデヒド水和物などの活性化PEGは、既知手段によって化学合成され得るか、または市販の供給源、例えば、Shearwater Polymers、(Huntsville、AL)またはEnzon, Inc. (Piscataway、N.J.)から得られ得る。

【0162】

本明細書に記載されたLDLHCの合成において有用な活性化PEGの一例として、Shearwater Polymers(Huntsville、AL)から市販されているPEG-プロピオンアルデヒドなどのPEG-アルデヒド化合物(例えば、メトキシPEG-アルデヒド)がある。PEG-プロピオンアルデヒドは、式 $\text{PEG}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ によって表される。例えば、米国特許第5,252,714号を参照のこと。また、PEGアルデヒド水和物、例えば、PEGアセトアルデヒド水和物およびPEGビスアルデヒド水和物「PEGアルデヒド化合物」の意味内に含まれ、後者は、二官能性に活性化された構造をもたらす[例えば、Bentley et al., Poly(ethylene glycol) aldehyde hydrates and related polymers and applications in modifying amines、米国特許第5,990,237号を参照のこと][例えば、Bentley et al., Poly(ethylene glycol) aldehyde hydrates and related polymers and applications in modifying amines、米国特許第5,990,237号を参照のこと]。当技術分野で公知の、二価、三価、四価、八価コンストラクトなどをもたらすよう複数のアームを含むPEG誘導体を得るた

10

20

30

40

50

めに、活性化された複数分岐 P E G - アルデヒド化合物が使用され得る。

【 0 1 6 3 】

一実施形態では、P E Gは、L D D H C中に組み込まれていると、本明細書に記載されたポリペプチド成分のアミノ酸残基の少なくとも1つの溶媒に曝露された遊離アミン部分に直接的に、還元的アミノ化によって共有結合によって結合され得る。一実施形態では、式(I)のL D D H Cは、組換え融合タンパク質上の1つもしくは複数の第一級もしくは第二級アミンでP E Gと、L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>を介してか、または融合タンパク質上の単一の第一級アミン部位で2つのP E G基と結合している。例えば、これは、還元的アミノ化反応が、過剰のP E G - アルデヒド化合物の存在を含む場合に起こり得る。一実施形態では、P E G化産物分子あたり単一のP E Gを有するP E G化産物が望まれる場合には、還元的アミノ化反応において、分子あたり1つのP E G基のみが移される第二級アミンを使用するP E G化が実施され得る。

10

【 0 1 6 4 】

第一級アミン部分を提供し得るアミノ酸残基として、リシン、ホモリシン、オルニチン、-ジアミノプロピオン酸(D a p)、-ジアミノプロピオノン酸(diamino propionic acid)(D p r)および-ジアミノ酪酸(D a b)、アミノ酪酸(A b u)および-アミノ-イソ酪酸(A i b)の残基が挙げられる。ポリペプチドN末端はまた、P E G化のために有用な-アミノ基を提供する。第二級アミン部分を提供し得るアミノ酸残基として、アルキルが、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>アルキルである、-N-アルキルリシン、-N-アルキルリシン、-N-アルキルオルニチン、-N-アルキルオルニチンまたはN末端プロリンが挙げられる。

20

【 0 1 6 5 】

本明細書に記載された化合物の合成のための、別の有用な活性化P E Gとして、メトキシP E G - マレイミドなどのP E G - マレイミド化合物がある。例えば、米国特許第6,602,498号; C. Delgado et al., Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 9:249-304 (1992); S. Zalipsky et al., in: Poly(ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and biomedical applications (J.M. Harris, Editor, Plenum Press: New York, 347-370 (1992); S. Herman et al., J. Bioactive Compatible Polymers 10:145-187 (1995); 米国特許第4,847,325号; 米国特許第5,166,322号; E P 0 4 6 9 0 7 4 B 1; E P 0 6 6 8 3 5 3 A 1; E P 0 6 6 8 3 5 4 A 1; 米国特許第5,206,344号; R.J. Goodson and N.V. Katre, Biotechnol., 8:343-346 (1990)を参照のこと。

30

【 0 1 6 6 】

ポリ(エチレングリコール)ビニルスルホンは、チオール化アミノ酸残基での、例えば、C残基でのコンジュゲーションによる、本明細書に記載されたP E Gがコンジュゲートされた化合物の作製のための別の有用な活性化P E Gである。例えば、M. Morpurgo et al., Bioconj. Chem. 7:363-368 (1996); 米国特許第5,446,090号; 同5,739,208号; 同5,900,461号; 同6,610,281号および同6,894,025号; WO 95/13312 A1を参照のこと。

40

【 0 1 6 7 】

本明細書に記載された化合物の合成において有用である、P E Gの別の活性化された形態として、P E G - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル化合物、例えば、メトキシP E G - N - ヒドロキシスクシンイミジル(N H S)エステルがある。

【 0 1 6 8 】

P E Gのヘテロ二官能性に活性化された形態も有用である。例えば、米国特許第6,552,170号を参照のこと。

【 0 1 6 9 】

ジオール活性化P E G化合物を含めたチオール活性化P E G化合物、P E G - ヒドラジド化合物、P E G - オキシアミン化合物またはP E G - プロモアセチル化合物もまた有用である。例えば、S. Herman, J. Bioactive and Compatible Polymers 10:145-187 (1995

50

); S. Zalipsky, Advanced Drug Delivery Reviews 16:157-182 (1995); R. Greenwald et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 17:101-161 (2000)を参考のこと。

### 【0170】

PEGの最小の実用的大きさは、約500ダルトン(Da)であり、それ未満では、PEGは毒性になる。約500Daを超えると、PEGの任意の分子質量、例えば、約1,000ダルトン(Da)~100,000Da(nは、20~2300である)が、実用的に望ましいものとして使用され得る。PEGモノマーの数(n)は、各モノマーについてMW=44Daを使用して平均分子質量から概算される。活性化リンカー上のPEGの組み合わされた分子質量は、製薬的使用に適していることが好ましい。

10

### 【0171】

さらにその他の実施形態では、本明細書に記載された化合物の成分ペプチドは、既知化学技術によって、ペンタエリスリトルテトラ-ポリエチレングリコールエーテルなどの活性化された複数分岐PEG化合物(二価、三価、四価、八価コンストラクトをもたらすよう複数のアームを含むPEG誘導体)と反応される。N-スクシンイミジルオキシカルボニル)プロピル、p-ニトロフェニルオキシカルボニル、(-CO<sub>2</sub>-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>)、3-(N-マレイミド)プロパンアミド、2-スルファニルエチルおよび3-アミノプロピルなどの官能化および活性化誘導体。

20

### 【0172】

#### 例示的化合物

命名法。本明細書に記載された化合物(例えば、LDHCおよびその他の化合物)の命名法に関して、角括弧(「[ ]」)は、別個の断片を示し、クロスハッチ(「#」)は、連結位置を示す。当技術分野で通例であるように、角括弧はまた、ペプチド置換を示し、この命名法の使用は、文脈から明らかとなる。例えば、「[化合物3-Lys(Cys(Mal-PEG35K-Mal#))、アミド] [化合物3-Lys(Cys(#))、アミド]」という命名法を用いる化合物35では、化合物3のC末端で結合しているリシンのペンドント-アミノ基は、順に、アミド連結を介してシステインと結合しており、そのシステインは、順に、マレイミドと結合しており、その部分は、順に、PEG部分と結合している。PEG部分は、順に、マレイミドと結合しており、これは、順に、システインと結合しており、これは、順に、化合物3のC末端でリシンの側鎖-アミノ基と結合している。「#」記号によって示される結合の化学的性質は、文脈から当業者に明らかとなる。例えば、化合物35について、「#」記号は、Cysおよびマレイミド間のチオエーテル結合を介した連結を示す。さらに、本明細書において提供された表において使用される慣習を含めた命名法に関して、反対する指示がない場合は、PEG部分は、ペプチドの主鎖と結合している。本明細書において提供された表中に使用された慣例を含めた命名法に関して、反対に表示がない場合には、PEG部分は、ペプチドの主鎖と結合している。例えば、化合物67は、mPEG40KDの、化合物49のN末端窒素とのコンジュゲーションの結果である。同様に、化合物68は、mPEG40KDの、化合物50のN末端窒素とのコンジュゲーションの結果である。アミノ酸の標準的な一文字略語が使用され得、同様に標準的な三文字略語も使用され得る。例えば、化合物72は、リシン26のペンドントアミン官能基(すなわち、K<sup>26</sup>のN)が、PEG40KD部分とコンジュゲートされている化合物54の類似体である。例示的化合物が以下の表1b中に提供されている。用語「PEGXXKD」とは、「XX」kDaの名目上の分子量を有するポリエチレングリコール部分を指す; 例えば、PEG40KDとは、名目上の分子量40kDaを有するポリエチレングリコールを指す。用語「mPEG」とは、当技術分野で通例であるように、メトキシル-PEGを指す。

30

### 【0173】

連結位置を示すためのクロスハッチの使用のさらなる例示として、以下の構造を有する式「化合物3-Lys(Cys(#)) [#Mal-PEG40KD-[des-Lys<sup>1</sup>]-化合物4」を有する化合物14がある(式中、「n」は、PEG40KD部分を得

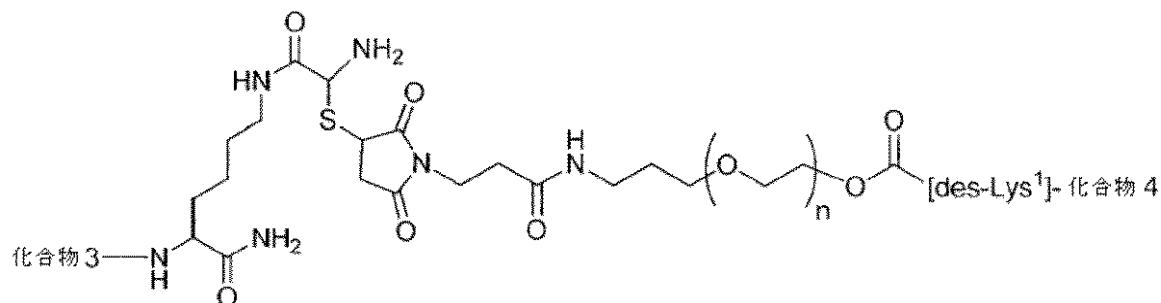
40

50

るのに十分な大きさのものである；例えば、nは、PEG40KDの約900である）。

〔 0 1 7 4 〕

〔化 3〕



10

20

【 0 1 7 5 】

一実施形態では、本明細書において企図される化合物は、エキセンディン、アミリン、プラムリンチド、ダバリンチドまたはその類似体もしくは誘導体から選択される  $P_1$  および  $P_2$  としてエキセンディンを含む。  $P_1$ 、 $P_2$  および  $PS$  は、本明細書に記載されるおりである。代表的化合物は、構造エキセンディン -  $L_1$  -  $PS$  -  $L_2$  - アミリン、エキセンディン -  $L_1$  -  $PS$  -  $L_2$  - プラムリンチドおよびエキセンディン -  $L_1$  -  $PS$  -  $L_2$  - ダバリンチドを有する化合物を含む。さらなる代表的化合物は、 $P_1$  として、例えば、アミリン -  $L_1$  -  $PS$  -  $L_2$  - アミリン、アミリン -  $L_1$  -  $PS$  -  $L_2$  - プラムリンチドおよびアミリン -  $L_1$  -  $PS$  -  $L_2$  - ダバリンチドを含めたアミリンまたはその類似体もしくは誘導体を含む。なおさらなる代表的化合物は、 $P_1$  として、例えば、ダバリンチド -  $L_1$  -  $PS$  -  $L_2$  - アミリンまたはダバリンチド -  $L_1$  -  $PS$  -  $L_2$  - ダバリンチドを含めた、ダバリンチドまたはその類似体もしくは誘導体を含む。例示的ペプチド、ペプチド誘導体、短いペプチドコンジュゲートおよび本明細書に記載された試薬が、以下の表 1 a において提供される。

【 0 1 7 6 】

表1a. 例示的ペプチド、ペプチド誘導体、短いペプチドヨンジュゲートおよび試薬

【表1a】

| 化合物 | 化合物の説明                                                                                                                                     |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | エキセンディン-4: HGETFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS-NH <sub>2</sub><br>(配列番号:6)                                                               |
| 2   | エキセンディン-4 (1-28):<br>HGETFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN (配列番号:68)                                                                                 |
| 3   | [Leu <sup>14</sup> ] エキセンディン-4:<br>HGETFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS-NH <sub>2</sub> (配列番号:7)                                          |
| 4   | ダバリンデドシクロ <sup>4-7</sup> KCNTATCVLGRSLQELHRLQTYPRTNTGSNTY-NH <sub>2</sub><br>(配列番号:34).                                                    |
| 5   | [Lys <sup>1</sup> -N <sub>ε</sub> -mPEG40KD]-化合物4 (配列番号:34)                                                                                |
| 6   | des Lys <sup>1</sup> [(N <sub>α</sub> -mPEG40KD)-Cys <sup>2</sup> ]-化合物4 (配列番号:69)                                                         |
| 7   | 化合物3-[N <sub>ε</sub> -Cys(mPEG 40KD)]Lys:<br>HGETFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSK(N <sub>ε</sub> -C(mPEG40KD))-NH <sub>2</sub> (配列番号:70) |
| 15  | HGETFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-(bAla)-(bAla)-<br>KCNATCVLGRSLQELHRLQTYPRTNTGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:71)                                    |
| 16  | HGETFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIISGGGKCNATCVLGRSLQE<br>LHRLQTYPRTNTGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:72)                                       |
| 17  | MeO-PEG 20K                                                                                                                                |
| 34  | HGETFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS-OH (配列番号:73)                                                                                          |
| 49  | KCNATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:28)                                                                             |
| 50  | ([des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物49): CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>(配列番号:75)                                         |
| 51  | KCNATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:76)                                                                             |
| 52  | ([des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物51): CNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>(配列番号:77)                                         |
| 53  | KCNATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:78)                                                                             |
| 54  | ([des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物53): CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>(配列番号:79)                                         |
| 55  | KCNATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:80)                                                                             |
| 56  | ([des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物55): CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>(配列番号:81)                                         |
| 57  | KCNATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:82)                                                                             |
| 58  | ([des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物57): CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>(配列番号:83)                                         |
| 59  | CNTATCATQRLANFLVHSSKNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:84)                                                                             |
| 60  | CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPKLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:85)                                                                             |
| 61  | CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTKVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:86)                                                                             |
| 62  | CNTATCATQRLANFLVHSSNNFKPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:87)                                                                             |
| 63  | CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGKILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:88)                                                                             |
| 64  | CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILKPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:89)                                                                            |
| 65  | CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILKPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:90)                                                                             |
| 66  | CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPKTNVGSNTY-NH <sub>2</sub> (配列番号:91)                                                                             |

表1b. 例示的ペグ化ペプチドおよびペプチド誘導体

【表1b】

| 化合物 | 化合物の説明                                            |
|-----|---------------------------------------------------|
| 67  | mPEG40KD-化合物 49 (配列番号:92)                         |
| 68  | mPEG40KD-化合物 50 (配列番号:93)                         |
| 69  | [K <sup>21</sup> (mPEG40KD)]-化合物 51 (配列番号:94)     |
| 70  | [K <sup>21</sup> (mPEG40KD)]-化合物 52 (配列番号:95)     |
| 71  | [K <sup>26</sup> (mPEG40KD)]-化合物 53 (配列番号:96)     |
| 72  | [K <sup>26</sup> (mPEG40KD)]-化合物 54 (配列番号:97)     |
| 73  | [K <sup>31</sup> (mPEG40KD)]-化合物 55 (配列番号:98)     |
| 74  | [K <sup>31</sup> (mPEG40KD)]-化合物 56 (配列番号:99)     |
| 75  | [K <sup>26</sup> (Y型-mPEG40KD)]-化合物 53 (配列番号:100) |
| 76  | [K <sup>21</sup> (mPEG40KD)]-化合物 59 (配列番号:101)    |
| 77  | [K <sup>26</sup> (mPEG40KD)]-化合物 60 (配列番号:102)    |
| 78  | [K <sup>31</sup> (mPEG40KD)]-化合物 61 (配列番号:103)    |
| 79  | [K <sup>26</sup> (Y型-mPEG40KD)]-化合物 60 (配列番号:104) |
| 80  | [K <sup>24</sup> (mPEG40KD)]-化合物 62 (配列番号:105)    |
| 81  | [K <sup>25</sup> (mPEG40KD)]-化合物 63 (配列番号:106)    |
| 82  | [K <sup>27</sup> (mPEG40KD)]-化合物 64 (配列番号:107)    |
| 83  | [K <sup>28</sup> (mPEG40KD)]-化合物 65 (配列番号:108)    |
| 84  | [K <sup>29</sup> (mPEG40KD)]-化合物 66 (配列番号:109)    |
| 85  | [K <sup>22</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:110)    |
| 86  | [K <sup>23</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:111)    |
| 87  | [K <sup>30</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:112)    |
| 88  | [K <sup>26</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:113)    |
| 89  | [K <sup>17</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:114)    |
| 90  | [K <sup>18</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:115)    |
| 91  | [K <sup>20</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:116)    |
| 92  | [K <sup>32</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:117)    |
| 93  | [K <sup>33</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:118)    |
| 94  | [K <sup>34</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:119)    |
| 95  | [K <sup>35</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:120)    |
| 96  | [K <sup>36</sup> (mPEG40KD)]-化合物 58 (配列番号:121)    |

最も好ましい化合物またはポリペプチドコンジュゲートは、化合物14である。

【0179】

本明細書に記載された化合物、組成物および方法にとって有用である例示的化合物(LDDHC)として、以下の表2に開示された化合物が挙げられる。

【0180】

表2. 例示的LDDHC

【表2】

| 化合物 | 化合物の説明                                                      |
|-----|-------------------------------------------------------------|
| 8   | 化合物2-GGG-化合物4ハイブリッド(直鎖)(配列番号:122)                           |
| 9   | 化合物3-GGG-化合物4ハイブリッド(配列番号:123)                               |
| 10  | 化合物2-GC(mPEG40KD)G-化合物4(ハイブリッド("T"40KD PEG))(配列番号:124)      |
| 11  | 化合物3-GC(mPEG40KD)G-化合物4(ハイブリッド("T"40K PEG))(配列番号:74)        |
| 12  | 化合物2-PEG12KD-[des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物4                   |
| 13  | [化合物3-Lys(Cys#)][#Mal-PEG12KD-[des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物4] |
| 14  | [化合物3-Lys(Cys#)][#Mal-PEG40KD-[des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物4] |
| 35  | [化合物3-Lys(Cys(Mal-PEG35KD-Mal#)),アミド][化合物3-Lys(Cys#),アミド]   |
| 45  | 化合物3-PEG30KD-[des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物4                   |
| 46  | 化合物3-PEG60KD-[des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物4                   |
| 47  | 化合物3-PEG80KD-[des-Lys <sup>1</sup> ]-化合物4                   |
| 48  | [化合物3-Lys-Cys#)-Gly-酸][#Mal-PEG40K-des-Lys1-化合物4]           |

