

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7581385号  
(P7581385)

(45)発行日 令和6年11月12日(2024.11.12)

(24)登録日 令和6年11月1日(2024.11.1)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	14/605 (2006.01)	C 0 7 K	14/605	Z N A
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
請求項の数 1 (全74頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-577750(P2022-577750)	(73)特許権者	509091848	
(86)(22)出願日	令和3年7月22日(2021.7.22)		ノヴォ ノルディスク アーノエス	
(65)公表番号	特表2023-534131(P2023-534131		デンマーク, パウスヴェア ディーケー	
	A)		- 2 8 8 0 , ノヴォ アレー 1	
(43)公表日	令和5年8月8日(2023.8.8)	(74)代理人	100108453	
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/070485		弁理士 村山 靖彦	
(87)国際公開番号	WO2022/018186	(74)代理人	100110364	
(87)国際公開日	令和4年1月27日(2022.1.27)		弁理士 実広 信哉	
審査請求日	令和6年7月12日(2024.7.12)	(74)代理人	100133400	
(31)優先権主張番号	63/055,026		弁理士 阿部 達彦	
(32)優先日	令和2年7月22日(2020.7.22)	(72)発明者	クナー、パトリック、ジェイ・	
(33)優先権主張国・地域又は機関			アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 1	
	米国(US)		6 8 ブレインフィールド	
(31)優先権主張番号	20192414.9	(72)発明者	フィナン、ブライアン	
(32)優先日	令和2年8月24日(2020.8.24)		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2	
最終頁に続く		最終頁に続く		

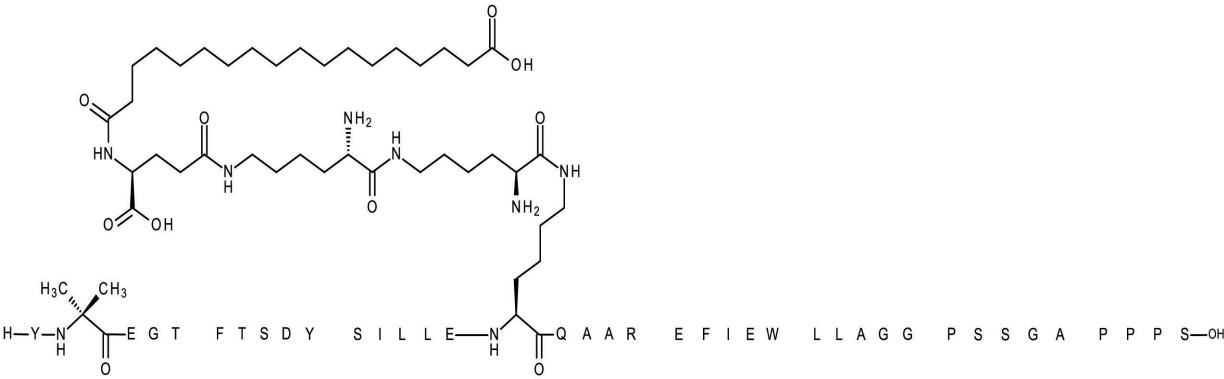
(54)【発明の名称】 経口送達に好適な G L P - 1 受容体および G I P 受容体共作動薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造の化合物：

【化 1】



(式中、アミノ酸配列は配列番号 2 5 である)、

またはその薬学的に許容可能な塩。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1】

本発明は、ヒトへの経口投与に好適な長期化作用プロファイルを有するグルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) 受容体作動薬およびグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) 受容体作動薬である化合物に関する。

【0002】

配列表の参照による組み込み

本出願は、電子形式の配列表とともに提出される。配列表の内容全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) は、腸内分泌細胞由来のホルモンであり、2つの顕著な内因性生理学的インクレチンのうちの一方である。GLP-1は、栄養素 (グルコース) に応答してグルコース依存性インスリン分泌を刺激することによって血糖コントロールを改善し、膵細胞からのグルカゴン分泌を阻害し、胃内容物排出を遅くし、主に食物消費量を減少させることによって体重減少を誘導する。もう一方の顕著なインクレチンであるグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) は、栄養素 (脂肪、グルコース) に応答してインスリン分泌を刺激することによって血糖コントロールを改善する。さらに、GIPは、血漿脂質プロファイルを改善し、骨中のカルシウム蓄積を刺激するように見える。GLP-1とは対照的に、GIPのインクレチン効果は2型糖尿病患者において大幅に減少するが、最近の研究は、これらの患者におけるGIP効率が治療後に取り戻されてグルコース管理を改善することができることを示唆している。それにもかかわらず、特にGIPが動物モデルにおける脂肪量の増加を促進するGIP作用に関連するため、膵臓内分泌部での直接効果を超える全身代謝を調節するGIPの役割は、依然として議論の余地がある。これらの結果は、GIP拮抗作用が体重を改善することができるという確信を高めている。したがって、体重を改善する戦略としてGIP受容体で作用する化合物、特に、作動するか拮抗するかは、依然として徹底的な科学調査の主題である (

【文献】、

【文献】)。

【0004】

げっ歯類モデルにおいて、長期化GIP類似体が体重を減少させ、血糖コントロールを改善することが示されているが、GLP-1類似体と比較して体重を減少させるには強力ではない (

【文献】)。さらに、GIP類似体は、二剤投与時のGLP-1類似体との相加/相乗作用によって体重減少を誘導し (

【文献】、

【文献】)、したがって、GLP-1に基づく薬理の増幅に好適な候補に相当する。前臨床動物モデルで示されているように、GIPR作動作用を単一分子共作動薬としてGLP-1R作動作用の非冗長パートナーとして採用して、GLP-1代謝利益、最も注目すべきことに、体重減少および血糖コントロールを増幅することができる (

【文献】、

【文献】)。強力な二重インクレチン受容体作動作用を有する2つの異なるペプチドが複数回投与臨床試験に進んだ。臨床結果ではベンチマークGLP-1特異的作動薬の同等の投与によって達成されるものをを超える血糖コントロールおよび体重の改善が示され (

【文献】、

【文献】)、これは、GLP-1受容体とGIP受容体との同時標的のトランスレーショナル側面および治療的利益を実証する。

【0005】

GLP-1誘導体の経口送達は、経口投与後のGLP-1誘導体の極低典型的曝露およびバイオアベイラビリティを改善するために、セマグルチドと透過促進剤N-[8-(2-ヒドロキシベンゾイル)アミノ]カプリル酸ナトリウム (SNAC) との1日1回錠

10

20

30

40

50

剤の形態で臨床的に調査されている（

【文献】）。

【0006】

GLP - 1 / GI P 共作動薬およびそれらの医学的使用の可能性は、

【文献】、

【文献】、

【文献】、

【文献】、

【文献】、

【文献】、

【文献】、

【文献】、

【文献】、

【文献】、

【文献】、および

【文献】などのいくつかの特許出願に記載されている。GLP - 1 誘導体の経口送達を開示する特許出願は、例えば、

【文献】、

【文献】、

【文献】、および

【文献】に記載されている。

【0007】

しかしながら、いずれの共作動薬製品もこれまでに販売承認を得ていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】国際公開第2010/011439号

【文献】国際公開第2013/164483号

【文献】国際公開第2014/192284号

【文献】国際公開第2015/067715号

【文献】国際公開第2015/022420号

【文献】国際公開第2015/086728号

【文献】国際公開第2015/086729号

【文献】国際公開第2016/111971号

【文献】国際公開第2020/023386号

【文献】米国特許第9745360号

【文献】米国特許公開第2014/162945号

【文献】米国特許公開第2014/0357552号

【文献】国際公開第2011/080103号

【文献】国際公開第2012/080471号

【文献】国際公開第2013/189988号

【文献】国際公開第2019/149880号

【非特許文献】

【0009】

【文献】Finan et al, TRENDS Mol Med, 2016, 22(5) : 359 - 376

【文献】Killion et al, Endo Rev, 2020, 41(1) : 1 - 21

【文献】Mroz et al, Mol Metab, 2019, 20 : 51 - 62

【文献】Finan et al, Sci Transl Med, 2013, 5(209) : 209ra151

10

20

30

40

50

【文献】Norregaard et al, Diabetes Obes Metab, 2018, 20(1): 60 - 68

【文献】Coskun et al, Mol Metab, 2018, 18: 3 - 14

【文献】Frias et al, Cell Metab, 2017, 26(2): 343 - 352

【文献】Frias et al, Lancet, 2018, 392(10160): 2180 - 2193

【文献】Hedrington & Davis, Exp. Opin. Pharmacother. 2019, 20(2): 133 - 141

【発明の概要】

10

【0010】

本発明は、ヒトGLP-1受容体およびGIP受容体の両方と強力に反応し、かつヒトへの1日1回の経口投与に好適である、ペプチドおよび置換基を含む単一分子共作動薬に関する。これは、ある特定のペプチド配列バリエーションと、二酸系脂肪酸での単一部位アシル化による置換基との組み合わせによって達成される。

【0011】

本発明の一態様は、以下のアミノ酸配列を有するペプチドであって、

YX<sub>2</sub>EGTX<sub>6</sub>TS DY SX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>LEX<sub>16</sub>QAA X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>FX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>W  
LLX<sub>28</sub>GGPX<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>(配列番号36)

C末端に任意選択のアミド修飾を有し、

20

式中、

X<sub>2</sub>がAibまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

X<sub>13</sub>がY、A、L、またはIであり、

X<sub>16</sub>がKまたはEであり、

X<sub>20</sub>がQ、R、E、Hであり、

X<sub>21</sub>がAまたはEであり、

X<sub>23</sub>がIまたはVであり、

X<sub>24</sub>がE、Q、またはNであり、

30

X<sub>28</sub>がAまたはRであり、

X<sub>32</sub>がE、S、または不在であり、

X<sub>33</sub>がS、K、または不在であり、

X<sub>34</sub>がGまたは不在であり、

X<sub>35</sub>がAまたは不在であり、

X<sub>36</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>37</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>38</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>39</sub>がSまたは不在である、ペプチドに関する。

【0012】

40

別の態様では、本発明は、以下のアミノ酸配列を有するペプチドであって、

YX<sub>2</sub>EGTX<sub>6</sub>TS DY SX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>LEX<sub>16</sub>QAA X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>FX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>W  
LLX<sub>28</sub>GGPX<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>(配列番号36)

C末端に任意選択のアミド修飾を有し、

式中、X<sub>2</sub>がAibまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

X<sub>13</sub>がY、A、L、またはIであり、

X<sub>16</sub>がKまたはEであり、

X<sub>20</sub>がQ、R、E、Hであり、

50

X<sub>21</sub> が A または E であり、  
X<sub>23</sub> が I または V であり、  
X<sub>24</sub> が E、Q、または N であり、  
X<sub>28</sub> が A または R であり、  
X<sub>32</sub> が E、S、または不在であり、  
X<sub>33</sub> が S、K、または不在であり、  
X<sub>34</sub> が G または不在であり、  
X<sub>35</sub> が A または不在であり、  
X<sub>36</sub> が P または不在であり、  
X<sub>37</sub> が P または不在であり、  
X<sub>38</sub> が P または不在であり、  
X<sub>39</sub> が S または不在である、ペプチド、および  
16 位または 33 位のリジン (K) を介して当該ペプチドに結合している置換基、  
またはその薬学的に許容可能な塩に関する。

10

## 【0013】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載の GLP-1 / GIP 共作動薬を調製するための方法に関する。

## 【0014】

さらなる態様では、本発明は、本明細書に記載の GLP-1 / GIP 共作動薬化合物を含む医薬組成物に関する。

20

## 【0015】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載の GLP-1 / GIP 共作動薬の医学的使用に関する。

## 【0016】

一態様では、本発明は、糖尿病、肥満、および / または肝疾患の予防または治療のための、本明細書に記載の GLP-1 / GIP 共作動剤の使用に関する。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0017】

以下において、ギリシャ文字は、それらの記号または対応する名称で表されてもよく、例えば、 $\alpha$  がアルファであり、 $\beta$  がベータであり、 $\gamma$  がイプシロンであり、 $\delta$  がガンマであり、 $\omega$  がオメガであるといった具合である。また、 $\mu$  のギリシャ文字は「u」で表されてもよく、例えば、 $\mu$  l が u l であり、 $\mu$  M が u M である。

30

## 【0018】

## GLP-1 / GIP 受容体共作動薬

本発明は、GLP-1 / GIP 受容体共作動薬または単に共作動薬とも呼ばれる GLP-1 受容体作動薬および GIP 受容体作動薬である化合物に関する。

## 【0019】

「化合物」という用語は、分子実体を指すために本明細書で使用され、それ故に、「化合物」は、各化合物または化合物の群に対して定義される最小限の要素以外の異なる構造要素を有してもよい。化合物が定義された構造および / または機能的要素を含む限り、その化合物はペプチドまたはその誘導体であってもよいということになる。

40

## 【0020】

「化合物」という用語は、本明細書の薬学的に関連した形態、すなわち、本明細書で定義される化合物、またはその薬学的に許容可能な塩、アミド、もしくはエステルを包含するようにも意図されている。

## 【0021】

「類似体」という用語は、概して、配列に参照アミノ酸配列と比較して 1 つ以上のアミノ酸変化があるペプチドを指す。「類似体」は、N 末端位置および / もしくは C 末端位置にアミノ酸伸長、ならびに / または N 末端位置および / もしくは C 末端位置に切断を含んでもよい。

50

## 【 0 0 2 2 】

一般に、アミノ酸残基は、それらの完全な名称、それらの 1 文字コード、および／またはそれらの 3 文字コードによって特定され得る。これらの 3 つの方法は、完全に同等である。

## 【 0 0 2 3 】

アミノ酸は、アミノ基およびカルボン酸基、ならびに任意選択で、しばしば側鎖と呼ばれる 1 つ以上の追加の基を含む分子である。

## 【 0 0 2 4 】

「アミノ酸」という用語は、タンパク質原性（または天然）アミノ酸（とりわけ、20 個の標準アミノ酸）だけでなく、非タンパク質原性（または非天然）アミノ酸も含む。タンパク質原性アミノ酸は、タンパク質に自然に組み込まれるものである。標準アミノ酸は、遺伝子コードによってコードされるアミノ酸である。非タンパク質原性アミノ酸は、タンパク質中に見られないか、または標準細胞機構によって産生されないかのいずれかである（例えば、それらは、翻訳後修飾に供されていない場合がある）。非タンパク質原性アミノ酸の非限定的な例は、A i b（ $\alpha$ -アミノイソ酪酸または 2 - アミノイソ酪酸）、ノルロイシン、ノルバリン、ならびにタンパク質原性アミノ酸の D 異性体である。

## 【 0 0 2 5 】

下文において、光学異性体が記載されていないペプチドの各アミノ酸は、（別段の指定がない限り）L 異性体を意味すると理解されたい。

## 【 0 0 2 6 】

本明細書に記載の G L P - 1 / G I P 受容体共作動薬は、以下で定義されるペプチドおよび置換基を含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ペプチドは、G L P - 1 受容体および G I P 受容体において活性を最適化するように作製された合成ペプチドである。G L P - 1 受容体および G I P 受容体の両方に対する好適な受容体結合活性を有する化合物は、本明細書の実施例で示されるように特定されている。

## 【 0 0 2 7 】

本化合物は、脂肪酸基を含む置換基によって半減期の延長をさらに呈する。

## 【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、ペプチドのカルボキシ末端は、 $-COOH$  基を保持する。いくつかの実施形態では、本化合物は、C 末端にアミド基（ $C(=O)-NH_2$ ）を任意選択で含んでもよく、これは、天然エキセンジン - 4 で見られるような  $-OH$  を  $-NH_2$  で置換する天然に存在する修飾である。

## 【 0 0 2 9 】

ペプチド

本明細書に記載の G L P - 1 / G I P 受容体共作動薬は、以下に定義されるペプチドおよび置換基を含み、ここで、置換基はアミノ酸残基を介してペプチド骨格に結合している。

## 【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は以下であり、

$YX_2EGTX_6TSDYSX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W$   
 $LLX_{28}GX_{30}X_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$ （配列番号 47）

C 末端に任意選択のアミド修飾を有し、

式中、 $X_2$  が A i b または A であり、

$X_6$  が F または V であり、

$X_{12}$  が I または Y であり、

$X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、

$X_{16}$  が K または E であり、

$X_{20}$  が Q、R、E、H であり、

$X_{21}$  が A または E であり、

10

20

30

40

50

$X_{23}$  が I または V であり、  
 $X_{24}$  が E、Q、または N であり、  
 $X_{28}$  が A または R であり、  
 $X_{30}$  が G または不在であり、  
 $X_{31}$  が P または不在であり、  
 $X_{32}$  が E、S、または不在であり、  
 $X_{33}$  が S、K、または不在であり、  
 $X_{34}$  が G または不在であり、  
 $X_{35}$  が A または不在であり、  
 $X_{36}$  が P または不在であり、  
 $X_{37}$  が P または不在であり、  
 $X_{38}$  が P または不在であり、  
 $X_{39}$  が S または不在である。

10

## 【0031】

いくつかの実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は、

$YX_2ETX_6TSDYSX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W$   
 $LLX_{28}GGPX_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$  (配列番号 36) であり、  
 C 末端に任意選択のアミド修飾を有し、  
 式中、

$X_2$  が A i b または A であり、  
 $X_6$  が F または V であり、  
 $X_{12}$  が I または Y であり、  
 $X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、  
 $X_{16}$  が K または E であり、  
 $X_{20}$  が Q、R、E、H であり、  
 $X_{21}$  が A または E であり、  
 $X_{23}$  が I または V であり、  
 $X_{24}$  が E、Q、または N であり、  
 $X_{28}$  が A または R であり、  
 $X_{32}$  が E、S、または不在であり、  
 $X_{33}$  が S、K、または不在であり、  
 $X_{34}$  が G または不在であり、  
 $X_{35}$  が A または不在であり、  
 $X_{36}$  が P または不在であり、  
 $X_{37}$  が P または不在であり、  
 $X_{38}$  が P または不在であり、  
 $X_{39}$  が S または不在である。

20

## 【0032】

一実施形態では、 $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{38}$  および  $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{34}$ 、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{33}$ 、 $X_{34}$ 、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{32}$ 、 $X_{33}$ 、 $X_{34}$ 、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{31}$ 、 $X_{32}$ 、 $X_{33}$ 、 $X_{34}$ 、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  は不在である。一実施形態では、 $X_{30}$ 、 $X_{31}$ 、 $X_{32}$ 、 $X_{33}$ 、 $X_{34}$ 、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  は不在である。さらなるかかる実施形態では、 $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  は、SSGA である。さらなるかかる実施形態では、 $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  は、ESGA である。さらなるかかる実施形態では、 $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  は、SKGA である。そのさら

40

50

なる実施形態では、ペプチドは、C末端にアミド修飾を有する。

【0033】

一実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は以下であり、

YX<sub>2</sub>EGTX<sub>6</sub>TSDY SX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>LEX<sub>16</sub>QAA X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>FX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>W  
LLX<sub>28</sub>GGPSSGAPPPS (配列番号37)

式中、

X<sub>2</sub>がA i bまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

X<sub>13</sub>がY、A、L、またはIであり、

10

X<sub>16</sub>がKまたはEであり、

X<sub>20</sub>がQ、R、E、Hであり、

X<sub>21</sub>がAまたはEであり、

X<sub>23</sub>がIまたはVであり、

X<sub>24</sub>がE、Q、またはNであり、

X<sub>28</sub>がAまたはRである。

【0034】

一実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は以下であり、

YX<sub>2</sub>EGTX<sub>6</sub>TSDY SX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>LEX<sub>16</sub>QAA X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>FX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>W  
LLX<sub>28</sub>GGPESGAPPPS (配列番号38)

20

式中、

X<sub>2</sub>がA i bまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

X<sub>13</sub>がY、A、L、またはIであり、

X<sub>16</sub>がKまたはEであり、

X<sub>20</sub>がQ、R、E、Hであり、

X<sub>21</sub>がAまたはEであり、

X<sub>23</sub>がIまたはVであり、

X<sub>24</sub>がE、Q、またはNであり、

30

X<sub>28</sub>がAまたはRである。

【0035】

一実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は以下であり、

YX<sub>2</sub>EGTX<sub>6</sub>TSDY SX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>LEX<sub>16</sub>QAA X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>FX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>W  
LLX<sub>28</sub>GGPSK G A P P P S (配列番号39)

式中、

X<sub>2</sub>がA i bまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

X<sub>13</sub>がY、A、L、またはIであり、

40

X<sub>16</sub>がKまたはEであり、

X<sub>20</sub>がQ、R、E、Hであり、

X<sub>21</sub>がAまたはEであり、

X<sub>23</sub>がIまたはVであり、

X<sub>24</sub>がE、Q、またはNであり、

X<sub>28</sub>がAまたはRである。

【0036】

一実施形態では、X<sub>2</sub>はA i bである。一実施形態では、X<sub>2</sub>はAである。一実施形態では、X<sub>6</sub>はFである。一実施形態では、X<sub>6</sub>はVである。一実施形態では、X<sub>12</sub>はIである。一実施形態では、X<sub>12</sub>はYである。一実施形態では、X<sub>13</sub>はYである。一実施

50



形態では、 $X_{13}$ はAである。一実施形態では、 $X_{13}$ はLである。一実施形態では、 $X_{13}$ はIである。一実施形態では、 $X_{16}$ はKである。一実施形態では、 $X_{16}$ はE。一実施形態では、 $X_{20}$ はQである。一実施形態では、 $X_{20}$ はRである。一実施形態では、 $X_{20}$ はEである。一実施形態では、 $X_{20}$ はHである。一実施形態では、 $X_{21}$ はAである。一実施形態では、 $X_{21}$ はEである。一実施形態では、 $X_{23}$ はIである。一実施形態では、 $X_{23}$ はVである。一実施形態では、 $X_{24}$ はEである。一実施形態では、 $X_{24}$ はQである。一実施形態では、 $X_{24}$ はNである。一実施形態では、 $X_{28}$ はAである。一実施形態では、 $X_{28}$ はRである。一実施形態では、 $X_{30}$ はGである。一実施形態では、 $X_{31}$ はPである。

#### 【0037】

10

一実施形態では、 $X_{13}LEX_{16}QAAX_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}$ は、LLEKQAAREFIN、LLEKQAAREFIE、LLEKQA AQEFIE、およびLLEEQAAREFIEからなる群から選択される。一実施形態では、 $X_{13}LEX_{16}QAAX_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}$ は、LLEKQAAREFINである。一実施形態では、 $X_{13}LEX_{16}QAAX_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}$ は、LLEKQAAREFIEである。一実施形態では、 $X_{13}LEX_{16}QAAX_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}$ は、LLEKQA AQEFIEである。一実施形態では、 $X_{13}LEX_{16}QAAX_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}$ は、LLEEQAAREFIEである。

#### 【0038】

さらなる実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、33、34、および35のうちのいずれか1つである。

20

#### 【0039】

一実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号10、22、または25のうちのいずれか1つである。

#### 【0040】

一実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号25である。

#### 【0041】

一実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号18、20、23、24のうちのいずれか1つである。

30

#### 【0042】

一実施形態では、ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号33、34、または35である。

#### 【0043】

さらなるかかる実施形態では、ペプチドは、C末端にアミド修飾を有する。

#### 【0044】

##### 誘導体

いくつかの実施形態では、GLP-1受容体作動薬およびGIP受容体作動薬は、ペプチドに共有結合した以下で定義される置換基を含むか、またはそれらからなる。

40

#### 【0045】

かかる化合物は、置換基をペプチド骨格に共有結合することによって得られるため、ペプチドの誘導体と呼ばれ得る。

#### 【0046】

本発明の一態様は、ペプチドおよび置換基を含む化合物であって、ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、

$YX_2EGTX_6TSDY SX_{12}X_{13}LEX_{16}QAAX_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W$   
 $LLX_{28}GX_{30}X_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$  (配列番号47)

)

C末端に任意選択のアミド修飾を有し、

50

式中、 $X_2$  が A i b または A であり、  
 $X_6$  が F または V であり、  
 $X_{12}$  が I または Y であり、  
 $X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、  
 $X_{16}$  が K または E であり、  
 $X_{20}$  が Q、R、E、H であり、  
 $X_{21}$  が A または E であり、  
 $X_{23}$  が I または V であり、  
 $X_{24}$  が E、Q、または N であり、  
 $X_{28}$  が A または R であり、  
 $X_{30}$  が G または不在であり、  
 $X_{31}$  が P または不在であり、  
 $X_{32}$  が E、S、または不在であり、  
 $X_{33}$  が S、K、または不在であり、  
 $X_{34}$  が G または不在であり、  
 $X_{35}$  が A または不在であり、  
 $X_{36}$  が P または不在であり、  
 $X_{37}$  が P または不在であり、  
 $X_{38}$  が P または不在であり、  
 $X_{39}$  が S または不在であり、

10

置換基が 16 位または 33 位のリジン (K) を介してペプチドに結合している、化合物、またはその薬学的に許容可能な塩に関する。

20

#### 【0047】

本発明の一実施形態は、ペプチドおよび置換基を含む化合物であって、ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、

$YX_2ETX_6TSDYSX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W$   
 $LLX_{28}GGPX_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$  (配列番号 36)

C 末端に任意選択のアミド修飾を有し、

式中、 $X_2$  が A i b または A であり、  
 $X_6$  が F または V であり、  
 $X_{12}$  が I または Y であり、  
 $X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、  
 $X_{16}$  が K または E であり、  
 $X_{20}$  が Q、R、E、H であり、  
 $X_{21}$  が A または E であり、  
 $X_{23}$  が I または V であり、  
 $X_{24}$  が E、Q、または N であり、  
 $X_{28}$  が A または R であり、  
 $X_{32}$  が E、S、または不在であり、  
 $X_{33}$  が S、K、または不在であり、  
 $X_{34}$  が G または不在であり、  
 $X_{35}$  が A または不在であり、  
 $X_{36}$  が P または不在であり、  
 $X_{37}$  が P または不在であり、  
 $X_{38}$  が P または不在であり、  
 $X_{39}$  が S または不在であり、

30

置換基が 16 位または 33 位のリジン (K) を介してペプチドに結合している、化合物、またはその薬学的に許容可能な塩に関する。

40

#### 【0048】

さらなる実施形態では、ペプチドは、本明細書で上述されるように定義され得る。

50

## 【 0 0 4 9 】

## 置換基

一実施形態では、本明細書に記載の置換基は、16位または33位のリジン（K）残基を介して本明細書に記載のペプチドに結合している。

## 【 0 0 5 0 】

一実施形態では、置換基は、リジンが16位または33位に含まれている場合、リジン（K）のイプシロン - アミノ基を介してペプチドに結合している。

## 【 0 0 5 1 】

一実施形態では、置換基は、血漿アルブミンと非共有結合複合体を形成し、それ故に、共作動薬と血流の循環を促進することができ、かつ共作動薬とアルブミンの複合体が腎クリアランスによって緩徐に除去されるに過ぎないという事実に起因して、共作動薬の作用時間を長期化する効果を有することできるペプチドに共有結合した化学構造である。

10

## 【 0 0 5 2 】

一実施形態では、置換基は、脂肪酸基を含む。かかる一実施形態では、脂肪酸基は、少なくとも8個の連続した - CH<sub>2</sub> - 基を含む炭素鎖を含む。一実施形態では、脂肪酸基は、少なくとも10個の連続した - CH<sub>2</sub> - 基、例えば、少なくとも12個の連続した - CH<sub>2</sub> - 基、少なくとも14個の連続した - CH<sub>2</sub> - 基、少なくとも16個の連続した - CH<sub>2</sub> - 基、少なくとも18個の連続した - CH<sub>2</sub> - 基を含む。

## 【 0 0 5 3 】

一実施形態では、脂肪酸基は、8 ~ 20個の連続した - CH<sub>2</sub> - を含む。一実施形態では、脂肪酸基は、10 ~ 18個の連続した - CH<sub>2</sub> - を含む。一実施形態では、脂肪酸基は、12 ~ 18個の連続した - CH<sub>2</sub> - を含む。一実施形態では、脂肪酸基は、14 ~ 18個の連続した - CH<sub>2</sub> - を含む。

20

## 【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態では、置換基は、プロトラクター要素（protractor element）および1つ以上のリンカー要素などのいくつかの要素からなる。一実施形態では、「プロトラクター」という用語は、化合物の半減期の延長に關与する置換基の末端部分である脂肪酸基を説明するために使用される。

