

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-532172

(P2013-532172A)

(43) 公表日 平成25年8月15日 (2013.8.15)

|                                 |                      |             |
|---------------------------------|----------------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                    | F I                  | テーマコード (参考) |
| <b>C 0 7 K 14/605 (2006.01)</b> | C 0 7 K 14/605 Z N A | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 K 38/04 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 37/43        | 4 H 0 4 5   |
| <b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>   | A 6 1 P 3/10         |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁)

|               |                              |          |                        |
|---------------|------------------------------|----------|------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2013-518873 (P2013-518873) | (71) 出願人 | 510084149              |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年7月8日 (2011.7.8)         |          | ダナ ファーバー キャンサー インステ    |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成25年2月28日 (2013.2.28)       |          | イテュート インコーポレイテッド       |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2011/043465            |          | アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O    |
| (87) 国際公開番号   | W02012/006598                |          | 2 1 1 5 ポストン ビニー・ストリート |
| (87) 国際公開日    | 平成24年1月12日 (2012.1.12)       |          | 4 4                    |
| (31) 優先権主張番号  | 61/363,097                   | (74) 代理人 | 100102668              |
| (32) 優先日      | 平成22年7月9日 (2010.7.9)         |          | 弁理士 佐伯 憲生              |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100182486              |
|               |                              |          | 弁理士 中村 正展              |
|               |                              | (74) 代理人 | 100147289              |
|               |                              |          | 弁理士 佐伯 裕子              |
|               |                              | (74) 代理人 | 100158872              |
|               |                              |          | 弁理士 牛山 直子              |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化したインスリン分泌促進ペプチド及び使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、異常なグルコースホメオスタシスに関連する疾患、例えば、2型糖尿病及び2型糖尿病に関連する疾患の治療に優れた予想外の利点を有する安定に架橋されたインスリン分泌促進ポリペプチドを提供する。このような利点は、これに限定されないが、対応する非改変ポリペプチドと比べて、延長されたポリペプチド半減期、増強されたα螺旋性、改善された熱安定性及びプロテアーゼ耐性、増大した機能活性及び薬理学的特性、いずれの経路で投与した場合でも改善されたバイオアベイラビリティ、並びに経口送達されたときの改善されたバイオアベイラビリティ並びに胃腸管吸収を包含する。本発明は、本発明のポリペプチドを投与するための組成物を、更に本発明のポリペプチドを製造及び評価する方法も提供する。

FIG. 1A

**Exonin-4** (Belodema waspexum) GI: 516057 (SEQ ID NO: 1)  
 KILLIKVGLAALFPLWQVVEGLSSEKASASASAKLAWGHPFISDLSQKKEGKVRfLHKLNGGSSGAF  
 FFG  
**Exonin-4** (SEQ ID NO: 2)  
 EGGFSSLSFQGEKAVELTIEKNGGSSGAPFS  
**Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor** (Bom. sapiens) GI: 475843 (SEQ ID NO: 3)  
 NVATKPAALLESPLAVGGEKKEGEPKRSFVSSBAMVSSQPSFPAAGCTISDYSIAMKIEQQPWNLAQKSE  
 ENQKLYTQDAKALCLAQWKKHNAVHVPQSPAKNSPDESGELIQELALDQMLDLAR  
**Gastric Inhibitory Peptide (GIP)** (SEQ ID NO: 4)  
 YAGCTFQPSIANKIRGQDPWGLAQKCKRWKXKITQ  
**Glucagon-like Peptide 1 Receptor** (Bom. sapiens) GI: 51778 (SEQ ID NO: 5)  
 KKKITFVGLFVCAQGSWRGQDIEKRSFPAQADESGPQKQKDRSGQSTFQYKYLNRRAQDFVQWYKRS  
 NNNANKHREKEDKACCFSSWSSYLEQAKETIAMVKSGKRLTFREVAIVELGRBAGDSFSDNCTILNARQ  
 FIMLIQKLTQK