10

20

20

30

40

【0181】

化合物設計の戦略

LDDHCおよび本明細書に記載されたその他の化合物を含めた、複数のペプチドホルモンを、1種または複数の水溶性ポリマースペーサーと組み合わせて組み込む化合物は、その中に含有されるペプチド、リンカーおよびスペーサーの相互接続を規定する種々の全体的な構造特徴によって記載され得る。いずれかの理論に拘泥するものではないが、図1A～Bにおいて示される理論的スキームに表されるような相互接続を考え出すことは有用であると考えられる。図1Aでは、ペプチドホルモンP<sub>1</sub>は、適宜、リンカーを介して、水溶性ポリマースペーサーとC末端で結合している。図1A～Bでは、記号「PEG」は、本明細書に記載された化合物において有用なすべての適した水溶性ポリマースペーサーの代理物であるということは理解される。ペプチドホルモンP<sub>2</sub>は、適宜、リンカーを介して、水溶性ポリマースペーサーとN末端で結合している。概念上は、LDDHCを形成するプロセスは、水溶性ポリマースペーサーと単一の実体との合体として想定され得る。

【0182】

図1Bに、図1Aに表されるスキームを補完して、ペプチドホルモンP<sub>1</sub>およびP<sub>2</sub>は、まず、適宜、本明細書に記載されたリンカーを介して、共有結合によって結合されると想定され得る。水溶性ポリマースペーサーの結合は、次いで、リンカー(すなわち、いわゆる側鎖または「T」モチーフ)を介して、または連結しているP<sub>1</sub>～P<sub>2</sub>部分のCもしくはN末端で起こり得る。

【0183】

本明細書に開示される生物学的結果は、本明細書に記載された化合物の活性が、化合物の水溶性ポリマースペーサー部分の特性(例えば、大きさ)に対する予想外の、驚くべき

50

依存を示すことを実証する。やはり、いずれかの理論に拘泥するものではないが、これらの観察について、種々の説明が利用可能であり得ると考えられる。例えば、適宜、十分に小さい大きさのリンカーを介して、一緒に結合している場合には、ペプチドホルモン P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> は、生物活性にとって好ましくない互いの相互作用を生じさせ得る。例示的な好ましくない相互作用として、例えば、生物学的受容体での適切な活性（例えば、結合）を妨げる、当技術分野で公知の、立体的、静電気的、親水性または疎水性相互作用が挙げられる。したがって、ペプチドホルモン P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> を分離する水溶性ポリマースペーサーの大きさが増大するにつれて、P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> 間の互いの相互作用は低減し、次いで、各ペプチドホルモンの、その生物学的受容体との個々の生物活性が妨げられずに起こり得る。

10

### 【0184】

#### I I I . 例示的合成

ポリペプチド合成の一般法。本明細書に記載された化合物のポリペプチド成分は、当技術分野で公知である生物学的、化学的および／または組換えDNA技術を使用して調製され得る。例示的方法は、本明細書に、およびその開示内容全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,872,700号；WO2007/139941；WO2007/140284；WO2008/082274；WO2009/011544；および米国公開第2007/0238669号に記載されている。化合物を調製するためのその他の方法は、本明細書において示されており、および／または当技術分野で公知である。

20

### 【0185】

例えば、本明細書に記載された化合物のポリペプチド成分は、自動化または半自動化ペプチドシンセサイザーなどの標準固相ペプチド合成技術を使用して調製され得る。通常、このような技術を使用して、-N-カルバモイル保護されたアミノ酸および樹脂上の成長するペプチド鎖と結合しているアミノ酸が、塩基（例えば、ジイソプロピルエチルアミンなど）の存在下、カップリング剤（例えば、ジシクロヘキシカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾ-トリアゾールなど）の存在下で、不活性溶媒（例えば、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリジノン、塩化メチレンなど）中、室温でカップリングされる。

-N-カルバモイル保護基は、試薬（例えば、トリフルオロ酢酸、ピペリジンなど）およびペプチド鎖に付加される次に望まれるN保護アミノ酸を用いて繰り返されたカップリング反応を使用して、得られたペプチド-樹脂から除去される。t-ブチルオキシカルボニル（t Boc）フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）などといった適したN保護基は、当技術分野で周知である。ペプチドシンセサイザーにおいて使用される、溶媒、アミノ酸誘導体および4-メチルベンズヒドリル-アミン樹脂は、例えば、Applied Biosystems Inc. (Foster City, Calif.) を含めたさまざまな市販の供給源から購入され得る。

30

### 【0186】

化学合成については、ポリペプチドコンジュゲートには固相ペプチド合成が使用され得るが、その理由は、一般に、固相合成が、直接的なアプローチであり、市販規模への優れた拡張性を有し、一般に、相対的に長いポリペプチドコンジュゲートと適合するからである。固相ペプチド合成は、NMP/HOBt（オプション1）システムおよびキャッピングを用いるt Boc または Fmoc 化学を使用する自動ペプチドシンセサイザー（モデル430A、Applied Biosystems Inc.、Foster City、Calif.）を用いて実施され得る（APPLIED BIOSYSTEMS USER'S MANUAL FOR THE ABI 430A PEPTIDE SYNTHESIZER, Version 1.3B Jul. 1, 1988, section 6, pp. 49-70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif. 参照のこと）。Boc-ペプチド-樹脂は、HFを用いて切断され得る（-5 ~ 0 、1時間）。ペプチドは、水および酢酸を交互に用いて樹脂から抽出され得、濾液は凍結乾燥される。Fmoc-ペプチド樹脂は、標準法（例えば、INTRODUCTION TO CLEAVAGE TECHNIQUES, Applied Biosystems, Inc., 1990, pp. 6-12）に従って切断され得る。ペプチドはまた、Advanced Chem

40

50

Techシンセサイザー（モデルMPS 350、Louisville、KY）を使用して組み立てることもできる。

【0187】

本明細書に記載された化合物は、当技術分野で公知の、および本明細書に記載された種々の方法によって、成分ペプチド（例えば、P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>）、リンカー（例えば、L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>）および水溶性ポリマースペーサーから組み立てられ得る。例えば、P<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-P<sub>2</sub>またはP<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-P<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>を合成し、次いで、P<sub>2</sub>と化学的連結し、P<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-P<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>を形成してもよい。

【0188】

ペグ化の方法。PEGの共有結合による結合は、合成化学の技術分野の当業者に利用可能なさまざまな方法によって達成され得ることが好都合である。主鎖または側鎖アミンでのペグ化には、通常、PEG試薬を、穏やかな条件下で反応させて、ペグ化化合物を得る。それだけには限らないが、還元を含めたさらなる工程が使用されてもよい。通常のペプチド-mPEGコンジュゲーションスキームでは、N-ヒドロキシルスクシンイミド（NHS）官能化されたmPEGが、DIPA（例えば、TFA対イオンあたり3当量）の存在下、窒素下、適した溶媒（例えば、無水DMF）中で、適した時間（例えば、24時間）の間、遊離アミンを有するペプチドと混合され得る。コンジュゲートは、沈殿試薬（例えば、冷ジエチルエーテル）の付加によって沈殿され得る。沈殿物は、遠心分離によって単離され、水に溶解され、続いて、凍結乾燥され得る。精製は、さまざまなクロマトグラフィー手順（例えば、勾配0.5M NaClを使用するMacroCap（商標）S-P陽イオン交換カラム）によって得られ得る。純度は、SDS-PAGEによって調べられ得る。質量分析（例えば、MALDI）は、水に対する透析後にコンジュゲートを特性決定するために使用され得る。

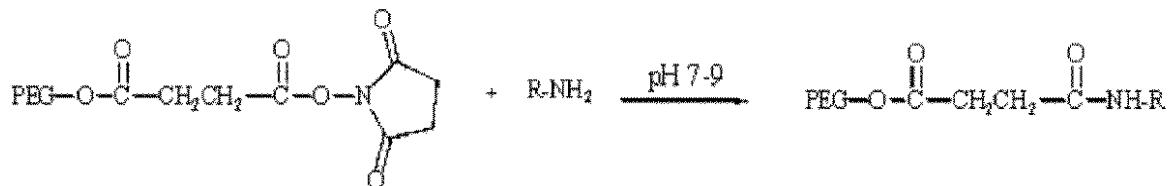
【0189】

PEG-SS（スクシンイミジルスクシネット）。スキーム1に示されるように、PEG-SSは、穏やかな条件下でアミン基と反応して、アミドを形成する。NHS官能化は、pH7~9で第一級アミン基と反応して、安定なアミド結合を形成し得るアミノ反応性PEG誘導体を提供する。反応は、1時間またはさらにそれ未満の時間で終了し得る。例示的反応は、スキーム1および2をたどる。

【0190】

【化4】

スキーム1.



【0191】

PEG-SG（グルタル酸スクシンイミジル）。同様に、PEG-SGは、スキーム2に示されるように、アミン基と反応して、対応するアミドを形成する。

【0192】

10

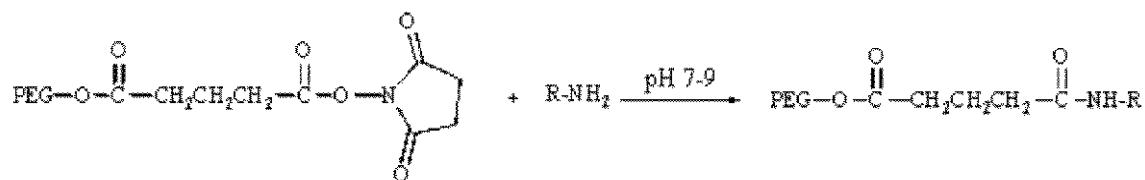
20

30

40

## 【化5】

スキーム2.



## 【0193】

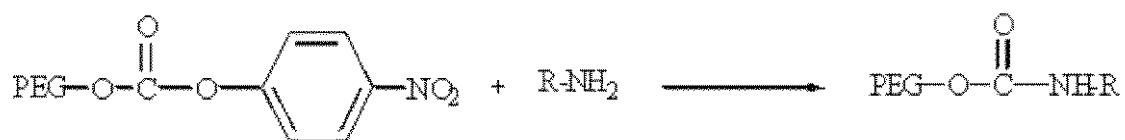
10

PEG-NPC (p-ニトロフェニルカルボネート)。PEG-NPCは、スキーム3に示されるように、アミン官能基と反応して、相対的に安定なウレタン官能基を形成する。

## 【0194】

## 【化6】

スキーム3.



20

## 【0195】

PEG-イソシアネート。スキーム4に示されるように、PEG-イソシアネートは、アミンと反応して、得られた相対的に安定なウレタン連結を形成し得る。

## 【0196】

## 【化7】

スキーム4.



30

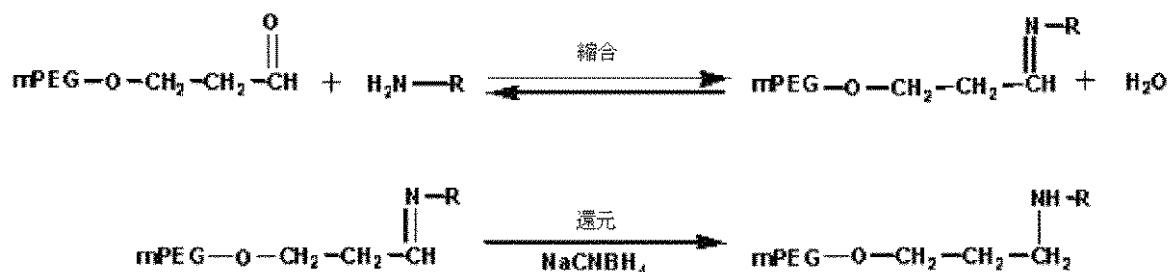
## 【0197】

PEG-アルデヒド。アミンとのさまざまなPEG-アルデヒド反応によって、イミンを得ることができ、これをさらに還元して、ペグ化アミンを得ることができる。反応pHは、標的選択性にとって重要であり得る。N末端アミンペグ化は、およそpH5であり得る。例えば、mPEG-プロピオンアルデヒドのペプチドアミンとの反応と、それに続く還元によって、以下のスキーム5に表される化合物が得られる。

## 【0198】

## 【化 8】

スキーム 5.



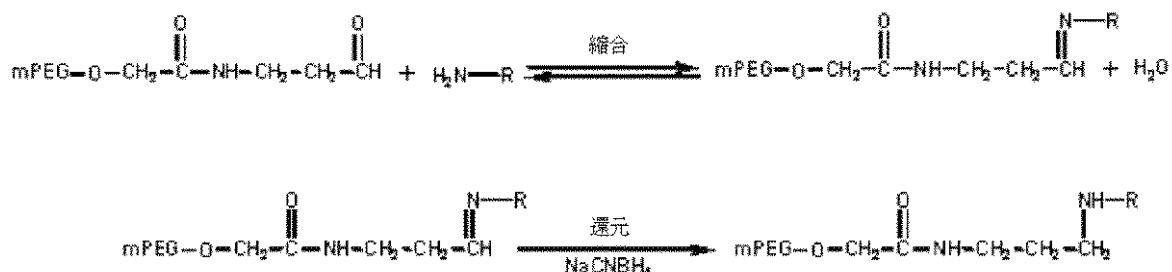
## 【0199】

同様に、mPEG-アミド-プロピオンアルデヒドのアミンとの縮合およびその後の還元によって、以下のスキーム 6 に表される化合物を得ることができる。

## 【0200】

## 【化 9】

スキーム 6.



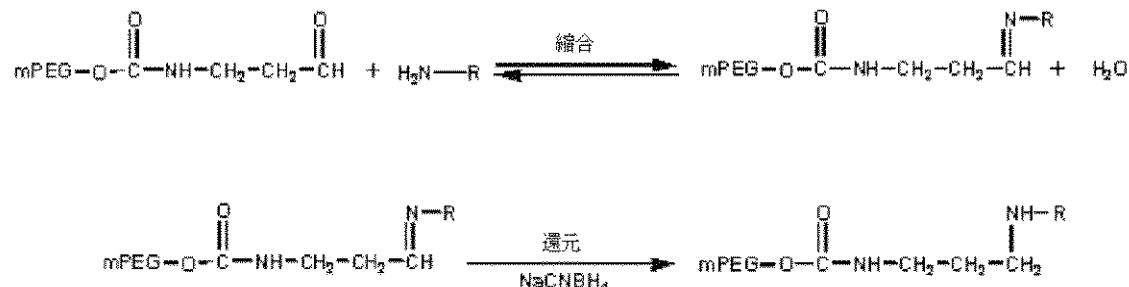
## 【0201】

mPEG-ウレタン-プロピオンアルデヒドのアミンとの反応およびその後の還元によって、以下のスキーム 7 に表される化合物を得ることができる。

## 【0202】

## 【化 10】

スキーム 7.



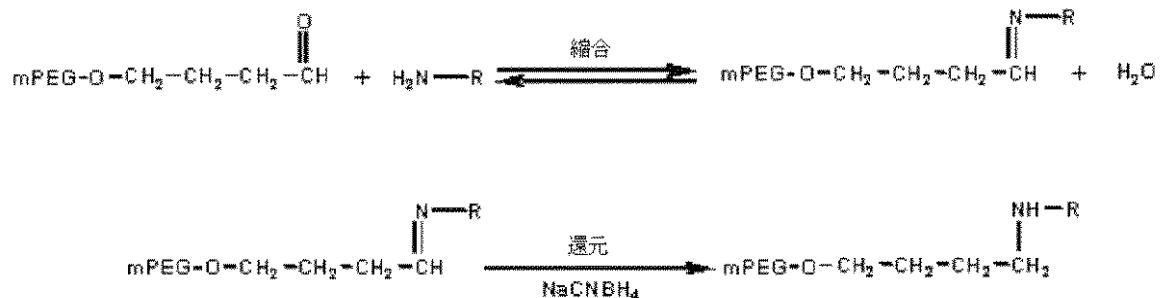
## 【0203】

さらに、mPEG-ブチルアルデヒドのアミンとの反応およびその後の還元によって、以下のスキーム 8 に表される化合物を得ることができる。

## 【0204】

## 【化11】

スキーム 8.



## 【0205】

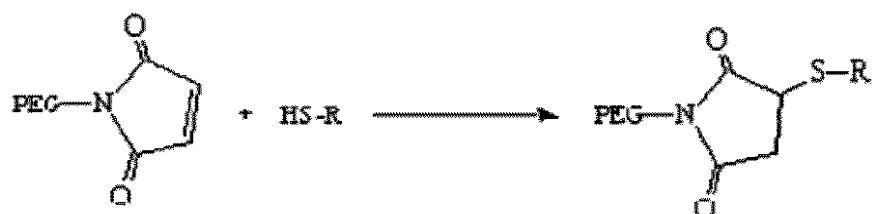
チオールペグ化：PEG - マレイミド。ペグ化は、当技術分野で公知のさまざまな方法によって、遊離チオール基で達成されることが好都合である。例えば、以下のスキーム9に示されるように、PEG - マレイミドは、標的化合物のチオールをペグ化し、これでは、マレイミン(maleimide)環の二重結合が切断されてチオールと接続する。反応速度は、pH依存的であり、最良条件は、およそpH 8に見られる。

## 【0206】

## 【化12】

20

スキーム 9.



## 【0207】

30

PEG - ビニルスルホン。さらに、以下のスキーム10に表されるように、PEG - ビニルスルホンは、遊離チオールのペグ化にとって有用である。

## 【0208】

## 【化13】

スキーム 10.