## 【 0 0 5 5 】

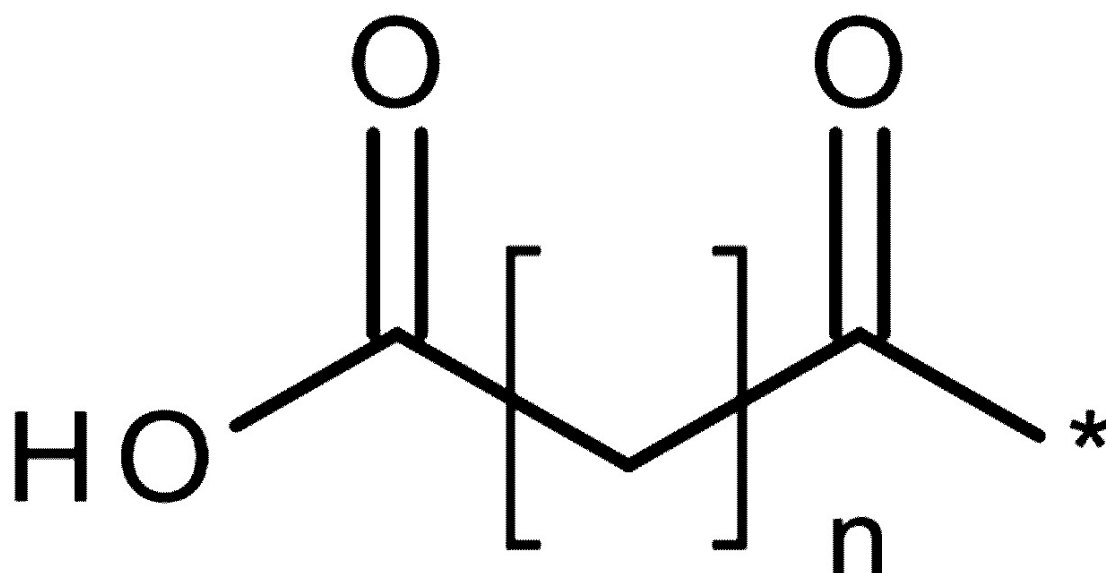
一実施形態では、プロトラクター（Prot）は、  
化学式1：HOOC - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - CO - \*（式中、nが8 ~ 20の範囲の整数である）によって定義されてもよく、C(n + 2)二酸と呼ばれてもよく、または  
化学式1b：

30

40

50

## 【化 1】



10

(式中、 $n$  が 8 ~ 20 の範囲の整数である)として定義されてもよい。

20

## 【0056】

一実施形態では、置換基は、1つ以上のリンカー要素をさらに含む。いくつかの実施形態では、リンカー要素は、アミド結合によって互いにかつプロトラクターに連結しており、「Z」と呼ばれる(さらに以下を参照されたい)。

## 【0057】

本明細書でさらに以下に定義されるように、リンカー要素の数は、最大3つであり、-Z1-Z2-Z3-と呼ばれ得、式中、Z1がプロトラクター(Prot)に連結しており、最後のZ要素がペプチドに連結しており、この場合、置換基は、Prot-Z1-Z2-Z3-と呼ばれ得る。したがって、上記の記号\*は、Z1への結合点を示し、アミド結合を介して結合している場合、窒素である。一実施形態では、Z1が結合である場合(以下を参照されたい)、記号\*は、隣接するZ要素の窒素への結合点を示す。

30

## 【0058】

一実施形態では、置換基は、Prot-Z1-Z2-Z3-(式中、Prot-が化学式1、化学式1b(式中、 $n$  が16~20の範囲の整数である)から選択される)によって定義される。

## 【0059】

特定の実施形態では、化学式1または化学式1b中、 $n$  は、14、15、16、17、18、19、または20である。

## 【0060】

特定の実施形態では、化学式1または化学式1b中、 $n$  は、14、15、16、17、または18である。

40

## 【0061】

特定の実施形態では、化学式1または化学式1b中、 $n$  は、14、16、または18である。

## 【0062】

特定の実施形態では、化学式1または化学式1b中、 $n$  は、16、17、18、19、または20である。

## 【0063】

特定の実施形態では、化学式1または化学式1b中、 $n$  は、16、18、または20である。

50

## 【0064】

特定の実施形態では、化学式 1 または化学式 1 b 中、n は、18 または 20 である。

## 【0065】

特定の実施形態では、プロトラクター (Prot) は、C16 二酸または C18 二酸である。

## 【0066】

特定の実施形態では、プロトラクター (Prot) は、C18 二酸または C20 二酸である。

## 【0067】

特定の実施形態では、プロトラクター (Prot) は、C16 二酸、C18 二酸、または C20 二酸である。

10

## 【0068】

本明細書で使用される「結合」という用語は、共有結合を意味する。Z1 ~ Z3 のリンカー要素が結合として定義される場合、そのリンカー要素が不在である状況と同等である。Z1 ~ Z3 のうちのいずれかが結合であるという本明細書の以下の指示は、前の Z 要素が「結合」ではない（または不在ではない）次の Z 要素に共有結合するように、Z1 ~ Z3 のうちのいずれかが不在であると解されてもよい。

## 【0069】

いくつかの実施形態では、リンカー要素 Z1 ~ Z3 は、Glu、Glu (ガンマ Glu または g Glu と呼ばれ、\* - NH - CH - (COOH) - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - CO - \* によって定義される)、Lys (イブシロン Lys または e Lys と呼ばれ、\* - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - CH (NH<sub>2</sub>) - CO - \* によって定義される)、Ser、Ala、Thr、Ado、Aee p、および Aee e p などのアミノ酸様部分、ならびに以下に記載のさらなる部分を含むアミド結合を形成することができる化学的部分から個別に選択される。

20

## 【0070】

一実施形態では、Z1 は、Glu、Glu、または結合から選択される。

## 【0071】

一実施形態では、Z1 は、Glu である。

## 【0072】

一実施形態では、Z2 および Z3 は、互いに独立して、Glu、Lys、Glu、Gly、Ser、Ala、Thr、Ado、Aee p、Aee e p、および結合から選択される。

30

## 【0073】

Glu、Gly、Ser、Ala、Thr は、当該技術分野で周知のアミノ酸残基である。

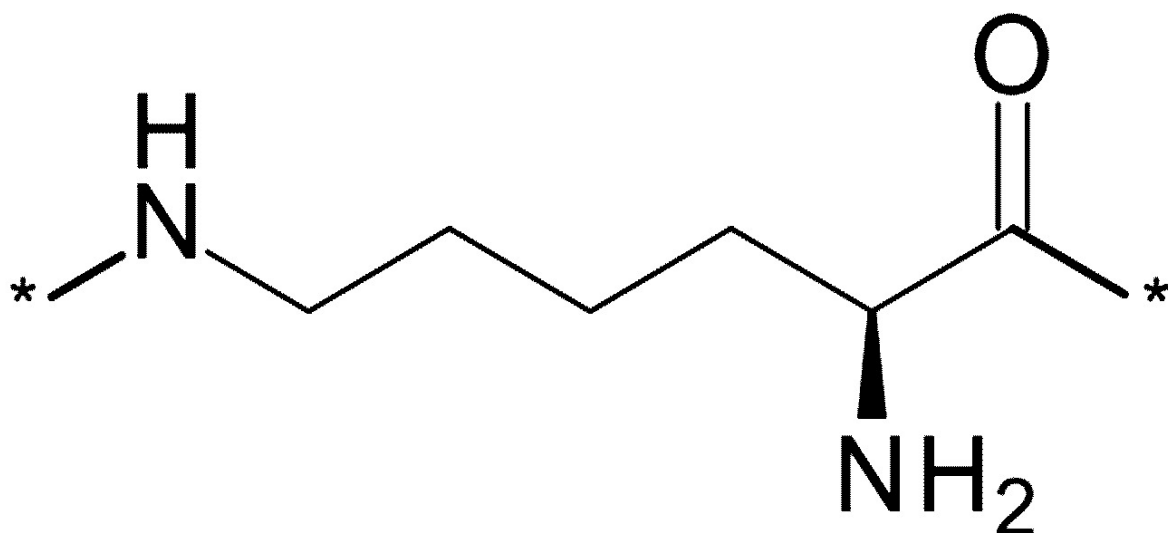
## 【0074】

Lys は、化学式 2 : \* - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - CH (NH<sub>2</sub>) - CO - \* によって定義され、

化学式 2 b : で表されてもよい。

40

【化 2】



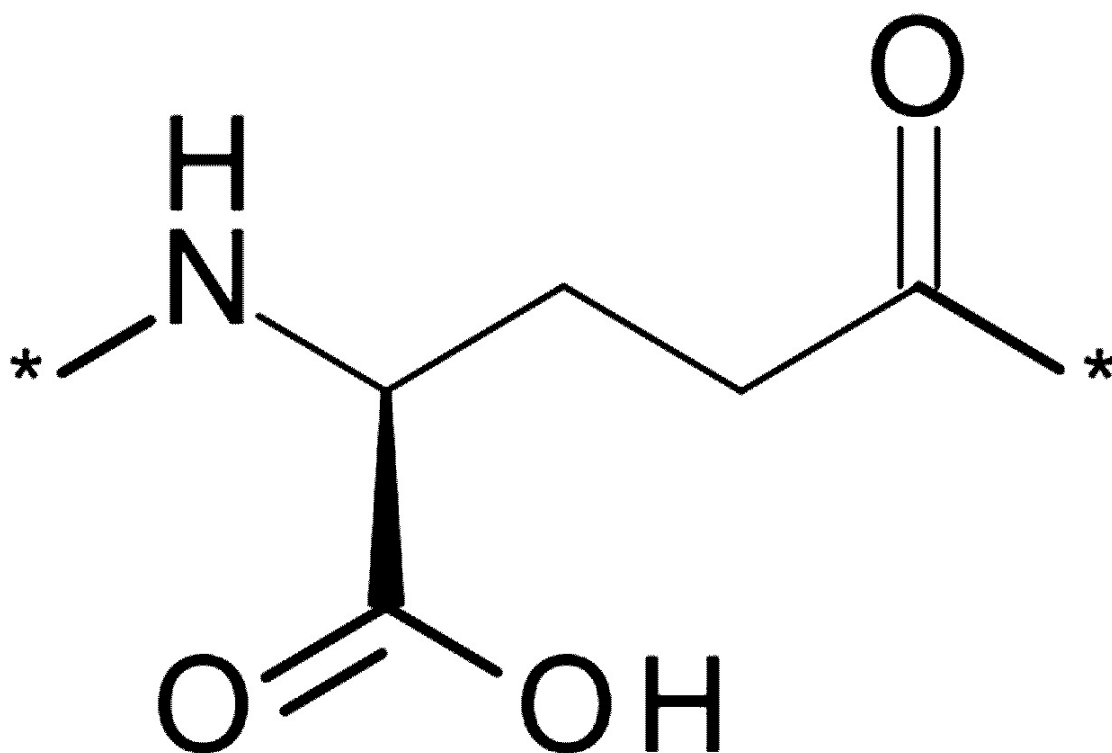
10

。【0075】

Gluは、化学式3： $* - NH - CH(COOH) - (CH_2)_2 - CO - *$ によって定義され、  
化学式3b：で表されてもよい。

20

【化 3】



30

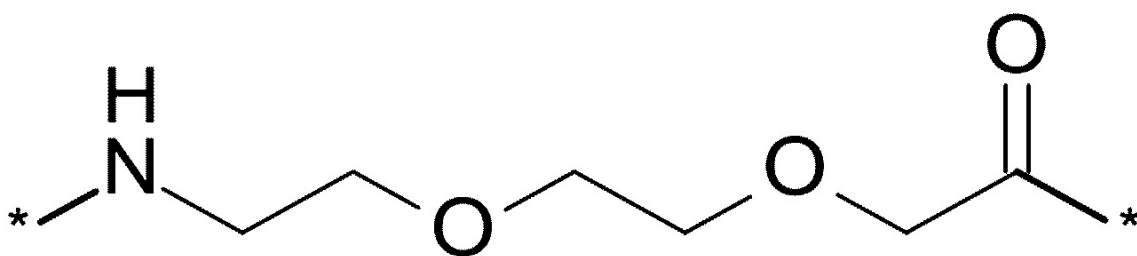
40

。【0076】

Adoは、化学式4： $* - NH - (CH_2)_2 - O - (CH_2)_2 - O - CH_2 - CO - *$ によって定義され、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸と呼ばれてもよく、  
化学式4b：

50

【化 4】



10

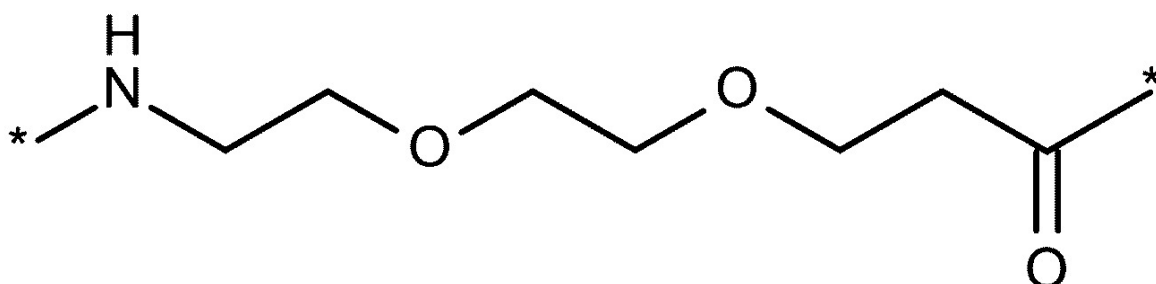
で表されてもよい。

【0077】

A e e p は、化学式 5 :  $*NH - CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2CO*$  によって定義され、

化学式 5 b :

【化 5】



20

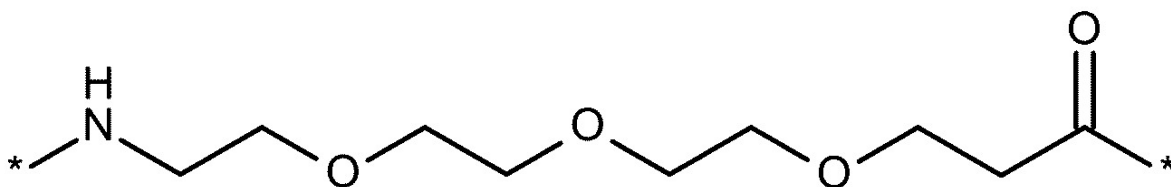
で表されてもよい。

【0078】

A e e e p は、化学式 6 :  $*NH - CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2CO*$  によって定義され、

化学式 6 b :

【化 6】



40

で表されてもよい。

【0079】

一実施形態では、Z 2 および Z 3 は、互いに独立して、G l u、 - L y s、 G l u、G l y、A l a、A d o、A e e p、A e e e p、および結合から選択される。

【0080】

一実施形態では、Z 2 および Z 3 は、互いに独立して、G l u、 - L y s、 G l u、G l y、A l a、A d o、および結合から選択される。

【0081】

一実施形態では、Z 2 および Z 3 は、互いに独立して、G l u、 - L y s、 G l u、G l y、A d o、および結合から選択される。

【0082】

50

一実施形態では、Z2およびZ3は、互いに独立して、-Lys、Glu、Gly、Ado、および結合から選択される。

【0083】

一実施形態では、Z2およびZ3は、互いに独立して、-Lys、Glu、Ado、および結合から選択される。

【0084】

一実施形態では、Z2およびZ3は、-LysまたはAdoである。

【0085】

一実施形態では、Z2およびZ3は、Adoである。

【0086】

一実施形態では、Z2およびZ3は、-Lysである。

【0087】

一実施形態では、置換基は、以下のように定義される置換基A、B、C、D、およびEから選択される。

【0088】

一実施形態では、置換基は、以下のように定義される置換基A、B、およびCから選択される。

【表1】

置換基#	Prot	Z1	Z2	Z3
A	C18 二酸	$\gamma$ Glu	Ado	Ado
B	C18 二酸	$\gamma$ Glu	$\epsilon$ Lys	$\epsilon$ Lys
C	C20 二酸	$\gamma$ Glu	$\epsilon$ Lys	$\epsilon$ Lys
D	C16 二酸	$\gamma$ Glu	Ado	Ado
E	C16 二酸	$\gamma$ Glu	$\epsilon$ Lys	$\epsilon$ Lys

【0089】

いくつかの実施形態では、置換基は、アシル化によって、すなわち、置換基のカルボン酸基とリジン残基のイプシロンアミノ基との間に形成されるアミド結合を介して、共作動薬のリジン残基に共有結合している。

【0090】

一実施形態では、置換基は、アシル化によって、すなわち、置換基のカルボン酸基とリジン残基のイプシロンアミノ基との間に形成されるアミド結合を介して、ペプチド骨格の16位のリジン残基に共有結合している。

【0091】

一実施形態では、置換基は、アシル化によって、すなわち、置換基のカルボン酸基とリジン残基のイプシロンアミノ基との間に形成されるアミド結合を介して、ペプチド骨格の33位のリジン残基に共有結合している。

【0092】

共作動薬は、同じ分子式および結合原子の配列を有する異なる立体異性形態で存在してもよいが、空間におけるそれらの原子の三次元方位のみ異なる。例証された共作動薬の立体異性は、標準の命名法を使用して、実験セクション、名称、ならびに構造に示されている。別段の定めのない限り、本発明は、具現化された誘導体の全ての立体異性形態に関する。

【0093】

機能的受容体活性化活性

本明細書に記載のGLP-1/GIP受容体作動薬の機能活性は、本明細書の実施例



2に記載されるようにインビトロで試験することができる。

【0094】

50%効果濃度 ( $EC_{50}$ ) という用語は、概して、用量反応曲線を参照することにより、ベースラインと最大との中間の反応を誘発する濃度を指す。 $EC_{50}$  は、化合物の効力の尺度として使用され、その最大効果の50%が観察される濃度を表す。

【0095】

したがって、化合物のインビトロ効力を本明細書に記載されるように決定することができ、 $EC_{50}$  を決定することができる。 $EC_{50}$  がより低いほど、効力がより良好である。

【0096】

かかる化合物を特徴付けるために、各々の受容体の天然ホルモンに関連してインビトロ効力を考慮することがさらに関連し得る。

【0097】

インビトロ効力は、例えば、適切なGLP-1受容体および/またはGIP受容体を発現する膜を含む培地中で、および/または適切なGLP-1受容体および/またはGIP受容体を発現する全細胞を用いたアッセイで決定され得る。

【0098】

例えば、ヒトGLP-1および/またはGIP受容体の機能的応答は、受容体遺伝子アッセイで、例えば、ヒトGLP-1および/またはGIP受容体を発現し、かつプロモーターに結合したcAMP応答配列 (CRE) のDNAおよびホタルルシフェラーゼ (CREルシフェラーゼ) の遺伝子を含む安定にトランスフェクトされたBHK細胞株中で測定され得る。GLP-1および/またはGIP受容体の活性化の結果としてcAMPが生成されると、次いで、ルシフェラーゼの発現がもたらされる。ルシフェラーゼは、ルシフェリンを添加することによって決定され得、これが酵素によってオキシルシフェリンに変換されて生物発光を生じ、これがインビトロ効力のレポーターとして測定される。かかるアッセイの一例が本明細書に記載の実施例2に記載される。本化合物がアルブミンに結合するように設計された置換基を含み得るため、受容体活性がアッセイ培地中のヒト血清アルブミン (HSA) の存在または不在に影響され得ることに留意することも重要である。HSAの不在下での $EC_{50}$ と比較した $EC_{50}$ の増加によって示されるHSAの存在下での本化合物の効力の減少は、本化合物とHSAとの相互作用を示し、インビボでの長期化作用時間を予測する。

【0099】

一実施形態では、本化合物は、ヒトGLP-1受容体およびGIP受容体を活性化する強力なインビトロ効果を有する。

【0100】

一実施形態では、本化合物は、HSAなしで行われた場合、本明細書の実施例2に記載のCREルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて20pM未満の $EC_{50}$ でヒトGLP-1受容体およびGIP受容体をインビトロで活性化することができる。

【0101】

一実施形態では、本化合物は、100pM以下、より好ましくは50pM未満、または最も好ましくは20pM未満の $EC_{50}$ に対応する実施例2の方法を使用して決定されるヒトGLP-1受容体およびGIP受容体でのインビトロ効力を有する。

【0102】

一実施形態では、ヒトGLP-1受容体アッセイおよびヒトGIP受容体アッセイにおける $EC_{50}$ はいずれも、1~20pMなど、1~15pMなど、または1~10pMなどの1~25pMである。

【0103】

薬物動態特性

共作動性化合物の薬物動態特性は、薬物動態 (PK) 研究によりインビボでさらに決定され得る。マウス、ラット、サル、イヌ、またはブタなどの動物モデルを使用して、こ

10

20

30

40

50

の特徴付けを行うことができる。

#### 【0104】

かかる研究では、動物に、典型的には、関連する製剤で、薬物の単回投与により、静脈内投与されるか、皮下（s.c.）投与されるか、または経口（p.o.）投与されるかのいずれかが行われる。血液試料が投薬後の所定の時点で採取され、関連する定量アッセイを用いて薬剤の濃度について分析される。これらの測定値に基づいて、試験化合物の時間-血漿濃度プロファイルがプロットされ、データのいわゆるノンコンパートメント薬物動態解析が行われる。長い半減期が、低頻度での化合物の投与が可能であり得ることを示すため、終末相半減期が重要なパラメータである。インビボでの終末相半減期（ $t_{1/2}$ ）は、好適なモデルを使用して、例えば、実施例3に記載のミニプタにおける静脈内投与後または実施例4に記載のイヌにおける経口投与後に測定され得る。

10

#### 【0105】

一実施形態では、終末相半減期は、例えば、本明細書の実施例3に記載されるように、静脈内投与後のミニプタにおけるインビボでの半減期（ $t_{1/2}$ ）である。

#### 【0106】

一実施形態では、ミニプタにおける終末相半減期は、少なくとも30時間など、または少なくとも40時間などの少なくとも24時間である。

#### 【0107】

一実施形態では、終末相半減期は、例えば、本明細書の実施例4に記載されるように、経口投与後のイヌにおけるインビボでの半減期（ $t_{1/2}$ ）である。

20

#### 【0108】

一実施形態では、イヌにおける終末相半減期は、少なくとも40時間など、または少なくとも50時間などの少なくとも24時間である。

#### 【0109】

薬学的に許容可能な塩

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の共作動薬は、薬学的に許容可能な塩の形態である。塩は、例えば、塩基と酸との間の化学反応、例えば、 $2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  によって形成される。塩は、塩基性塩であっても酸性塩であってもよく、またはどちらでもなくてもよい（すなわち、中性塩）。水中で、塩基性塩は水酸化物イオンを生成し、酸性塩はヒドロニウムイオンを生成する。本共作動薬の塩は、それぞれ、アニオン基の間またはカチオン基の間にカチオンまたはアニオンを付加することによって形成され得る。これらの基は、本誘導体のペプチドおよび/または置換基に位置し得る。アニオン基の非限定的な例には、存在する場合、置換基中の任意の遊離カルボン酸基、ならびにペプチド中の遊離カルボン酸基が挙げられる。ペプチドは、存在する場合、C末端に遊離カルボン酸基、ならびにAspおよびGluなどの内部酸性アミノ酸残基の任意の遊離カルボキシル基を含み得る。

30

#### 【0110】

カチオン基の非限定的な例には、存在する場合、置換基中の任意の遊離アミノ基、ならびにペプチド中の遊離アミノ基が挙げられる。ペプチドは、存在する場合、N末端に遊離アミノ基、ならびにHis、Arg、およびLysなどの内部塩基性アミノ酸残基の任意の遊離イミダゾールまたはアミノ基を含み得る。

40

#### 【0111】

特定の実施形態では、ペプチドまたは誘導体は、薬学的に許容可能な塩の形態である。

#### 【0112】

生成プロセス

共作動薬は、例えば、t-BocもしくはFmoc化学反応または他の十分に確立された技法を使用した古典的なペプチド合成、例えば、固相ペプチド合成によって生成されてもよく、例えば、Greene and Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999、Florencio Zaragoza Dorwald, "Organic

50

Synthesis on Solid Phase”, Wiley - VCH Verlag GmbH, 2000、および“Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis”, Edited by W.C.Chan and P.D.White, Oxford University Press, 2000を参照されたい。

#### 【0113】

あるいは、本化合物は、組換え法によって、例えば、ペプチド配列をコードするDNA配列を含み、かつペプチドを発現することができる宿主細胞を、ペプチドの発現を許容する条件下で、好適な栄養培地で培養することによって生成されてもよい。これらのペプチドの発現に好適な宿主細胞の非限定的な例は、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、ならびに哺乳類BHKまたはCHO細胞株である。

10

#### 【0114】

非天然アミノ酸および/または共有結合した置換基を含む共作動薬は、実験パートに記載されるように生成されてもよい。

#### 【0115】

いくつかの共作動薬を調製する方法の具体的な例が実験パートに含まれている。

#### 【0116】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載のペプチドを調製するための方法に関する。

#### 【0117】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載のGLP-1/GIP共作動薬を調製するための方法に関する。

20

#### 【0118】

一実施形態では、本明細書に記載の化合物を調製するための方法は、固相ペプチド合成の工程を含む。置換基は、固相ペプチド合成の一部として連続して構築されてもよく、または別個に生成されてペプチド合成後にリジン残基を介して結合してもよい。

#### 【0119】

一実施形態では、本化合物は、置換基が2つのペプチド断片の一方に結合した後にそれらのペプチド断片がライゲーションされる二段階プロセスによって生成される。

#### 【0120】

医薬組成物

30

さらなる態様では、本発明は、本明細書に記載のGLP-1/GIP受容体共作動薬を含む医薬組成物に関する。本発明の化合物またはその薬学的に許容可能な塩と、任意選択で1つ以上の薬学的に許容可能な賦形剤とを含む組成物は、当該技術分野で公知のように調製され得る。

#### 【0121】

「賦形剤」という用語は、活性治療成分以外の任意の成分を広範に指す。賦形剤は、不活性(inert)物質、不活性(inactive)物質、および/または医学的に活性でない物質であり得る。賦形剤は、例えば、担体、ビヒクル、充填剤、結合剤、潤滑剤、滑剤、崩壊剤、流量制御剤、結晶化抑制剤、可溶化剤、安定剤、着色剤、香味剤、界面活性剤、乳化剤、もしくはそれらの組み合わせとして、および/または投与を改善するために、および/または活性物質の吸収を改善するために、様々な目的を果たし得る。使用される賦形剤の各々の量は、当該技術分野において慣習的な範囲内で変動し得る。経口剤形を製剤化するために使用され得る技法および賦形剤は、*Handbook of Pharmaceutical Excipients* (例えば、第8版、Sheskey et al., Eds., American Pharmaceuticals Association and Pharmaceutical Press, publications department of the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain (2017)、およびそれ以降のいずれかの版)、および*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (例えば、第22版、Remington and All

40

50

en, Eds., Pharmaceutical Press (2013)、およびそれ以降のいずれかの版)に記載されている。

【0122】

一実施形態では、本医薬組成物は、固体製剤、例えば、凍結乾燥または噴霧乾燥組成物であり得、これらをそのまま使用してもよく、または医師もしくは患者が使用前に溶媒および/または希釈剤を添加して使用してもよい。さらなる実施形態では、本医薬組成物は、例えば、国際公開第2012/080471号、国際公開第2013/189988号、または国際公開第2019/149880号に記載の製剤のうちのいずれか1つ以上を使用する、本活性成分、N-[8-(2-ヒドロキシベンゾイル)アミノ]カプリル酸塩、および当該技術分野で公知の1つ以上のさらなる賦形剤からなる固体製剤であり得る。

10

【0123】

あるいは、本医薬組成物は、水性製剤などの液体製剤である。注射に好適な液体組成物は、必要に応じて成分を溶解させて混合して、所望の最終生成物をもたらすことを伴う医薬産業の従来の技法を使用して調製することができる。したがって、ある手順に従って、本明細書に記載のGLP-1/GIP共作動薬は、好適なpHの好適な緩衝液中に溶解される。本組成物は、例えば、滅菌濾過によって滅菌され得る。

【0124】

薬学的適応

本発明のさらなる態様は、薬剤としての本明細書に記載のGLP-1/GIP受容体共作動薬化合物の使用に関する。

20

【0125】

一実施形態では、本明細書に記載の化合物は、以下の医学的処置における使用のためのものである：

(i) 高血糖症、2型糖尿病、耐糖能障害、1型糖尿病、非インスリン依存性糖尿病、MODY(若年発症成人型糖尿病)、妊娠糖尿病などの全ての形態の糖尿病の予防および/もしくは治療、ならびに/またはHbA1Cの低減、

(ii) 2型糖尿病の進行などの糖尿病疾患の進行の遅延または予防、耐糖能障害(IGT)からインスリンを必要とする2型糖尿病への進行の遅延、インスリン抵抗性の遅延または予防、および/またはインスリンを必要としない2型糖尿病からインスリンを必要とする2型糖尿病への進行の遅延、

30

(iii) 例えば、食物摂取量の減少、体重減少、食欲の抑制、満腹感の誘発による、肥満などの摂食障害の予防および/もしくは治療；過食性障害、神経性大食症、および/もしくは抗精神病薬もしくはステロイドの投与によって誘発された肥満の治療もしくは予防、胃内容排出の遅延、身体的可動性の増加、ならびに/または骨関節炎および/もしくは尿失禁などの肥満の併存疾患の予防および/もしくは治療、

(iv) (薬剤誘発性または食事と運動による)減量成功後の体重維持、すなわち、減量成功後の体重増加の予防。

(v) 肝脂肪症、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝炎症、または脂肪肝などの肝臓障害の予防および/または治療。

【0126】

40

一実施形態では、本化合物は、糖尿病および/または肥満を治療および/または予防するための方法に使用するためのものである。

【0127】

一実施形態では、本化合物は、糖尿病および/または肥満を治療するための方法に使用するためのものである。

【0128】

一実施形態では、本化合物は、2型糖尿病を治療および/または予防するための方法に使用するためのものである。

【0129】

一実施形態では、本化合物は、2型糖尿病を治療するための方法に使用するためのも

50

のである。

【 0 1 3 0 】

一実施形態では、本化合物は、肥満を治療および／または予防するための方法に使用するためのものである。

【 0 1 3 1 】

一実施形態では、本化合物は、肥満を治療するための方法に使用するものである。

【 0 1 3 2 】

一実施形態では、本化合物は、体重を管理するための方法に使用するものである。一実施形態では、本化合物は、食欲を低下させるための方法に使用するものである。一実施形態では、本化合物は、食物摂取量を減少させるための方法に使用するものである。