FIG. 1A (Continued)

**Yasporitide** (SEQ ID NO: 11)  
 H2N-His-2-acetyl-Ala-Gly-Gly-Phe-Gln-Gar-Ser-Arg-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-  
 Ala-Ala-Lys-Gly-Phe-Ile-Ala-Ile-Phe-Val-Lys-2-methyl-Ala-Arg-CONH2  
**Albiglutide** (SEQ ID NO: 12)  
 genetic fusion of albumin and GLP-1  
**L218926**  
 GIP-1 analog linked to a fragment of IgG

FIG. 1B

**Exonin-4** (Belodema waspexum) GI: 516057 (SEQ ID NO: 1)  
 KILLIKVGLAALFPLWQVVEGLSSEKASASASAKLAWGHPFISDLSQKKEGKVRfLHKLNGGSSGAF  
 FFG  
**Exonin-4** (SEQ ID NO: 2)  
 EGGFSSLSFQGEKAVELTIEKNGGSSGAPFS  
**Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor** (Bom. sapiens) GI: 475843 (SEQ ID NO: 3)  
 NVATKPAALLESPLAVGGEKKEGEPKRSFVSSBAMVSSQPSFPAAGCTISDYSIAMKIEQQPWNLAQKSE  
 ENQKLYTQDAKALCLAQWKKHNAVHVPQSPAKNSPDESGELIQELALDQMLDLAR  
**Gastric Inhibitory Peptide (GIP)** (SEQ ID NO: 4)  
 YAGCTFQPSIANKIRGQDPWGLAQKCKRWKXKITQ

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

$\alpha$  螺旋及び 1 つ又はそれ以上の分子鎖を含んでなり、それぞれの分子鎖が当該ペプチドの  $\alpha$  螺旋上に存在している残基の 1 対と共有結合で結合しており、それによりインスリン分泌促進ポリペプチドを構造的に強化する、構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 2】

インスリン分泌促進ポリペプチドが、エクセナチド、G I P P、G I P、G L P-1 前駆体、G L P-1、G L P-2、G L P-1 (7~37)、G L P-1 (7~36)、リラグルチド、タスポグルチド、アルビグルチド又は L Y 2 1 8 9 2 6 5 である、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

10

## 【請求項 3】

インスリン分泌促進ポリペプチドがエクセナチドである、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 4】

分子鎖の数が、1~2、2~3、2~4、2~5、2~6、2~7、2~8、2~9 又は 2~10 の間である、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 5】

少なくとも 1 つの残基対がポリペプチドの N-末端半分内にある、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

20

## 【請求項 6】

少なくとも 1 つの残基対がポリペプチドの C-末端半分内にある、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 7】

ポリペプチドの C-末端半分内にある少なくとも 1 つの結合残基対及びポリペプチドの N-末端半分内にある別の結合残基を含んでなる、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 8】

ポリペプチドが、配列番号 2 又は 15~38 のうち何れか 1 つで表わされる配列を有しているエクセナチドに対応している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

30

## 【請求項 9】

ポリペプチドが、配列番号 39~62 のうち何れか 1 つで表わされる配列を有している G L P-1 に対応している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 10】

ポリペプチドの  $\alpha$  螺旋の残基位置に対して位置 (i、i+3)、又は (i、i+4) 又は (i、i+7) に位置している第 1 分子鎖を含んでなる、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

40

## 【請求項 11】

ポリペプチドの  $\alpha$  螺旋の残基位置に対して位置 (i、i+3)、又は (i、i+4) 又は (i、i+7) に位置している第 1 分子鎖、及びポリペプチドの  $\alpha$  螺旋の残基位置に対して位置 (i、i+3)、又は (i、i+4) 又は (i、i+7) に位置している第 2 分子鎖を含んでなるが、第 1 分子鎖と第 2 分子鎖が同一位置に位置していない、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 12】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドの半減期より少なくとも 2 倍長い半減期を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