40

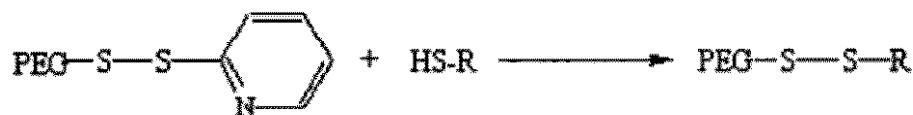
## 【0209】

PEG - オルトピリジル - ジスルフィド(OPTSS)。ポリペプチドへのジスルフィド連結PEGの形成は、以下のスキーム11に表される反応を含めた当技術分野で公知のさまざまな方法によって達成される。この種の連結では、得られたPEGコンジュゲートは、例えは、それだけには限らないが、水素化ホウ素、小分子ジチオール(例えは、ジチオエリスリトール)などを用いる還元によってポリペプチドからデカップリングされ得る。

## 【0210】

## 【化14】

## スキーム 11.



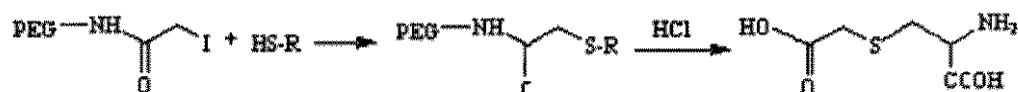
## 【0211】

PEG-ヨードアセトアミド。PEG-ヨードアセトアミドは、軽度に塩基性の媒質において、チオールをペグ化して、安定なチオエーテル結合を形成する。この種のコンジュゲーションは、強酸解析によって、タンパク質のペグ化システイン残基が、カルボキシメチルシステインを生じさせることができる興味深い様相を示し、これは、標準アミノ酸解析（例えば、アミノ酸配列決定）によって評価され得、したがって、反応の出現を確認する方法を提供できる。通常の反応スキームは、以下のスキーム12に表されている。

## 【0212】

## 【化15】

## スキーム 12.



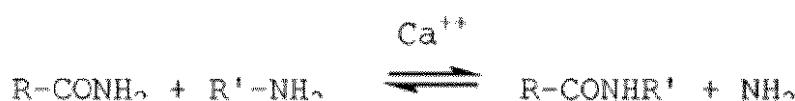
## 【0213】

グルタミン転移。グルタミン転移酵素 (EC 2.3.1.13) は、ペプチドおよびタンパク質基質のグルタミン側鎖の -カルボキサミド基のアミノリシスを触媒する。通常の反応は、スキーム13に開示されており、ここで、R'-CONH<sub>2</sub>は、アクセプターを表し、R'-NH<sub>2</sub>は、ドナーアルキルアミンである。

## 【0214】

## 【化16】

## スキーム 13.



## 【0215】

反応は、 -カルボキサミド基が、アシルドナーとして作用し、適切に分岐していない第一級アミンが、アシルアクセプターとして作用するアシル転移機構によって進む。したがって、グルタミン転移酵素によって触媒される反応は、穏やかな条件下でタンパク質中に官能基の選択的導入をするための方法を提供する。例えば、Coussons et al., 1992, Biochem J. 283:803-806を参照のこと。

## 【0216】

アルキルアミンを得るためのカルボン酸末端でのPEGの修飾は、種々の経路、例えば、それだけには限らないが、以下のスキーム14に示される反応によって進み得る。このスキームでは、 -カルボキシメチ -メトキシポリオキシエチレンが、N,N-ジメチルホルムアミドに溶解され得、それに、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) およびジシクロヘキシルカルボジイミド (CDI) が添加され、反応は、窒素雰囲気下で、経時的に（例えば、5時間）進み得る。反応混合物に、N-Boc-1,5-ジアミノペンタンが添加されてもよく、反応は、窒素下で、経時的に（例えば、36時間）進み

10

20

30

40

50

得る。溶媒は、除去され得、残渣は、カラムクロマトグラフィーによって精製され、P E G - B o c 化合物が得られ得る。B o c 基は、トリフルオロ酢酸 ( T F A ) を用いて除去され、グルタミン転移酵素を用いる反応に適したP E G - アルキルアミンが得られ得る。Sato, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54:487-504を参照のこと。

【0217】

【化17】

## スキーム 14.



10

HOBr, CDD



20

NH<sub>2</sub>~~~~~NHBOC

TFA



【0218】

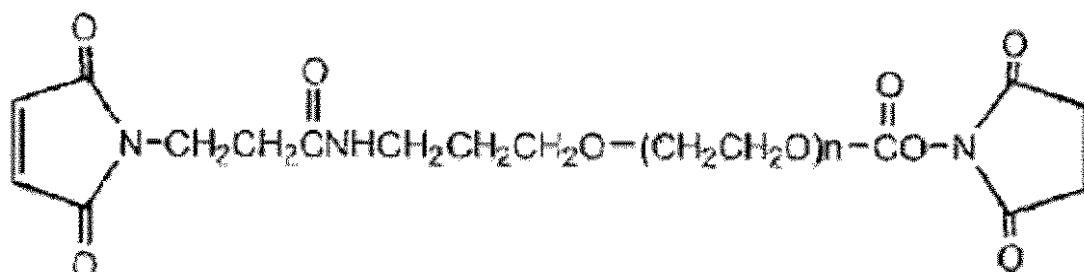
30

二官能性P E G化試薬。本明細書に記載された化合物のペグ化にとって有用な種々の二官能性試薬は、当業者に利用可能である。ペグ化の特定の方法は、ペグ化試薬上の反応性基ならびに所望の特定の側鎖および/または主鎖コンジュゲーションによって決定される。ペグ化反応は、本明細書に記載されるとおりであるか、またはそうでなければ当技術分野で公知のとおりである。一実施形態では、ペグ化試薬は、名目上のM W = 40 k D a を有するマレイミド - P E G - カーボネートN H S二官能性試薬である：

【0219】

30

【化18】



40

【0220】

40

さらなる不活性なコンジュゲーション。本明細書に記載された化合物における使用に適した種々のさらなる水溶性ポリマースペーサーは、当業者に利用可能である。一実施形態では、水溶性ポリマースペーサーは、ヒドロキシアルキルデンプン ( H A S ) 、好ましく

50

は、ヒドロキシエチルデンブン（H E S）である。例えば、その各々が、参照により、すべての目的のために本明細書に組み込まれる、P C T 公開出願番号 W O 2 0 0 5 / 0 1 4 0 5 0 、 W O 2 0 0 5 / 0 1 4 6 5 5 、 W O 2 0 0 5 / 0 9 2 3 9 0 、 W O 2 0 0 7 / 0 3 1 2 6 6 、 W O 2 0 0 5 / 0 9 2 9 2 8 および W O 2 0 0 5 / 0 9 2 3 9 1 を参照のこと。用語「h a s 化」および「h e s 化」とは、それぞれ、H A S およびH E S のコンジュゲーションを指す。

#### 【 0 2 2 1 】

化合物の精製。本明細書に記載された化合物の精製は、一般に、当業者に利用可能な方法をたどる。通常の精製手順では、粗ペプチド - P E G コンジュゲートをまず、イオン交換クロマトグラフィー、例えば、Macro Cap S P 陽イオン交換体カラムによって精製する。通常の精製手順は、バッファー A ( 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー、p H 5 . 0 ) およびバッファー B ( 2 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー、p H 5 . 0 、 0 . 5 M 塩化ナトリウム ) を、勾配溶出プログラム、例えば、0 ~ 0 % バッファー B ( 2 0 分 ) とそれに続く 0 ~ 5 0 % バッファー B ( 5 0 分 ) 、次いで、1 0 0 % バッファー B ( 2 0 分 ) で使用する。流速は、通常、3 m L / 分である。収集された画分の S D S ポリアクリルアミドゲル可視化、続いて、適した画分プールの水に対する透析および得られたものの凍結乾燥を実施する。解析特性決定は、通常、M A L D I 質量分析を使用する。

10

#### 【 0 2 2 2 】

#### I V . 使用方法

一態様では、疾患または障害を治療するための方法が提供される。本方法は、有効量の本明細書に記載された化合物または医薬組成物を、治療を必要とする対象に投与することを含む。

20

#### 【 0 2 2 3 】

本明細書において使用される場合、「対象」は、それだけには限らないが、ラット、マウスおよびヒトを含めた任意の哺乳類を含み得る。「対象」はまた、家畜（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）ならびにその他の動物も含む。本明細書において使用される場合、また当技術分野で十分に理解されるように、「治療」は、臨床結果を含めた、有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。疾患、障害または状態を「治療すること」、「緩和すること」または「寛解させること」とは、障害を治療していないのと比較して、障害または疾患状態の程度、状態の望ましくない臨床兆候または両方が減少することおよび/または進行の経時的推移が減速されること（すなわち、時間が延ばされること）を意味する。本明細書に開示された方法の目的のための、有益なまたは所望の臨床結果として、それだけには限らないが、検出可能であろうと、検出不可能であろうと、1種または複数の症状の軽減または寛解、障害の程度の縮小、障害の安定化された（すなわち、悪化していない）状態、障害進行の遅延または減速、障害の寛解または緩和および緩解（部分であろうと完全であろうと）が挙げられる。「治療」はまた、治療を受けない場合に予測される生存と比較した、生存の延長を意味する場合もある。さらに、治療は、1用量の投与によって必ずしも起こらず、一連の用量の投与の際に起こることが多い。したがって、「治療上有効な量」、緩和するのに十分な量または疾患、障害もしくは状態を治療するのに十分な量が、1回または複数回の投与で投与され得る。

30

#### 【 0 2 2 4 】

ある実施形態では、疾患または障害は、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、肥満症、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、鬱血性心不全、卒中、高コレステロール血症、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流、摂食障害、妊娠糖尿病、糖尿病性神経障害、肺高血圧症または不十分な臍臓細胞量である。ある実施形態では、対象は、食物摂取を調節、体重を調節または造血を調節するための治療を必要としている。

40

#### 【 0 2 2 5 】

一実施形態では、疾患または障害は、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病または妊娠糖尿病である。一実施形態では、疾患または障害は、肥満症である。一実施形態では、疾患または障害は、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、卒中、心血管疾患、心

50

筋虚血、心筋再灌流または肺高血圧症である。一実施形態では、疾患または障害は、脂質異常症または高コレステロール血症である。

【0226】

一実施形態では、疾患または障害は、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、鬱血性心不全、卒中、高コレステロール血症、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流、妊娠糖尿病、糖尿病性神経障害、肺高血圧症または不十分な脾臓細胞量であり、それを必要とする対象は、過体重、肥満、極度肥満であるか、または体重低減を必要としている。一実施形態では、疾患または障害は、糖尿病、2型糖尿病、糖尿病性神経障害または不十分な脾臓細胞量であり、それを必要とする対象は、過体重、肥満、極度肥満であるか、または体重低減を必要としている。

10

【0227】

本明細書に記載された任意の方法に加えて、一実施形態では、式(I)の化合物のP<sub>1</sub>またはエキセンディン類似体は、[Leu<sup>1-4</sup>]エキセンディン-4または[Leu<sup>1-4</sup>, Lys<sup>4-0</sup>]エキセンディン-4である。一実施形態では、式(I)の化合物のP<sub>2</sub>またはアミリン類似体は、ダバリチド(davalitide)または[des-Lys<sup>1</sup>] - ダバリチドである。一実施形態では、式(I)の化合物のPSは、ポリエチレングリコールまたはその誘導体であり、ポリエチレングリコールまたはその誘導体は直鎖である。一実施形態では、化合物は、化合物14である。

【0228】

V. アッセイ

20

本明細書に記載されたデュアルコンジュゲート化合物は、当業者に一般に公知である結合アッセイ方法論を使用する種々の受容体結合アッセイにおいて試験され得る。このようなアッセイとして、本明細書に記載されたものが挙げられる。

【0229】

食物摂取。さまざまな食物摂取アッセイが、当業者には利用可能である。例えば、食物摂取のいわゆる「ホームケージモデル」では、対象(例えば、ラット)は、そのホームケージ中で維持し、試験化合物の注射後に対象の総重量とともに食物摂取を測定する。食物摂取アッセイのいわゆる「給餌パターンモデル」では、対象(例えば、ラット)を、給餌チャンバーに対して、また試験の前の注射に対して慣れらす。試験化合物を投与した後、対象を給餌チャンバー中に直ちに入れ、食物摂取を、時間の関数(例えば、1分間隔)として自動的に決定する。両試験のために、食物は、標準固形飼料または当技術分野で公知のさまざまな固形飼料のうちいずれか(例えば、「高脂肪」)である。いわゆる「マウス食物摂取」アッセイでは、試験化合物は、食欲抑制について、または食餌誘導性肥満症(DIO)マウスにおける体重増加に対する効果について試験され得る。通常のマウス食物摂取アッセイでは、雌のNIH/Swissマウス(8~24週齢)が、12:12時間明:暗周期で0600に明かりをつけて群で収容される。水および標準ペレットマウス固形飼料食は、記載がなければ自由に利用可能とする。動物を、実験の1日前におよそ1500時間で開始して絶食させる。実験の朝、動物を実験群に分割する。通常の研究では、n=3匹のマウス/ケージを有する4ケージ。時間=0分で、すべての動物に、通常、約10nmol/kg~75nmol/kgの範囲の量で媒体または化合物の腹腔内注射を行い、予め秤量した量(10~15g)の標準固形飼料を直ちに与える。種々の時点、通常、30、60および120分で食物を取り出し、秤量して、消費された食物量を決定する。例えば、Morley et al., 1994, Am. J. Physiol. 267:R178-R184参照のこと)。食物摂取は、時間=0で最初に提供された食物の重量から、例えば、30、60、120、180および/または240分の時点で残っている食物の重量を差し引くことによって算出する。有意な治療効果は、ANOVAによって同定される(p<0.05)。有意差が存在する場合には、ダネット試験(Prism v. 2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, Calif.)を使用して試験平均値を対照平均値と比較する。本明細書に記載された任意の試験について、試験化合物の投与は、注射(例えば、皮下、腹腔内など)、経口または当技術分野で公知のその他の投与方法を

30

40

50

含めた任意の手段によってであり得る。

【0230】

さらなる例示的アッセイは、代謝疾患のための食餌誘導性肥満（DIO）マウスモデルの使用を含む。治療期間に先立って、雄のC57BL/6Jマウスに高脂肪食（#D12331、脂肪に由来する58%のカロリー；Research Diets, Inc.）を、4週齢で開始して6週間、給餌してもよい。研究の間、マウスは、その高脂肪食を食べ続けてよい。水は、研究を通じて自由に提供され得る。同様の齢の非肥満マウスの1群は、代謝パラメータをDIO群と比較する目的で低脂肪食（#D12329、脂肪に由来する11%のカロリー）を給餌され得る。DIOマウスに、媒体[例えば、水中、50%ジメチルスルホキシド（DMSO）]または本明細書に記載された化合物のいずれかを送達するよう、皮下（SC）肩甲骨内浸透圧ポンプを埋め込んでもよい。後者の群のポンプは、任意の量、例えば、1000 μg/kg/dの化合物を、7～28日間送達するよう設定され得る。

10

【0231】

血糖。血糖は、種々の市販の試験キットのうちいずれか、例えば、One Touch（登録商標）Ultra（登録商標）（LifeScan, Inc. Milpitas, CA）によって測定され得る。

【0232】

カルシトニンアデニレートシクラーゼアッセイ（機能アッセイ）。カルシトニン受容体媒介性アデニレートシクラーゼ活性化は、Cis Bio（Bedford, MA）製のHTRF（ホモジニアス時間分解蛍光）細胞ベースのcAMPアッセイキットを使用して測定され得る。このキットは、d2アクセプターフルオロフォアを用いて標識されたcAMPおよびドナーウロピウムクリプテートを用いて標識された抗cAMPモノクローナル抗体を使用する競合イムノアッセイである。cAMPレベルの増大は、ドナーおよびアクセプター間の時間分解蛍光エネルギー移動の減少として記録される。ペプチドは、バッファーを用いて段階希釈され、例えば、384ウェルの化合物プレートに移され得る。ラットC1aカルシトニン受容体を安定に発現するC1a-HEK細胞は、細胞培養フラスコから剥離され、500 μM IBMXおよびd2フルオロフォアを1:40で含有する刺激バッファーに2×10<sup>6</sup>個の細胞/mlで再懸濁され得る。細胞は、ウェルあたり12,500個の密度で化合物プレートに加えられ、受容体活性化のために、室温、暗所で30分間インキュベートされ得る。続いて、細胞は、キットコンジュゲート/溶解バッファー（1:40）で希釈された抗cAMPクリプテート溶液の付加によって溶解され得る。暗所で1～24時間インキュベートされた後、プレートは、時間分解蛍光エネルギー移動を測定できるTecan Ultra（Tecan Group, Ltd. Mannedorf, Switzerland）でカウントされ得る。

20

【0233】

GLP-1アデニル酸シクラーゼアッセイ（機能アッセイ）。GLP-1受容体媒介性アデニル酸シクラーゼ活性化は、Cis Bio製のHTRF[均一時間分解蛍光(Homogenous Time-Resolved Fluorescence)]細胞ベースのcAMPアッセイキットを使用して測定され得る。このキットは、d2アクセプターフルオロフォアで標識されたcAMPと、ドナーウロピウムクリプテートで標識された抗cAMPモノクローナル抗体とを使用する競合イムノアッセイである。cAMPレベルの増大は、ドナーおよびアクセプター間の時間分解蛍光エネルギー移動の減少として記録される。ペプチドは、バッファーで段階希釈され、384ウェル化合物プレートに移され得る。ラットGLP-1受容体を内因性に発現するラット甲状腺C細胞株6-23細胞は、細胞培養フラスコから剥離され、500 μMのIMXおよび1:40でd2フルオロフォアを含有する刺激バッファーに、2.5×10<sup>6</sup>個細胞/mlで再懸濁され得る。細胞は、ウェルあたり12,500個の密度で化合物プレートに添加され、受容体活性化のために、室温、暗所で30分間インキュベートされ得る。細胞は、続いて、キットコンジュゲート/溶解バッファー（1:40）で希釈された抗cAMPクリプテート溶液の添加によって溶解され得る。暗所で1～24時

30

40

50

間インキュベートした後、時間分解蛍光エネルギー移動を測定できる T e c a n U l t r a でプレートをカウントしてもよい。

【 0 2 3 4 】

アミリン結合アッセイ。例示的化合物の、アミリン受容体との結合の評価は、ラット脳から調製された側坐核膜において以下のとおりに実施され得る。雄の Sprague - Dawley (登録商標) ラット (200 ~ 250) グラムは、断頭によって屠殺され得る。脳が取り出され、冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に入れられ得る。腹側表面から、嗅索によって外側に境界され、これらの索から内側に45度で伸びる視床下部の吻側が切断され得る。側坐核および周囲の領域を含有するこの前脳基底組織は秤量され、氷冷20 mM HEPESバッファー (23の20 mM HEPES酸、NaOHで7.4にpH調整された) 中でホモジナイズされ得る。48,000 × Gで15分間の遠心分離によって、新鮮なバッファー中で3回、膜が洗浄され得る。最終膜ペレットは、0.2 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) を含有する20 mM HEPESバッファーに再懸濁され得る。

【 0 2 3 5 】

<sup>1 2 5</sup> I - アミリン結合を測定するために (例えば、Beaumont K et al., 1995, Can J Physiol Pharmacol. 73(7):1025-9を参照のこと)、4 mg の元の湿重の組織から得られた膜が、0.5 mg / ml バシトラシン、0.5 mg / ml ウシ血清アルブミンおよび0.2 mM PMSF を含有する20 mM HEPESバッファー中で、12 ~ 16 pM の<sup>1 2 5</sup> I - アミリンとともにインキュベートされ得る。溶液は、2で60分間インキュベートされ得る。インキュベーションは、放射標識されたペプチドの非特異的結合を低減するために0.3 % ポリエチレンイミン中に4時間予備浸漬されたGF / B ガラスファイバーフィルター (Whatman Inc.、Clifton, N. J.) を通した濾過によって終了され得る。フィルターは、5 ml の冷PBSを用いて濾過の直前に、15 ml の冷PBSを用いて濾過の直後に洗浄され得る。フィルターは、取り出され、ガンマカウンターで、例えば、77 % のカウント効率で放射能が評価され得る。10 - 12 ~ 10 - 6 M の標識されていない試験化合物の存在下で結合を測定することによって競合曲線が作製され得、4 - パラメータロジスティック方程式 (Inplot program; GraphPAD Software, San Diego) を使用する非線形回帰によって解析され得る。別のアミリン受容体結合アッセイでは、細胞株、例えば、Codex

ACTOne (商標) 細胞株において異所的に発現されたヒトアミリン受容体3 (AMY3) から<sup>1 2 5</sup> I - アミリン (ラット) が置換される。この細胞株は、ヒトRAMP3 (NCBIタンパク質データベースCAA04474) を安定に発現して、ヒトAMY3受容体を製造するACTOne (商標) HEK293 - CNG - hCalCR細胞株 (CB - 80200 - 258) を使用して作製され得る。