10

【 0 1 3 3 】

実施形態

1. ペプチドおよび置換基を含む化合物であって、当該ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、

Y X<sub>2</sub> E G T X<sub>6</sub> T S D Y S X<sub>12</sub> X<sub>13</sub> L E X<sub>16</sub> Q A A X<sub>20</sub> X<sub>21</sub> F X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> W  
L L X<sub>28</sub> G X<sub>30</sub> X<sub>31</sub> X<sub>32</sub> X<sub>33</sub> X<sub>34</sub> X<sub>35</sub> X<sub>36</sub> X<sub>37</sub> X<sub>38</sub> X<sub>39</sub> (配列番号 4 7)

C末端に任意選択のアミド修飾を有し、

20

式中、X<sub>2</sub>がA i bまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

X<sub>13</sub>がY、A、L、またはIであり、

X<sub>16</sub>がKまたはEであり、

X<sub>20</sub>がQ、R、E、Hであり、

X<sub>21</sub>がAまたはEであり、

X<sub>23</sub>がIまたはVであり、

X<sub>24</sub>がE、Q、またはNであり、

X<sub>28</sub>がAまたはRであり、

30

X<sub>30</sub>がGまたは不在であり、

X<sub>31</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>32</sub>がE、S、または不在であり、

X<sub>33</sub>がS、K、または不在であり、

X<sub>34</sub>がGまたは不在であり、

X<sub>35</sub>がAまたは不在であり、

X<sub>36</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>37</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>38</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>39</sub>がSまたは不在であり、

40

当該置換基が16位または33位のリジン(K)を介してペプチドに結合している、化合物、

またはその薬学的に許容可能な塩。

2. ペプチドおよび置換基を含み、当該ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、

Y X<sub>2</sub> E G T X<sub>6</sub> T S D Y S X<sub>12</sub> X<sub>13</sub> L E X<sub>16</sub> Q A A X<sub>20</sub> X<sub>21</sub> F X<sub>23</sub> X<sub>24</sub> W  
L L X<sub>28</sub> G G P X<sub>32</sub> X<sub>33</sub> X<sub>34</sub> X<sub>35</sub> X<sub>36</sub> X<sub>37</sub> X<sub>38</sub> X<sub>39</sub> (配列番号 3 6)

C末端に任意選択のアミド修飾を有し、

式中、X<sub>2</sub>がA i bまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

50

$X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、  
 $X_{16}$  が K または E であり、  
 $X_{20}$  が Q、R、E、H であり、  
 $X_{21}$  が A または E であり、  
 $X_{23}$  が I または V であり、  
 $X_{24}$  が E、Q、または N であり、  
 $X_{28}$  が A または R であり、  
 $X_{32}$  が E、S、または不在であり、  
 $X_{33}$  が S、K、または不在であり、  
 $X_{34}$  が G または不在であり、  
 $X_{35}$  が A または不在であり、  
 $X_{36}$  が P または不在であり、  
 $X_{37}$  が P または不在であり、  
 $X_{38}$  が P または不在であり、  
 $X_{39}$  が S または不在であり、

10

当該置換基が 16 位または 33 位のリジン (K) を介してペプチドに結合している、実施形態 1 に記載の化合物、

またはその薬学的に許容可能な塩。

3.  $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  が不在である、実施形態 1 に記載の化合物。

4.  $X_{34}$ 、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  が不在である、実施形態 1 に記載の化合物。

20

5.  $X_{32}$ 、 $X_{33}$ 、 $X_{34}$ 、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  が不在である、実施形態 1 に記載の化合物。

6.  $X_{30}$ 、 $X_{31}$ 、 $X_{32}$ 、 $X_{33}$ 、 $X_{34}$ 、 $X_{35}$ 、 $X_{36}$ 、 $X_{37}$ 、 $X_{38}$ 、および  $X_{39}$  が不在である、実施形態 1 に記載の化合物。

7. 当該ペプチドが C 末端に当該アミド修飾を有する、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

8.  $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  が、SSGA、ESGA、および SKGA からなる群から選択される、実施形態 1、2、または 7 のいずれか 1 つに記載の化合物。

9.  $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  が SSGA、実施形態 1、2、または 7 のいずれか 1 つに記載の化合物。

30

10.  $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  が ESGA である、実施形態 1、2、または 7 のいずれか 1 つに記載の化合物。

11.  $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$  が SKGA である、実施形態 1、2、または 7 のいずれか 1 つに記載の化合物。

12. 当該ペプチドのアミノ酸配列が、以下であり、

$YX_2EGTX_6TSDY SX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W$   
 $LLX_{28}GGPSSGAPPPS$  (配列番号 37)

式中、

$X_2$  が Aib または A であり、

40

$X_6$  が F または V であり、

$X_{12}$  が I または Y であり、

$X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、

$X_{16}$  が K または E であり、

$X_{20}$  が Q、R、E、H であり、

$X_{21}$  が A または E であり、

$X_{23}$  が I または V であり、

$X_{24}$  が E、Q、または N であり、

$X_{28}$  が A または R である、実施形態 1 に記載の化合物。

13. 当該ペプチドのアミノ酸配列が、以下であり、

50

$YX_2EGTX_6TSDY SX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W$   
 $LLX_{28}GGPESGAPPPS$  (配列番号 38)

式中、

$X_2$  が A i b または A であり、

$X_6$  が F または V であり、

$X_{12}$  が I または Y であり、

$X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、

$X_{16}$  が K または E であり、

$X_{20}$  が Q、R、E、H であり、

$X_{21}$  が A または E であり、

$X_{23}$  が I または V であり、

$X_{24}$  が E、Q、または N であり、

$X_{28}$  が A または R である、実施形態 1 に記載の化合物。

14. 当該ペプチドのアミノ酸配列が、以下であり、

$YX_2EGTX_6TSDY SX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W$   
 $LLX_{28}GGPSK G A P P P S$  (配列番号 39)

式中、

$X_2$  が A i b または A であり、

$X_6$  が F または V であり、

$X_{12}$  が I または Y であり、

$X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、

$X_{16}$  が K または E であり、

$X_{20}$  が Q、R、E、H であり、

$X_{21}$  が A または E であり、

$X_{23}$  が I または V であり、

$X_{24}$  が E、Q、または N であり、

$X_{28}$  が A または R である、実施形態 1 に記載の化合物。

15.  $X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}$  が、 $LLEKQAAREFIN$ 、 $LLEKQAAREFIE$ 、 $LLEKQAAQEFIE$ 、および  $LLEEQAAREFIE$  からなる群から選択される、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の化合物。

16. 当該ペプチドのアミノ酸配列が配列番号 1 ~ 27 または 33 ~ 35 のうちのいずれか 1 つである、実施形態 1 に記載の化合物。

17. 当該ペプチドが C 末端に当該アミド修飾を有する、実施形態 16 に記載の化合物。

18. 当該化合物が、実施例 2 に記載されるように CRE ルシフェラーゼ受容体アッセイにおいて HSA なしで測定された場合、20 pM 未満の EC<sub>50</sub> で、ヒト GLP-1 受容体および GIP 受容体をインビトロで活性化する、実施形態 1 ~ 17 のいずれかに 1 つに記載の化合物。

19. 当該化合物が、ミニブタにおいて少なくとも 35 時間の半減期を有する、実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の化合物。

20. 当該置換基が 16 Lys を介して結合している、実施形態 1 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の化合物。

21. 当該置換基が 33 Lys を介して結合している、実施形態 1 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の化合物。

22. 当該置換基が少なくとも 1 つのプロトラクターを含む、実施形態 1 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の化合物。

23. 当該プロトラクターが脂肪酸基である、実施形態 22 に記載の化合物。

24. 当該プロトラクターが、化学式 1:  $HOOC-(CH_2)_n-CO-$  (式中、n が、8 ~ 20 の範囲の整数、例えば、n = 14、16、または 18 である) によって定義される二酸である、実施形態 23 に記載の化合物。

25. 当該プロトラクターが、化学式 1:  $HOOC-(CH_2)_n-CO-$  (式中、n

10

20

30

40

50

が、8～20の範囲の整数、例えば、 $n = 16$ または18である）によって定義される二酸である、実施形態23に記載の化合物。

26．当該置換基が少なくとも1つのリンカー要素を含む、実施形態1～25のいずれか1つに記載の化合物。

27．当該置換基が最大3つのリンカー要素を含む、実施形態26に記載の化合物。

28．当該置換基が-Z1-Z2-Z3と呼ばれる最大3つのリンカー要素を含み、ここで、-Z1-が当該プロトラクターに連結しており、-Z3-が当該ペプチドに連結している、実施形態27に記載の化合物。

29．当該置換基が、

Prot-Z1-Z2-Z3-

(式中、

ProtがC16-C20二酸であり、

Z1がGluまたは結合であり、

Z2がLys、Glu、またはAdoであり、

Z3がLysまたはAdoである)である、実施形態1～28のいずれか1つに記載の化合物。

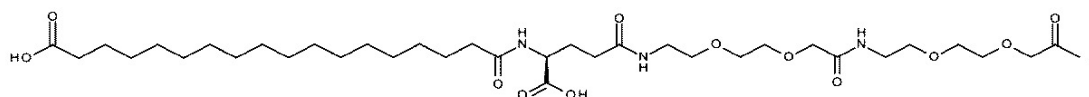
30．Z1-が-Glu-である、実施形態29に記載の化合物。

31．-Z2-Z3-およびが-Ado-Ado-である、実施形態29または30に記載の化合物。

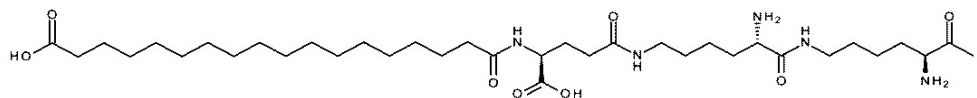
32．-Z2-Z3-およびが-Lys-Lys-である、実施形態29、30、または31に記載の化合物。

33．当該置換基が以下からなる群から選択される、実施形態1～17のいずれか1つに記載の化合物。

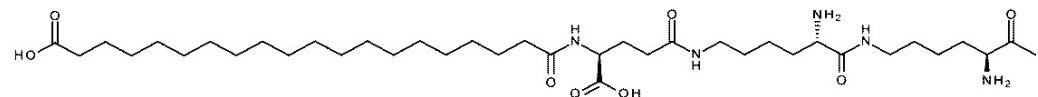
【化7】



A :



B :



C :

34．当該置換基が以下からなる群から選択される、実施形態1～17のいずれか1つに記載の化合物。

10

20

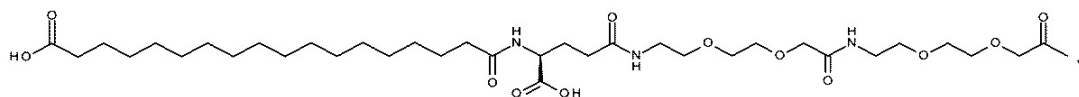
30

40

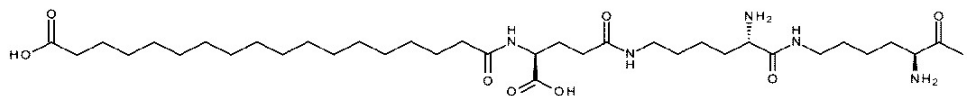
50



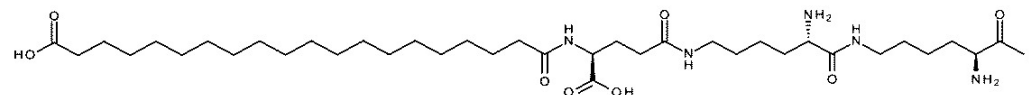
## 【化 8】



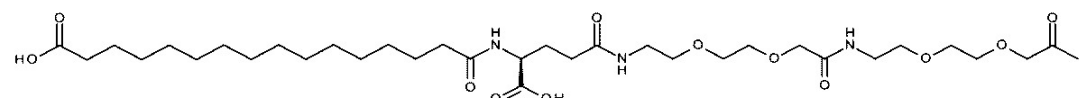
A :



B :

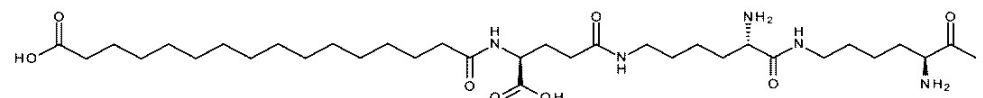


C :



D :

および



E :

35. 当該置換基がリジン (K) のイプシロン - アミノ基を介してペプチドに結合している、実施形態 1 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の化合物。