【 0 2 3 6 】

CGRP受容体結合アッセイ。本明細書に記載された化合物の、CGRP受容体との結合の評価は、CGRP受容体を発現すると知られているSK - N - MC細胞から調製された膜を使用することを除いて、本質的に、アミリンについて記載されたとおりであり得る。例えば、Muff, R et al., Ann NY Acad. Sci. 1992, 657:106-16を参照のこと。結合アッセイは、13,500 cpm の<sup>1 2 5</sup> I - hCGRP / ウエルまたは21.7 pM / ウエル (Amersham) を使用することを除いて、アミリンについて記載されたとおりに実施され得る。

【 0 2 3 7 】

アドレノメデュリン結合アッセイ。アドレノメデュリン受容体との結合は、ウェルあたり25 ~ 30,000個細胞の最適条件を使用するサイクリックAMPについてのPerkin Elmer AlphaScreen (商標) アッセイを使用して、アドレノメデュリン受容体を含有するH U V E C (Kato Jet. al., Eur J Pharmacol. 1995, 289:383-5) を使用して調査され得る。cAMPレベルの上昇は、C R O 細胞と比較してH U V E C については大きくない。そのようなものとして、必要に応じて、C R O 細胞が、それら

10

20

30

40

50

がアドレノメデュリン受容体を発現しないので陰性対照として選択され得る。

【0238】

カルシトニン受容体結合アッセイ。カルシトニン受容体との結合は、カルシトニン受容体も発現するC R O細胞またはT 4 7 D細胞を使用して調査され得る。例えば、Muff R. et.al, 同著; Kuestner RE. et. al. Mol Pharmacol. 1994, 46:246-55を参照のこと。

【0239】

G L P - 1受容体結合アッセイ。G L P - 1受容体結合活性および親和性は、受容体供給源がR I N m 5 F細胞膜であり、リガンドが、[<sup>125</sup>I]G L P - 1である結合置換アッセイを使用して測定され得る。ホモジナイズされたR I N m 5 F細胞膜は、4 0 , 0 0 0 c p m e 2 5 I ] G L P - 1トレーサーおよび種々の濃度の試験化合物を有する2 0 m M H E P E Sバッファー中、2 3 で2時間、一定に混合しながらインキュベートされ得る。反応混合物は、0 . 3 % P E I溶液を用いて予備浸漬され、氷冷リン酸緩衝生理食塩水を用いてすすぐれたガラスフィルターパッドを通して濾過され得る。結合しているカウントは、シンチレーションカウンターを使用して決定され得る。結合親和性は、Graph Pad Prismソフトウェア(Graph Pad Software, Inc.、San Diego, CA)を使用して算出され得る。

【0240】

腎臓空胞形成アッセイ。腎臓空胞形成アッセイは、当技術分野で公知のように、糸球体による濾過負荷を測定するのに有用である。近位尿細管の内側の上皮細胞の細胞質における空胞の存在は、当技術分野で公知の顕微鏡法によって観察される。いずれかの理論に拘泥するものではないが、ペグ化タンパク質は、糸球体によってゆっくりと濾過され、ピノサイトシスによって近位尿細管の内側の上皮細胞のリソソーム中に取り込まれると考えられる。リソソーム酵素は、タンパク質成分を処理(例えば、加水分解)できるが、P E G成分はできない。次いで、P E Gの吸湿性がリソソームの流体膨張を引き起こし、これが観察される。

【0241】

V I . 医薬組成物

一態様では、本明細書に記載されるようなペプチドコンジュゲートを、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。

【0242】

A . 製剤

本明細書に記載された化合物は、さまざまな経口、非経口および局所剤形で調製され、投与され得る。したがって、本明細書に記載された化合物は、注射(例えば、静脈内に、筋肉内に、皮内に、皮下に、十二指腸内にまたは腹腔内に)によって投与され得る。また、本明細書に記載された化合物は、吸入によって、例えば、鼻腔内に投与され得る。さらに、化合物は、経皮的に投与され得る。複数の投与経路(例えば、筋肉内、経口、経皮)を使用して、化合物を投与してもよいということも想定される。したがって、本明細書はまた、医薬上許容される担体または賦形剤と、1種または複数の本明細書に記載された化合物とを含む医薬組成物を提供する。

【0243】

本明細書に記載された化合物から医薬組成物を調製するために、医薬上許容される担体は、固体または液体のいずれであってもよい。固体形態調製物として、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、カシェ剤、坐剤および分散性顆粒剤が挙げられる。固体担体は、希釈剤、香味剤、結合剤、保存料、錠剤崩壊剤またはカプセル化材料としても作用し得る1種または複数の物質であり得る。

【0244】

散剤では、担体は、微粉化活性成分との混合物中の微粉化固体である。錠剤では、活性成分は、必要な結合特性を有する担体と、適した割合で混合され、所望の形状および大きさに圧縮される。

【0245】

10

20

30

40

50

散剤および錠剤は、5%～70%の活性化合物を含有することが好ましい。適した担体として、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、低融点ワックス、ココアバターなどがある。用語「調製物」は、カプセル剤を提供する担体としてカプセル化材料を有する活性化合物の製剤を含むものとし、これでは、その他の担体を含むか、または含まない活性成分が、担体によって囲まれて、したがって、それを伴っている。同様に、カシェ剤およびロゼンジ剤が含まれる。錠剤、散剤、カプセル剤、丸剤、カシェ剤およびロゼンジ剤は、経口投与に適した固体剤形として使用され得る。

## 【0246】

10

坐剤を調製するには、脂肪酸グリセリドまたはココアバターの混合物などの低融点ワックスを、まず、融解し、攪拌によってのように、それに活性成分を均一に分散させる。融解された均一な混合物を、次いで、好都合な大きさの型に注ぎ入れ、放冷し、それによって、凝固させる。

## 【0247】

液体形態調製物として、溶液、懸濁液およびエマルジョン、例えば、水または水／プロピレングリコール溶液が挙げられる。非経口注射用には、ポリエチレングリコール水溶液中の溶液で液体調製物が製剤され得る。

## 【0248】

20

非経口適用が必要であるか、または望ましい場合には、本明細書に記載された化合物に特に適した混合物として、注射用滅菌溶液、好ましくは、油性または水性溶液ならびに懸濁液、エマルジョンまたは坐剤を含めたインプラントがある。特に、非経口投与のための担体として、デキストロースの水溶液、生理食塩水、純水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ピーナッツオイル、ゴマ油、ポリオキシエチレンプロックポリマーなどが挙げられる。アンプルは、好都合な単位投与物である。本明細書に記載された化合物はまた、リポソームに組み込まれ得るか、または経皮ポンプもしくはパッチを介して投与され得る。本明細書に記載された方法において使用するための適した医薬混合物として、例えば、PHARMACEUTICAL SCIENCES (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA)およびWO 96/05309に記載されるものが挙げられ、それら両方の教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

## 【0249】

経口使用に適した水溶液は、活性成分を水に溶解することおよび必要に応じて、適した着色剤、香味料、安定化剤および増粘剤を添加することによって調製され得る。経口使用に適した水性懸濁液は、微粉化活性成分を、天然または合成ゴム、樹脂、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよびその他の周知の懸濁剤などの粘性材料とともに水に分散させることによって製造され得る。

## 【0250】

40

使用直前に、経口投与用液体形態調製物に変換されるよう意図される固体形態調製物も含まれる。このような液体形態として、溶液、懸濁液およびエマルジョンが挙げられる。これらの調製物は、活性成分に加えて、着色料、香味料、安定化剤、バッファー、人工および天然甘味料、分散剤、増粘物、可溶化剤などを含有し得る。

## 【0251】

医薬調製物は、単位剤形であることが好ましい。このような形態では、調製物は、適当な分量の活性成分を含有する単位用量に細分割される。単位剤形は、バイアルまたはアンプルにパケットされた錠剤、カプセル剤および散剤などの、パッケージ調製物、個別の分量の調製物を含有するパッケージであり得る。また、単位剤形は、カプセル剤、錠剤、カシェ剤もしくはロゼンジ剤自体であり得るか、またはパッケージングされた形態の、適当な数のこれらのうち任意のものであり得る。

## 【0252】

50

単位用量調製物中の活性成分の分量は、活性成分の特定の適用および効力に従って、例

えば、 $1 \mu\text{g} \sim 300 \text{mg}$ 、 $10 \mu\text{g} \sim 300 \text{mg}$ 、 $0.1 \text{mg} \sim 300 \text{mg}$ 、 $0.1 \text{mg} \sim 100 \text{mg}$ 、 $1.0 \text{mg} \sim 300 \text{mg}$ 、 $1.0 \text{mg} \sim 100 \text{mg}$ 、より通常には、 $0.1 \text{mg} \sim 10 \text{mg}$ 、さらにより通常には、 $0.1 \text{mg} \sim 5 \text{mg}$ で変えられ、または調整され得る。一実施形態では、1日用量は、 $1 \mu\text{g} \sim 1000 \mu\text{g}$ 、例えば、 $10 \mu\text{g} \sim 500 \mu\text{g}$ 、 $50 \mu\text{g} \sim 500 \mu\text{g}$ または $100 \mu\text{g} \sim 400 \mu\text{g}$ である。一実施形態では、1週間用量は、 $1 \mu\text{g} \sim 7000 \mu\text{g}$ 、例えば、 $10 \mu\text{g} \sim 3500 \mu\text{g}$ 、 $50 \mu\text{g} \sim 3500 \mu\text{g}$ または $100 \mu\text{g} \sim 2800 \mu\text{g}$ である。一実施形態では、1週間用量は、 $7 \mu\text{g} \sim 7000 \mu\text{g}$ 、例えば、 $70 \mu\text{g} \sim 3500 \mu\text{g}$ 、 $350 \mu\text{g} \sim 3500 \mu\text{g}$ および $700 \mu\text{g} \sim 2800 \mu\text{g}$ である。一実施形態では、1週間用量は、 $100 \mu\text{g} \sim 350 \mu\text{g}$ である。一実施形態では、1日投与量範囲の下端は、 $10 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 、 $30 \mu\text{g}$ 、 $40 \mu\text{g}$ 、 $50 \mu\text{g}$ 、 $60 \mu\text{g}$ 、 $70 \mu\text{g}$ 、 $80 \mu\text{g}$ 、 $90 \mu\text{g}$ 、 $100 \mu\text{g}$ 、 $150 \mu\text{g}$ 、 $200 \mu\text{g}$ 、 $250 \mu\text{g}$ 、 $300 \mu\text{g}$ 、 $350 \mu\text{g}$ またはそれを超える。一実施形態では、1日投与量範囲の上端は、 $1 \text{mg}$ 、 $2 \text{mg}$ 、 $3 \text{mg}$ 、 $4 \text{mg}$ 、 $5 \text{mg}$ 、 $6 \text{mg}$ 、 $7 \text{mg}$ 、 $8 \text{mg}$ 、 $9 \text{mg}$ 、 $10 \text{mg}$ 、 $20 \text{mg}$ 、 $30 \text{mg}$ 、 $60 \text{mg}$ 、 $100 \text{mg}$ 、 $200 \text{mg}$ 、 $300 \text{mg}$ またはそれを超える。一実施形態では、好み $1$ 日投与量範囲は、 $0.1 \text{mg} \sim 60 \text{mg}$ 、好み $1$ は、 $0.15 \text{mg} \sim 30 \text{mg}$ 、より好み $1$ は、 $0.15 \text{mg} \sim 10 \text{mg}$ 、さらにより好み $1$ は、 $0.15 \sim 0.3 \text{mg}$ である。一実施形態では、1日用量は、 $0.1 \text{mg}$ 、 $0.2 \text{mg}$ 、 $0.3 \text{mg}$ 、 $0.4 \text{mg}$ 、 $0.5 \text{mg}$ 、 $1.0 \text{mg}$ 、 $1.5 \text{mg}$ 、 $2.0 \text{mg}$ 、 $2.5 \text{mg}$ 、 $3.0 \text{mg}$ 、 $4.0 \text{mg}$ またはさらに $5.0 \text{mg}$ である。一実施形態では、1週間用量は、 $0.1 \text{mg}$ 、 $0.2 \text{mg}$ 、 $0.3 \text{mg}$ 、 $0.4 \text{mg}$ 、 $0.5 \text{mg}$ 、 $1.0 \text{mg}$ 、 $1.5 \text{mg}$ 、 $2.0 \text{mg}$ 、 $3.0 \text{mg}$ 、 $4.0 \text{mg}$ 、 $5.0 \text{mg}$ 、 $6.0 \text{mg}$ 、 $7.0 \text{mg}$ 、 $8.0 \text{mg}$ 、 $9.0 \text{mg}$ 、 $10 \text{mg}$ 、 $20 \text{mg}$ 、 $30 \text{mg}$ 、 $35 \text{mg}$ またはさらにそれを超える。組成物は、必要に応じて、他の適合する治療剤も含有し得る。

### 【0253】

一部の化合物は、制限された水への溶解度を有し得、したがって、組成物において界面活性剤またはその他の適当な共溶媒が必要であり得る。このような共溶媒として、ポリソルベート $20$ 、 $60$ および $80$ ；Pluronics F-68、F-84およびP-103；シクロデキストリン；およびポリオキシル $35$ ヒマシ油が挙げられる。このような共溶媒は、通常、約 $0.01$ 重量%から約 $2$ 重量%の間のレベルで使用される。

### 【0254】

製剤の分注における可変性を低減するために、製剤の懸濁液もしくはエマルジョンの成分の物理的分離を低減するために、および/またはそうではなく製剤を改善するために、単純水溶液の粘度を超える粘度が望ましい場合がある。このような粘度上昇剤(viscosity building agent)として、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、コンドロイチン硫酸およびその塩、ヒアルロン酸およびその塩ならびに前記のものの組合せが挙げられる。このような薬剤は、通常、約 $0.01$ 重量%から約 $2$ 重量%の間のレベルで使用される。

### 【0255】

本明細書に記載された組成物は、徐放および/または快適さを提供するための成分をさらに含み得る。このような成分として、高分子量、陰イオン性ムコミメティック(mucomimetic)ポリマー、ゲル形成多糖および微粉化薬物担体基質が挙げられる。これらの成分は、米国特許第 $4,911,920$ 号；同 $5,403,841$ 号；同 $5,212,162$ 号および同 $4,861,760$ 号において、より詳細に論じられている。これらの特許の全内容は、その全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

### 【0256】

#### B. 有効投与量

本明細書において提供される医薬組成物は、活性成分が、治療上有効な量で、すなわち、その意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物を含む。特定の適用に

10

20

30

40

50

とって有効な実際の量は、とりわけ、治療されている状態に応じて変わる。例えば、精神神経疾患または障害を治療するための方法において投与される場合には、このような組成物は、所望の結果（例えば、精神神経疾患または障害の症状を軽減すること）を達成するのに有効な活性成分の量を含有する。

【0257】

投与される化合物の投与量および頻度（単回用量または複数回用量）は、投与経路；レシピエントの大きさ、年齢、性別、健康、体重、肥満度指数および食餌；治療されている疾患の症状の性質および程度（例えば、寛解に応答する精神神経疾患）；その他の疾患の存在またはその他の健康と関連する問題；併用する治療の種類；および任意の疾患または治療レジメンからの合併症を含めたさまざまな因子に応じて多様であり得る。その他の療法レジメンまたは治療剤を、本明細書に記載された方法および化合物とともに使用してもよい。

10

【0258】

本明細書に記載された任意の化合物について、治療上有効な量は、それだけには限らないが、細胞培養アッセイおよび行動アッセイを含めたさまざまなアッセイからまず決定され得る。標的濃度は、細胞培養アッセイにおいて生物学的応答を誘発できるか、または行動応答を誘発できる活性化合物（単数または複数）の濃度となる。

【0259】

ヒトにおいて使用するための治療上有効な量は、動物モデルから決定され得る。例えば、ヒトのための用量は、動物において有効であると見出されている濃度を達成するよう製剤され得る。ヒトにおける投与量は、当技術分野で公知のように、および／または本明細書に記載されるように、根底にある精神神経疾患または障害をモニタリングすることおよび投与量を上方または下方調整することによって調整され得る。

20

【0260】

投与量は、患者の必要条件および使用されている化合物に応じて多様であり得る。本明細書に記載された方法との関連において患者に投与される用量は、患者において経時的に有益な治療応答を達成するのに十分でなくてはならない。用量の大きさはまた、任意の有害な副作用の存在、性質および程度によって決定される。一般に、治療は、化合物の最適用量未満である少ない投与量で開始される。したがって、投与量は、環境下で最適効果が到達されるまで、小さい増分で増加される。一実施形態では、投与量範囲は、0.001%～10% w/vである。別の実施形態では、投与量範囲は、0.1%～5% w/vである。

30

【0261】

投与量および間隔は、治療されている特定の臨床適応症にとって有効な、投与される化合物のレベルを提供するよう、個々に調整され得る。これは、個体の病状の重篤度と釣り合った療法レジメンを提供する。

【0262】

本明細書に提供された教示を利用して、実質的な毒性を引き起こさないが、特定の患者によって示された臨床症状を治療するのに完全に有効である、有効な予防的または治療的治療レジメンが計画され得る。この計画は、化合物の効力、相対的バイオアベイラビリティ、患者体重、有害な副作用の存在および重篤度、好ましい投与方式ならびに選択された薬剤の毒性プロフィールなどの因子を考慮することによって活性化合物を注意深く選択することを含まなくてはならない。

40

【0263】

C. 毒性

特定の化合物の毒性および治療効果間の比は、その治療指数であり、LD<sub>50</sub>（集団の50%において致死的である化合物の量）とED<sub>50</sub>（集団の50%において有効な化合物の量）の間の比として表され得る。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイおよび／または動物研究から得られた治療指数データは、ヒトにおいて使用するための投与量の範囲の製剤に使用され得る。このような化合物の投与量は、ED<sub>50</sub>を含み

50

、毒性がほとんどないか、または全くない血漿濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で多様であり得る。例えば、Fingl et al., In: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ch.1, p.1, 1975参照のこと。正確な製剤、投与経路および投与量は、患者の状態および化合物が使用される特定の方法を考慮して個々の医師によって選択され得る。

【実施例 1】

【0264】

本明細書に記載された化合物の代表的合成

ペプチドを、Fmoc化学を用いるABI 433Aシンセサイザーで合成した。分取逆相HPLCを、Waters 2525 Prep HPLC Pump、2767サンプルマネージャー、2487二重吸光度検出器およびMicromass（登録商標）ZQ（商標）質量分析計からなるWaters HPLC/MSシステムで実施した。粗ペプチドは、Kromasil C4カラムを備えたWaters分取HPLC/MS機器を使用し、30分かけてバッファーA中のバッファーBの直線勾配（25～45%）（バッファーA = 水中、0.05% TFA；バッファーB = ACN中、0.05% TFA）および20mL/分の流速を使用して精製した。解析用逆相HPLCは、6120四重極LC/MSを備えたAgilent 1100システムで実施した。

10

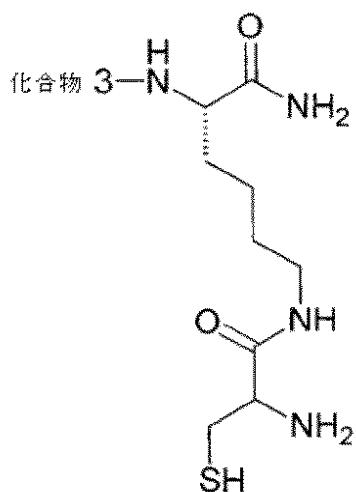
【0265】

化合物14（化合物3-Lys(Cys(#)) [#Mal-PEG40KD-[des-Lys<sup>1</sup>] - 化合物4]。des-Lys<sup>1</sup>-化合物4は、通常のリンクアミド樹脂上のFmoc-アミノ酸を用いて調製した。化合物3-Lys(Cys)アミドは、C末端からの最初の残基、Fmoc-Lys(Boc-Cys(trt))-OHをEMD chemicalsから購入した点を除いて、通常のリンクアミド樹脂上のFmoc-アミノ酸を用いて調製した。両ペプチドは、TFA塩の形態で精製し、使用した。化合物3-Lys(Cys)アミドの構造は以下に示されている：

20

【0266】

【化19】



30

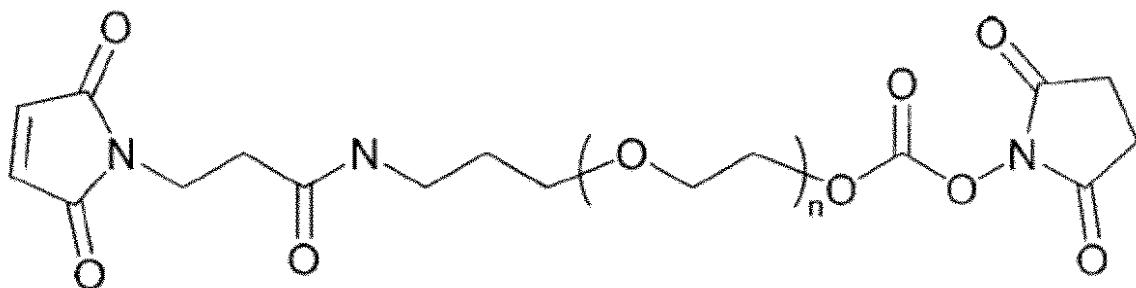
40

【0267】

40Kの二官能性PEG MA-400Tsを、NOF corporationから購入した。MA-400Tsの構造は以下のとおりである：

【0268】

【化 2 0】



10

〔 0 2 6 9 〕

M A - 4 0 0 T s ( 7 . 5 n m o l ) を 1 0 m L の 無 水 D M F に 溶 解 し た。 [ d e s - L y s <sup>1</sup> ] - 化 合 物 4 ( 7 . 4 n m o l ) 、 続 いて、 5 0  $\mu$  L の ジ イ ソ プ ロ ピ ル エ チ ル ア ミ ン ( D I E A ) を 添加 し た。 反 応 物 を 一 晩 静 置 し、 そ の 後、 t e r t - プ チ ル メ チ ル エ テ ル ( T B D M E ) を 添加 し て、 コン ジ ュ ゲ ト を 沈 殿 さ せ た。 粗 化 合 物 を T B D M E を 用 い て 2 回 洗 淨 し、 乾 燥 さ せ、 1 5 m l の 2 0 m M p H 4 . 0 N a O A c バ ッ フ ア - 中 で 再 構 成 し、 次 い で、 自 己 充 填 し た 1 5 m L M a c r o c a p ( 商 標 ) S P カ ラ ム ( G E 、 勾 配 0 ~ 3 0 % ~ 1 0 0 % 、 各 1 3 C V 、 3 m l / 分 ) を 備 え た p H 4 . 0 の F P L C ( A k t a E x p l o r e r 1 0 0 、 G E ) に よ つ て 精 製 し た。 フ ォ ー ル ス ル -(fall through) 画 分 は、 5 m l H i T r a p ( 商 標 ) S P H P カ ラ ム ( G E 、 勾 配 0 ~ 2 0 % ~ 1 0 0 % 、 各 1 5 C V 、 2 m l / 分 ) を 通 し て 再 循 環 さ せ た。 コン ジ ュ ゲ ト、 d e s - L y s 1 - 化 合 物 4 - P E G 4 0 K - M a l の 画 分 を プ ール し、 プ ール の 小 画 分 を 水 に 対 し て 透 析 し、 凍 結 乾 燥 し、 全 収 量 が 4 . 8 n m o l ( 6 4 . 5 % 収 率 ) と い う こ と を 決 定 し た 以 外 は、 次 の 反 応 に 直 ち に 使用 し た。

20

【 0 2 7 0 】

des-Lys1-化合物4-PEG40K-Mal(3.2 nmol)プールに、化合物3-Lys(Cys)(3.2 nmol)を添加し、混合物を一晩静置した。得られた粗物質を、自己充填した15 mL Macrocap(商標)SPカラム(GE製、勾配0~100%、30 CV、3 mL/分)を備えたpH 4.0のFPLCで精製した。最終生成物の画分は、Maldi-TOF MSおよびSDS pageゲル結果に従ってプールし、透析し、凍結乾燥すると、2.3 nmol(71.8%収率)の化合物14が得られた。

30

【 0 2 7 1 】

NuPAGE (登録商標) 4~12% Bis-Trisゲルを使用するSDSポリアクリルアミド電気泳動 (SDS PAGE) は、15ml Macrocap (商標) SPカラムを用いる化合物14のFPLC精製から得られた画分で実施し、その結果が図2Aに示されている。

〔 0 2 7 2 〕

Mal d i - T O F M S 機器を使用する質量分析を、化合物 14 で実施し、結果は図 2 B に示されている。ピークは、24929.73 および 49534.56 (m/z) で観察される。

40

[ 0 2 7 3 ]

別の SDS PAGE 電気泳動図 ( NuPAGE ( 登録商標 ) 4 ~ 12% Bis - Tris ゲル ) を実施して、化合物 14 の濃度に対する効果を実証し、その結果は、図 2 C に示されている。

## 【案例 2】

〔 0 2 7 4 〕

インビトロ機能アッセイ：化合物 12～14

本明細書に記載された L P D H C 化合物および適当な対照化合物を、本明細書に記載さ

50

れるような GLP-1 およびカルシトニンの機能アッセイにおいて活性について調査した。以下の表 3 に示されるように、LDDHC (化合物 12 ~ 14) は、GLP-1 およびカルシトニン機能アッセイの両方においてナノモル範囲の活性を実証する。さらに、驚くべきことに、水溶性ポリマースペーサー PS の大きさは、化合物 13 (10 kDa PEG スペーサー) の化合物 14 (40 kDa PEG スペーサー) との比較によって明らかにインビトロ活性に影響を及ぼす。GLP-1 シクラーゼアッセイデータは、対照ペプチド：エキセンディン-4 EC<sub>50</sub> = 4 pM、GLP-1 EC<sub>50</sub> = 10 pM に対して正規化される。カルシトニンシクラーゼアッセイデータは、対照ペプチド：ダバリンチド EC<sub>50</sub> = 40 pM に対して正規化される。

【0275】

10

表3. インビトロ GLP-1R およびカルシトニン機能アッセイ

【表3】

| 化合物 | GLP-1<br>機能<br>(nmol) | カルシトニン<br>機能<br>(nmol) |
|-----|-----------------------|------------------------|
| 2   | 0.010                 |                        |
| 3   | 0.011                 |                        |
| 4   |                       | 0.040                  |
| 5   |                       | 15.4                   |
| 6   |                       | 1.23                   |
| 7   | 0.073                 |                        |
| 8   | 0.060                 | 1.31                   |
| 9   | 0.044                 | 3.63                   |
| 10  | 6.2                   | 64.5                   |
| 11  | 0.47                  | 7.13                   |
| 12  | 9.6                   | 2.65                   |
| 13  | 1.6                   | 6.9                    |
| 14  | 0.18                  | 0.65                   |

20

30

40

【実施例 3】

【0276】

## インビトロ調査：化合物 14

血糖および体重の経時的推移に対する用量依存的効果を、化合物 14 および対照化合物 1 (エキセンディン-4) について測定した。アッセイ条件は本明細書に記載されている。試験化合物および媒体を、ベースラインサンプリングの直後、0 時間に SC 注射した。対象は、NIH / Swiss 雌マウスとした。化合物 14 を、3、8、25、80 および 250 nmol / kg に投与した。サンプルを 1 日目の間に t = 2、4 および 8 時間に採取し、次いで、5 日目まで毎日採取した。平均処置前血糖は、127 mg / dL であった。図 3A ~ B に示されるように、これらのアッセイにおいて化合物 14 について血糖および体重の用量依存性低下がある。「\*」記号は、ダネット試験を用いる ANOVA を使用して、媒体に対して p < - . 05 を示す。

【実施例 4】

【0277】

## インビトロ調査：化合物 8 および化合物 9

50

直鎖ハイブリッド化合物、化合物8および化合物9を、血糖および体重の経時的推移についてアッセイした。アッセイ条件および実験設計は、上記のとおりとした。試験対象は、N S A 雌マウスとした。化合物は、0時間で250 nmol/kgで投与した。平均処置前血糖は、129 mg/dLであった。図4A～Bに示されるように、化合物8および化合物9は両方とも、血糖の即時の低下を誘発する。図4A～Bによって判断されるように、化合物9は、化合物8と比較して、5日にわたる体重の減少においてより有効である。

【実施例5】

【0278】

インビボ調査：化合物11および化合物14

実施例3について記載された実験系を使用して、25および80 nmol/kgの化合物11および化合物14の投薬を用いて、血糖および体重変化の比較を実施した。図5A～Bに示されるように、化合物14は、少なくとも4日目まで血糖の低下および体重の減少において化合物11よりも有効である。

【実施例6】

【0279】

インビボ調査：化合物1、5、7、14

研究は、相乗的効果またはその他の非相加的効果が、各々、水溶性ポリマースペーサー(P E G 40 kDa)と組み合わせた、単一の生物学的に活性なペプチドのみを有する化合物(化合物5および化合物7)に対してL D D H C化合物(例えば、化合物14)を用いて観察され得るかどうかを調査するよう設計した。血糖および体重手順のためのアッセイおよび実験条件は、上記のとおりとした。試験対象は、N I H / S w i s s 雌マウスとした。対照化合物1を、2.5 nmol/kgで投与した点を除いて、化合物投薬は、25 nmol/kgでとした。図6A～Bに示されるように、化合物14のみが、2～3日目を通して、血糖の低下および体重減少において持続した効果を実証する。化合物5および化合物7の効果は、2日目までに減少した。

【実施例7】

【0280】

食物摂取および体重低減の持続期間：化合物6、7、14

体重に対する化合物14の効果を、雄の非近交系食餌誘導性肥満S p r a g u e D a w l e y ラットにおいて調べた。単独および組み合わせたP E G化親ペプチドに対して、体重の媒体補正された変化パーセントを測定した。薬物は、1週間の間隔をあけた2回の別個の単回注射で皮下投与した。処置群は、以下の表4に列挙されている。

【0281】

表4.DIOラットの体重に対する化合物14の調査のための処置パラダイム

【表4】

| 群 | 化合物       | 用量                     |
|---|-----------|------------------------|
| 1 | 媒体        | 0                      |
| 2 | 化合物7      | 32 nmol/kg (1.4 mg/kg) |
| 3 | 化合物6      | 32 nmol/kg (1.4 mg/kg) |
| 4 | 化合物7+化合物6 | 各々 32 nmol/kg で        |
| 5 | 化合物14     | 32 nmol/kg (1.5 mg/kg) |

【0282】

具体的には、この実験では、単一の活性ペプチド要素を有する化合物(化合物6および化合物7)の、食物摂取および体重の変化に対する作用の持続期間を、これらの化合物の組み合わせた投薬に対して、さらに、40 kDa P E G水溶性ポリマースペーサーによ

10

20

30

40

50

って分離されている化合物 6 ~ 7 の活性ペプチド要素を有する L D D H C 化合物 1 4 に対して比較した。すべての化合物は、3 2 n m o l / k g で投与した。組合せ投薬では、化合物 6 および化合物 7 の各々を、3 2 n m o l / k g で投与した。試験対象は、D I O ラット (n = 6 / 群、体重ベースライン = 4 7 8 g ) とした。投薬は、0 および 7 日目に行った。

【0 2 8 3】

図 7 A ~ B に示されるように、化合物 1 4 を用いて、化合物 6 もしくは化合物 7 のいずれかに対して、またはそれらの組み合わせた投与に対して、食物摂取および体重の両方における比較的小さいが、統計的に有意な低減 (媒体補正された%) が観察される。

【実施例 8】

【0 2 8 4】

生体重比較：化合物 6、7、1 4

これまでの実施例に記載された実験を、生体重についてさらに解析した。図 8 に示されるように、化合物 1 4 を投薬された D I O ラットにおける生体重減少は、同時投与とほぼ等しい単一要素化合物 (化合物 6 / 化合物 7 ) 投与によって誘導されるものの相加的なものである。

【実施例 9】

【0 2 8 5】

薬物動態 / 薬力学結果：化合物 1 4

ラット血漿についての化合物 1 4 P K E L I S A。血漿中の化合物 1 4 の定量化のためのイムノアッセイを開発した。このアッセイは、2 種のモノクローナル抗体を使用する 2 部位「サンドイッチ」イムノアッセイである。Imm u l o n (商標) 2 H B マイクロタイタープレートを、自家マウスモノクローナル抗体を 0 . 2 M 炭酸バッファー (1 0 0  $\mu$  L / ウエル) 中、5  $\mu$  g / mL で用いてコーティングし、2 ~ 8 で一晩インキュベートした。プレートを、P B S T w e e n を用いて 3 回洗浄して、結合していない抗体を除去し、ウェルを、3 % B S A を用いて 1 ~ 2 時間ブロッキングした。アッセイの当日に、ラット血漿中の 1 0 2 , 4 0 0 p g / mL で調製した凍結標準を、ラット血漿中で 1 : 2 段階希釈して、較正曲線を作製した。過剰の 3 % B S A ブロックを洗浄して除去し、1 : 3 の最小の必要な希釈を用いて、2 連でサンプルをウェルに添加した (1 5 0  $\mu$  L / ウエルの総容量)。定量化の上限 (U L O Q) より高いと予測されるサンプルを、Immunochemistry Technologies S D 1 バッファーでアッセイ範囲に希釈した。アッセイ許容性対照として、各プレートで低、中、高および希釈対照について実行した。1 ~ 2 時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (H R P ) がコンジュゲートしている自家モノクローナル抗体を、さらに 1 ~ 2 時間添加する。過剰の H R P を洗浄して除去し、発色基質、T M B を添加する。高標準が 0 . 8 ~ 1 . 0 O D <sub>6 5 0</sub> に達する時点で、0 . 3 M H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> を用いて反応を停止する。データは、5 - パラメータ曲線フィッティングを用いる S o f t m a x (登録商標) P r o を用いて解析する。

【0 2 8 6】

単回用量の際の化合物 1 4 の薬物動態学および薬力学を、2 1 日間にわたって調査した。投薬は、0 . 5 、 1 . 5 および 3 . 0 m g / k g でとした。図 9 A に示されるように、投与量が増大するにつれて、体重の用量依存性低下がある (媒体補正された%)。血漿薬物レベルは、E L I S A アッセイによって決定した。図 9 B に示されるように、これらの実験条件下で化合物 1 4 のほぼ一次のクリアランスがある。

【0 2 8 7】

図 9 B に表されるデータが、以下の表 5 で表にされている。表 5 では、D I O S p r a g u e D a w l e y ラット、n = 6 / 群 (示される場合を除く) への注射後、3 、 7 、 1 4 および 2 1 日目での用量に応じた、体重および化合物 1 4 の対応する血漿レベルの変化が提供されている。2 1 日目での血漿薬物レベルについて、高用量群中の単一の動物のみが、測定可能なレベルの化合物 1 4 を実証した、データは示されていない。最大体重

10

20

30

40

50

減少は、3日目の時点で観察された。BW、体重。

【0288】

表5

【表5】

| 用量           | 3日目△<br>BW(媒体<br>補正された<br>%) | 血漿薬物<br>レベル<br>(ng/mL) | 7日目△<br>BW(媒体<br>補正された<br>%) | 血漿薬物<br>レベル<br>(ng/mL) | 14日目△<br>BW(媒体<br>補正された<br>%) | 血漿薬物<br>レベル<br>(ng/mL) | 21日目△<br>BW(媒体<br>補正された<br>%) |
|--------------|------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| 媒体           | 0.0 ± 0.2                    | ND                     | 0.0 ± 0.4                    | ND                     | 0.0 ± 0.7                     | ND                     | 0.0 ± 0.7                     |
| 0.5<br>mg/kg | -4.9 ± 0.3                   | 233 ± 24               | -4.2 ± 0.3                   | 10 ± 2                 | -3.7 ± 0.7                    | ND                     | -3.4 ± 0.9                    |
| 1.5<br>mg/kg | -7.5 ± 0.7                   | 730 ± 72               | -6.5 ± 0.6                   | 37 ± 6                 | -4.8 ± 0.5                    | 0.5 ± 0.1<br>(n=2)     | -4.3 ± 0.6                    |
| 3.0<br>mg/kg | -9.6 ± 0.6                   | 1377 ±<br>166          | -7.9 ± 0.8                   | 80 ± 19                | -5.7 ± 1.1                    | 11.3 ±<br>0.2 (n=2)    | -4.2 ± 1.3                    |

【実施例10】

【0289】

薬力学および空胞形成アッセイ：化合物6、7、14

これまでの実験に並行した実験では、本明細書に記載されたペグ化化合物の投与の薬力学および腎臓組織学（空胞形成）結果を行った。実験は、これまでの実施例に記載された手順をたどった。累積的食物摂取および体重変化は、試験コホートにおいて決定した。示されたような投薬および持続期間を有する図10A～10Bを参照のこと。化合物6は、累積的食物摂取および体重変化の無視できる低減しか実証しなかった。化合物7または化合物14の投与は、累積的食物摂取および体重の低減両方をもたらした。

【0290】

試験対象は、7日に屠殺し、腎臓を切り出し、病理組織学的解析に付し、結果は以下の表6に示されている。空胞形成解析は、上記のように実施した。化合物6、7または14の投与は、組織学的検査によって判断されるように腎臓空胞形成をもたらさなかった。

【0291】

表6:腎臓空胞形成アッセイ結果

【表6】

| 化合物 | 個々の空胞スコア             | 平均空胞スコア    |
|-----|----------------------|------------|
| 6   | 0,0,0,0,0,0          | 0          |
| 7   | 0,0,0,0,0,0          | 0          |
| 14  | 0,0,0,0,0,0 (すべての用量) | 0 (すべての用量) |

【実施例11】

【0292】

インビトロ機能アッセイ

化合物14のLDH類似体に対する水溶性（PEG）部分の大きさの効果を調査した。それぞれ、30K、60Kおよび80KのPEG部分を有することにおいて化合物14とは異なる、化合物45、46および47のGLP-1およびカルシトニンアッセイにおけるインビトロ機能を、本明細書に記載された方法によって決定した。これらの研究では、GLP-1シクラーゼアッセイデータを、対照ペプチド：エキセンディン-4（EC<sub>50</sub> = 4 pM）、GLP-1（EC<sub>50</sub> = 10 pM）に対して正規化した。カルシトニン

10

20

30

40

50

シクラーゼアッセイデータは、対照ペプチド：ダバリンチド（EC<sub>50</sub> = 40 pM）に対して正規化した。これらのアッセイの結果は、以下の表7で表にされている。