36. 当該化合物が以下からなる群から選択される、実施形態 1 に記載の化合物。

10

20

30

40

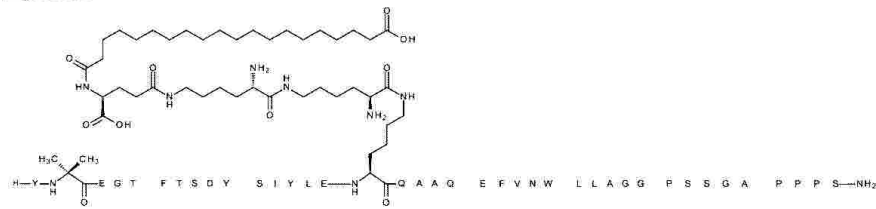
50

【化 9 - 1】

化合物番号1

配列番号1

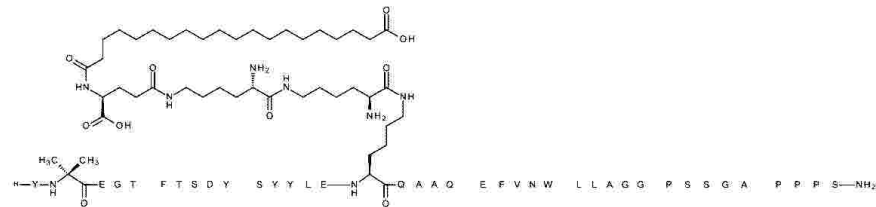
置換基:C



化合物番号2

配列番号2

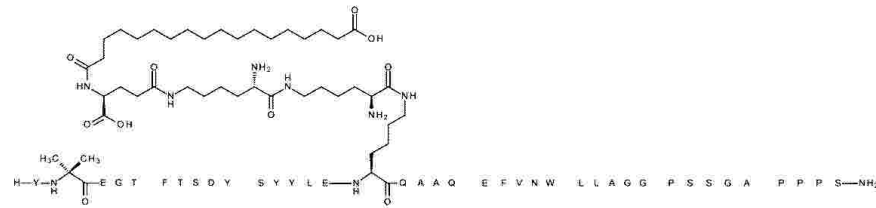
置換基:C



化合物番号3

配列番号2

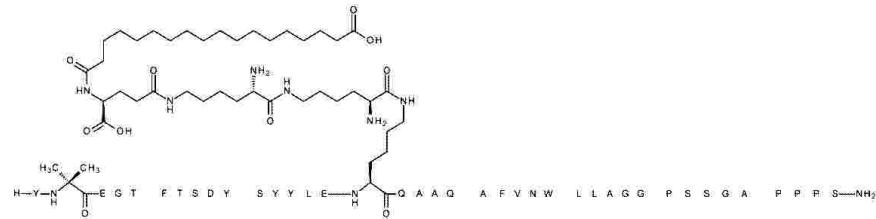
置換基:B



化合物番号4

配列番号3

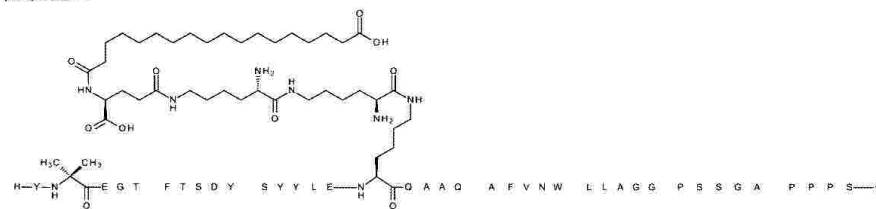
置換基:B



化合物番号5

配列番号3

置換基:B



10

20

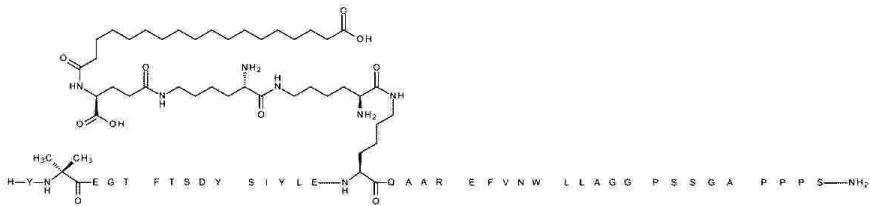
30

40

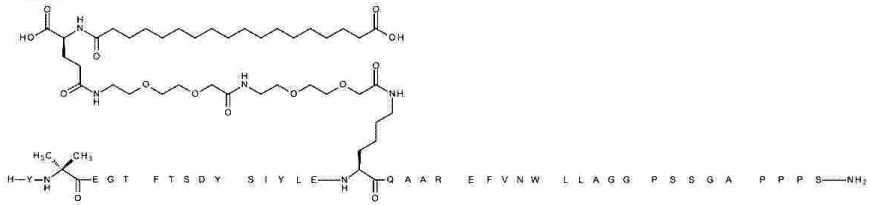
50

【化 9 - 2】

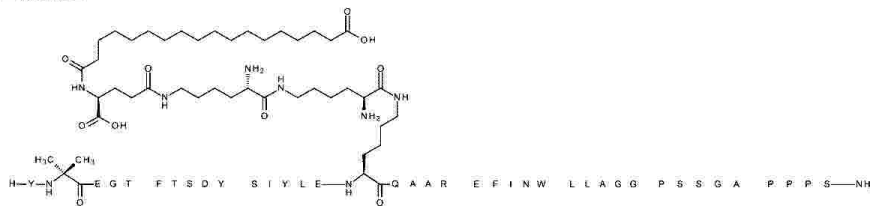
化合物番号6  
配列番号4  
置換基:B



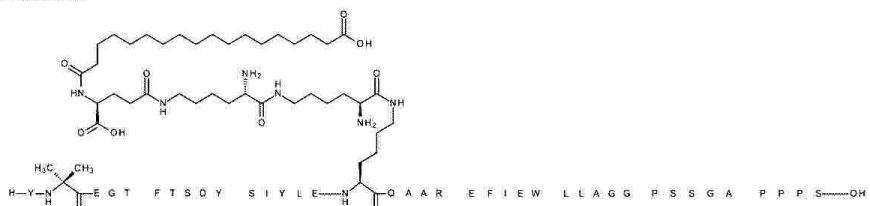
化合物番号7  
配列番号4  
置換基:A



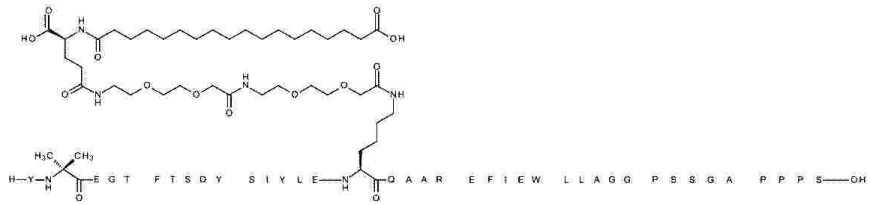
化合物番号8  
配列番号5  
置換基:B



化合物番号9  
配列番号6  
置換基:B



化合物番号10  
配列番号6  
置換基:A



10

20

30

40

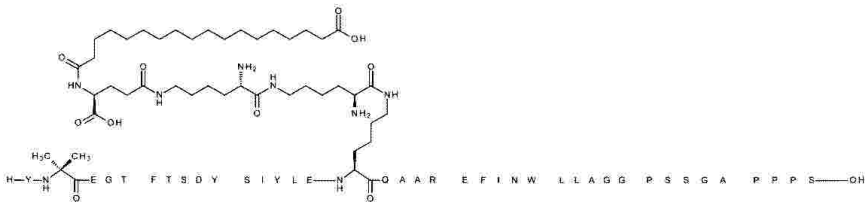
50

【化 9 - 3】

化合物番号11

配列番号5

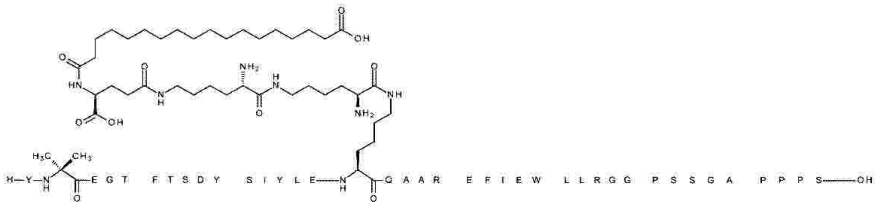
置換基:B



化合物番号12

配列番号7

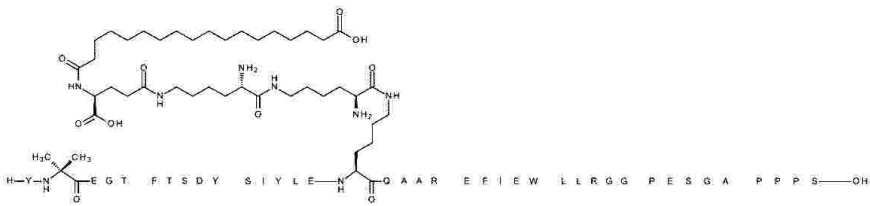
置換基:B



化合物番号13

配列番号8

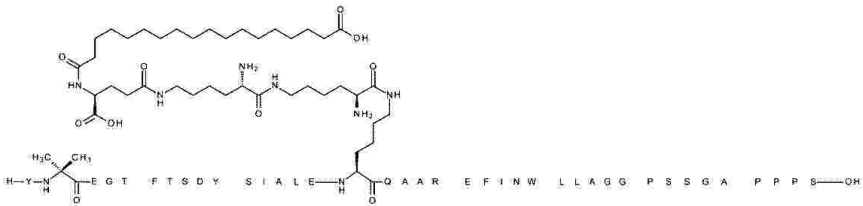
置換基:B



化合物番号14

配列番号9

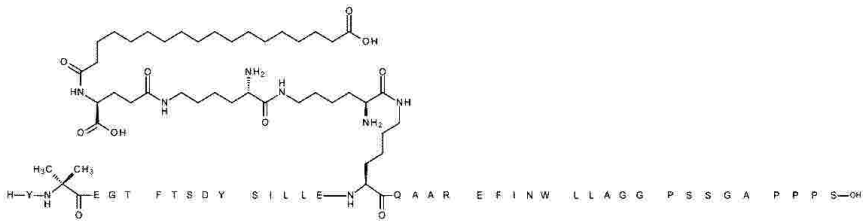
置換基:B



化合物番号15

配列番号10

置換基:B



10

20

30

40

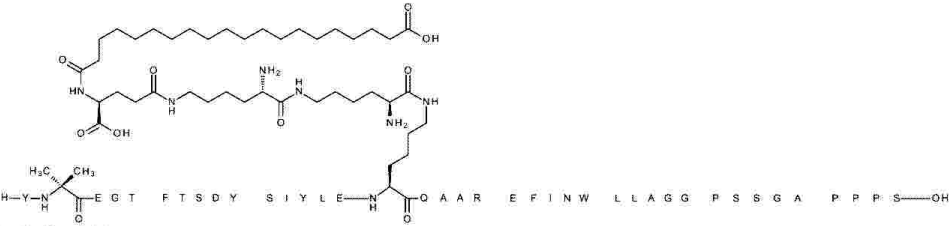
50

【化 9 - 4】

化合物番号16

配列番号5

置換基:C

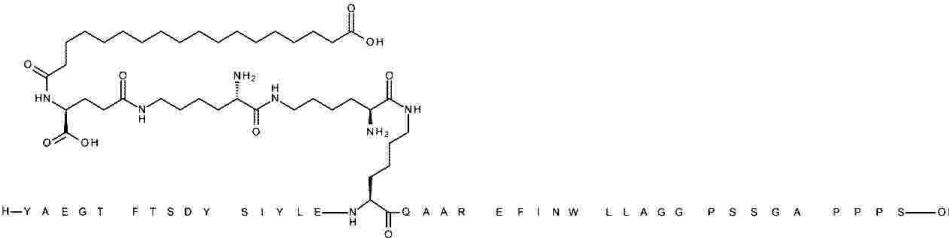


10

化合物番号17

配列番号11

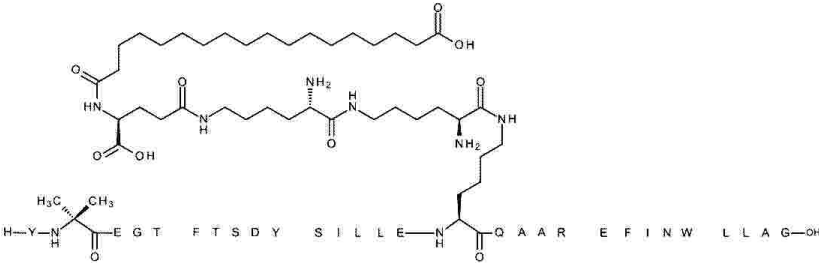
置換基:B



化合物番号18

配列番号12

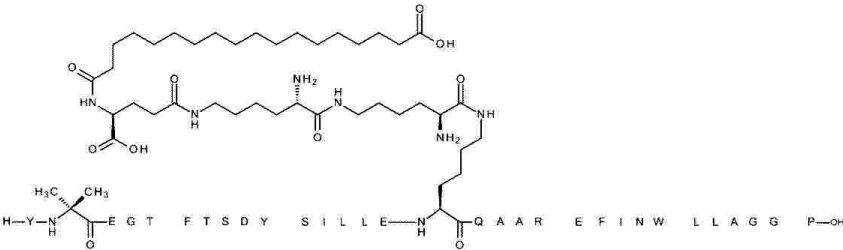
置換基:B



化合物番号19

配列番号13

置換基:B



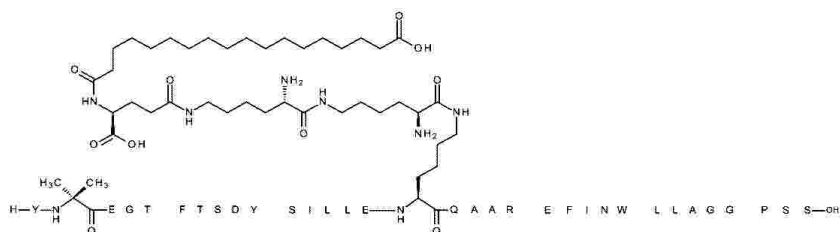
化合物番号20

配列番号14

置換基:B

40

## 【化 9 - 5】

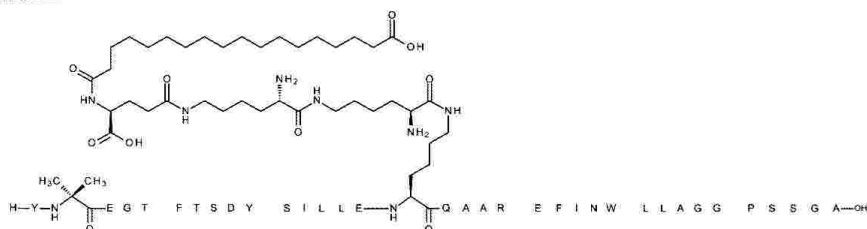


化合物番号21

配列番号15

置換基:B

10

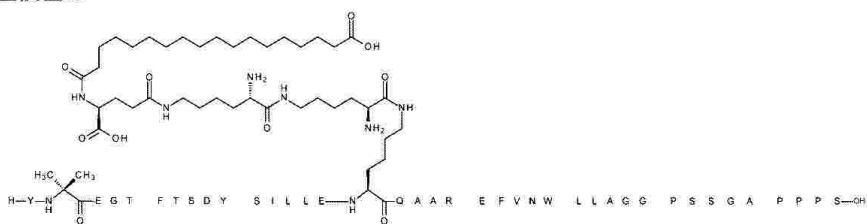


化合物番号22

配列番号16

置換基:B

20

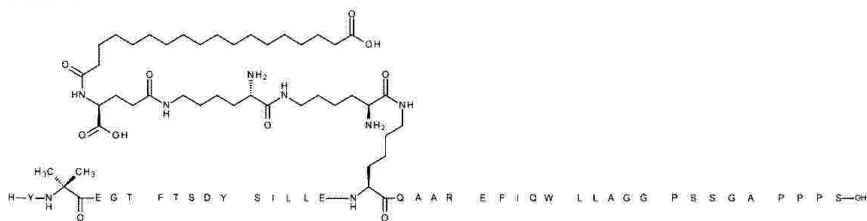


化合物番号23

配列番号17

置換基:B

30

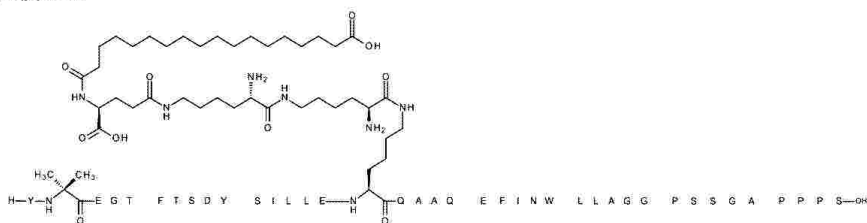


化合物番号24

配列番号18

置換基:B

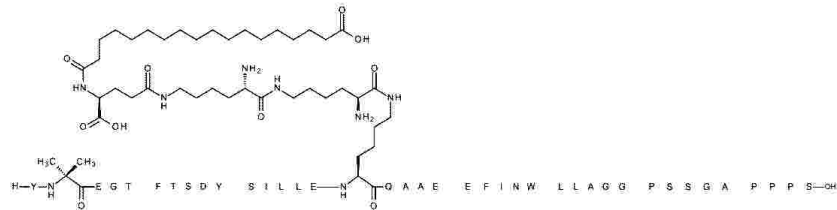
40



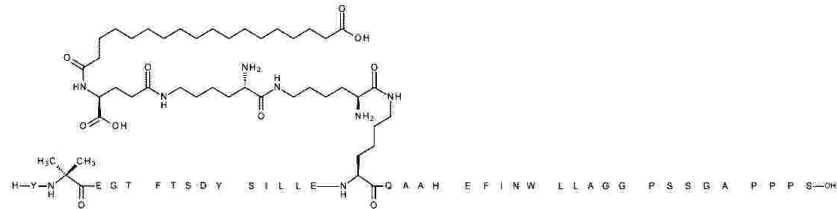
50

【化 9 - 6】

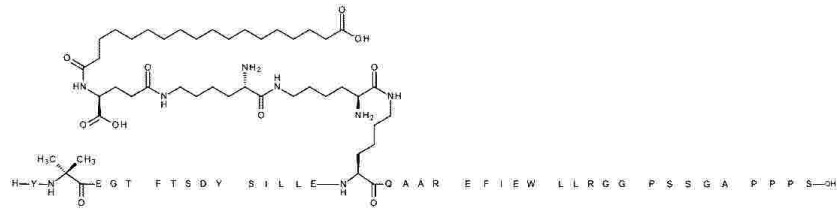
化合物番号25  
配列番号19  
置換基:B



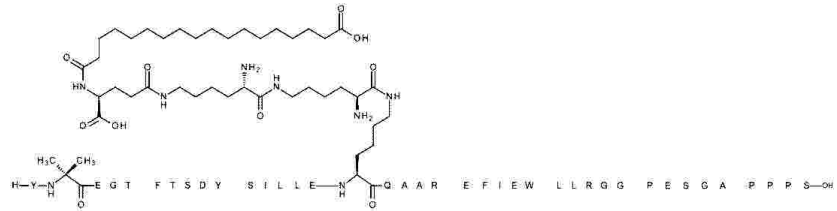
化合物番号26  
配列番号20  
置換基:B



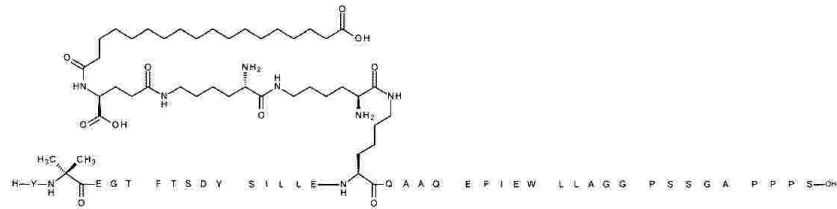
化合物番号27  
配列番号21  
置換基:B



化合物番号28  
配列番号22  
置換基:B



化合物番号29  
配列番号23  
置換基:B



10

20

30

40

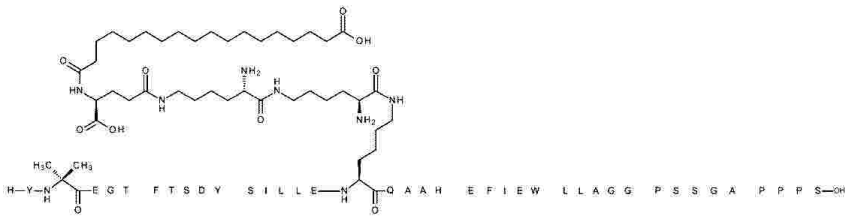
50

【化 9 - 7】

化合物番号30

配列番号24

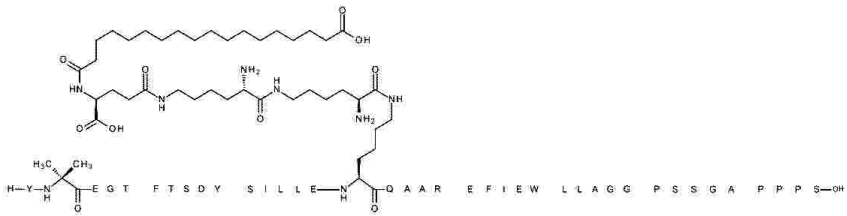
置換基:B



化合物番号31

配列番号25

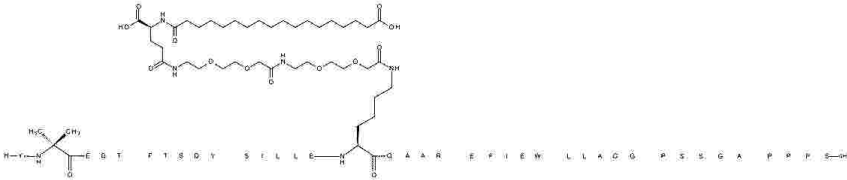
置換基:B



化合物番号32

配列番号25

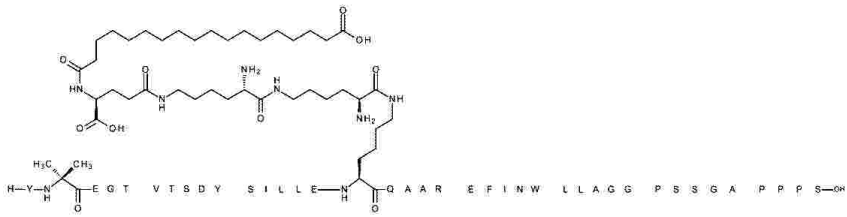
置換基:A



化合物番号33

配列番号26

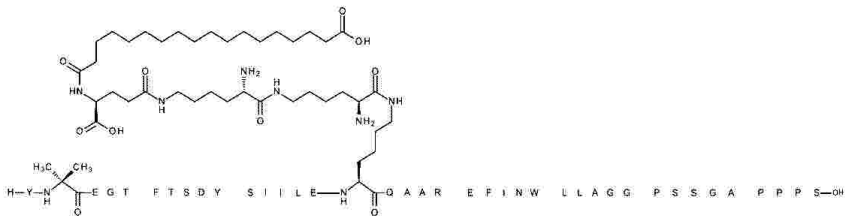
置換基:B



化合物番号34

配列番号27

置換基:B



10

20

30

40

50

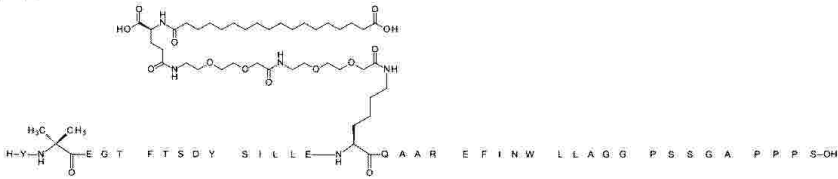


【化 9 - 8】

化合物番号35

配列番号10

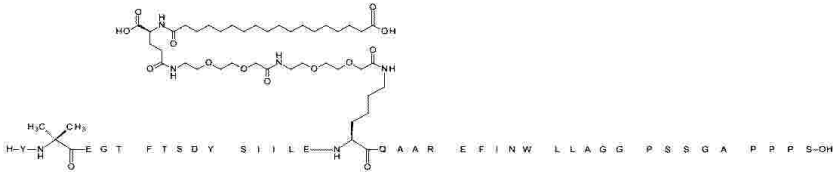
置換基:A



化合物番号36

配列番号27

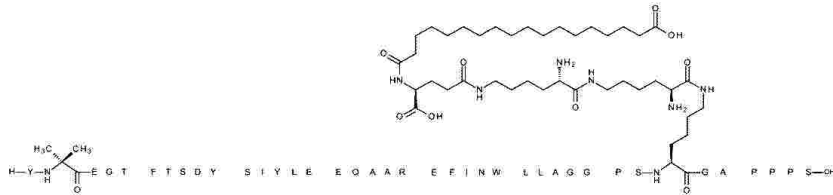
置換基:A



化合物番号42

配列番号33

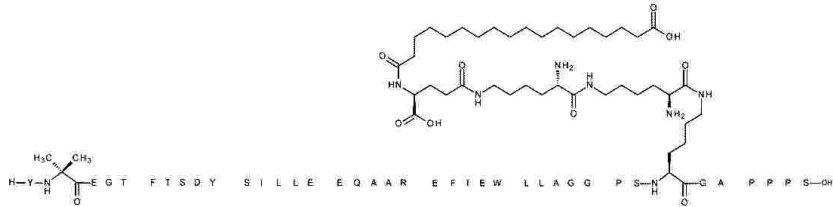
置換基:B



化合物番号43

配列番号34

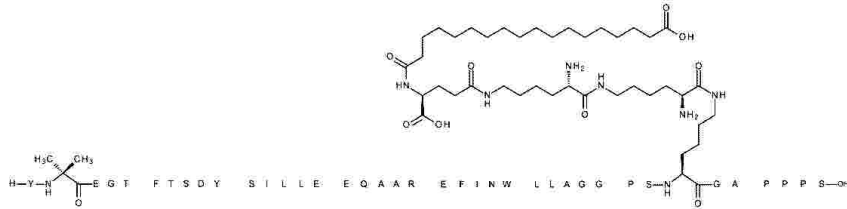
置換基:B



化合物番号44

配列番号35

置換基:B



化合物番号45

配列番号34

置換基:A



10

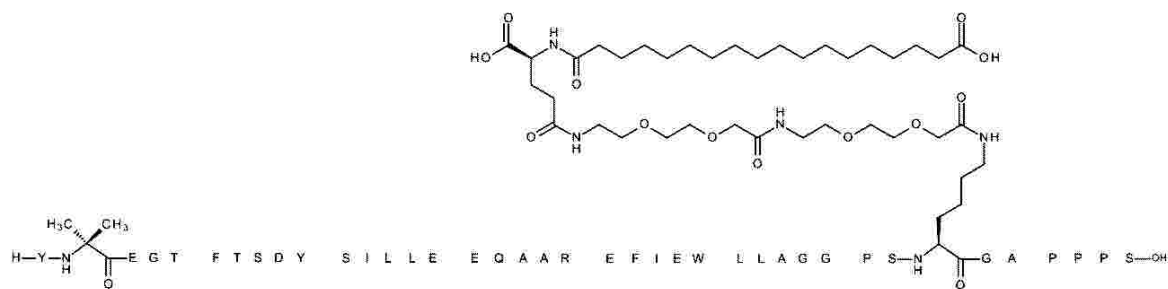
20

30

40

50

【化 9 - 9】

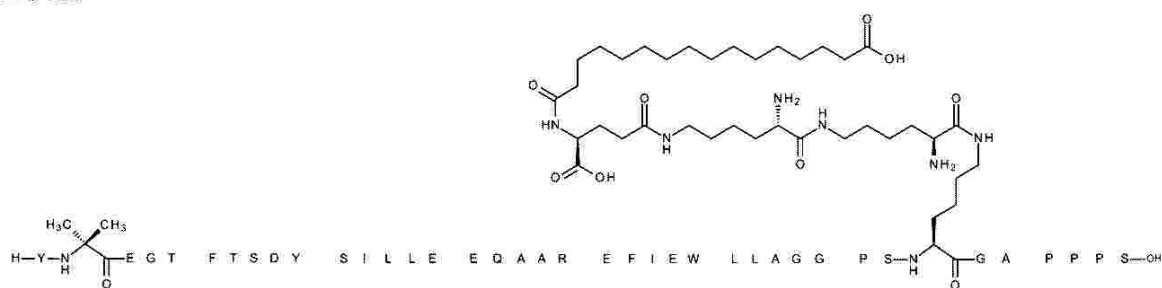


化合物番号46

10

配列番号34

置換基:E

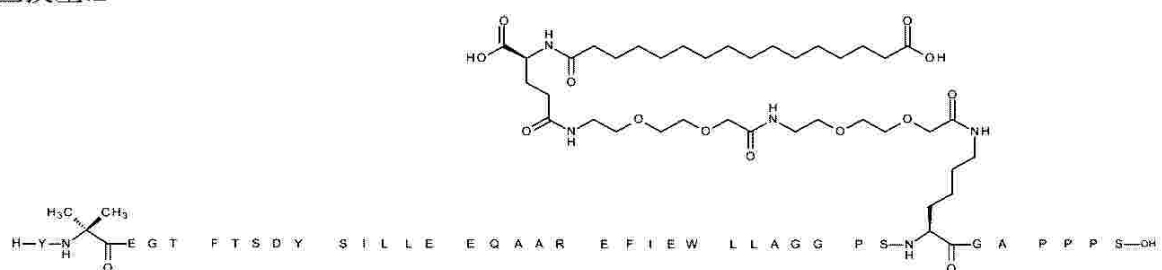


化合物番号47

20

配列番号34

置換基:D



30

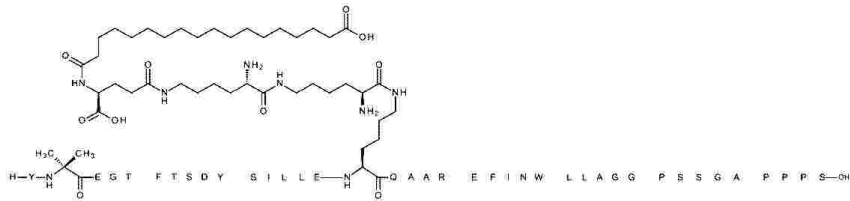
37. 当該化合物が以下からなる群から選択される、実施形態1に記載の化合物。

40

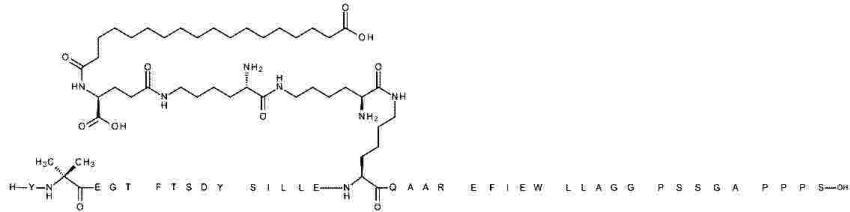
50

【化 1 0 - 1】

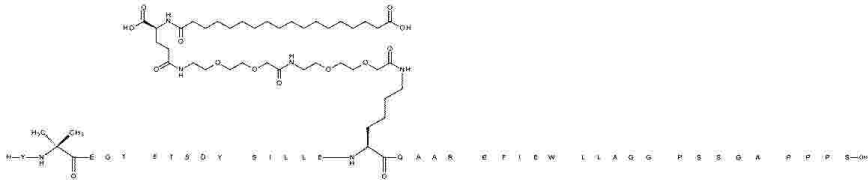
化合物番号15  
配列番号10  
置換基:B



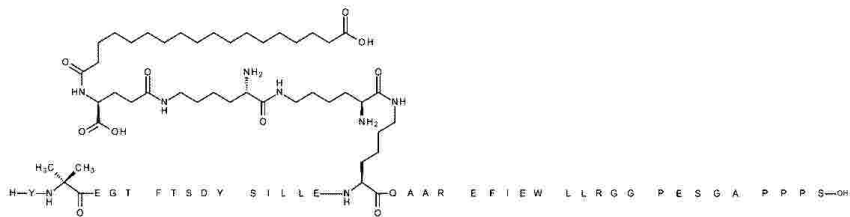
化合物番号31  
配列番号25  
置換基:B



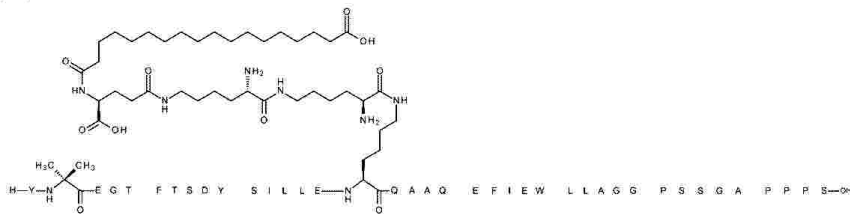
化合物番号32  
配列番号25  
置換基:A



化合物番号28  
配列番号22  
置換基:B



化合物番号29  
配列番号23  
置換基:B



10

20

30

40

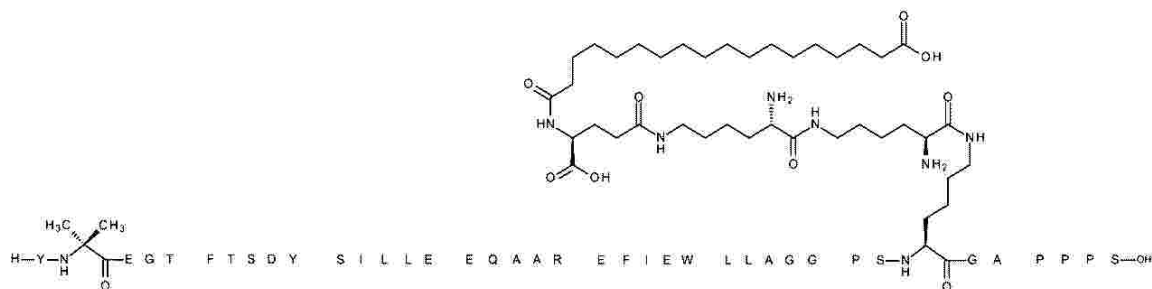
50

【化 10 - 2】

化合物番号43

配列番号34

置換基:B

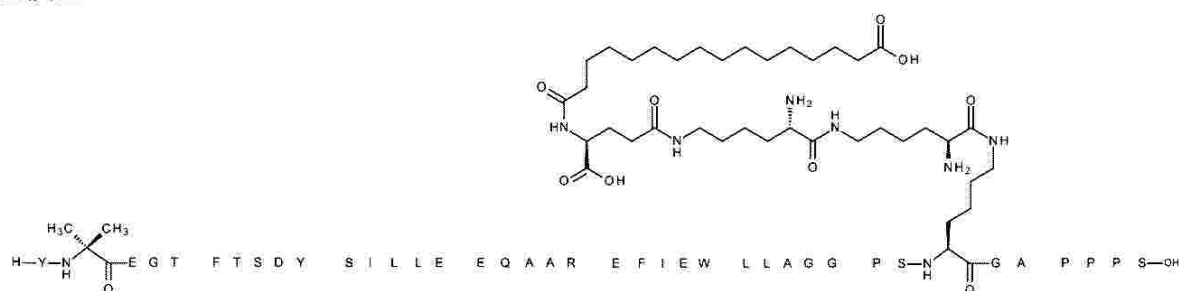


10

化合物番号46

配列番号34

置換基:E

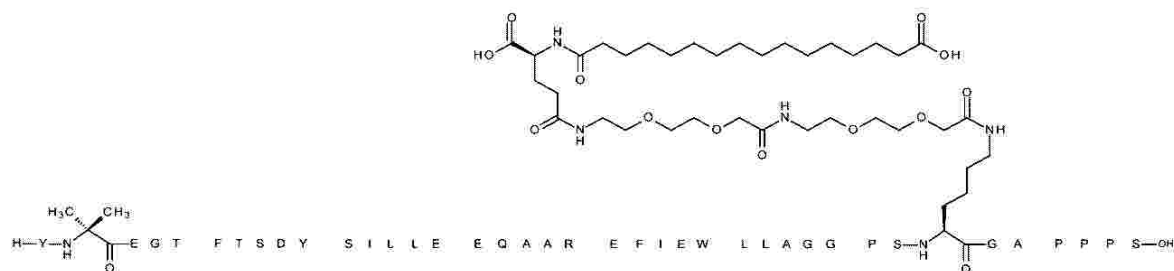


20

化合物番号47

配列番号34

置換基:D



30

38. 当該化合物が以下からなる群から選択される、実施形態1に記載の化合物。

40

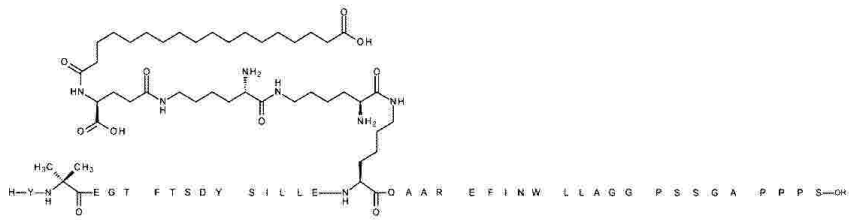
50

【化 1 1 - 1】

化合物番号15

配列番号10

置換基:B

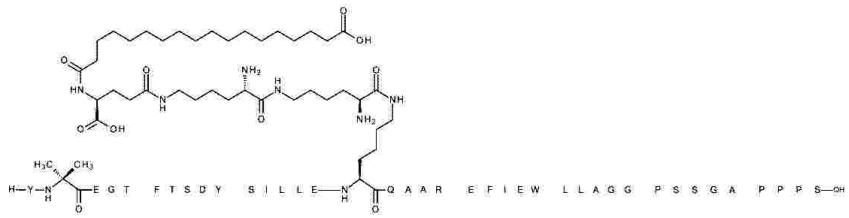


10

化合物番号31

配列番号25

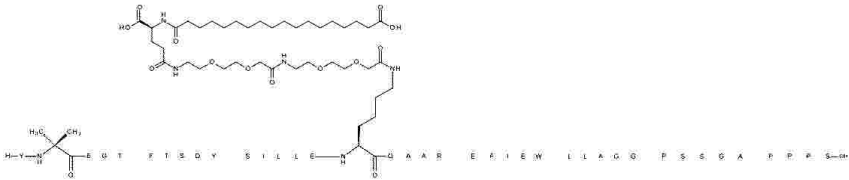
置換基:B



化合物番号32

配列番号25

置換基:A

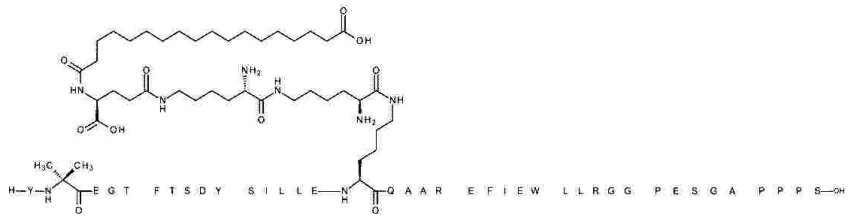


20

化合物番号28

配列番号22

置換基:B

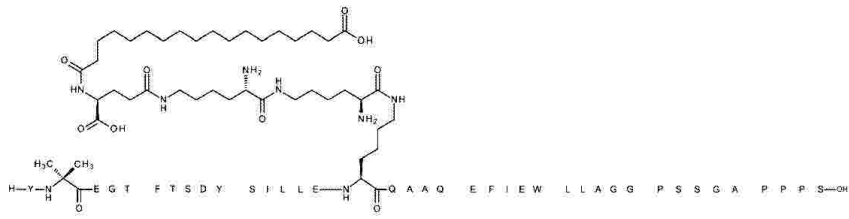


30

化合物番号29

配列番号23

置換基:B



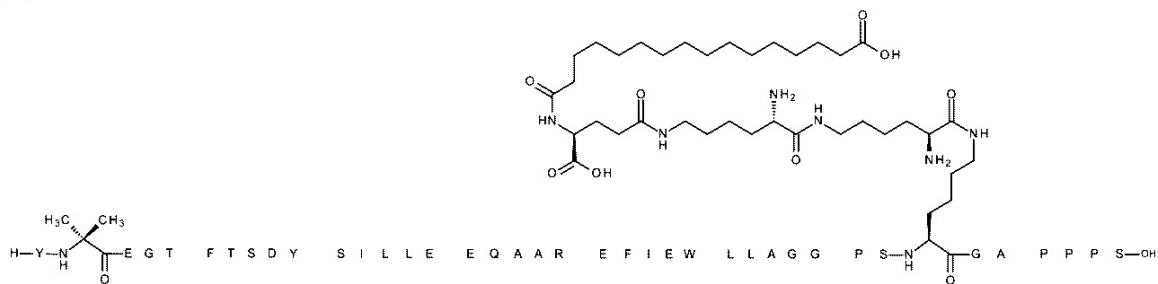
40

【化 1 1 - 2】

化合物番号46

配列番号34

置換基:E

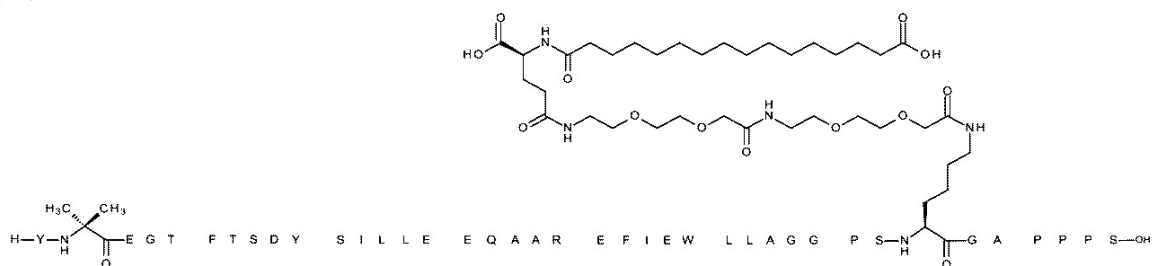


10

化合物番号47

配列番号34

置換基:D



20

39. 当該化合物が以下である、実施形態1に記載の化合物。

30

40

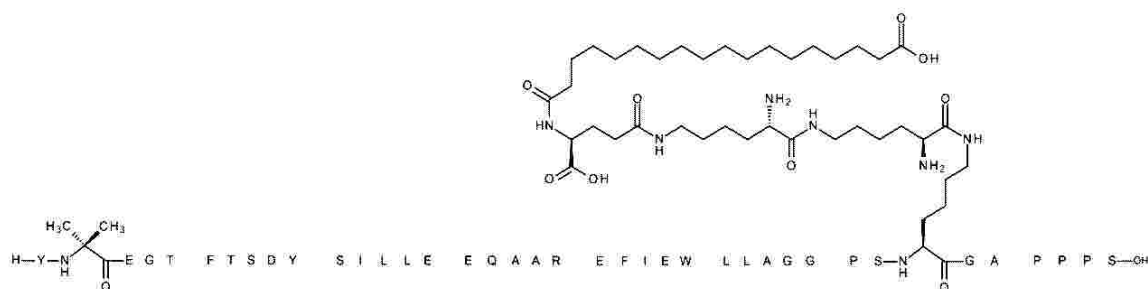
50

## 【化 1 2】

化合物番号43

配列番号34

置換基:B

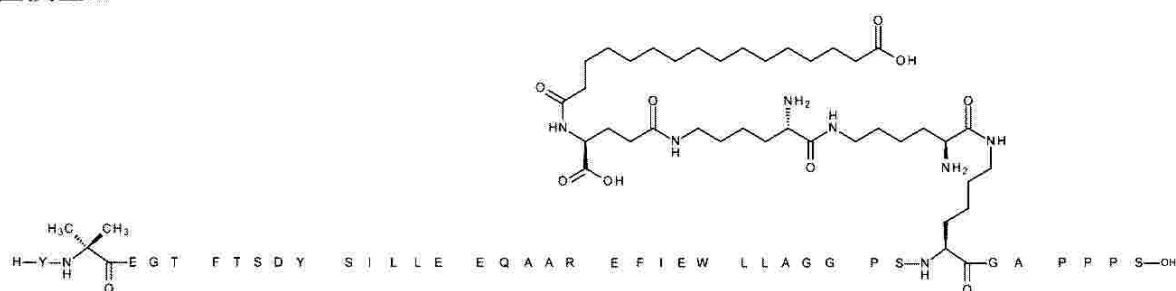


10

化合物番号46

配列番号34

置換基:E

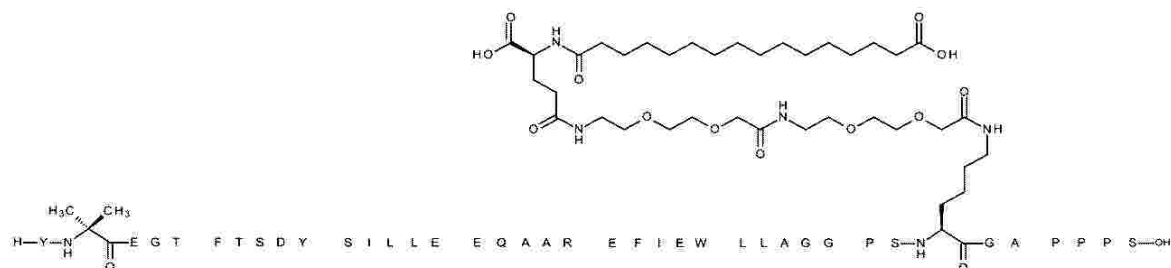


20

化合物番号47

配列番号34

置換基:D



30

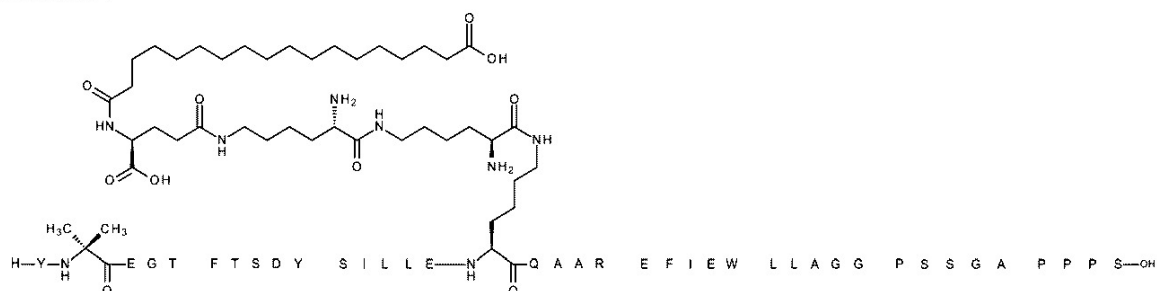
40. 当該化合物が以下である、実施形態 1 に記載の化合物。

## 【化 1 3】

化合物番号31

配列番号25

置換基:B



40

41. 医薬として使用するための、実施形態 1 ~ 40 のいずれか 1 つに記載の化合物。

42. 実施形態 1 ~ 40 のいずれか 1 つに記載の化合物を含む、医薬組成物。

50

43．当該組成物が水性液体である、実施形態42に記載の組成物。

44．当該組成物が固体組成物である、実施形態42に記載の組成物。

45．糖尿病および/または肥満の予防および/または治療のための、実施形態42～44のいずれか1つに記載の医薬組成物。

46．肝脂肪症、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）肝炎症、および/または脂肪肝などの肝臓障害の予防および/または治療のための、実施形態42～44のいずれか1つに記載の医薬組成物。