## 【0293】

表7. 化合物14と関連する化合物のインビトロ機能アッセイ

## 【表7】

| 化合物 | GLP-1<br>機能<br>(nmol) | カルシトニン<br>機能<br>(nmol) |
|-----|-----------------------|------------------------|
| 45  | 0.17                  | 3.58                   |
| 46  | 0.17                  | 3.11                   |
| 47  | 0.43                  | 4.42                   |

10

20

30

40

50

## 【実施例12】

## 【0294】

## インビトロ結合および機能アッセイ

化合物4、9、48および14の結合および機能アッセイを実施して、CGRP結合、アドレノメデュリン（AM）受容体結合、これらの化合物のAMシクラーゼEC<sub>50</sub>およびAMシクラーゼIC<sub>50</sub>を決定した。方法は、本明細書に記載されるか、または当技術分野で公知のとおりとした。

## 【0295】

表8

## 【表8】

| 化合物 | CGRP結合<br>IC <sub>50</sub> (nM) | AM結合<br>IC <sub>50</sub> (nM) | AMシクラーゼ<br>EC <sub>50</sub> (nM) | AMシクラーゼ<br>IC <sub>50</sub> (nM) |
|-----|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 4   | 4.3 ± 2.3 (24)                  | 1.2 ± 0.5 (3)                 | >10000 (5)                       | 18 ± 7 (4)                       |
| 9   | 1166 ± 368 (2)                  | 543 (1)                       | >10000 (3)                       | >10000 (2)                       |
| 48  | 760 (1)                         | >10000 (1)                    | >10000 (2)                       | >10000 (1)                       |
| 14  | >1000 (1)                       | >10000 (1)                    | >10000 (2)                       | >10000 (1)                       |

## 【0296】

表8に示されるように、ダバリンチド（化合物4）は、CGRP受容体およびアドレノメデュリン受容体の両方に対して高い効力を示す。対照的に、それにもかかわらず、ダバリンチド成分を有する化合物9、48および14は、両受容体で有意に強力でない。実際、化合物4は、アドレノメデュリンシクラーゼアッセイにおいてアンタゴニストであるのに対し、化合物9、48および14はそうではない。ダバリンチドが強力なアドレノメデュリン受容体アンタゴニスト（IC<sub>50</sub> = 18 nM）であるのにもかかわらず、化合物48および14は、最大10 μMの濃度でアドレノメデュリン受容体の機能的活性化または拮抗作用を示さなかった。したがって、化合物9、48および14は、アミリンおよびアミリノミメティックを認識する細胞受容体に関して、ダバリンチドと比較して驚くべきことに異なる薬理学的プロフィールを示す。したがって、化合物9、48および14は、親ペプチドよりも少ないオフターゲット活性を有する。化合物9、48および14の改善された薬理学的プロフィールは、親ペプチドダバリンチドと比較して、特に、ヒト対象を用いた場合に、重篤な顔面紅潮、恶心および/または嘔吐の減少などの副作用の減少をもたらすと予測される。例えば、CGRPおよびCGRPアゴニストは、ヒト対象において重篤な顔面紅潮ならびにさらに恶心および嘔吐を誘導すると報告されており、これは、幾つかは、CGRP受容体の活性化によると考えられており、CGRPアンタゴニストによつ

て軽減される。化合物9、48および14は、これまでの化合物と比較して、例えば、ダバリンチドと比較して、患者のコンプライアンスの増大を有し、および/または必要に応じた投薬の増大を可能にし、改善された商業的成功をもたらすと予測される。

【実施例13】

【0297】

作用の持続期間に対するPEGの大きさの効果

本明細書に記載された化合物内に含まれるPEGの大きさの影響を評価するために、化合物45、46、47、14aおよび14を使用して、体重に対する経時的な化合物の単回用量の効果の比較を実施した。以下の表9を参照のこと。化合物14aは、化合物14の式構造を有し、合成に使用される異なる40kDaのPEG試薬を有することにおいて化合物14とは異なる。化合物45、46、47および14の合成は、JenKem製の40kDaのPEG試薬を使用したのに対し、化合物14aの合成は、NOF製の40kDaのPEG試薬を使用した。

10

【0298】

表9

【表9】

| 群 | 化合物 | PEGの大きさ | 用量         |
|---|-----|---------|------------|
| 1 | 媒体  | NA      | PBS        |
| 2 | 45  | 30 kDa  | 1.22 mg/kg |
| 3 | 46  | 60 kDa  | 2.07 mg/kg |
| 4 | 47  | 80 kDa  | 2.84 mg/kg |
| 5 | 14a | 40 kDa  | 1.57 mg/kg |
| 6 | 14  | 40 kDa  | 1.5 mg/kg  |

20

【0299】

雄のSprague Dawley DIOラット( $n=6$ )に、表9に列挙された化合物の単回用量を投与し、19日かけて体重をモニタリングした。ベースライン体重は、505g mであった。図11に示されるように、40kDaのPEG部分を有する化合物14および14aは、これらの条件下での体重の減少においてほぼ等しく効果的であった。化合物45(30kDa PEG)、化合物46(60kDa PEG)および化合物47(80kDa PEG)は有意に効果が低かった。

30

【実施例14】

【0300】

体重の変化 - 化合物48および14

実施例13に記載された条件下で、重量減少に対する化合物48の用量の効果を決定した。図12Aに示されるように、化合物48の用量が増大する場合に、重量減少についての用量応答がある。図12Bは、3、7、14および20日の血漿薬物レベルのヒストグラムを表す。

40

【実施例15】

【0301】

化合物の調製

化合物。本明細書に記載された化合物は、以下の例示的方法を含めたいくつかの方法によって合成した。

【0302】

a) 例えば、化合物67は、還元的アルキル化反応において、mPEG40K-アルデヒドを、化合物49のN末端とともに処理して、特異的にN末端がペグ化された化合物49を作製することによって調製した。

【0303】

50

b) 別の例では、化合物 68 を、化合物 50 の N 末端アミノ基を、mPEG40K-NHS (n-ヒドロキシスクシンイミドエステル) と反応させることによって調製した。

【0304】

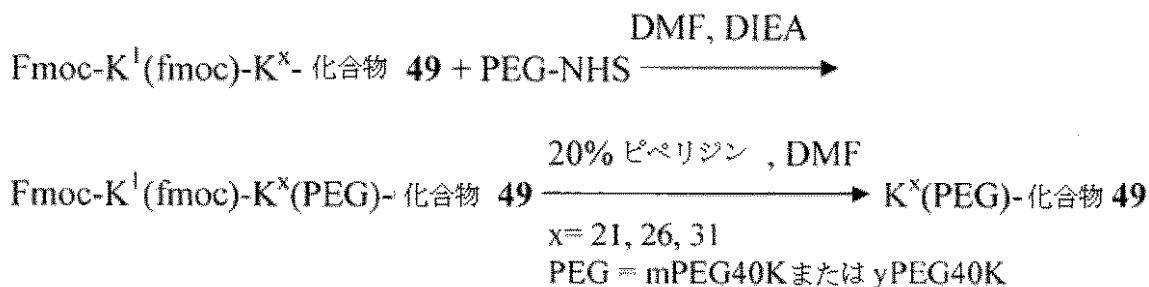
c) 別の実施例では、化合物 69、71、73 および 75 は、以下のスキーム 15 に示されるように調製した。

【0305】

【化21】

スキーム 15.

10



【0306】

DIEA を有する DMF 中で、Fmoc 保護された Lys<sup>1</sup> と、21、26 および 31 位に突然変異リシンを有する化合物 49 の類似体を、mPEG40K-NHS とともに処理した。得られたペグ化ペプチドを、ピペリジンによって脱保護すると、ペグ化遊離ペプチドが得られた。

【0307】

d) 別の例では、リシン側鎖上での選択的ペグ化によって化合物 74、70 および 72 を調製した。DIEA を有する DMF 中で、21、24~29 および 31 位に突然変異リシンを有する化合物 50 の類似体を、mPEG40K-NHS とともに処理した。粗生成物を精製し、領域特異性について解析した。

【実施例 16】

20

【0308】

方法。本明細書に記載された化合物を使用して受容体結合活性アッセイを実施した。受容体結合活性は、例えば、当技術分野で公知のように、4-パラメータロジスティック方程式を使用する反復曲線フィッティングプログラム (PRISM (登録商標)、GraphPad Software、La Jolla、CA) を使用して生データから算出された IC<sub>50</sub> 値として表 10 に表され得る。

【0309】

アミリン受容体結合アッセイについては、RNA 膜を、およそ 20 pM (終濃度) の <sup>1</sup><sub>25</sub>I-ラットアミリン (Bolton-Hunter labeled、Perkin Elmer、Waltham、MA) および漸増濃度の試験化合物とともに、96 ウェルポリスチレンプレートにおいて、周囲温度で 1 時間インキュベートした。ウェル内容物の結合している画分を、96 ウェルガラスファイバープレート [0.5% PEG (ポリエチレンイミン) 中で少なくとも 30 分間予めブロッキングされた] 上に集め、Perkin Elmer プレートハーベスターを使用して 1 × PBS を用いて洗浄した。当技術分野で周知のように、乾燥ガラスファイバープレートをシンチラントと組み合わせ、マルチウェル Perkin Elmer シンチレーションカウンターでカウントした。

【0310】

結果。以下の表 10 に示されるように、ペグ化化合物は、一般に、アミリン結合アッセイにおいて、対応する非ペグ化ポリペプチド成分 (化合物 49) よりも強力ではない場合がある。化合物 50 を提供するための親化合物 49 の N 末端リシンの除去および得られた

40

50

化合物のペグ化は、すべての結合活性を低下させるとと思われる。さらに、21、24～29および31位のいずれかでの誘導体化は、受容体結合にとって有害であると思われる。

【0311】

表10.受容体結合アッセイ

【表10】

| 化合物 | 配列番号 | PEG<br>部位/種類 | 結合<br>IC <sub>50</sub> (nM) |            | 機能<br>EC <sub>50</sub> (nM) |
|-----|------|--------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|
|     |      |              | ラット<br>側坐核                  | ヒト<br>AMY3 |                             |
| 49  | 74   |              | 0.10                        | 0.247      | 0.003                       |
| 50  | 75   |              | 0.42                        |            |                             |
| 67  | 92   | N末端          | 40                          |            |                             |
| 68  | 93   | N末端          | 78                          |            |                             |
| 69  | 94   | 21           | 104                         |            |                             |
| 71  | 96   | 26           | 66                          |            |                             |
| 73  | 98   | 31           | 86                          |            |                             |
| 75  | 100  | 26           | 470                         |            |                             |
| 74  | 99   | 31           | 75                          |            |                             |
| 70  | 95   | 21           | 112                         |            |                             |
| 72  | 97   | 26           | 54                          |            |                             |
| 76  | 101  | 21           | 131                         | 388        | 1.75                        |
| 77  | 102  | 26           | 39                          | 60         | 0.078                       |
| 78  | 103  | 31           | 61                          | 80         | 0.10                        |
| 79  | 104  | 26/<br>yPEG  | 132                         | 1132       | 1.74                        |
| 80  | 105  | 24           | 79                          | 111        | 0.41                        |
| 81  | 106  | 25           | 31                          | 48         | 0.086                       |
| 82  | 107  | 27           | 51                          | 87         | 0.20                        |
| 83  | 108  | 28           | 53                          | 46         | 0.20                        |
| 84  | 109  | 29           | 27                          | 47         | 0.11                        |
| 85  | 110  | 22           | 148                         |            | 1.66                        |
| 86  | 111  | 23           | 611                         | 240        | 2.82                        |
| 87  | 112  | 30           | 599                         | 685        | 4.25                        |
| 88  | 113  | 26           |                             | 74         | 0.082                       |
| 89  | 114  | 17           |                             | 334        | 2.23                        |
| 90  | 115  | 18           |                             | 238        | 0.85                        |
| 91  | 116  | 20           |                             | 918        | 5.51                        |
| 92  | 117  | 32           |                             | 1000       | 24.69                       |
| 93  | 118  | 33           |                             | 860        | 1.69                        |
| 94  | 119  | 34           |                             | 77         | 0.034                       |
| 95  | 120  | 35           |                             | 143        | 0.122                       |
| 96  | 121  | 36           |                             | 984        | 3.074                       |

10

20

30

40

【実施例17】

【0312】

50

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物 6 9、7 3、7 2、7 0、7 4

痩せたラットに、試験化合物（125 nmol / kg）または媒体の、週に1回の皮下（SC）注射を施した。図13A～13Bは、複数日食物摂取アッセイの結果を提供する。対照として媒体を使用して、化合物69、73、72、70および74について、24時間食物摂取に対する効果を調べた。図13A～Bの結果は、試験された化合物の各々は、3日間の体重および食物摂取の低減において効果的であったことを実証する。いくつかの化合物の場合には、減量は、1週間後でさえも依然として明白であった。

【実施例18】

【0313】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物74、71

化合物74の週に2回の用量または週に1回の用量のSC注射を用いて判断されるような減量に対する効果を調べた。DIO（「食餌誘導性肥満」）ラットにおいて125 nmol / kgで週に2回投薬された場合には、化合物74は、12.5 nmol / kg / dの化合物49の連続注入と類似の有効性を有する（図14A）。125 nmol / kgで週に1回投薬された化合物71は、DIOラットに4週間与えられた場合には、注入された化合物49と同程度には効果的でなかったが、体重の一貫した低下を示した（図14B）。図15A～15Bに示されるように、化合物71はまた、痩せたラットでは、体重および食物摂取を用量依存的に低減した。

【実施例19】

【0314】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物67、71、75

y-分岐PEG（化合物75）またはN末端PEG（化合物67）のいずれかを有する化合物の単回用量の、SC注射を用いて判断されるような24時間食物摂取に対する効果を調べた。図16Aに示されるように、N末端ペグ化化合物、化合物67の3回用量は、DIOラットにおける体重の低減において媒体と同程度には効果的でなかった。y-分岐ペグ化化合物、化合物75は、図16Bに示されるように、痩せたラットにおける体重の低減において、直鎖ペグ化版、化合物71と同程度には効果的でなかった。

【実施例20】

【0315】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物74、76、77、78、79

SC注射（125 nmol / kg）を用いて判断されるような24時間食物摂取に対する効果を、化合物74、76、77および78について調べた。図17A～17Bに示されるように、試験されたペグ化化合物76、77および78の各々は、痩せたラットにおける体重および食物摂取低減において少なくとも化合物74と同程度に効果的であった。y-分岐ペグ化化合物、化合物79は、図18A～18Bに示されるように、痩せたラットにおける体重および食物摂取低減において、直鎖ペグ化版、化合物77と同程度には効果的でなかった。化合物77はまた、図18A～18Bに実証されるように、用量依存的有効性を示した。

【実施例21】

【0316】

食物摂取に対するペグ化位置の効果：化合物77、80～84

それぞれ、26、24、25、27、28および29位に40 kDaのPEGを有する化合物77および80～84（125 nmol / kg）について、累積的食物摂取および体重低減に対する効果を調査した。試験動物（痩せたラット）に、125 nmol / kgでSC注射し、媒体に対して体重を補正し（図19A）、累積的食物摂取（図19B）を7日間決定した。図19A～19Bに示されるように、試験された一連のもののほとんどの化合物が、体重減少を提供し、これは、7日後に依然として明白であった。

【0317】

要約すれば、実施例16～21に示された食物摂取データは、試験された化合物のポリペプチド要素のペグ化の作用の持続期間に対する有効性および効果に関する価値ある観察

10

20

30

40

50

結果を提供する。具体的には、ポリペプチド成分の 40KD PEG 誘導体は、非ペグ化ペプチドと比較して長期の、作用の経時的推移を示す。21、26または31位のPEGの結合は、作用の持続期間および食物摂取応答の規模の両方を増大した。また、直鎖PEG化合物は、食物摂取アッセイにおいて、分岐PEG化合物と比較してより大きな有効性を実証する。

【0318】

VIII. 実施形態

実施形態1。式I



の構造を有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート (LDHC) 化合物であって、

10

式中、 $P_1$  は、第1の生物活性を有するペプチドホルモンであり、 $P_2$  は、第2の生物活性を有するペプチドホルモンであり、 $L_1$  および  $L_2$  は、独立に、結合またはリンカーであり、PS は、30~80kDa の範囲の分子量を有する水溶性ポリマースペーサーであり、ここで、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第1の生物活性を示し、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第2の生物活性を示す、化合物。

【0319】

実施形態2。 $P_1$  が、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体である、実施形態1に記載の化合物。

【0320】

実施形態3。 $P_2$  が、アミリン、プラムリンチド、ダバリンチドまたはその類似体もしくは誘導体である、実施形態1から2のいずれかに記載の化合物。

20

【0321】

実施形態4。エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体が、エキセンディン-4、エキセンディン類似体-4またはその誘導体である、実施形態1から3のいずれか一つに記載の化合物。

【0322】

実施形態5。 $P_1$  が、1~39個の残基を含む、実施形態1から4のいずれか一つに記載の化合物。

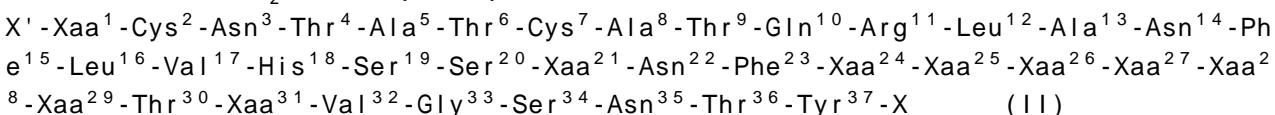
30

【0323】

実施形態6。 $P_1$  が、1~28個の残基を含む、実施形態5に記載の化合物。

【0324】

実施形態7。 $P_2$  が、式(I)：



の残基1~37のアミノ酸配列(配列番号31)を含み、

ここで、式(I)に示されるアミノ酸の最大55%が、欠失しているか、または異なるアミノ酸で置換されていてもよく、式中、X' が、水素、N末端キャップ基、PSとの結合またはPSとのリンカーであり、Xaa<sup>1</sup> が、Lys または結合であり、Xaa<sup>2~1</sup> が、Lys、Cys またはAsn であり、Xaa<sup>2~4</sup> が、Lys、Cys またはGly であり、Xaa<sup>2~5</sup> が、Lys、Cys またはPro であり、Xaa<sup>2~6</sup> が、Lys、Cys またはIle であり、Xaa<sup>2~7</sup> が、Lys、Cys またはLeu であり、Xaa<sup>2~8</sup> が、Lys、Cys またはPro であり、Xaa<sup>2~9</sup> が、Lys、Cys またはPro であり、Xaa<sup>3~1</sup> が、Lys、Cys またはAsn であり、X が、適宜であり、存在する場合には、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、ヒドロキシル、PSとの結合またはPSとのリンカーであり、ここで、PSが、適宜、リ