47．糖尿病および/または肥満を予防および/または治療するための方法であって、患者に、薬学的に活性な量の実施形態1～40のいずれか1つに記載の化合物を投与することを含む、方法。

10

48．肝脂肪症、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）肝炎症、および/または脂肪肝などの肝臓障害を予防および/または治療するための方法であって、患者に、薬学的に活性な量の実施形態1～40のいずれか1つに記載の化合物を投与することを含む、方法。

49．ペプチドであって、当該ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、

YX<sub>2</sub>EGTX<sub>6</sub>TS DY SX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>LEX<sub>16</sub>QAA X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>FX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>W  
LLX<sub>28</sub>GX<sub>30</sub>X<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>（配列番号47）

C末端に任意選択のアミド修飾を有し、  
式中、

20

X<sub>2</sub>がAibまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

X<sub>13</sub>がY、A、L、またはIであり、

X<sub>16</sub>がKまたはEであり、

X<sub>20</sub>がQ、R、E、Hであり、

X<sub>21</sub>がAまたはEであり、

X<sub>23</sub>がIまたはVであり、

X<sub>24</sub>がE、Q、またはNであり、

X<sub>28</sub>がAまたはRであり、

30

X<sub>30</sub>がGまたは不在であり、

X<sub>31</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>32</sub>がE、S、または不在であり、

X<sub>33</sub>がS、K、または不在であり、

X<sub>34</sub>がGまたは不在であり、

X<sub>35</sub>がAまたは不在であり、

X<sub>36</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>37</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>38</sub>がPまたは不在であり、

X<sub>39</sub>がSまたは不在である、ペプチド。

40

50．ペプチドであって、当該ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、

YX<sub>2</sub>EGTX<sub>6</sub>TS DY SX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>LEX<sub>16</sub>QAA X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>FX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>W  
LLX<sub>28</sub>GGPX<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>（配列番号36）

C末端に任意選択のアミド修飾を有し、  
式中、

X<sub>2</sub>がAibまたはAであり、

X<sub>6</sub>がFまたはVであり、

X<sub>12</sub>がIまたはYであり、

X<sub>13</sub>がY、A、L、またはIであり、

X<sub>16</sub>がKまたはEであり、

50



<p> <math>X_{20}</math> が Q、R、E、H であり、  <math>X_{21}</math> が A または E であり、  <math>X_{23}</math> が I または V であり、  <math>X_{24}</math> が E、Q、または N であり、  <math>X_{28}</math> が A または R であり、  <math>X_{32}</math> が E、S、または不在であり、  <math>X_{33}</math> が S、K、または不在であり、  <math>X_{34}</math> が G または不在であり、  <math>X_{35}</math> が A または不在であり、  <math>X_{36}</math> が P または不在であり、  <math>X_{37}</math> が P または不在であり、  <math>X_{38}</math> が P または不在であり、  <math>X_{39}</math> が S または不在である、ペプチド。  51. <math>X_{36}</math>、<math>X_{37}</math>、<math>X_{38}</math>、および <math>X_{39}</math> が不在である、実施形態 49 に記載のペプチド。  52. <math>X_{34}</math>、<math>X_{35}</math>、<math>X_{36}</math>、<math>X_{37}</math>、<math>X_{38}</math>、および <math>X_{39}</math> が不在である、実施形態 49 に記載のペプチド。  53. <math>X_{32}</math>、<math>X_{33}</math>、<math>X_{34}</math>、<math>X_{35}</math>、<math>X_{36}</math>、<math>X_{37}</math>、<math>X_{38}</math>、および <math>X_{39}</math> が不在である、実施形態 49 に記載のペプチド。  54. <math>X_{30}</math>、<math>X_{31}</math>、<math>X_{32}</math>、<math>X_{33}</math>、<math>X_{34}</math>、<math>X_{35}</math>、<math>X_{36}</math>、<math>X_{37}</math>、<math>X_{38}</math>、および <math>X_{39}</math> が不在である、実施形態 49 に記載のペプチド。  55. <math>X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}</math> が、SSGA、ESGA、および SKGA の群から選択される、実施形態 49 または 50 に記載のペプチド。  56. <math>X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}</math> SSGA、実施形態 55 に記載のペプチド。  57. <math>X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}</math> が ESGA である、実施形態 55 に記載のペプチド。  58. <math>X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}</math> が SKGA である、実施形態 55 に記載のペプチド。  59. 当該ペプチドが C 末端に当該アミド修飾を有する、実施形態 47 ~ 58 のいずれか 1 つに記載のペプチド。  60. 当該ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、  <math>YX_2EGTX_6TSDYSX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W</math>  <math>LLX_{28}GGPSSGAPPPS</math> (配列番号 37)  式中、  <math>X_2</math> が A i b または A であり、  <math>X_6</math> が F または V であり、  <math>X_{12}</math> が I または Y であり、  <math>X_{13}</math> が Y、A、L、または I であり、  <math>X_{16}</math> が K または E であり、  <math>X_{20}</math> が Q、R、E、H であり、  <math>X_{21}</math> が A または E であり、  <math>X_{23}</math> が I または V であり、  <math>X_{24}</math> が E、Q、または N であり、  <math>X_{28}</math> が A または R である、実施形態 49 に記載のペプチド。  61. 当該ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、  <math>YX_2EGTX_6TSDYSX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W</math>  <math>LLX_{28}GGPESGAPPPS</math> (配列番号 38)  式中、  <math>X_2</math> が A i b または A であり、  <math>X_6</math> が F または V であり、  <math>X_{12}</math> が I または Y であり、  <math>X_{13}</math> が Y、A、L、または I であり、 </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p> <p>50</p>
--	---

$X_{16}$  が K または E であり、  
 $X_{20}$  が Q、R、E、H であり、  
 $X_{21}$  が A または E であり、  
 $X_{23}$  が I または V であり、  
 $X_{24}$  が E、Q、または N であり、  
 $X_{28}$  が A または R である、実施形態 48 に記載のペプチド。  
 62. 当該ペプチドのアミノ酸配列が以下であり、  
 $YX_2EGTX_6TSDY SX_{12}X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}W$   
 $LLX_{28}GGPSKGA P P P S$  (配列番号 39)

式中、

$X_2$  が A i b または A であり、  
 $X_6$  が F または V であり、  
 $X_{12}$  が I または Y であり、  
 $X_{13}$  が Y、A、L、または I であり、  
 $X_{16}$  が K または E であり、  
 $X_{20}$  が Q、R、E、H であり、  
 $X_{21}$  が A または E であり、  
 $X_{23}$  が I または V であり、  
 $X_{24}$  が E、Q、または N であり、  
 $X_{28}$  が A または R である、実施形態 49 に記載のペプチド。

63. 当該ペプチドのアミノ酸配列が配列番号 1 ~ 27 または 33 ~ 35 のうちのいずれか 1 つである、実施形態 49 に記載のペプチド。

64. 当該ペプチドが C 末端に当該アミド修飾を有する、実施形態 63 に記載のペプチド。

65.  $X_{13}LEX_{16}QAA X_{20}X_{21}FX_{23}X_{24}$  が、 $LLEKQAAREFIN$ 、 $LLEKQAAREFIE$ 、 $LLEKQA AQEFIE$ 、および  $LLEEQAAREFIE$  からなる群から選択される、実施形態 49 ~ 64 のいずれか 1 つに記載のペプチド。

66. 当該ペプチドが、実施例 2 に記載されるように CREL シフェラーゼ受容体アッセイにおいて HSA なしで測定された場合、20 pM 未満の  $EC_{50}$  で、ヒト GLP-1 受容体および GIP 受容体をインビトロで活性化する、実施形態 49 ~ 64 のいずれかに 1 つに記載のペプチド。

67.  $X_{16}$  が K である、実施形態 49 ~ 64 のいずれか 1 つに記載のペプチド。

68.  $X_{33}$  が K である、実施形態 49 ~ 64 のいずれか 1 つに記載のペプチド。

69. 当該ペプチドのアミノ酸配列が配列番号 15、28、29、31、32、または 43 のうちのいずれかである、実施形態 49 に記載のペプチド。

70. 当該ペプチドのアミノ酸配列が配列番号 31 である、実施形態 49 に記載のペプチド。

71. 実施形態 1 ~ 40 のいずれか 1 つに記載の化合物を調製するための方法。

72. 実施形態 49 ~ 64 のいずれか 1 つに記載のペプチドを調製するための方法。

73. 実施形態 49 ~ 70 のいずれか 1 つに記載のペプチドを調製するための方法。

#### 【0134】

方法および実施例

略語リスト

以下の略語はアルファベット順であり、以下で使用される。

A c : アセチル

A d o ( O E G と呼ばれる ) : 8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸

A i b : - アミノイソ酪酸

A P I : 医薬品有効成分

A U C : 曲線下面積

B G : 血糖

10

20

30

40

50

B H K	：ベビーハムスター腎臓	
B o c	： t e r t - ブチルオキシカルボニル	
B W	：体重	
C A S	：ケミカルアブストラクトサービス	
C l - H O B t	： 6 - クロロ - 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール	
D C M	：ジクロロメタン	
D I C	：ジイソプロピルカルボジイミド	
D I P E A	： N , N - ジイソプロピルエチルアミン	
D M E M	：ダルベッコ改変イーグル培地	
D P B S	：ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水	10
E D T A	：エチレンジアミン四酢酸	
E L I S A	：酵素結合免疫吸着アッセイ	
e q u i v	：モル当量	
F B S	：ウシ胎児血清	
F m o c	： 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル	
G I P	：グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド	
G I P R	：グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド受容体	
G L P - 1	：グルカゴン様ペプチド 1	
G L P - 1 R	：グルカゴン様ペプチド 1 受容体	
h	：時間	20
H E P E S	： 4 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸	
H F I P	： 1 , 1 , 1 , 3 , 3 , 3 - ヘキサフルオロ - 2 - プロパノールまたはヘキサフルオロイソプロパノール	
H P L C	：高速液体クロマトグラフィー	
H S A	：ヒト血清アルブミン	
i . p .	：腹腔内	
I P G T T	： 腹腔内糖負荷試験	
i . v .	：静脈内	
L C M S	：液体クロマトグラフィー質量分析	
L Y D	：ランドレース・ヨークシャー・デュロック	30
M e C N	：アセトニトリル	
M e O H	：メタノール	
m M	：ミリモル	
m m o l	：ミリモル	
m i n	：分	
M t t	： 4 - メチルトリチル	
M W	：分子量	
n M	：ナノモル	
N M P	： 1 - メチル - ピロリジン - 2 - オン	
O E G	： 8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸 ( A d o と呼ばれる )	40
O t B u	： t e r t - ブチルエステル	
O x y m a P u r e	( 登録商標 ) : シアノ - ヒドロキシイミノ - 酢酸エチルエステル	
P b f	： 2 , 2 , 4 , 6 , 7 - ペンタメチルジヒドロベンゾフラン - 5 - スルホニル	
P B S	：リン酸緩衝生理食塩水	
P D	：薬力学的	
P K	：薬物動態	
p M	：ピコモル	
R P	：逆相	
R P - H P L C	：逆相高速液体クロマトグラフィー	
r p m	： 1 分当たりのラウンド数	50

R T : 室温  
 R t : 保持時間  
 s . c . : 皮下  
 S D : 標準偏差  
 S E C - H P L C : サイズ排除高速液体クロマトグラフィー  
 S E M : 標準誤差  
 S N A C : N - [ 8 - ( 2 - ヒドロキシベンゾイル ) アミノ ] カプリル酸ナトリウム  
 S P P S : 固相ペプチド合成  
 t B u : t e r t - ブチル  
 T F A : トリフルオロ酢酸  
 T I S : トリイソプロピルシラン  
 T r t : トリフェニルメチルまたはトリチル  
 T r x : トラネキサム酸

10

## 【 0 1 3 5 】

一般的な調製方法

固相ペプチド合成法 ( S P P S 法、アミノ酸の脱保護法、樹脂からのペプチドの切断法、およびその精製法を含む )、ならびに結果として得られたペプチドの検出法および特徴付け法 ( L C M S 方法 ) を以下に記載する。

## 【 0 1 3 6 】

C 末端ペプチドアミドの調製に用いた樹脂は、H - R i n k A m i d e - C h e m M a t r i x 樹脂 (例えば、ロード量 0 . 5 m m o l / g ) であった。別段の指定がない限り、使用した F m o c 保護アミノ酸誘導体は、例えば、A A P P T E C、A n a s p e c、B a c h e m、C h e m I m p e x、I r i s B i o t e c h、M i d w e s t B i o t e c h、G y r o s P r o t e i n T e c h n o l o g i e s、または N o v a b i o c h e m から供給される、F m o c - A l a - O H、F m o c - A r g ( P b f ) - O H、F m o c - A s n ( T r t ) - O H、F m o c - A s p ( O t B u ) - O H、F m o c - C y s ( T r t ) - O H、F m o c - G l n ( T r t ) - O H、F m o c - G l u ( O t B u ) - O H、F m o c - G l y - O H、F m o c - H i s ( T r t ) - O H、F m o c - I l e - O H、F m o c - L e u - O H、F m o c - L y s ( B o c ) - O H、F m o c - M e t - O H、F m o c - P h e - O H、F m o c - P r o - O H、F m o c - S e r ( t B u ) - O H、F m o c - T h r ( t B u ) - O H、F m o c - T r p ( B o c ) - O H、F m o c - T y r ( t B u ) - O H、F m o c - V a l - O H、F m o c - L y s ( M t t ) - O H、F m o c - A i b - O H などの推奨標準品であった。他に何も指定がない場合、アミノ酸の天然 L 型を使用する。B o c 基を事前導入した試薬 (例えば、N 末端に T y r を有するペプチドの場合、B o c - T y r ( t B u ) - O H ) を使用するか、またはペプチド N 末端にアミノ酸を導入した後に N 末端 F m o c 保護基を B o c 保護基と交換するかのいずれかを行うことによって、N 末端アミノ酸のアルファ - アミノ基を B o c 保護した。

20

30

## 【 0 1 3 7 】

S P P S を使用するモジュールアルブミン結合部分付着の場合、F m o c - 8 - アミノ - 3 , 6 - ジオキサオクタン酸 ( F m o c - A d o - O H )、B o c - L y s ( F m o c ) - O H、F m o c - G l u - O t B u、ヘキサデカン二酸モノ - t e r t - ブチルエステル、オクタデカン二酸モノ - t e r t - ブチルエステル、ノナデカン二酸モノ - t e r t - ブチルエステル、エイコサン二酸モノ - t e r t - ブチルエステル、テトラデカン二酸モノ - t e r t - ブチルエステル、または 4 - ( 9 - カルボキシノニルオキシ ) 安息香酸 t e r t - ブチルエステルなどであるが、これらに限定されない、好適に保護された構成ブロックを使用した。以下に記載の全ての操作を 0 . 1 ~ 0 . 2 m m o l の合成スケール範囲内で行った。

40

## 【 0 1 3 8 】

1 . 樹脂に結合した保護ペプチド骨格の合成 :

50

## 方法：S P P S \_ A

S P P Sを、製造業者から支給されたプロトコルに若干の変更を加えて、P r o t e i n T e c h n o l o g i e s S y m p h o n y X固相ペプチド合成装置でF m o cに基づく化学反応を使用して行った。混合を、時折の窒素バブリングによって達成した。段階的構築を、以下の工程：1) D M F中で樹脂を事前膨張させる工程、2) 20% (v/v) ピペリジンのD M F溶液を使用して2回の処理 (各々10分) でF m o cを脱保護する工程、3) D M Fで洗浄してピペリジンを除去する工程、4) 各々0.6 M D M F溶液としてF m o c - アミノ酸 (12当量) およびO x y m a P u r e (登録商標) (12当量) を添加し、その後、1.2 M D M F溶液としてD I C (12当量) を添加し、その後、D M Fを添加して、各々の成分の最終濃度を0.3 Mに低下させ、その後、0.5 ~ 4時間混合することによってF m o c - アミノ酸をカップリングする工程、4) D M Fで洗浄して過剰試薬を除去する工程、5) 構築完了時にD C Mで最終洗浄する工程を使用して行った。立体障害アミノ酸 (例えば、A i b) に続くアミノ酸などであるが、これらに限定されないいくつかのアミノ酸を長時間の反応時間 (例えば、4時間) でカップリングして、反応完了を確実にした。

10

## 【0139】

## 方法：S P P S \_ B

保護されたペプチジル樹脂は、A p p l i e d B i o s y s t e m s 431A固相ペプチド合成装置上で、製造業者から支給された一般的なF m o cプロトコルを使用し、F m o c方法に従って合成した。混合を、ボルテックスおよび時折の窒素バブリングによって達成した。段階的構築を、以下の工程：1) 1 M N M P溶液としてC l - H O B t (10当量) 中に固体F m o c - アミノ酸 (10当量) を溶解させ、その後、1 M N M P溶液としてD I C (10当量) を添加し、その後、工程2 ~ 3と同時に混合することによってF m o c - アミノ酸を活性化する工程、2) 20% (v/v) ピペリジンのN M P溶液を使用して1回目の処理 (3分)、その後、2回目の処理 (15分) でF m o cを脱保護する工程、3) N M Pで洗浄してピペリジンを除去する工程、4) 活性化F m o c - アミノ酸溶液を樹脂に添加し、その後、45 ~ 90分間混合する工程、4) N M Pで洗浄して過剰試薬を除去する工程、5) 構築完了時にD C Mで最終洗浄する工程を使用して行った。上記の標準保護アミノ酸誘導体は、(例えば、M i d w e s t B i o t e c hから) 事前秤量カートリッジで供給されたものであり、非標準誘導体を手動で秤量した。立体障害アミノ酸 (例えば、A i b) に続くアミノ酸などであるが、これらに限定されないいくつかのアミノ酸を「二重カップリング」して、つまり、最初のカップリング (例えば、45分) 後に樹脂を排出し、さらなる試薬を添加し (F m o c - アミノ酸、D I C、C l - H O B t)、混合物を再び反応させる (例えば、45分間) ことによって、反応完了を確実にした。

20

30

## 【0140】

## 方法：S P P S \_ C

S P P Sを、製造業者から支給されたプロトコルに若干の変更を加えて、P r e l u d e X固相ペプチド合成装置でF m o cに基づく化学反応を使用して行った。混合を、350 r p mでの振盪および時折の窒素バブリングによって達成した。段階的構築を、以下の工程：1) D M F中で樹脂を事前膨張させる工程、2) 20% (v/v) ピペリジンのD M F溶液を使用して1回の処理 (70で3分) でF m o cを脱保護する工程、3) D M Fで洗浄してピペリジンを除去する工程、4) 各々0.4 M D M F溶液としてF m o c - アミノ酸 (12当量) およびO x y m a P u r e (登録商標) (12当量) を添加し、その後、1.2 M D M F溶液としてD I C (12当量) を添加し、その後、70で5分間混合することによってF m o c - アミノ酸をカップリングする工程、4) D M Fで洗浄して過剰試薬を除去する工程、5) 構築完了時にD C Mで最終洗浄する工程を使用して行った。立体障害アミノ酸 (例えば、A i b) に続くアミノ酸などであるが、これらに限定されないいくつかのアミノ酸を長時間の反応時間 (例えば、15分間) でカップリングして、反応完了を確実にした。

40

50

## 【0141】

## 2. 樹脂結合保護ペプチド骨格への置換基の結合

方法：SC\_\_A

N-イブシロン-リジン保護Mtt保護基を、2回の処理（各々45分）で樹脂を30%HFIPのDCM溶液で洗浄し、その後、DCMおよびDMFで洗浄することによって除去した。アシル化を、Boc-Lys(Fmoc)-OH、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸、Fmoc-Glu-OtBu、ヘキサデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル、オクタデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル、およびエイコサン二酸モノ-tert-ブチルエステルなどであるが、これらに限定されない構成ブロックの段階的添加を使用して、方法SPPS\_\_Aに記載のプロトコルを使用して、Protein Technologies Symphony X固相ペプチド合成装置で行った。

10

## 【0142】

方法：SC\_\_B

N-イブシロン-リジン保護Mtt保護基を、2回の処理（各々45分）で樹脂を30%HFIPのDCM溶液で洗浄し、その後、DCMおよびDMFで洗浄することによって除去した。アシル化を、Boc-Lys(Fmoc)-OH、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸、Fmoc-Glu-OtBu、ヘキサデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル、オクタデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル、およびエイコサン二酸モノ-tert-ブチルエステルなどであるが、これらに限定されない構成ブロックの段階的添加を使用して、方法SPPS\_\_Bに記載のプロトコルを使用して、Applied Biosystems 431A固相ペプチド合成装置で行った。

20

## 【0143】

方法：SC\_\_C

N-イブシロン-リジン保護Mtt保護基を、2回の処理（各々45分）で樹脂を30%HFIPのDCM溶液で洗浄し、その後、DCMおよびDMFで洗浄することによって除去した。アシル化を、Boc-Lys(Fmoc)-OH、Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸、Fmoc-Glu-OtBu、ヘキサデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル、オクタデカン二酸モノ-tert-ブチルエステル、およびエイコサン二酸モノ-tert-ブチルエステルなどであるが、これらに限定されない構成ブロックの段階的添加を使用して、方法SPPS\_\_Cに記載のプロトコルを使用して、Protein Technologies Prelude X固相ペプチド合成装置で行った。

30

## 【0144】

## 3. 樹脂結合ペプチドの切断および精製：

方法：CP\_\_A

側鎖合成完了後、ペプチジル樹脂をDCMで洗浄し、乾燥させ、その後、TFA/水/TIS（95：2.5：2.5（v/v/v））でおよそ2時間処理し、その後、ジエチルエーテルで沈殿させた。沈殿物をジエチルエーテルで洗浄し、好適な溶媒（例えば、2：1の水/MeCN）中に溶解させ、全ての不安定付加物が分解するまで放置した。精製を、Phenomenex Luna C8（2）カラム（粒径10μm、孔径100、寸法250×21.2mm）を用いて逆相分取HPLC（Waters 2545バイナリグラジエントモジュール、Waters 2489 UV/可視検出器、Waters フラクションコレクターIII）によって行った。不純物の分離および生成物の溶出を、0.1%TFA含有水溶液中のMeCNのグラジエントを増加させることによって達成した。関連する分画を分析LCMSによって同一性および純度について調べた。純粋な所望のペプチドを含む分画をプールし、凍結乾燥させて、白色の固体としてペプチドTFA塩を得た。

40

## 【0145】

## 4. TFAからナトリウム塩への塩交換：

50

方法：S X \_\_ A

方法C P \_\_ Aから単離した凍結乾燥ペプチドを、適切な水性緩衝液（例えば、4：1の水／MeCN、0.2 M酢酸ナトリウム）中に溶解させて5～20 mg/mLにし、必要に応じて1 M NaOHでpH 7～8に調整して、完全に溶解させた。ペプチドを含む緩衝液を、Sep-Pak C18カートリッジ（0.5～2 g）を使用して塩交換した。カートリッジを最初に4カラム体積のイソプロパノール、その後、4カラム体積のMeCN、その後、8カラム体積の水で平衡化した。ペプチド溶液をカートリッジに適用し、通過画分を再適用して、ペプチドの完全保持を確実にした。カートリッジを4カラム体積の水、その後、NaHCO<sub>3</sub>、NaOAc、またはNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>などを含むが、これらに限定されない10カラム体積の緩衝液（例えば、pH 7.5）で洗浄した。カラムを4カラム体積の水で洗浄し、ペプチドを5～10カラム体積の50～80% MeCN水溶液で溶出した。ペプチドを含む溶離液を凍結乾燥させて、白色の固体としてペプチドナトリウム塩を得て、これをそのまま使用した。

10

【0146】

一般的な検出法および特徴付け法

LCMS法：

方法：LCMS \_\_ A

LCMS \_\_ Aを、Agilent 1260 Infinity series HPLC systemおよびAgilent Technologies 6120 Quadrupole MSからなるセットアップで行った。溶離液：A：0.05% TFA水溶液、B：0.05% TFAの9：1 MeCN／水溶液。

20

【0147】

分析を、AおよびBのグラジエントで溶出した適切な体積の試料をカラムに注入することによって室温（カラム温度37℃）で行った。カラム：Phenomenex Kinetex C8、2.6 μm、100、4.6×75 mm。グラジエント実行時間：1.0 mL／分の流量で10分かけて線形10～80% B。検出：214 nmに設定したダイオードアレイ検出器。MSイオン化モード：API-ES、正極性。MSスキャン質量範囲：500～2000 amu。各々のm/zの最も豊富な同位体が報告される。

【0148】

方法：LCMS \_\_ B

LCMS \_\_ Bを、Agilent 1260 Infinity series HPLC systemおよびAgilent Technologies 6120 Quadrupole MSからなるセットアップで行った。溶離液：A：0.05% TFA水溶液、B：0.05% TFAの9：1 MeCN／水溶液。

30

【0149】

分析を、AおよびBのグラジエントで溶出した適切な体積の試料をカラムに注入することによって室温（カラム温度37℃）で行った。カラム：Phenomenex Kinetex C8、2.6 μm、100、4.6×75 mm。グラジエント実行時間：1.0 mL／分の流量で10分かけて線形20～100% B。検出：214 nmに設定したダイオードアレイ検出器。MSイオン化モード：API-ES、正極性。MSスキャン質量範囲：500～2000 amu。各々のm/zの最も豊富な同位体が報告される。

40

【0150】

本発明のある特定の特徴が本明細書に例証および記載されているが、ここで、多くの修正、代用、変更、および等価物が当業者に想到されるであろう。したがって、添付の実施形態が、本発明の真の趣旨の範囲内に含まれる全ての修正および変更を包含するよう意図されていることが理解されたい。

【0151】

実施例1：化合物の合成

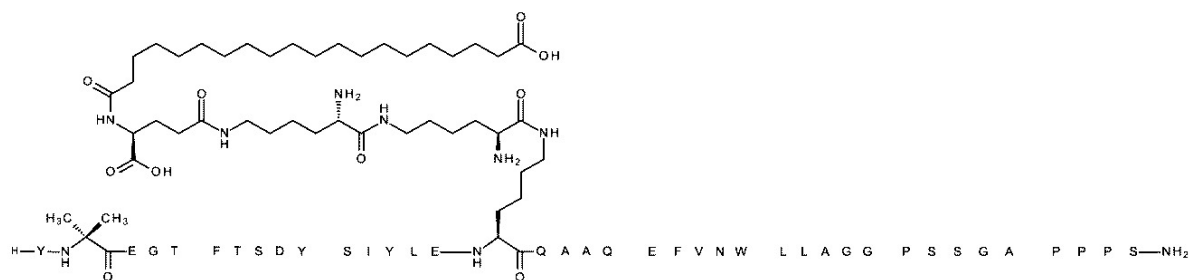
化合物は、Aibを除いて一文字アミノ酸コードを使用して記載した以下のものである。置換基を、それが結合しているリジン（K）残基の後に含める。

50

## 化合物番号 1

Y - A i b - E G T F T S D Y S I Y L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 19 - カルボキシノナデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A Q E F V N W L L A G G P S S G A P P P S - N H <sub>2</sub>

## 【化 1 4】



10

C 末端アミド修飾を有する配列番号 1、置換基：C、置換基位置：K 1 6

合成法：S P P S \_ A、S C \_ B、C P \_ A

計算分子量（平均）：4 8 7 3 . 5 D a

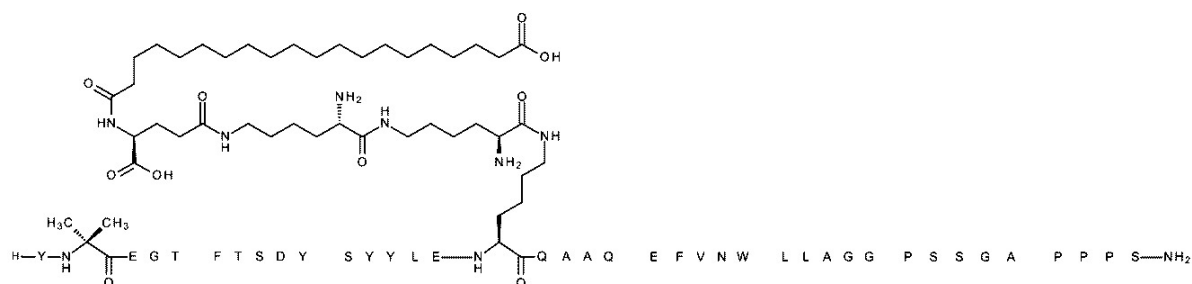
L C M S \_ A：保持時間 = 6 . 0 分、実測値 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup> 1 6 2 5 . 4、[ M + 4 H ] <sup>4 +</sup> 1 2 1 9 . 1 .

20

## 化合物番号 2

Y - A i b - E G T F T S D Y S Y Y L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 19 - カルボキシノナデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A Q E F V N W L L A G G P S S G A P P P S - N H <sub>2</sub>

## 【化 1 5】



30

C 末端アミド修飾を有する配列番号 2、置換基：C、置換基位置：K 1 6

合成法：S P P S \_ A、S C \_ B、C P \_ A

計算分子量（平均）：4 9 2 3 . 5 D a

L C M S \_ A：保持時間 = 6 . 0 分、実測値 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup> 1 6 4 1 . 8、[ M + 4 H ] <sup>4 +</sup> 1 2 3 7 . 5

40

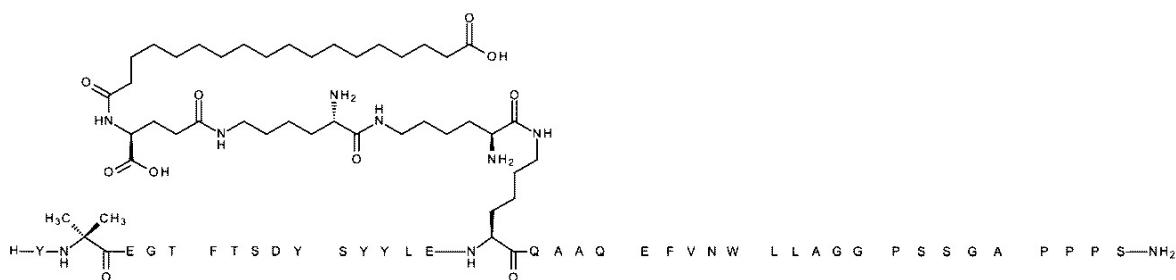
## 化合物番号 3

Y - A i b - E G T F T S D Y S Y Y L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A Q E F V N W L L A G G P S S G A P P P S - N H <sub>2</sub>

50



## 【化 1 6】



C末端アミド修飾を有する配列番号 2、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_B、CP\_\_A

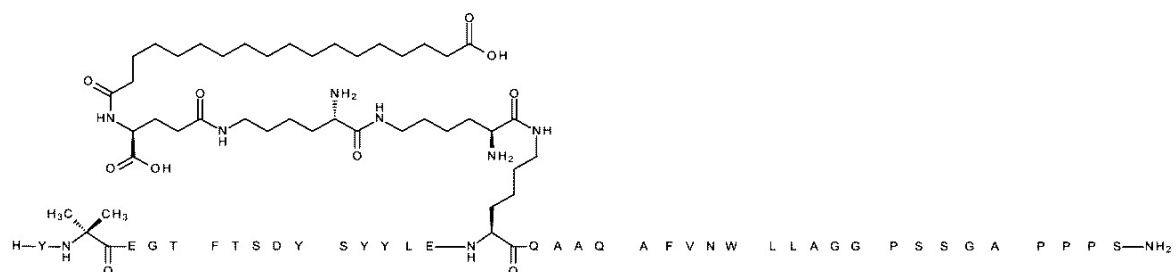
計算分子量（平均）：4 8 9 5 . 4 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5 . 7 分、実測値 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup> 1 6 3 2 . 7、[ M + 4 H ] <sup>4 +</sup> 1 2 2 4 . 6

化合物番号 4

Y - A i b - EGTFTSDYSYYLE - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 1 7 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A Q A F V N W L L A G G P S S G A P P P S - N H <sub>2</sub>

## 【化 1 7】



C末端アミド修飾を有する配列番号 3、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_B、CP\_\_A

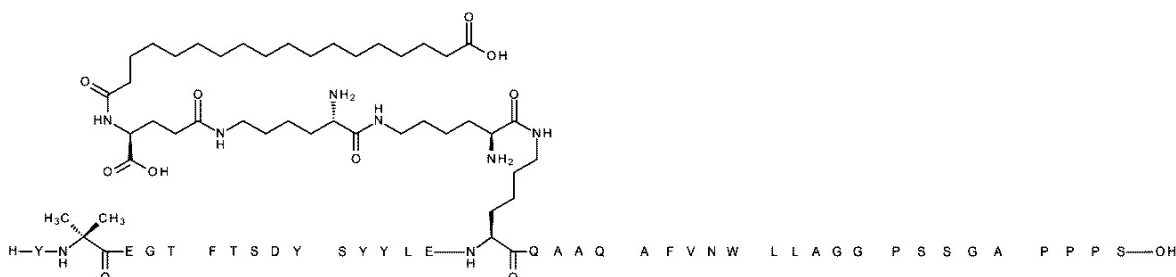
計算分子量（平均）：4 8 3 7 . 4 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5 . 7 分、実測値 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup> 1 6 1 3 . 3、[ M + 4 H ] <sup>4 +</sup> 1 2 1 0 . 1

化合物番号 5

Y - A i b - EGTFTSDYSYYLE - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 1 7 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A Q A F V N W L L A G G P S S G A P P P S - O H

## 【化 1 8】



配列番号 3、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：SPPS\_\_B、SC\_\_B、CP\_\_A

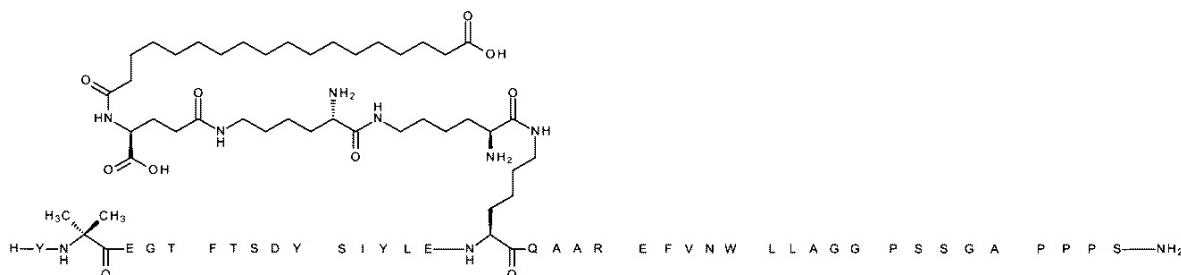
計算分子量（平均）：4 8 3 8 . 4 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5.7 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1613.6、 $[M + 4H]^4+$  1210.4

化合物番号 6

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAREFVNWLLAGGPSSSGAPPSS-NH<sub>2</sub>

【化19】



10

C末端アミド修飾を有する配列番号4、置換基：B、置換基位置：K16

合成法：SPPS\_\_B、SC\_\_B、CP\_\_A

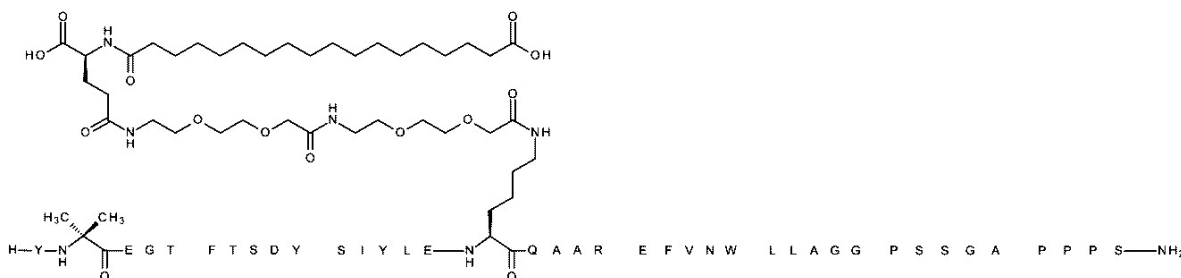
計算分子量(平均)：4873.5 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5.6 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1625.3、 $[M + 4H]^4+$  1219.1

化合物番号 7

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLE-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]エトキシ]エトキシ]アセチル]アミノ]エトキシ]エトキシ]アセチル]-QAAREFVNWLLAGGPSSSGAPPSS-NH<sub>2</sub>

【化20】



30

C末端アミド修飾を有する配列番号4、置換基：A、置換基位置：K16

合成法：SPPS\_\_B、SC\_\_B、CP\_\_A

計算分子量(平均)：4907.4 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 6.3 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1636.5、 $[M + 4H]^4+$  1227.9

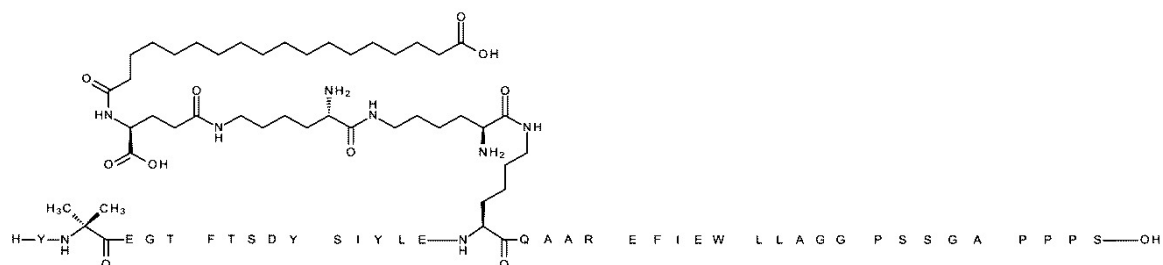
化合物番号 8

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAREFINWLLAGGPSSSGAPPSS-NH<sub>2</sub>

50

Chemical structure of the protein structure, showing the amino acid sequence and the corresponding chemical structure of the protein. The sequence is: H-Y-N-H-CH(CH<sub>3</sub>)-C(=O)-E-G-T-F-T-S-D-Y-S-I-Y-L-E-N-H-C(=O)-Q-A-A-R-E-F-I-N-W-L-L-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH<sub>2</sub>. The structure shows the protein backbone and side chains, with the amino acid sequence written below the structure.

【化 2 2 】 20



Y - A i b - E G T F T S D Y S I Y L E - K [ 2 - [ 2 - [ 2 - [ [ 2 - [ 2 - [ 2 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 1 7 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブ  
タノイル ] アミノ ] エトキシ ] エトキシ ] アセチル ] アミノ ] エトキシ ] エトキシ ] アセ  
チル ] - Q A A R E F I E W L L A G G P S S G A P P P S - O H

Chemical structure of the modified protein, showing the attachment of the long-chain fatty acid and the PEG linker to the protein backbone. The protein sequence is H-Y-NH-CH(CH<sub>3</sub>)-C(=O)-E-G-T-F-T-S-D-Y-S-I-Y-L-E-NH-CH(CH<sub>3</sub>)-C(=O)-Q-A-A-R-E-F-I-E-W-L-L-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-OH. The modification is attached to the N-terminus of the protein, specifically to the Y residue.

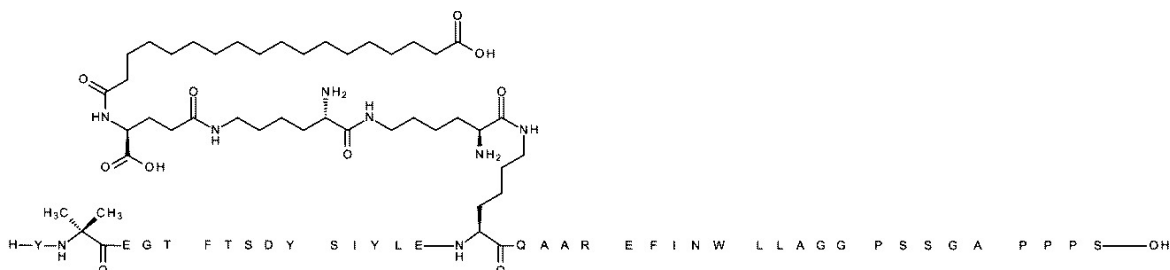
配列番号 6、置換基：A、置換基位置：K 1 6  
 合成法：S P P S \_\_ A、S C \_\_ B、C P \_\_ A  
 計算分子量（平均）：4 9 3 7 . 5 D a

LCMS\_\_A : 保持時間 = 6 . 5 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1646 . 6、 $[M + 4H]^4+$  1235 . 1

化合物番号 1 1

Y - A i b - E G T F T S D Y S I Y L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A R E F I N W L L A G G P S S G A P P P S - O H

【化 2 4】



10

配列番号 5、置換基 : B、置換基位置 : K 1 6

合成法 : S P P S \_\_ A、S C \_\_ C、C P \_\_ A

計算分子量 (平均) : 4888 . 5 D a

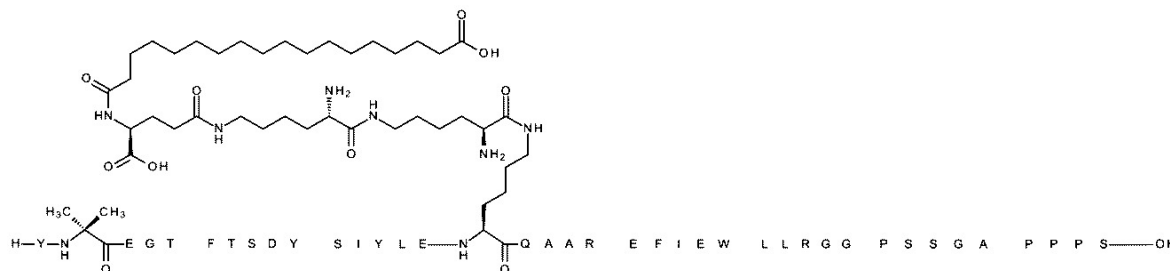
LCMS\_\_A : 保持時間 = 5 . 7 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1630 . 2、 $[M + 4H]^4+$  1222 . 9

20

化合物番号 1 2

Y - A i b - E G T F T S D Y S I Y L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A R E F I E W L L R G G P S S G A P P P S - O H

【化 2 5】



30

合成法 : S P P S \_\_ A、S C \_\_ C、C P \_\_ A

配列番号 7、置換基 : B、置換基位置 : K 1 6

計算分子量 (平均) : 4988 . 6 D a

LCMS\_\_A : 保持時間 = 5 . 7 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1663 . 6、 $[M + 4H]^4+$  1248 . 0

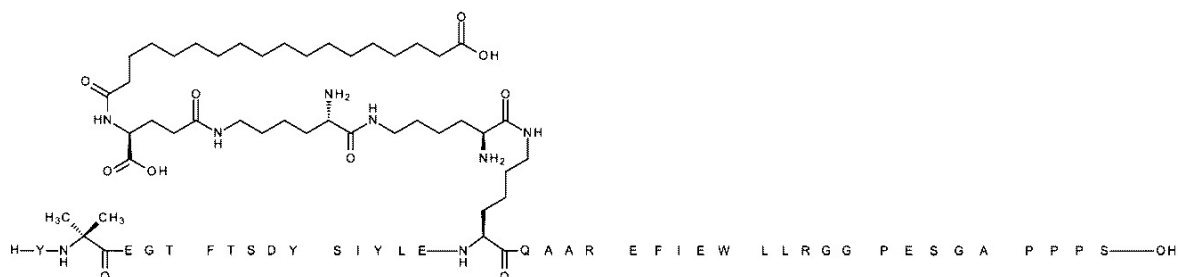
40

化合物番号 1 3

Y - A i b - E G T F T S D Y S I Y L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A R E F I E W L L R G G P E S G A P P P S - O H

50

## 【化 2 6】



10

配列番号 8、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：S P P S \_ A、S C \_ C、C P \_ A

計算分子量（平均）：5 0 3 0 . 6 D a

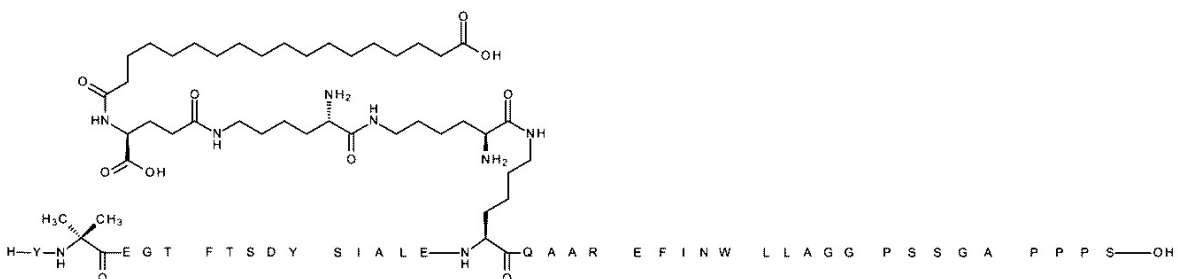
L C M S \_ A：保持時間 = 5 . 7 分、実測値  $[M + 3 H]^3 + 1677.7$ 、 $[M + 4 H]^4 + 1258.4$ 

化合物番号 1 4

Y - A i b - E G T F T S D Y S I A L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 1 7 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ) プタノイル] アミノ] ヘキサノイル] アミノ] ヘキサノイル] - Q A A R E F I N W L L A G G P S S G A P P P S - O H

20

## 【化 2 7】



30

配列番号 9、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：S P P S \_ A、S C \_ C、C P \_ A

計算分子量（平均）：4 7 9 6 . 4 D a

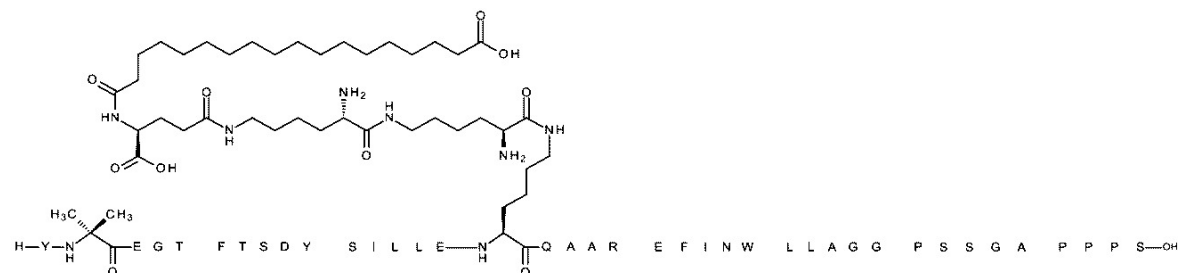
L C M S \_ A：保持時間 = 5 . 7 分、実測値  $[M + 3 H]^3 + 1599.6$ 、 $[M + 4 H]^4 + 1199.8$ 

化合物番号 1 5

Y - A i b - E G T F T S D Y S I L L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 1 7 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ) プタノイル] アミノ] ヘキサノイル] アミノ] ヘキサノイル] - Q A A R E F I N W L L A G G P S S G A P P P S - O H

40

## 【化 2 8】



配列番号 1 0、置換基：B、置換基位置：K 1 6

50

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A、SX\_\_A

計算分子量（平均）：4838.5 Da

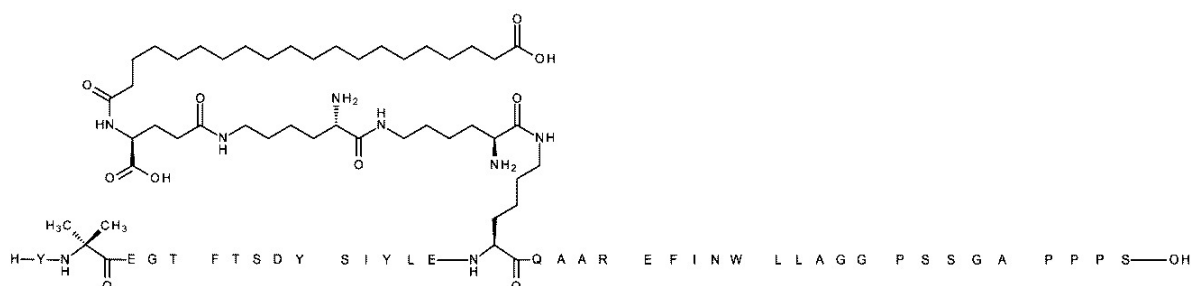
LCMS\_\_A：保持時間 = 5.8分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1613.4、 $[M + 4H]^4+$  1210.3

化合物番号16

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(19-カルボキシノナデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAA  
REFINWLLAGGPSSGAPPPS-OH

【化29】

10



配列番号5、置換基：C、置換基位置：K16

20

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4916.5 Da

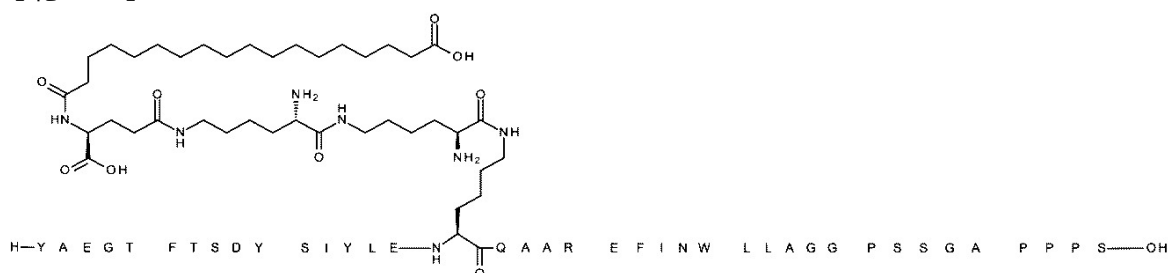
LCMS\_\_A：保持時間 = 6.0分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1639.6、 $[M + 4H]^4+$  1229.9

化合物番号17

Y AEGTFTSDYSIYLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAA  
REFINWLLAGGPSSGAPPPS-OH

【化30】

30



配列番号11、置換基：B、置換基位置：K16

40

合成法：SPPS\_\_C、SC\_\_A、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4874.5 Da

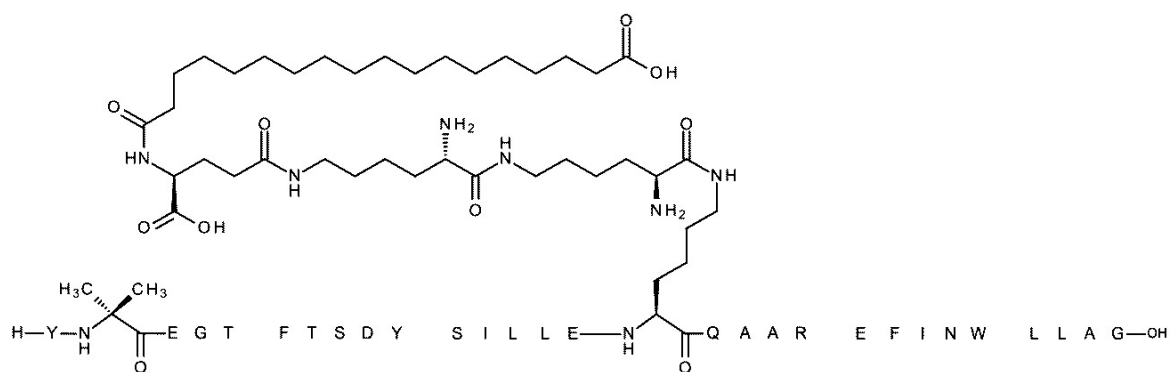
LCMS\_\_A：保持時間 = 5.7分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1625.4、 $[M + 4H]^4+$  1219.4

化合物番号18

Y-Aib-EGTFTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-Q  
AREFINWLLAG-OH

50

## 【化 3 1】



10

配列番号 12、置換基：B、置換基位置：K 16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4003.6 Da

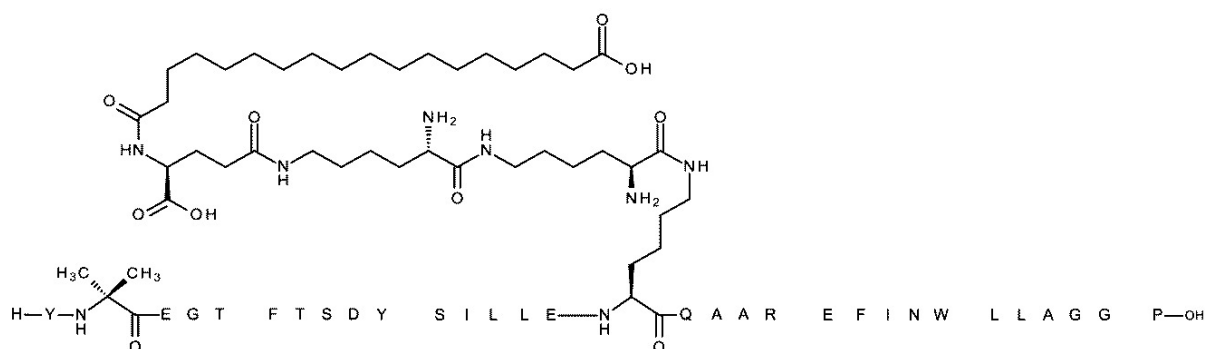
LCMS\_\_A：保持時間 = 6.2 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1335.3、 $[M + 4H]^4+$  1001.7

化合物番号 19

Y-Aib-EGTFTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAREFINWLLAGGP-OH

20

## 【化 3 2】



30

配列番号 13、置換基：B、置換基位置：K 16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4157.8 Da

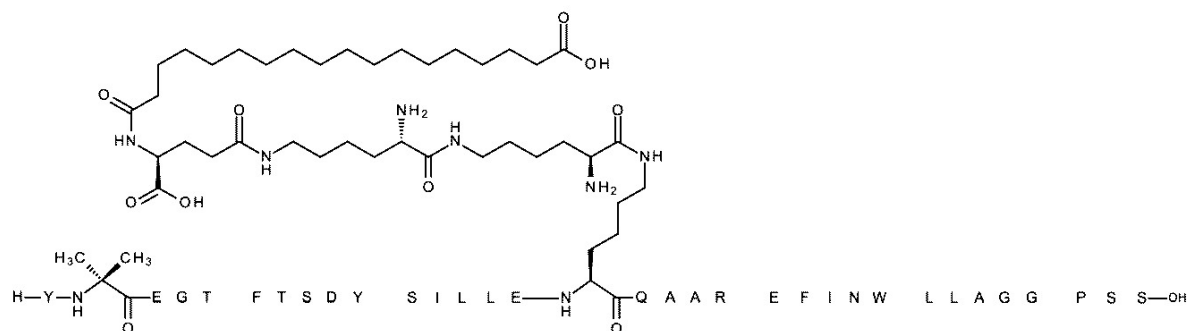
LCMS\_\_A：保持時間 = 6.1 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1386.6、 $[M + 4H]^4+$  1040.3

化合物番号 20

Y-Aib-EGTFTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAREFINWLLAGGPSS-OH

40

## 【化 3 3】



10

配列番号 14、置換基：B、置換基位置：K 16

合成法：S P P S\_\_A、S C\_\_A、C P\_\_A

計算分子量（平均）：4331.9 Da

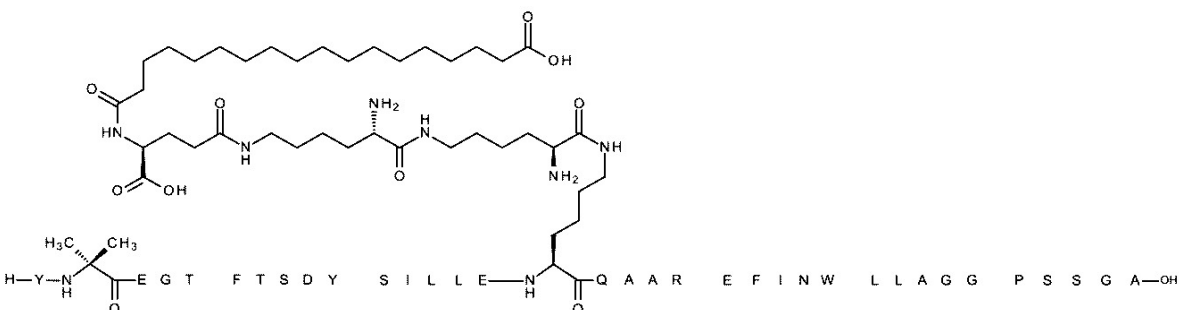
LCMS\_\_A：保持時間 = 5.9 分、実測値 [M + 3H]<sup>3+</sup> 1444.7、[M + 4H]<sup>4+</sup> 1083.7