40

50

ンカーを介して、連結アミノ酸残基、X'またはXの側鎖と共有結合によって連結している、実施形態1から6のいずれか一つに記載の化合物。

【0325】

実施形態8。連結アミノ酸残基が、システインまたはリシンである、実施形態7に記載の化合物。

【0326】

実施形態9。PSが、式(I1)の構造を含む化合物の11、24~29または31位のアミノ酸の側鎖と結合している、実施形態7から8のいずれか一つに記載の化合物。

【0327】

実施形態10。PSが、30~80kDaの質量を有する、実施形態1から9のいずれか一つに記載の化合物。

【0328】

実施形態11。PSが、35~60kDaの質量を有する、実施形態10に記載の化合物。

【0329】

実施形態12。PSが、約40kDaの質量を有する、実施形態10に記載の化合物。

【0330】

実施形態13。PSが、ポリエチレングリコールまたはその誘導体である、実施形態1から12のいずれか一つに記載の化合物。

【0331】

実施形態14。ポリエチレングリコールが、直鎖、分岐またはコーム型である、実施形態13に記載の化合物。

【0332】

実施形態15。ポリエチレングリコールが、30~80kDaの質量を有する、実施形態14に記載の化合物。

【0333】

実施形態16。ポリエチレングリコールが、35~60kDaの質量を有する、実施形態15に記載の化合物。

【0334】

実施形態17。ポリエチレングリコールが、約40kDaの質量を有する、実施形態16に記載の化合物。

【0335】

実施形態18。実施形態1から17のいずれか一つに記載の化合物を、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物。

【0336】

実施形態19。対象において疾患または障害を治療するための方法であって、実施形態1から18のいずれか一つに記載のポリペプチドコンジュゲートを、疾患または障害を治療するのに有効な量でそれを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【0337】

実施形態20。疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、肥満症、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、鬱血性心不全、卒中、高コレステロール血症、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流、摂食障害、妊娠糖尿病、糖尿病性神経障害、肺高血圧症または不十分な胰臓細胞量である、実施形態19に記載の方法。

【0338】

実施形態21。疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病または妊娠糖尿病である、実施形態20に記載の方法。

【0339】

実施形態22。疾患または障害が、肥満症である、実施形態20に記載の方法。

【0340】

実施形態23。疾患または障害が、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全

10

20

30

40

50

、卒中、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流または肺高血圧症である、実施形態 20 に記載の方法。

【 0 3 4 1 】

実施形態 24。疾患または障害が、脂質異常症または高コレステロール血症である、実施形態 20 に記載の方法。

【 0 3 4 2 】

実施形態 25。式 I



の構造を有する長持続期間デュアルホルモンコンジュゲート (LDDHC) 化合物であつて、

10

式中、 $P_1$  は、第 1 の生物活性を有し、エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体であり、 $P_2$  は、第 2 の生物活性を有し、アミリン、アミリン類似体またはその誘導体であり、 $L_1$  および  $L_2$  は、独立に、結合またはリンカーであり、PS は、30 ~ 80 kDa の範囲の分子量を有する水溶性ポリマースペーサーであり、ここで、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第 1 の生物活性を示し、化合物は、生物学的アッセイにおいて、第 2 の生物活性を示す、化合物。

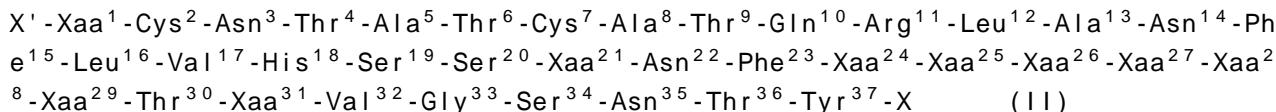
【 0 3 4 3 】

実施形態 26。エキセンディン、エキセンディン類似体またはその誘導体が、エキセンディン - 4、エキセンディン - 4 類似体またはその誘導体である、実施形態 25 に記載の化合物。

20

【 0 3 4 4 】

実施形態 27。 $P_2$  が、式 (II) :



の残基 1 ~ 37 のアミノ酸配列 (配列番号 31) を含み、

ここで、式 (II) に示されるアミノ酸の最大 55 % が、欠失しているか、または異なるアミノ酸で置換されていてもよく、式中、 $X'$  が、水素、N 末端キャップ基、PS との結合または PS とのリンカーであり、 $Xaa^1$  が、Lys または結合であり、 $Xaa^{21}$  が、Lys、Cys または Asn であり、 $Xaa^{24}$  が、Lys、Cys または Gly であり、 $Xaa^{25}$  が、Lys、Cys または Pro であり、 $Xaa^{26}$  が、Lys、Cys または Ile であり、 $Xaa^{27}$  が、Lys、Cys または Leu であり、 $Xaa^{28}$  が、Lys、Cys または Pro であり、 $Xaa^{29}$  が、Lys、Cys または Pro であり、 $Xaa^{30}$  が、Lys、Cys または Asn であり、 $X$  が、適宜であり、存在する場合には、置換または非置換アミノ、置換または非置換アルキルアミノ、置換または非置換ジアルキルアミノ、置換または非置換シクロアルキルアミノ、置換または非置換アリールアミノ、置換または非置換アラルキルアミノ、置換または非置換アルキルオキシ、置換または非置換アリールオキシ、置換または非置換アラルキルオキシ、ヒドロキシル、PS との結合または PS とのリンカーであり、ここで、PS が、適宜、リンカーを介して、連結アミノ酸残基、 $X'$  または  $X$  の側鎖と共有結合によって連結している、実施形態 25 から 26 のいずれか一つに記載の化合物。

30

【 0 3 4 5 】

実施形態 28。PS が、30 ~ 80 kDa の質量を有する、実施形態 25 から 27 のいずれか一つに記載の化合物。

40

【 0 3 4 6 】

実施形態 29。PS が、35 ~ 60 kDa の質量を有する、実施形態 25 から 28 のいずれか一つに記載の化合物。

【 0 3 4 7 】

実施形態 30。PS が、約 40 kDa の質量を有する、実施形態 25 から 29 のいずれか一つに記載の化合物。

50

## 【0348】

実施形態31。実施形態25から30のいずれか一つに記載の化合物を、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物。

## 【0349】

実施形態32。対象において疾患または障害を治療するための方法であって、実施形態25から31のいずれか一つに記載の化合物を、疾患または障害を治療するのに有効な量でそれを必要とする対象に投与することを含む、方法。

## 【0350】

実施形態33。疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、肥満症、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、鬱血性心不全、卒中、高コレステロール血症、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流、摂食障害、妊娠糖尿病、糖尿病性神経障害、肺高血圧症または不十分な臍臍細胞量である、実施形態32に記載の方法。

10

## 【0351】

実施形態34。疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病または妊娠糖尿病である、実施形態33に記載の方法。

## 【0352】

実施形態35。疾患または障害が、肥満症である、実施形態33に記載の方法。

## 【0353】

実施形態36。疾患または障害が、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、卒中、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流または肺高血圧症である、実施形態33に記載の方法。

20

## 【0354】

実施形態37。疾患または障害が、脂質異常症または高コレステロール血症である、実施形態33に記載の方法。

## 【0355】

実施形態38。疾患または障害が、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症、鬱血性心不全、卒中、高コレステロール血症、心血管疾患、心筋虚血、心筋再灌流、妊娠糖尿病、糖尿病性神経障害、肺高血圧症または不十分な臍臍細胞量であり、それを必要とする対象が、過体重、肥満、極度肥満であるか、または体重低減を必要としている、上記の実施形態のいずれか一つに記載の方法または使用。

30

## 【0356】

実施形態39。疾患または障害が、糖尿病、2型糖尿病、糖尿病性神経障害または不十分な臍臍細胞量であり、それを必要とする対象が、過体重、肥満、極度肥満であるか、または体重低減を必要としている、前記実施形態に記載の方法または使用。

## 【0357】

実施形態40。P1またはエキセンディン類似体が、[Leu<sup>1-4</sup>]エキセンディン-4または[Leu<sup>1-4</sup>, Lys<sup>4-0</sup>]エキセンディン-4である、上記の実施形態のいずれか一つに記載の化合物、組成物または方法。

40

## 【0358】

実施形態41。P2またはアミリン類似体が、ダバリチドまたは[des-Lys<sup>1</sup>]ダバリンチドである、上記の実施形態のいずれか一つに記載の化合物、組成物または方法。

## 【0359】

実施形態42。P5が、ポリエチレングリコールまたはその誘導体であり、ポリエチレングリコールまたはその誘導体が直鎖である、上記の実施形態のいずれか一つに記載の化合物、組成物または方法。

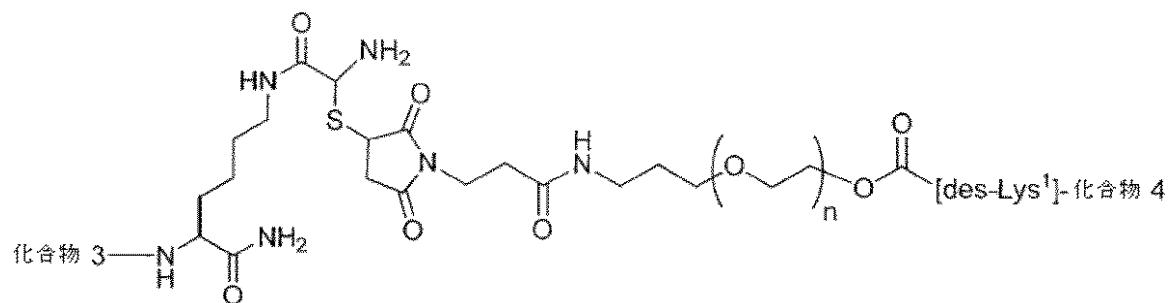
## 【0360】

実施形態43。化合物またはポリペプチドコンジュゲートが、構造

## 【0361】

50

## 【化22】



10

[式中、化合物3が、[Leu<sup>1-4</sup>]エキセンディン-4(配列番号7)であり、化合物4が、ダバリンチド(配列番号34)であり、nが、約900である]

を有する化合物14である、上記の実施形態のいずれか一つに記載の化合物、組成物または方法。

## 【0362】

実施形態44。化合物が、1μg～1000μgの1日用量で、または7μg～7000μgの1週間用量で投与される、実施形態19から24または32から43のいずれか一つに記載の方法。

## 【0363】

実施形態45。化合物が、10μg～500μgの1日用量で、または70μg～3500μgの1週間用量で投与される、前記実施形態に記載の方法。

## 【0364】

実施形態46。化合物が、50μg～500μgの1日用量で、または350μg～3500μgの1週間用量で投与される、前記実施形態に記載の方法。

## 【0365】

実施形態48。化合物が、100μg～400μgの1日用量で、または100μg～350μgの1週間用量で投与される、前記実施形態に記載の方法。

## 【0366】

ありとあらゆる組成物、製剤、投与様式、投与レジメン、使用方法、治療もしくは予防方法、併用療法、作製方法、使用方法または任意のその他の組成物、方法もしくは使用または本出願に記載および開示されるその他の実施形態について、最も好ましい化合物またはポリペプチドコンジュゲートは、化合物14であるということは、明確に企図され、提示される。

20

30

## 【図1】

Fig. 1A

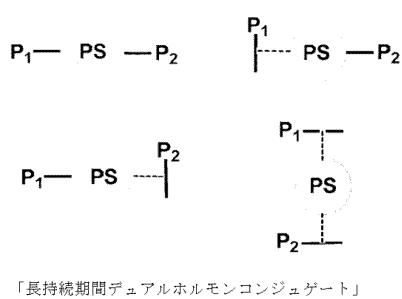
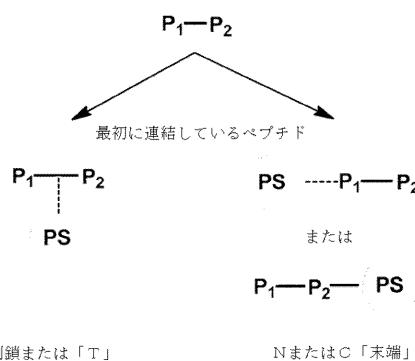


Fig. 1B



## 【図2】

Fig. 2A

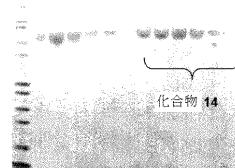


Fig. 2B

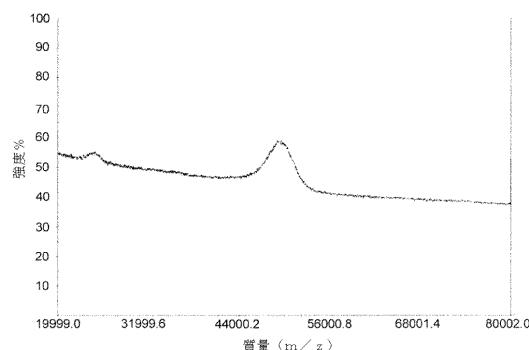


Fig. 2C



## 【図3】

Fig. 3A

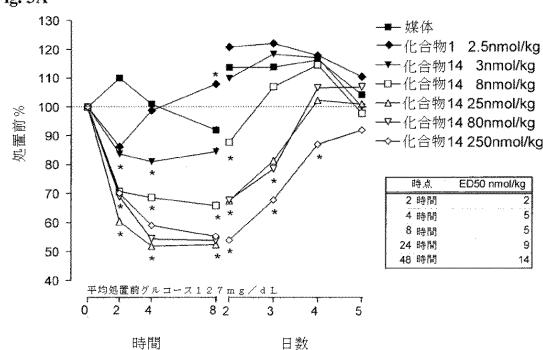
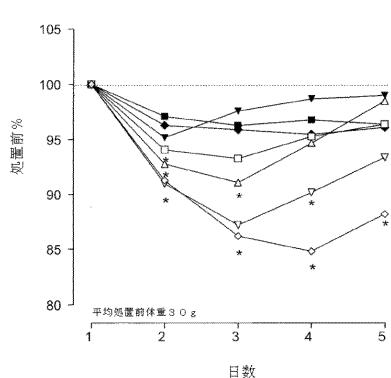


Fig. 3B



## 【図4】

Fig. 4A

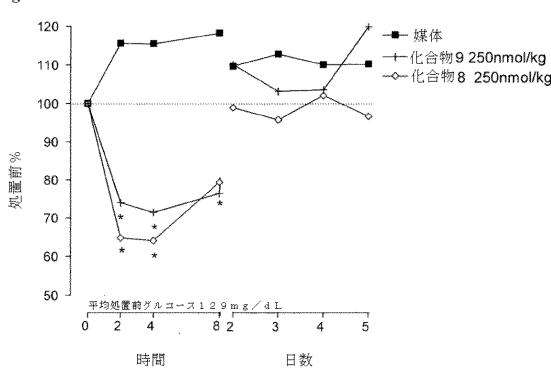
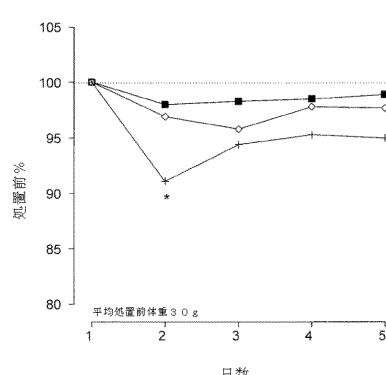


Fig. 4B



【図5】

Fig. 5A

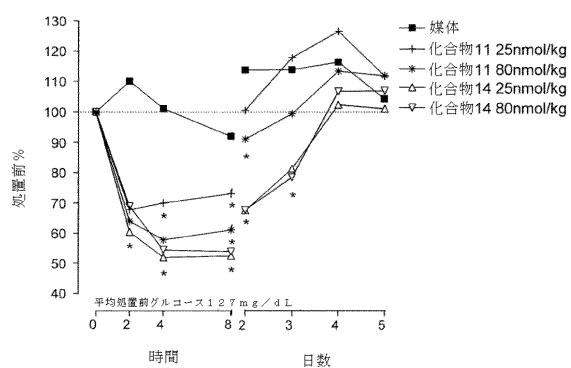
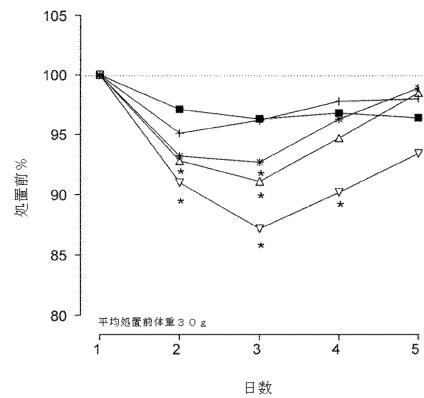


Fig. 5B



【図6】

Fig. 6A

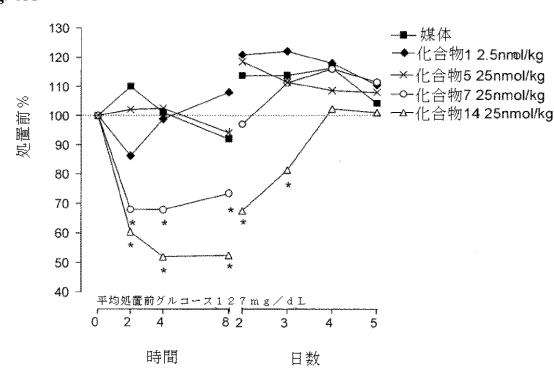
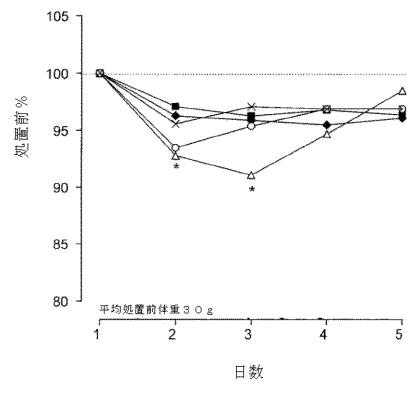


Fig. 6B



【図7】

Fig. 7A

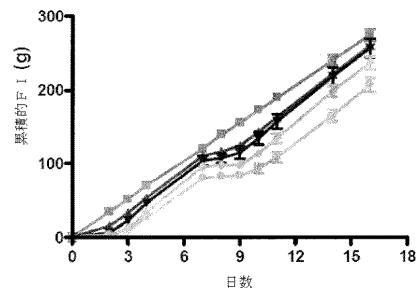
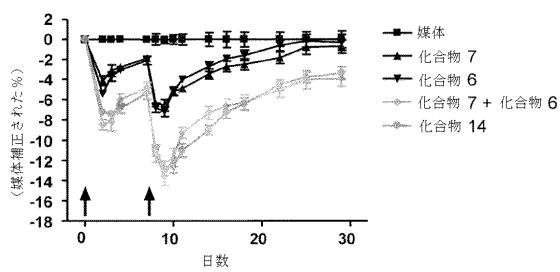
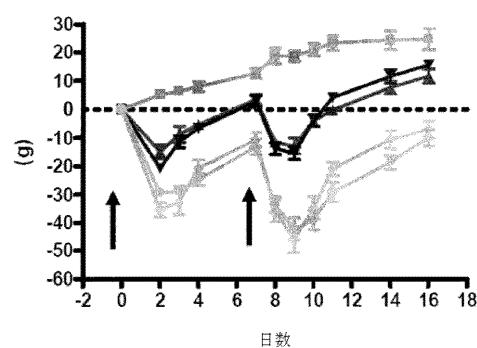


Fig. 7B



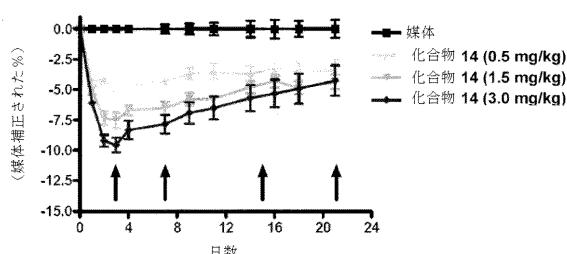
【図8】

Fig. 8.

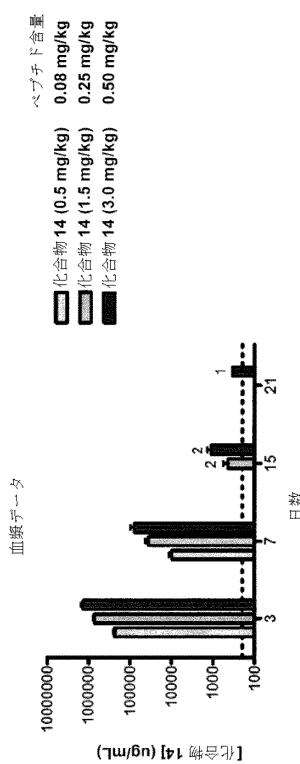


【図9A】

Fig. 9A



【図 9B】



【図 10】

Fig. 10A

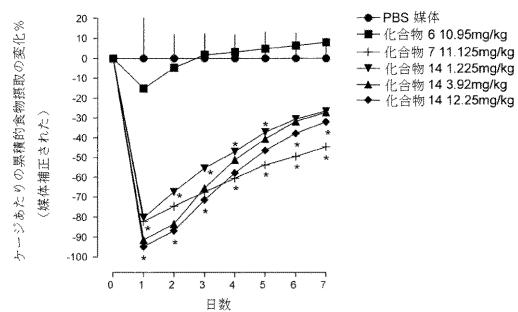


Fig. 10B

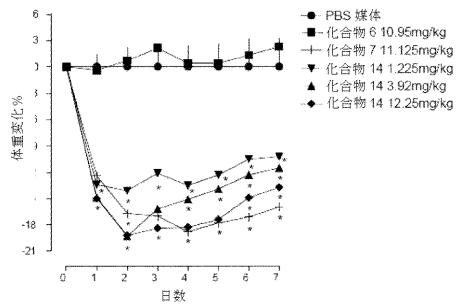
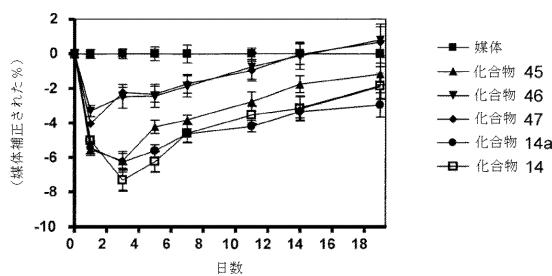


Fig. 11



【図 11】

【図 12】

Fig. 12A

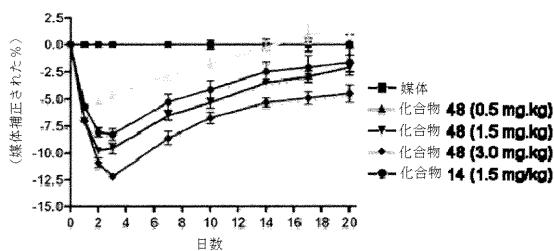
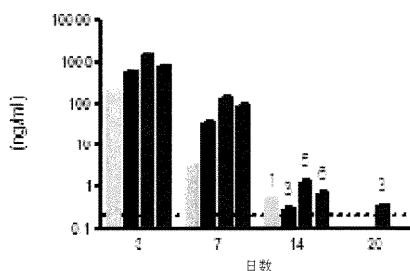


Fig. 12B



【図13】

Fig.13A

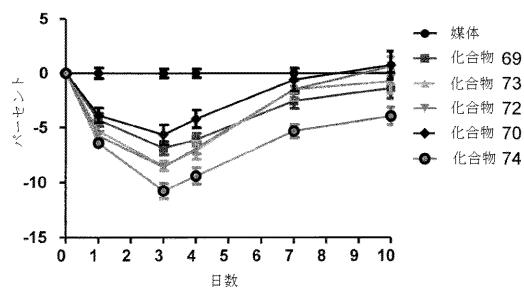
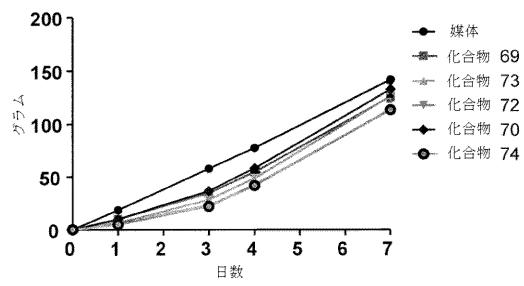


Fig. 13B



【図14】

Fig. 14A

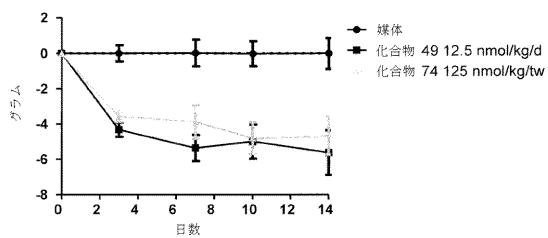
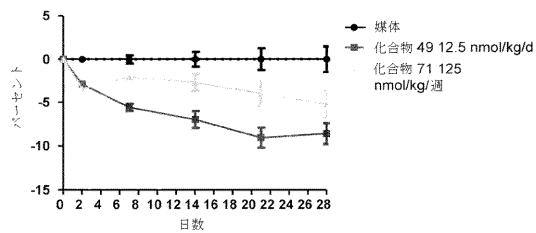


Fig. 14B



【図15】

Fig. 15A

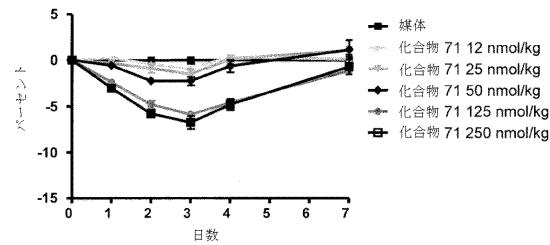
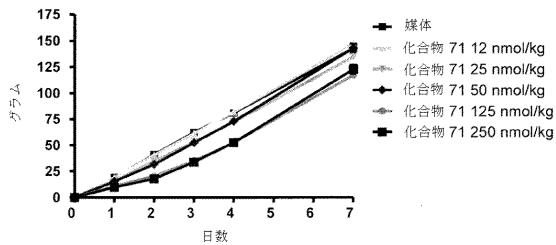


Fig. 15B



【図16】

Fig. 16A

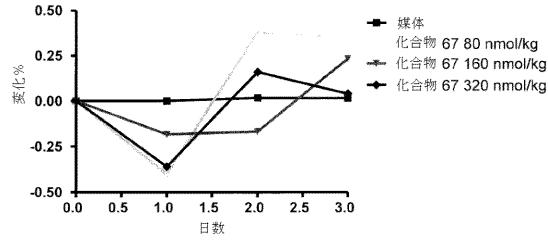
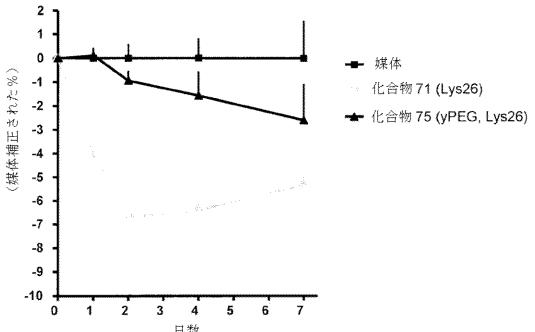


Fig. 16B



【図 17】

Fig. 17A

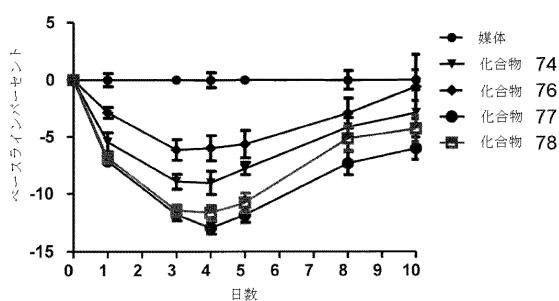
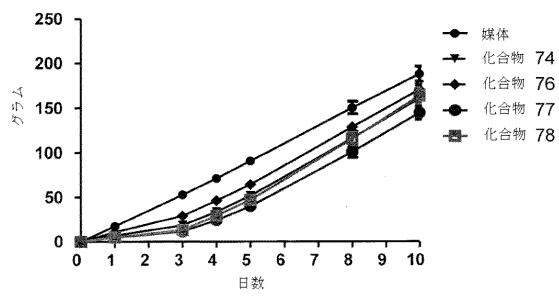


Fig. 17B



【図 18】

Fig. 18A

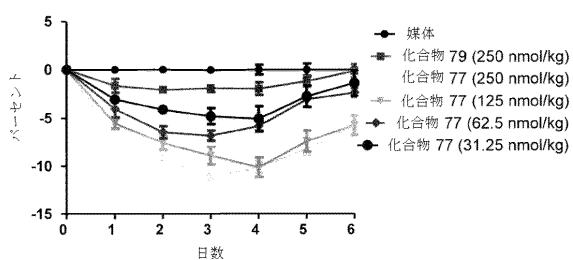
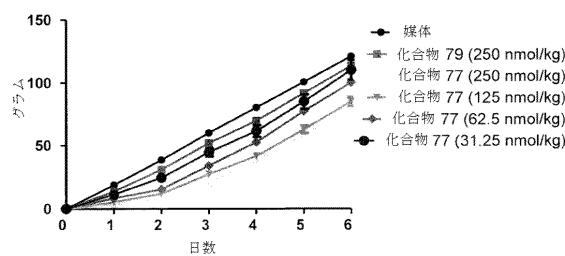


Fig. 18B



【図 19】

Fig. 19A

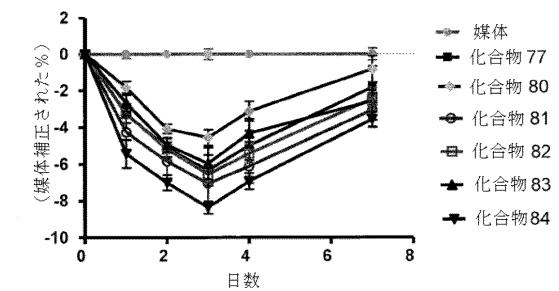
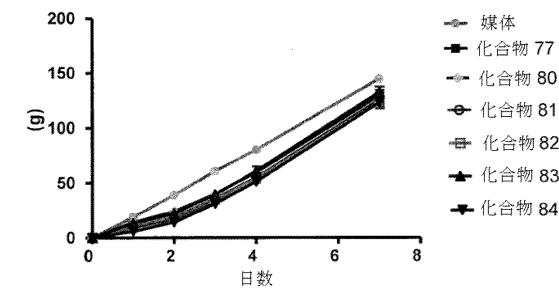


Fig. 19B



【配列表】

2014521594000001.app

【国際調査報告】

61400220847

PCT/US2012/039440 10.10.2012



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                       |                                                                                           |                                                                       |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>92494-838063 | FOR FURTHER ACTION<br>see Form PCT/ISA/220<br>as well as, where applicable, item 5 below. |                                                                       |
| International application No.<br>PCT/US 12/39440      | International filing date (day/month/year)<br>24 May 2012 (24.05.2012)                    | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br>25 May 2011 (25.05.2011) |
| Applicant<br>AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.             |                                                                                           |                                                                       |

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

## 1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:
- the international application in the language in which it was filed.
- a translation of the international application into \_\_\_\_\_ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
- b.  This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).
- c.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).3.  Unity of invention is lacking (see Box No. III).

## 4. With regard to the title,

- the text is approved as submitted by the applicant.
- the text has been established by this Authority to read as follows:

## 5. With regard to the abstract,

- the text is approved as submitted by the applicant.
- the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

## 6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1A
- as suggested by the applicant.
- as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
- as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b.  none of the figures is to be published with the abstract.

2

**PCT/US2012/039440 10.10.2012**

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  | International application No. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------|
| PCT/US 12/39440                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |                               |
| <b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |                               |
| <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-24, 28-47 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                               |
| <b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |                               |
| <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>- Please see extra sheet for continuation -</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3</p> |  |                               |
| <p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |                               |

PCT/US2012/039440 10.10.2012

3

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                     | International application No.<br>PCT/US 12/39440 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61K 38/28; C07K 5/00; C07K 7/00 (2012.01)<br>USPC - 530/303<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                     |                                                  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC(8) - A61K 38/28; C07K 5/00; C07K 7/00 (2012.01)<br>USPC - 530/303                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                     |                                                  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>USPC - 530/324                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                     |                                                  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>PubWest (PGB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); PubMed (MEDLINE); USPTO (PatFT, AppFT); Google (Scholar)<br>peptide, hormone, insulin, glucagon, conjugat*, half-life, exendin, exenatide, amylin, pramlintide, davalintide                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                     |                                                  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                     |                                                  |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                  | Relevant to claim No.                            |
| X<br>—<br>Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | US 2006/0177692 A1 De FREES et al.) 10 August 2006 (10.08.2006) para [0021], [0187], [0272], [0277] | 1<br>—<br>2-3                                    |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | US 2010/0330108 A1 (SONG et al.) 30 December 2010 (30.12.2010) para [0017], [0023]-[0027]           | 2-3                                              |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                     |                                                  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |                                                                                                     |                                                  |
| Date of the actual completion of the international search<br>27 September 2012 (27.09.2012)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Date of mailing of the international search report<br>10 OCT 2012                                   |                                                  |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISAUS, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-273-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774          |                                                  |

PCT/US2012/039440 10.10.2012 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/39440

Continuation of:  
Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Group I: claims 1-3, drawn to a long-duration dual hormone conjugate (LDDHC) compound having the structure of Formula I P1-L1-PS-L2-P2, wherein

P1 is a peptide hormone having a first biological activity;

P2 is a peptide hormone having a second biological activity;

L1 and L2 are independently a bond or a linker; and

PS is a water-soluble polymeric spacer having a molecular weight in the range 30-80 kDa, wherein said compound exhibits said first biological activity in a biological assay, and said compound exhibits said second biological activity in a biological assay.

Group II: claims 25-27, drawn to a long-duration dual hormone conjugate (LDDHC) compound having the structure of Formula I, P1-L1-PS-L2-P2, wherein

P1 has a first biological activity and is an exendin, exendin analog or derivative thereof;

P2 has a second biological activity and is an amylin, amylin analog or derivative thereof;

L1 and L2 are independently a bond or a linker; and

PS is a water-soluble polymeric spacer having a molecular weight in the range 30-80 kDa; wherein said compound exhibits said first biological activity in a biological assay, and said compound exhibits said second biological activity in a biological assay.

The Inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Inventions of Group I do not include the inventive concept of exendin, amylin and their analogs or derivatives thereof, as required by Group II.

The inventions of Groups I-II share the technical feature of a long-duration dual hormone conjugate (LDDHC) compound having the structure of Formula I, P1-L1-PS-L2-P2, wherein

P1 is a peptide hormone having a first biological activity, P2 is a peptide hormone having a second biological activity, L1 and L2 are independently a bond or a linker, and PS is a water-soluble polymeric spacer having a molecular weight in the range 30-80 kDa, wherein said compound exhibits said first biological activity in a biological assay, and said compound exhibits said second biological activity in a biological assay. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2008/0177892 A1 to De Frees et al. (hereinafter 'De Frees'). De Frees discloses Claim 1, a long-duration dual hormone conjugate (LDDHC) compound having the structure of Formula I, P1-L1-PS-L2-P2, (para [0277], in an exemplary embodiment, EPO is conjugated to glial derived neurotropic growth factor (GDNF) wherein each conjugation is accomplished via a bifunctional linker that includes an intact glycosyl linking group at each terminus of the PEG moiety) wherein

P1 is a peptide hormone having a first biological activity (para [0277], EPO);

P2 is a peptide hormone having a second biological activity (para [0277], GDNF);

[NOTE: As defined in the instant Specification para [0077] The terms 'having a first biological activity', 'having a second biological activity' and the like mean that the peptide hormone is capable of eliciting an in vitro biochemical response (e.g., receptor binding, cAMP cyclase activation and the like) and/or an in vivo physiologic (i.e., biological) response (e.g., change in blood glucose, change in body weight and the like).]

L1 and L2 are independently a bond or a linker; and

PS is a water-soluble polymeric spacer having a molecular weight in the range 30-80 kDa (para [0272], a PEG moiety is functionalized at a first terminus with a first glycosyl unit and at a second terminus with a second glycosyl unit to form a first and second modified glycosyl unit at each end of the PEG moiety. Accordingly the first glycosyl unit corresponds to claimed L1, the second glycosyl unit corresponds to claimed L2, and the PEG moiety corresponds to claimed PS; para [0187], -(PEG)<sub>n</sub>- wherein n is from 1 to 2000), wherein said compound exhibits said first biological activity in a biological assay, and said compound exhibits said second biological activity in a biological assay (para [0277] EPO and GDNF have different biological activities). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.            | F I           | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 9/12 (2006.01)  | A 6 1 P 9/12  |            |
| A 6 1 P 3/06 (2006.01)  | A 6 1 P 3/06  |            |
| A 6 1 P 9/04 (2006.01)  | A 6 1 P 9/04  |            |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01)  | A 6 1 P 9/00  |            |
| A 6 1 P 1/18 (2006.01)  | A 6 1 P 1/18  |            |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1      |
| A 6 1 K 47/48 (2006.01) | A 6 1 K 47/48 |            |
| A 6 1 K 47/34 (2006.01) | A 6 1 K 47/34 |            |

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

(特許序注:以下のものは登録商標)

1. W I N D O W S

|           |                           |                                                                                                                                                                    |
|-----------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (71)出願人   | 513094387                 | アストラゼネカ・ファーマシューティカルズ・リミテッド・パートナーシップ<br>AstraZeneca Pharmaceuticals LP<br>アメリカ合衆国デラウェア州、ウィルミントン、コンコード・パイク1800番                                                      |
| (74)代理人   | 100081422                 | 弁理士 田中 光雄                                                                                                                                                          |
| (74)代理人   | 100084146                 | 弁理士 山崎 宏                                                                                                                                                           |
| (74)代理人   | 100122301                 | 弁理士 富田 憲史                                                                                                                                                          |
| (74)代理人   | 100157956                 | 弁理士 稲井 史生                                                                                                                                                          |
| (74)代理人   | 100170520                 | 弁理士 笹倉 真奈美                                                                                                                                                         |
| (72)発明者   | スン・チェンザオ                  | アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、インテレクチュアル・プロパティ・グループ内                                                          |
| (72)発明者   | バーロウズ・ブルース・フォルード          | アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、インテレクチュアル・プロパティ・グループ内                                                          |
| F ターム(参考) | 4C076 CC21 EE23 EE59 FF31 | 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA19 CA59 DA40 MA02 NA12<br>ZA36 ZA40 ZA42 ZA45 ZA66 ZA70 ZC33 ZC35 ZC75<br>4H045 AA10 AA30 BA10 BA50 BA57 CA40 DA30 EA20 FA10 FA34 |