化合物番号 21

Y-Aib-EGTFTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAR-EFINWLLAGGPSSGA-OH

20

## 【化 3 4】



30

配列番号 15、置換基：B、置換基位置：K 16

合成法：S P P S\_\_A、S C\_\_A、C P\_\_A

計算分子量（平均）：4460.0 Da

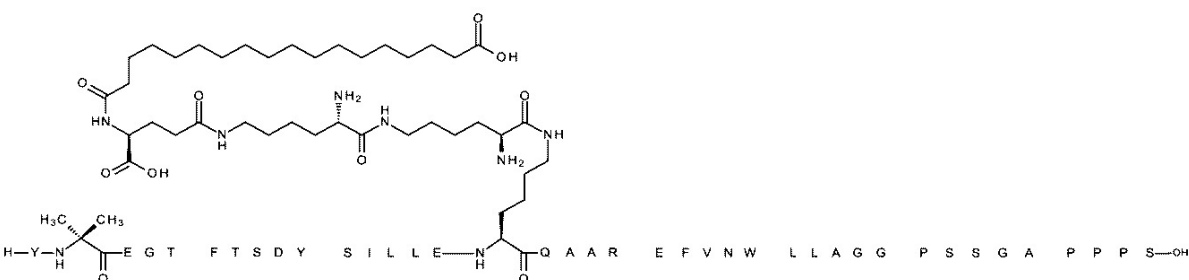
LCMS\_\_A：保持時間 = 5.9 分、実測値 [M + 3H]<sup>3+</sup> 1487.5、[M + 4H]<sup>4+</sup> 1116.1

化合物番号 22

Y-Aib-EGTFTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAREFVNWLLAGGPSSGAPPPS-OH

40

## 【化 3 5】



50



配列番号 16、置換基：B、置換基位置：K 16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

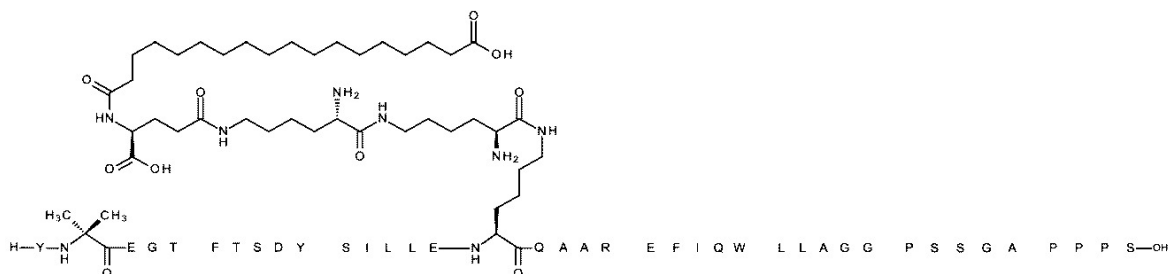
計算分子量（平均）：4824.4 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5.7 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1608.9、 $[M + 4H]^4+$  1206.9

化合物番号 23

Y - Aib - EGTFTSDYSILLE - K[(2S) - 2 - アミノ - 6 - [[(2S) - 2 - アミノ - 6 - [[(4S) - 4 - カルボキシ - 4 - (17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ) プタノイル] アミノ] ヘキサノイル] アミノ] ヘキサノイル] - QAAREFIQWLLAGGPSSSGAPPPS - OH

【化 36】



配列番号 17、置換基：B、置換基位置：K 16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

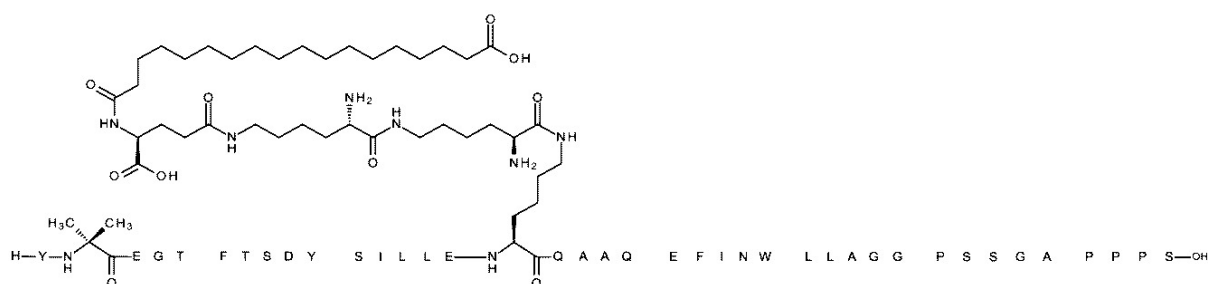
計算分子量（平均）：4852.5 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5.9 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1618.4、 $[M + 4H]^4+$  1214.1

化合物番号 24

Y - Aib - EGTFTSDYSILLE - K[(2S) - 2 - アミノ - 6 - [[(2S) - 2 - アミノ - 6 - [[(4S) - 4 - カルボキシ - 4 - (17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ) プタノイル] アミノ] ヘキサノイル] アミノ] ヘキサノイル] - QAQEFINWLLAGGPSSSGAPPPS - OH

【化 37】



配列番号 18、置換基：B、置換基位置：K 16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_C、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4810.4 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 6.0 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1604.0、 $[M + 4H]^4+$  1203.4

化合物番号 25

Y - Aib - EGTFTSDYSILLE - K[(2S) - 2 - アミノ - 6 - [[(2S) - 2 - アミノ - 6 - [[(4S) - 4 - カルボキシ - 4 - (17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ) プタノイル] アミノ] ヘキサノイル] アミノ] ヘキサノイル] - QAEEFINWLLAGGPSSSGAPPPS - OH

10

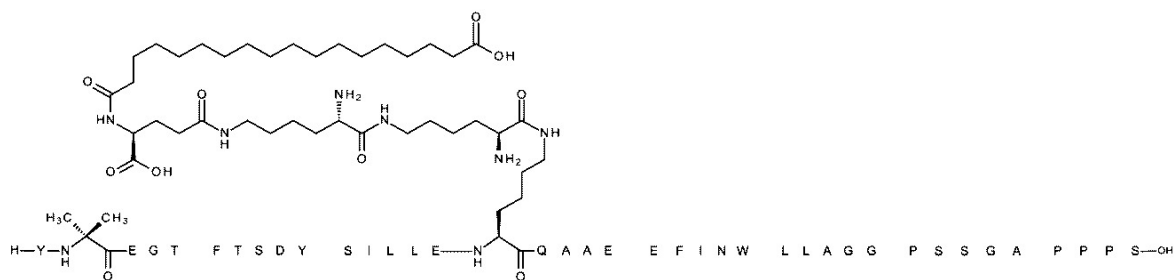
20

30

40

50

## 【化 3 8】



配列番号 19、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：S P P S \_ A、S C \_ C、C P \_ A

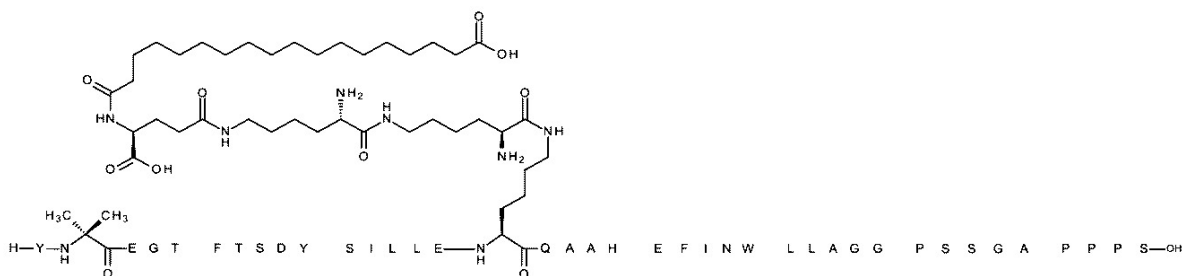
計算分子量（平均）：4 8 1 1 . 4 D a

L C M S \_ A：保持時間 = 6 . 1 分、実測値  $[M + 3 H]^3 + 1604.4$ 、 $[M + 4 H]^4 + 1203.6$ 

化合物番号 2 6

Y - A i b - E G T F T S D Y S I L L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A H E F I N W L L A G G P S S G A P P P S - O H

## 【化 3 9】



配列番号 20、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：S P P S \_ A、S C \_ C、C P \_ A

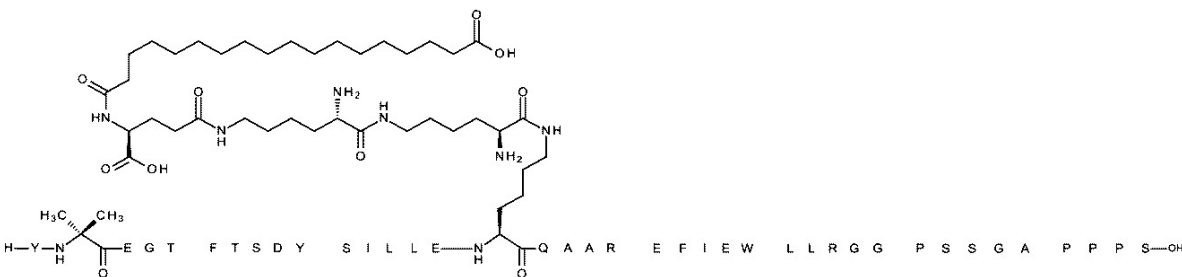
計算分子量（平均）：4 8 1 9 . 4 D a

L C M S \_ A：保持時間 = 5 . 8 分、実測値  $[M + 3 H]^3 + 1607.1$ 、 $[M + 4 H]^4 + 1205.5$ 

化合物番号 2 7

Y - A i b - E G T F T S D Y S I L L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A R E F I E W L L R G G P S S G A P P P S - O H

## 【化 4 0】



配列番号 21、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：S P P S \_ A、S C \_ C、C P \_ A

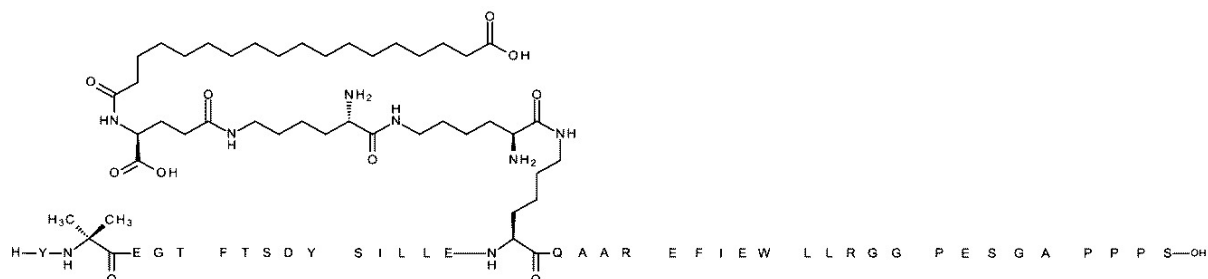
計算分子量（平均）：4 9 3 8 . 6 D a

LCMS\_\_A：保持時間 = 5.7 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1646.9、 $[M + 4H]^4+$  1235.4

化合物番号 28

Y-Aib-EGTFTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAREFIEWLLRGGPESGAPPPS-OH

【化 4 1】



10

配列番号 22、置換基：B、置換基位置：K16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A、SX\_\_A

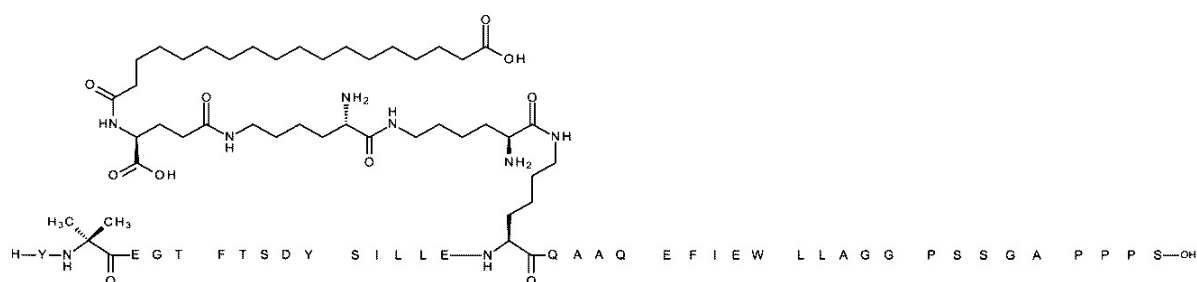
計算分子量（平均）：4980.6 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5.8 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1660.7、 $[M + 4H]^4+$  1246.0

化合物番号 29

Y-Aib-EGTFTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QA AQEFIEWLLAGGPSSSGAPPPS-OH

【化 4 2】



30

配列番号 23、置換基：B、置換基位置：K16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A、SX\_\_A

計算分子量（平均）：4825.4 Da

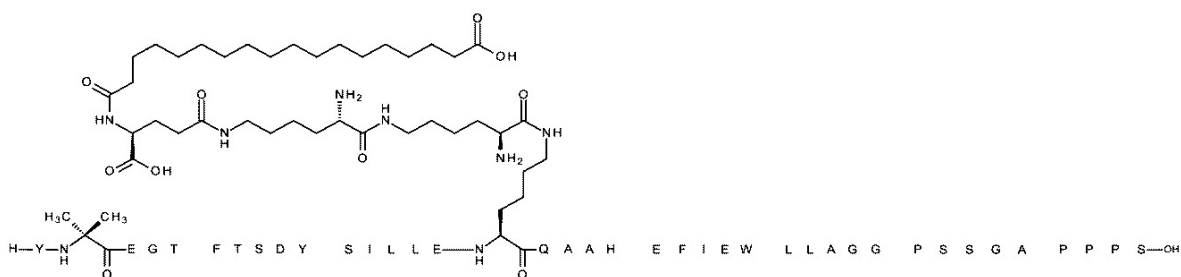
LCMS\_\_A：保持時間 = 6.1 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1609.3、 $[M + 4H]^4+$  1207.0

化合物番号 30

Y-Aib-EGTFTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QA AHEFIEWLLAGGPSSSGAPPPS-OH

50

## 【化 4 3】



配列番号 2 4、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

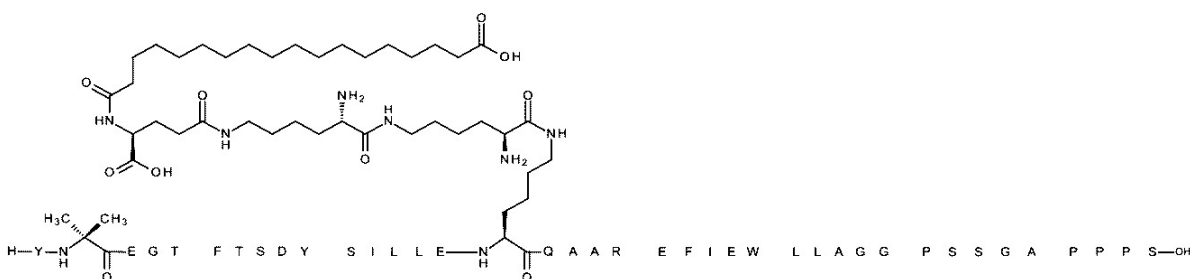
計算分子量（平均）：4 8 3 4 . 4 D a

LCMS\_\_A：保持時間 = 5 . 8 分、実測値 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup> 1 6 1 2 . 1、[ M + 4 H ] <sup>4 +</sup> 1 2 0 9 . 3

化合物番号 3 1

Y - A i b - E G T F T S D Y S I L L E - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 1 7 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Q A A R E F I E W L L A G G P S S G A P P P S - O H

## 【化 4 4】



配列番号 2 5、置換基：B、置換基位置：K 1 6

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A、SX\_\_A

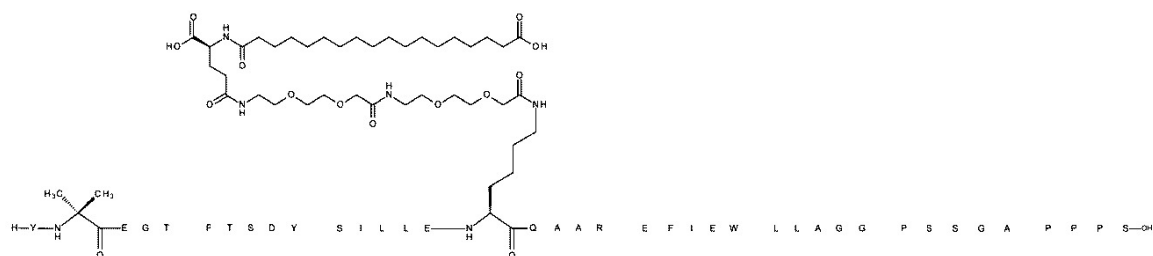
計算分子量（平均）：4 8 5 3 . 5 D a

LCMS\_\_A：保持時間 = 5 . 9 分、実測値 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup> 1 6 1 8 . 5、[ M + 4 H ] <sup>4 +</sup> 1 2 1 4 . 2

化合物番号 3 2

Y - A i b - E G T F T S D Y S I L L E - K [ 2 - [ 2 - [ 2 - [ [ 2 - [ 2 - [ 2 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 1 7 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] エトキシ ] エトキシ ] アセチル ] アミノ ] エトキシ ] エトキシ ] アセチル ] - Q A A R E F I E W L L A G G P S S G A P P P S - O H

## 【化 4 5】



配列番号 2 5、置換基：A、置換基位置：K 1 6

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

10

20

30

40

50

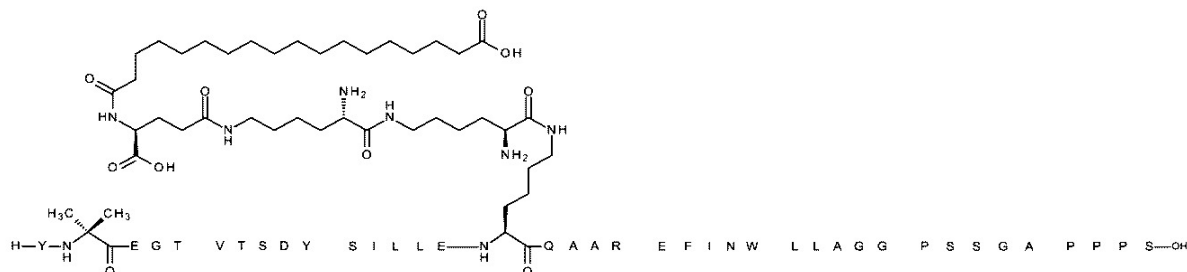
計算分子量（平均）：4887.4 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 6.6 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1629.8、 $[M + 4H]^4+$  1222.8

化合物番号 33

Y-Aib-EGTVTSDYSILLE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAREFINWLLAGGPSSSGAPPPS-OH

【化46】



10

配列番号 26、置換基：B、置換基位置：K16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

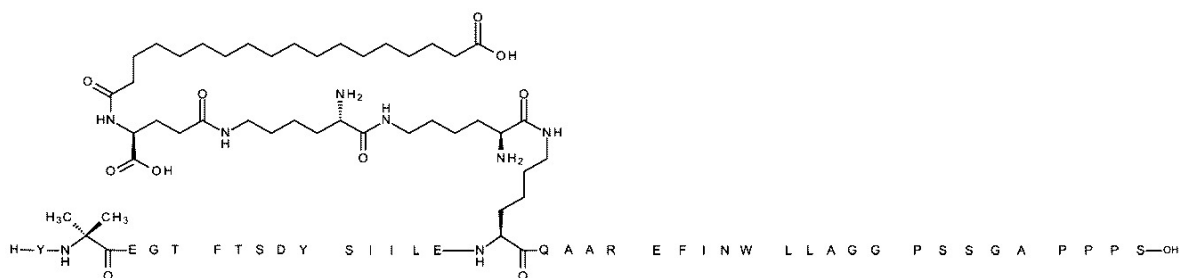
計算分子量（平均）：4790.4 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5.8 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1597.4、 $[M + 4H]^4+$  1198.3

化合物番号 34

Y-Aib-EGTFTSDYSIILE-K[(2S)-2-アミノ-6-[[[(2S)-2-アミノ-6-[[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]ヘキサノイル]アミノ]ヘキサノイル]-QAAREFINWLLAGGPSSSGAPPPS-OH

【化47】



30

配列番号 27、置換基：B、置換基位置：K16

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4838.5 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 5.8 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1613.4、 $[M + 4H]^4+$  1210.3

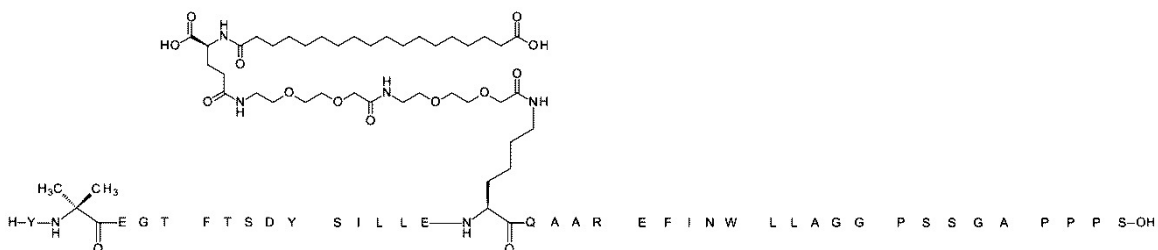
化合物番号 35

Y-Aib-EGTFTSDYSIILE-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブタノイル]アミノ]エトキシ]エトキシ]アセチル]アミノ]エトキシ]エトキシ]アセチル]-QAAREFINWLLAGGPSSSGAPPPS-OH

40

50

## 【化 4 8】



配列番号 10、置換基：A、置換基位置：K 16

10

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4872.4 Da

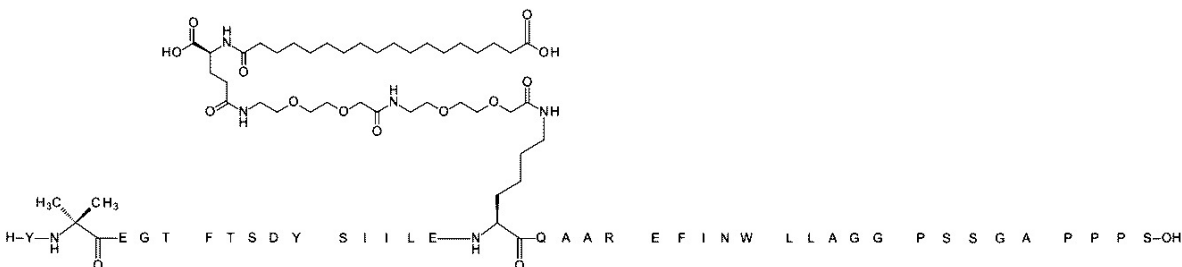
LCMS\_\_A：保持時間 = 6.6 分、実測値 [M + 3H]<sup>3+</sup> 1624.9、[M + 4H]<sup>4+</sup> 1218.9

化合物番号 36

Y - Aib - EGTFTSDYSILLE - K [ 2 - [ 2 - [ 2 - [ [ 2 - [ 2 - [ 2 - [ [ ( 4S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] エトキシ ] エトキシ ] アセチル ] アミノ ] エトキシ ] エトキシ ] アセチル ] - QAAREFINWLLAGGPSSGAPPPS - OH

## 【化 4 9】

20



配列番号 27、置換基：A、置換基位置：K 16

30

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4872.4 Da

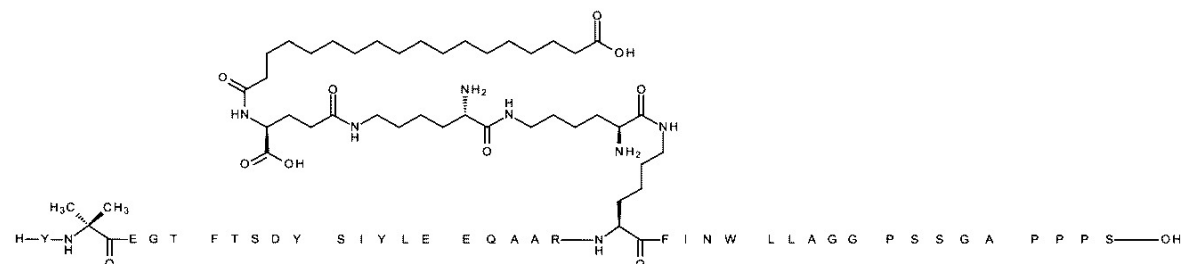
LCMS\_\_A：保持時間 = 6.5 分、実測値 [M + 3H]<sup>3+</sup> 1624.8、[M + 4H]<sup>4+</sup> 1218.9

化合物番号 37

Y - Aib - EGTFTSDYSIYLEEQAAAR - K [ ( 2S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - FINWLLAGGPSSGAPPPS - OH

## 【化 5 0】

40



配列番号 28、置換基：B、置換基位置：K 21

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_C、CP\_\_A

計算分子量（平均）：4888.5 Da

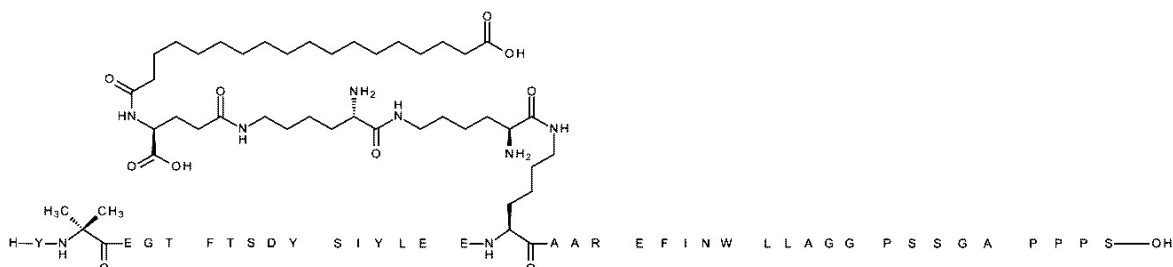
50

LCMS\_\_A : 保持時間 = 6 . 0 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1630 . 3、 $[M + 4H]^4+$  1223 . 0

化合物番号 38

Y - Aib - EGTFTSDYSIYLEE - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - AAREFINWLLAGGPSSSGAPPSPS - OH

【化 5 1】



10

配列番号 29、置換基 : B、置換基位置 : K 17

合成法 : SPPS\_\_C、SC\_\_C、CP\_\_A

計算分子量 (平均) : 4889 . 5 Da

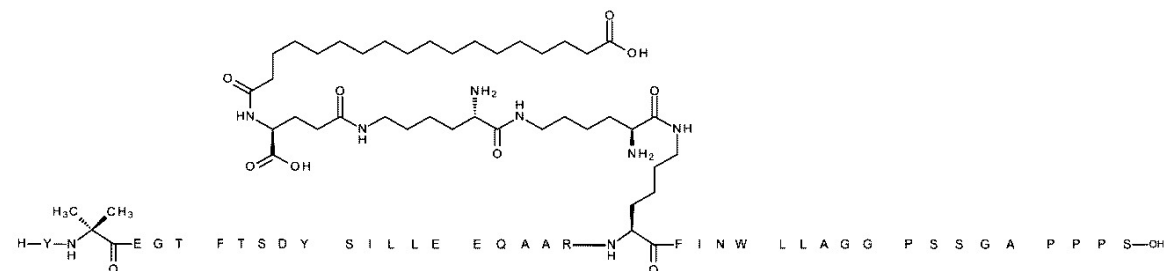
LCMS\_\_A : 保持時間 = 6 . 0 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1630 . 6、 $[M + 4H]^4+$  1223 . 2

20

化合物番号 39

Y - Aib - EGTFTSDYSILLEEQAAR - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - FINWLLAGGPSSSGAPPSPS - OH

【化 5 2】



30

配列番号 30、置換基 : B、置換基位置 : K 21

合成法 : SPPS\_\_A、SC\_\_C、CP\_\_A

計算分子量 (平均) : 4838 . 5 Da

LCMS\_\_A : 保持時間 = 6 . 2 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1613 . 5、 $[M + 4H]^4+$  1210 . 4

40

化合物番号 40

Y - Aib - EGTFTSDYS - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - LLEEQAAREFIEWLLAGGPSSSGAPPSPS - OH

50

## 【化 5 3】



10

配列番号 3 1、置換基：B、置換基位置：K 1 2

合成法：S P P S \_ A、S C \_ A、C P \_ A

計算分子量（平均）：4 8 6 9 . 4 D a

L C M S \_ A：保持時間 = 5 . 7 分、実測値  $[M + 3 H]^3 + 1623.8$ 、 $[M + 4 H]^4 + 1218.2$ 

化合物番号 4 1

Y - A i b - E G T F T S D Y S - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) プタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - Y L E E Q A A R E F I N W L L A G G P S S G A P P P S - O H

20

## 【化 5 4】



配列番号 3 2、置換基：B、置換基位置：K 1 2

合成法：S P P S \_ A、S C \_ A、C P \_ A

計算分子量（平均）：4 9 0 4 . 4 D a

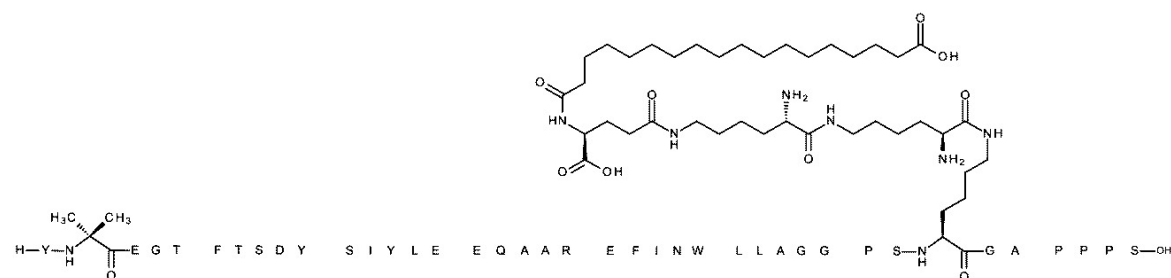
L C M S \_ A：保持時間 = 5 . 7 分、実測値  $[M + 3 H]^3 + 1635.4$ 、 $[M + 4 H]^4 + 1226.7$ 

化合物番号 4 2

Y - A i b - E G T F T S D Y S I Y L E E Q A A R E F I N W L L A G G P S - K [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 2 S ) - 2 - アミノ - 6 - [ [ ( 4 S ) - 4 - カルボキシ - 4 - ( 17 - カルボキシヘプタデカノイルアミノ ) プタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - G A P P P S - O H

30

## 【化 5 5】



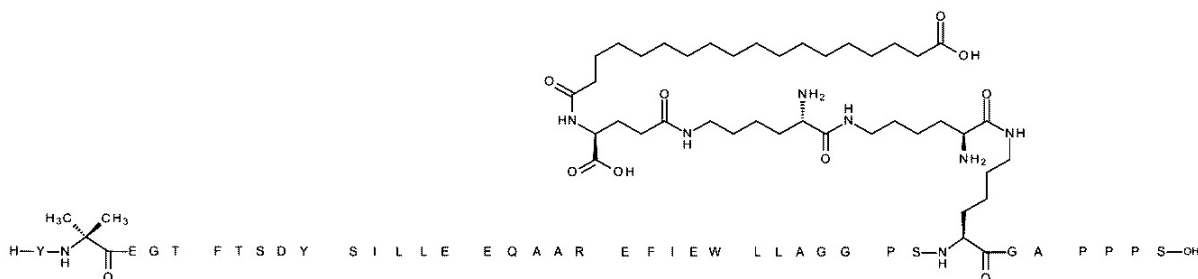
40

配列番号 3 3、置換基：B、置換基位置：K 3 3

50

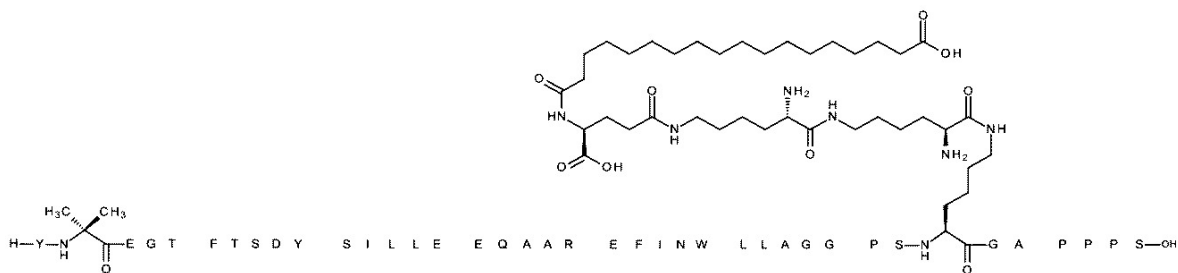


10



20

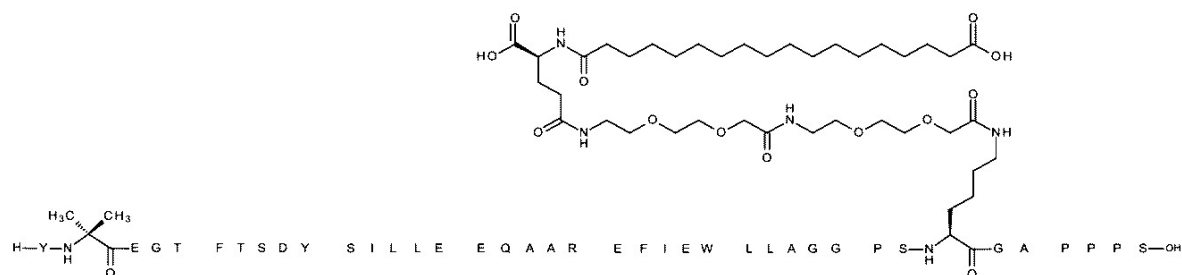
30



40

50

## 【化 5 8】



配列番号 34、置換基：A、置換基位置：K 3 3

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

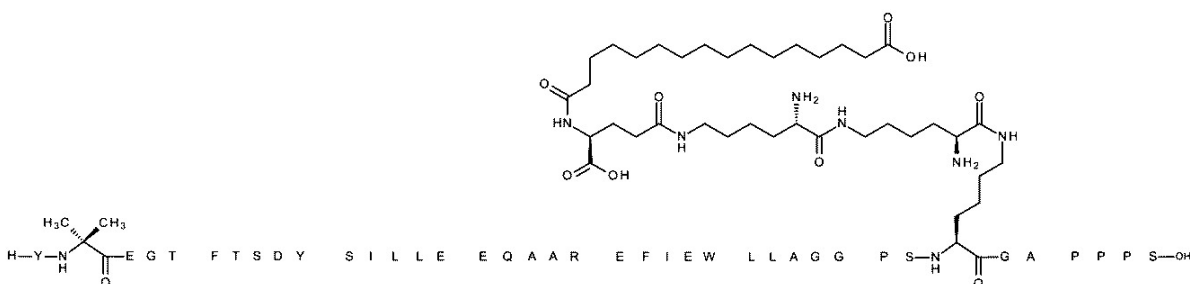
計算分子量（平均）：4929.5 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 6.6 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1643.8、 $[M + 4H]^4+$  1233.1

化合物番号 46

Y - Aib - EGTFTSDYSILLEEQAAREFIEWLLAGGPS - K [ (2S) - 2 - アミノ - 6 - [ [ (2S) - 2 - アミノ - 6 - [ [ (4S) - 4 - カルボキシ - 4 - (15 - カルボキシペンタデカノイルアミノ) ブタノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] アミノ ] ヘキサノイル ] - GAPPPS - OH

## 【化 5 9】



配列番号 34、置換基：E、置換基位置：K 3 3

合成法：SPPS\_\_A、SC\_\_A、CP\_\_A

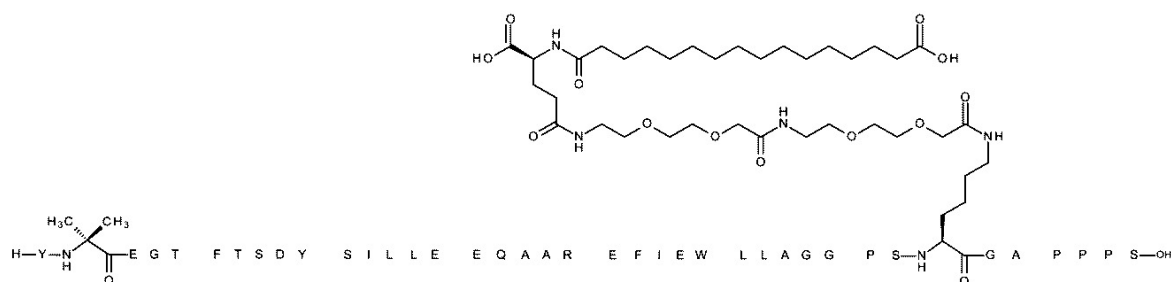
計算分子量（平均）：4867.5 Da

LCMS\_\_A：保持時間 = 6.1 分、実測値  $[M + 3H]^3+$  1623.1、 $[M + 4H]^4+$  1217.6

化合物番号 47

Y - Aib - EGTFTSDYSILLEEQAAREFIEWLLAGGPS - K [ 2 - [ 2 - [ 2 - [ [ 2 - [ 2 - [ [ (4S) - 4 - カルボキシ - 4 - (15 - カルボキシペンタデカノイルアミノ) ブタノイル ] アミノ ] エトキシ ] エトキシ ] アセチル ] アミノ ] エトキシ ] エトキシ ] アセチル ] - GAPPPS - OH

## 【化 6 0】



配列番号 34、置換基：D、置換基位置：K 3 3

10

20

30

40

50

合成法：S P P S \_\_ A、S C \_\_ A、C P \_\_ A

計算分子量（平均）：4 9 0 1 . 4 D a

L C M S \_\_ A：保持時間 = 6 . 3 分、実測値 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup> 1 6 3 4 . 6、[ M + 4 H ] <sup>4 +</sup> 1 2 2 6 . 1

【 0 1 5 2 】

実施例 2：インビトロ機能的効力（C R E ルシフェラーゼ、全細胞）

この実施例の目的は、ヒト G L P - 1 受容体および G I P 受容体におけるインビトロでの本化合物の機能的活性または効力を試験することである。インビトロ機能的効力は、全細胞アッセイにおける標的受容体活性化の尺度である。実施例 1 の誘導体の効力を以下に記載するように決定した。ヒト G L P - 1 ( 7 - 3 7 ) およびヒト G I P を比較のための適切なアッセイに含めた。

10

【 0 1 5 3 】

原理

インビトロ機能的効力を、個別の細胞株におけるレポーター遺伝子アッセイにおいて標的受容体の応答を測定することによって決定した。このアッセイは、以下の G タンパク質共役受容体：ヒト G L P - 1 受容体またはヒト G I P 受容体のうちの 1 つを発現し、かつ各々の細胞株がプロモーターに結合した c A M P 応答配列（C R E）の D N A およびホタルルシフェラーゼ（C R E ルシフェラーゼ）の遺伝子を含む安定にトランスフェクトされた B H K 細胞株で行った。それぞれの受容体が活性化されると、c A M P が生成され、次いで、ルシフェラーゼタンパク質の発現がもたらされる。アッセイインキュベーションが完了した時点で、ルシフェラーゼ基質（ルシフェリン）を添加し、ルシフェリンのオキシルシフェリンへの酵素変換を引き起こし、生物発光を生じさせる。発光を本アッセイの読み取り値として測定する。

20

【 0 1 5 4 】

細胞培養および調製

これらのアッセイで使用した細胞株は、親細胞株として B H K T S 1 3 を有する B H K 細胞であった。これらの細胞を、C R E ルシフェラーゼ要素を含むクローンから得て、さらにそれぞれのヒト受容体をトランスフェクトすることによって確立して、関連細胞株：B H K C R E l u c 2 P h G L P - 1 R または B H K C R E l u c 2 P h G I P R を得た。細胞を、細胞培養培地中、3 7 / 5 % C O <sub>2</sub> で培養した。これらをアリコートし、液体窒素中に保存した。これらの細胞を連続培養し、各アッセイの前日に播種した。

30

【 0 1 5 5 】

材料

以下の化学物質をアッセイで使用した：ブルロニック F - 6 8 1 0 % ( G i b c o 2 4 0 4 )、ヒト血清アルブミン（H S A、S i g m a A 9 5 1 1）、1 0 % ウシ胎児血清（F B S、I n v i t r o g e n 1 6 1 4 0 - 0 7 1）、ニワトリ卵白オボアルブミン（S i g m a A 5 5 0 3）、フェノールレッドフリー D M E M ( G i b c o 2 1 0 6 3 - 0 2 9 )、D M E M ( G i b c o 1 2 4 3 0 - 0 5 4 )、1 M H e p e s ( G i b c o 1 5 6 3 0 )、G l u t a m a x 1 0 0 x ( G i b c o 3 5 0 5 0 )、G 4 1 8 ( I n v i t r o g e n 1 0 1 3 1 - 0 2 7 )、ハイグロマイシン（I n v i t r o g e n 1 0 6 8 7 - 0 1 0）、および s t e a d y l i t e p l u s ( P e r k i n E l m e r 6 0 1 6 7 5 7 )。

40

【 0 1 5 6 】

緩衝液

G L P - 1 R 細胞培養培地は、1 0 % F B S、5 0 0 μ g / m L の G 4 1 8、および 3 0 0 μ g / m L のハイグロマイシンを含む D M E M 培地からなった。G I P R 細胞培養培地は、1 0 % F B S、4 0 0 μ g / m L の G 4 1 8、および 3 0 0 μ g / m L のハイグロマイシンを含む D M E M 培地からなった。アッセイ緩衝液は、最終アッセイ濃度の 2 倍の H S A を添加した、フェノールレッドフリー D M E M、1 0 m M の H e p e s、1 x

50

G l u t a m a x、1 %オボアルブミン、および0 . 1 %プルロニックF - 6 8 になった。アッセイ培地を、アッセイ緩衝液中、等体積の試験化合物と1 : 1 で混合して、H S A の最終アッセイ濃度を得た。

【 0 1 5 7 】

手順

1 ) 細胞を5 0 0 0 細胞 / ウェルでプレーティングし、アッセイプレート中で一晩インキュベートした。

2 ) 細胞をD P B S で1 回洗浄した。

3 ) 1 0 0 ~ 3 0 0  $\mu$  M の範囲の濃度の試験化合物のストックおよび参照化合物のストックをアッセイ緩衝液中で1 : 1 5 0 に希釈した。その後、化合物を9 6 ディープウェル希釈プレートの列1 で1 : 1 0 に希釈し、その後、その行に移して、3 . 5 倍、1 2 点希釈曲線を作成した。

10

4 ) H S A を含むまたは含まないアッセイ培地 ( 5 0  $\mu$  l アリコート ) をアッセイプレートの各ウェルに添加した。

5 ) 化合物またはブランクの5 0  $\mu$  l アリコートを、希釈プレートから、H S A を含むまたは含まないアッセイ緩衝液を含むアッセイプレートに移した。

6 ) アッセイプレートを、5 % C O <sub>2</sub> のインキュベーター内で、3 7 °C で3 時間インキュベートした。

7 ) 細胞をD P B S で1 回洗浄した。

8 ) D P B S の1 0 0  $\mu$  l アリコートをアッセイプレートの各ウェルに添加した。

20

9 ) s t e a d y l i t e p l u s 試薬 ( 感光性 ) の1 0 0  $\mu$  l アリコートをアッセイプレートの各ウェルに添加した。

1 0 ) 各アッセイプレートをアルミホイルで覆って遮光し、室温で3 0 分間にわたって2 5 0 R P M で振盪した。

1 1 ) 各アッセイプレートをマイクロタイタープレートリーダーで読み取った。

【 0 1 5 8 】

計算および結果

マイクロタイタープレートリーダーからのデータを最初にE x c e l で回帰分析して、x 軸 ( 対数スケール濃度 ) を個々の試験化合物のストック濃度および本アッセイの希釈に基づいて計算した。その後、このデータをG r a p h P a d P r i s m ソフトウェアに転送してグラフを作成し、統計分析を行った。このソフトウェアは非線形回帰を実行する ( 対数 ( 作動薬 ) 対応答 ) 。このソフトウェアを用いて計算し、p M 単位で報告したE C <sub>50</sub> を以下の表1 ~ 3 に示す。1 試料当たり最低2 つの複製を測定した。報告値は複製の平均値である。

30

40

50

## 【表 2】

表 1：0% HSA および 1% HSA の存在下でのヒト GLP-1R および GIPR における機能的効力

化合物 番号	hGLP-1R、CRE Luc 0%HSA EC <sub>50</sub> (pM)	hGLP-1R、CRE Luc 1%HSA EC <sub>50</sub> (pM)	hGIPR、CRE Luc 0%HSA EC <sub>50</sub> (pM)	hGIPR、CRE Luc 1%HSA EC <sub>50</sub> (pM)
hGLP-1(7-37)	8.4	6.7	nd	nd
hGIP	nd	nd	11.3	6.4
1	7.8	1659.0	2.8	172.5
2	6.0	899.7	3.8	275.4
3	8.5	626.3	6.9	229.2
4	6.6	484.3	8.5	293.8
5	9.4	624.8	14.2	362.4
6	3.4	242.7	18.5	434.0
7	4.2	513.2	28.7	686.8
8	2.3	82.1	6.7	191.1
9	3.8	278.8	10.8	508.2
10	3.9	939.9	11.3	1745.1
11	3.3	132.3	9.9	450.2
37	2.7	94.6	11.2	297.8
12	4.0	54.4	9.0	71.5
13	7.4	204.1	13.9	257.2
14	5.4	306.2	11.6	580.1
15	5.0	129.7	7.1	137.5
38	3.1	258.9	12.4	815.1
16	3.1	321.1	13.4	803.8
17	5.2	256.6	34.9	1319.0
18	19.7	226.2	20.9	285.1
19	8.6	364.8	6.5	275.4
20	4.2	256.0	7.1	247.4
21	5.7	118.2	5.4	130.9
22	2.8	170.5	6.2	168.9
23	4.1	117.8	6.7	134.3
24	12.1	490.2	3.9	115.1
25	15.5	740.2	7.2	263.0
26	7.4	594.6	4.9	153.0
39	8.2	135.4	28.4	365.2
27	4.6	127.0	6.3	131.8
28	6.2	139.1	6.6	86.5
29	16.8	378.5	3.8	101.7
30	7.3	267.5	3.2	185.0
41	1.2	31.4	4.9	79.3
42	2.3	83.5	5.9	305.7
40	6.4	333.6	9.5	500.6
31	4.2	202.0	4.7	188.5
32	5.0	981.9	7.1	678.7
43	4.0	359.5	5.6	444.5
44	4.2	240.9	5.7	365.3
33	14.8	360.7	2.9	102.8
34	6.0	186.4	8.3	212.8
35	3.0	412.6	5.2	303.0
36	4.7	413.8	5.5	356.5
45	3.9	1580.0	3.8	1220.0
46	1.5	110.8	1.8	97.0
47	2.1	154.5	3.1	155.7

n d = 未決定

## 【0159】

本発明の化合物は、所与の条件下で、ヒト GLP-1R 受容体およびヒト GIPR 受容体の強力な機能的活性化を呈する。

## 【0160】

## 実施例 3：ミニブタにおける薬物動態研究

この実施例の目的は、ミニブタへの静脈内投与後の本発明の誘導体のインビボでの半減期、すなわち、体内でのそれらの時間の延長、ひいてはそれらの作用時間の延長を決定することである。これを薬物動態 (PK) 研究で行い、問題の誘導体の終末相半減期を決定する。終末相半減期とは、概して、初期分布相の後に測定されるある特定の血漿濃度を

半減するのにかかる期間を意味する。

【0161】

研究

雌GotttingenミニブタをEllegaard Gotttingen Minipigs (Dalmose, Denmark) から入手し、およそ7～14ヶ月齢であり、かつ体重およそ16～35kgのミニブタを本研究で使用した。ミニブタを個別に収容し、SDSミニブタ食餌 (Special Diets Services, Essex, UK) を制限された状態で1日1回与えた。

【0162】

3週間順応させた後、2つの永久中心静脈カテーテルを各ミニブタの大静脈尾に埋め込んだ。ミニブタを外科処置後1週間回復させ、その後、誘導体連続投与の間に好適なウォッシュアウト期間を伴う反復薬物動態研究に使用した。

【0163】

ミニブタを、投薬前およそ18時間および投薬後0～4時間絶食させたが、全期間中、水に自由にアクセスさせた。

【0164】

実施例1の化合物のナトリウム塩を、0.007%ポリソルベート20、50mMリン酸ナトリウム、70mM塩化ナトリウムを含む緩衝液 (pH7.4) 中で、20～40nmol/mLの濃度に溶解させた。化合物の静脈注射 (通常1.5～2nmol/kgに対応する体積、例えば、0.1mL/kg) を一方のカテーテルを通して与え、血液試料を投与後14日までの所定の時点で (好ましくは他方のカテーテルを通して) 採取した。血液試料 (例えば、0.8mL) を8mM EDTA緩衝液中に採取し、その後、4および1942gで10分間遠心分離した。

【0165】

サンプリングおよび分析

血漿をドライアイス上のMicronicチューブ中にピペットで移し、ELISAまたは類似の抗体ベースのアッセイまたはLCMSを使用して化合物の血漿濃度について分析するまで-20℃で保持した。個々の血漿濃度-時間プロファイルを、Phoenix WinNonLin ver. 6.4. (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA) におけるノンコンパートメントモデルによって分析し、結果として得られた終末相半減期 (調和平均) を決定した。

【0166】

結果

【表3】

表2：ミニブタへの静脈内投与後に測定した終末相半減期

化合物番号	t <sub>1/2</sub> (時)
15	36
28	35
29	68
31	49

本発明の試験した化合物は、ヒトで測定されたhGLP-1およびhGIPの半減期と比較して非常に長い半減期を有し、それぞれ、およそ2～4分および5～7分である。ミニブタで測定された半減期は、液体注射による少なくとも週1回の投与または経口錠剤による少なくとも1日1回の投与で十分であるヒトにおける半減期を予測する。

【0167】

実施例5：イヌにおける薬物動態研究

この実施例の目的は、ビーグル犬に経口投与した後の本発明の化合物のインビボでの半減期および血漿曝露、すなわち、経時的に循環に到達する被験物質の終末相半減期およ

び濃度を決定することである。これを薬物動態（PK）研究で行い、問題の化合物のこれらのパラメータを決定する。終末相半減期とは、概して、初期分布相の後に測定されるある特定の血漿濃度を半減するのにかかる期間を意味する。

#### 【0168】

##### 錠剤組成物の調製

被験物質およびSNAC（N-（8-（2-ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸ナトリウム）を含む錠剤組成物を、例えば、WO2019/149880に記載されるように、被験物質をローラー圧縮SNACおよびステアリン酸マグネシウムと混合することによって、当業者に公知の方法に従って調製した。錠剤組成物中のSNACの量は100～300mgであり、錠剤組成物中のステアリン酸マグネシウムの量は7.7mgであり、錠剤組成物中の各被験物質の目標量は3～4mgであった。

10

#### 【0169】

##### 動物、投薬、およびサンプリング

試験期間中に1～7歳および体重9～17kgであった雄ビーグル犬を本研究に含めた。ビーグル犬に絶食状態で投薬した。ビーグル犬を囲い内に群別に収容し（12時間明：12時間暗）、Royal Canin Medium Adult dog food（Royal Canin Products（中国支店）またはBrogaarden A/S（デンマーク））を個別かつ制限的に1日1回給餌した。ビーグル犬を、連続投与の間に好適なウォッシュアウト期間を伴う反復PK研究に使用した。最初のPK研究の開始前に、適切な順応期間を与えた。ビーグル犬の全ての取り扱い、投薬、および採血を、訓練を受けた熟練したスタッフが行った。研究前に、ビーグル犬を一晩絶食させ、投薬後0～4時間絶食させた。投薬1時間前から投薬4時間後までビーグル犬の水へのアクセスを制限したが、それ以外、全期間を通して水に自由にアクセスさせた。

20

#### 【0170】

本組成物を単回経口投与により6～8匹の群のビーグル犬に投与した。本錠剤を以下の様式で投与した：錠剤投与の10分前に、ビーグル犬に約3nmol/kgの配列番号48を皮下投与してもよく、その後、錠剤を咀嚼させないようにビーグル犬の口の奥に置いた。その後、口を閉じ、注射器またはチューブを用いて10mLの水道水を与えて、錠剤の嚥下を促進した。

#### 【0171】

投薬前に1つの血液試料を採取し、投薬後に追加の試料を所定の時点で、例えば、5、10、15、20、30、および45分後、ならびに1、1.5、2、4、7、10、24、48、72、120、144、168、192、216時間後に最大240時間にわたって採取して、被験物質の完全な血漿濃度-時間吸収プロファイルを十分に網羅した。採血時点毎に、およそ0.8mLの全血を1.5mLのEDTAコーティングチューブに採取し、チューブを穏やかに回転させて試料をEDTAと混合させた。血液試料をEDTA緩衝液（8mM）中に採取し、その後、4および2000gで10分間遠心分離した。血漿をドライアイス上のMicronicチューブにピペットで移し、分析まで-20以下で維持した。血液試料を、必要に応じて、例えば、最初の2時間では前肢の橈側皮静脈内のVenflonから採取し、その後、残りの時点では頸静脈から注射器で採取した。最初の数滴をペンフロンから排出させて、Venflonから試料中にヘパリン生理食塩水が入り込むのを回避した。

30

40

#### 【0172】

全ての血液試料を安定化のためにEDTAを含む試験管に採取し、遠心分離まで氷上で維持した。血漿を遠心分離によって全血から分離し、血漿を分析まで-20以下で貯蔵した。

#### 【0173】

##### 分析および計算

血漿を、当業者に公知のLC-MS（液体クロマトグラフィー-質量分析）を使用して被験物質について分析した。システムは、10弁インターフェースモジュールTurbo

50

oFlowシステム、CTC HTS PALオートサンプラー、Accela 1250ポンプ、およびHot Pocketカラムオープンを装備したThermo Fisher QExactiv質量分析計、または弁インターフェースモジュールTurboFlowシステム、TriPlus RSIオートサンプラー、Dionex Ultimate 3000ポンプ、Hot Pocketカラムオープンを装備したThermo Fisher QExactiv Plus質量分析計のいずれかからなった。RP-HP LC分離を、Phenomenex Onyx Monolithic C18カラム(50×2.0mm)(30 で流量0.8mL/分)、またはAgilent Poros hell 120 SB-C18カラム(50×2.1mm、2.7μm)(60 で流量0.4mL/分)のいずれかを使用して、1%ギ酸水溶液中1:1アセトニトリル/メタノール線形勾配を使用して達成した。質量分析計を、陽イオン化SIMモードまたは陽イオン化PRMモードのいずれかで操作した。

10

【0174】

個々のビーグル犬毎に、血漿濃度-時間プロファイルを、Pharsight Phoenix WinNonLinバージョン6.4ソフトウェアまたはPK分析用の他の関連ソフトウェアにおけるノンコンパートメントモデルによって分析し、結果として得られた終末相半減期( $t_{1/2}$ )、用量当たりの最大血漿濃度( $C_{max}/D$ )、最大血漿濃度までの時間( $t_{max}$ )、および用量当たりの最大限までの曲線下面積( $AUC/D$ )を決定した。薬物動態結果の要約統計量を、中央値( $t_{max}$ )、ホルモニック平均( $t_{1/2}$ )、または算術平均( $C_{max}$ 、 $AUC$ )として提示した。

20

【0175】

結果

【表4】

表3：ビーグル犬に被験物質およびSNACの錠剤組成物を経口投与した後の薬物動態パラメータ

化合物番号	SNACの量 (mg)	被験物質の目標 量(mg)	$T_{max}$ (時)	$t_{1/2}$ (時)	$C_{max}$ /用量 (kg/L)	AUC/用量 (kg·h/L)
9	100	4	2.0	50	0.24	12.1
10	100	4	1.0	36	0.20	8.4
11	100	4	1.4	34	0.19	7.1
13	100	3	1.5	60	0.29	14.8
15	100	3	1.5	59	0.24	11.9
15	300	3	2.0	46	0.28	11.6
16	100	3	1.3	47	0.21	8.6
20	100	3	2.0	56	0.21	10.8
24	300	3	1.8	74	0.29	16.4
25	300	3	1.8	43	0.30	15.2
26	300	3	1.2*	70*	0.49*	27.4*
28	300	3	1.3**	67**	0.36**	18.6**
29	300	3	1.2**	69**	0.26**	16.6**
30	300	3	0.8	81	0.24	6.5
40	300	3	2.0	61	0.48	27.0
31	300	3	1.3**	56**	0.35**	17.9**
32	300	3	1.8*	80*	0.45*	25.3*
43	300	3	1.5	131	0.22	21.4

30

40

\*=同じ製剤条件下での2つの実験からの平均データ、\*\*=同じ製剤条件下での3つの実験からの平均データ。

経口投与後に化合物の濃度が血漿中で検出された( $C_{max}/D = 0$  超および $AUC/D = 0$  超)ため、試験した本発明の化合物は、このモデルにおいて経口バイオアベイラビリティを示す。さらに、本発明の試験した化合物は、ヒトで測定されたhGLP-1およびhGIPの半減期と比較して非常に長い半減期をさらに有し、それぞれ、およそ2~4分および5~7分である。

【0176】

50



本発明のある特定の特徴が本明細書に例証および記載されているが、ここで、多くの修正、代用、変更、および等価物が当業者に想到されるであろう。したがって、添付の実施形態が、本発明の真の趣旨の範囲内に含まれる全ての修正および変更を包含するよう意図されていることが理解されたい。

【配列表】

0007581385000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I  
A 6 1 P 29/00 (2006.01) A 6 1 P 29/00

(33)優先権主張国・地域又は機関  
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 63/156,988

(32)優先日 令和3年3月5日(2021.3.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

早期審査対象出願  
2 0 インディアナポリス

(72)発明者 ディマルキ、リチャード  
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 3 3 インディアナポリス

(72)発明者 リンデロート、ラース  
デンマーク国 2 8 8 0 バウスヴェア ノヴォ アレー

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 0 8 8 3 7 9 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
C 0 7 K 1 4 / 6 0 5  
A 6 1 K 3 8 / 1 6  
A 6 1 P 3 / 1 0  
A 6 1 P 3 / 0 4  
A 6 1 P 1 / 1 6  
A 6 1 P 2 9 / 0 0