50

## 【請求項 1 3】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドの半減期より少なくとも 3 倍長い半減期を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 1 4】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドの半減期より少なくとも 8 倍長い半減期を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 1 5】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドのインビボにおけるキモトリプシンに対する耐性より少なくとも 2 倍大きいインビボにおけるキモトリプシンに対する耐性を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

10

## 【請求項 1 6】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドのインビボにおけるキモトリプシンに対する耐性より少なくとも 3 倍大きいインビボにおけるキモトリプシンに対する耐性を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 1 7】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドのインビボにおけるキモトリプシンに対する耐性より少なくとも 8 倍大きいインビボにおけるキモトリプシンに対する耐性を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

20

## 【請求項 1 8】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドのインビボにおけるペプシンに対する耐性より少なくとも 6 倍大きいインビボにおけるペプシンに対する耐性を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 1 9】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドのインビボにおけるペプシンに対する耐性より少なくとも 1 3 倍大きいインビボにおけるペプシンに対する耐性を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

30

## 【請求項 2 0】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドのインビボにおける血清プロテアーゼに対する耐性より少なくとも 2 倍大きいインビボにおける血清プロテアーゼに対する耐性を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 2 1】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドのインビボにおける血清プロテアーゼに対する耐性より少なくとも 5 倍大きいインビボにおける血清プロテアーゼに対する耐性を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

40

## 【請求項 2 2】

強化されたポリペプチドが、強化されていない対応するポリペプチドのインビボにおける血清プロテアーゼに対する耐性より少なくとも 1 0 倍大きいインビボにおける血清プロテアーゼに対する耐性を保有している、請求項 1 に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

## 【請求項 2 3】

請求項 1 ～ 2 2 の何れか一項に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペ

50

チド及び1つ又はそれ以上の薬学的に許容される賦形剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項24】

ポリペプチド鑄型が、配列番号2で表わされる配列のエクセナチド又はその機能的断片  
或いは誘導体である、請求項23に記載の医薬組成物。

【請求項25】

請求項1～22の何れか一項に記載のインスリン分泌促進ポリペプチドの治療有効量を  
投与することを含んでなる、糖尿病を治療又は予防する方法。

【請求項26】

ポリペプチドがエクセナチド又はその機能的断片或いは誘導体である、請求項25に記  
載の方法。

10

【請求項27】

請求項23に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含んでなる、糖尿病を治  
療又は予防する方法。

【請求項28】

ポリペプチドがエクセナチド又はその機能的断片或いは誘導体である、請求項27に記  
載の方法。

【請求項29】

α螺旋及び1つ又はそれ以上の分子鎖を含んでなり、それぞれの分子鎖が当該ポリペ  
プチドのα螺旋上に存在している非天然アミノ酸残基の1対と共有結合で結合している、構  
造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチドの治療有効量を投与することを含んで  
なる、糖尿病を治療又は予防する方法。

20

【請求項30】

インスリン分泌促進ポリペプチドが、エクセナチド、G I P P、G I P、G L P－1 前  
駆体、G L P－1、G L P－2、G L P－1（7～37）、G L P－1（7～36）、リ  
ラグルチド、タスポグルチド、アルビグルチド或いはL Y 2 1 8 9 2 6 5、又はこれらの  
機能的断片或いは誘導体である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

インスリン分泌促進ポリペプチドが、エクセナチド又はその機能的断片或いは誘導体で  
ある、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

インスリン分泌促進ポリペプチドを経口送達経路を介して投与する、請求項29に記載  
の方法。

30

【請求項33】

インスリン分泌促進ポリペプチドを注射による経路を介して投与する、請求項29に記  
載の方法。

【請求項34】

インスリン分泌促進ポリペプチドを経口送達経路を介して投与し、ここで経口送達され  
る生体利用可能なポリペプチドのレベルが静脈注射で送達される生体利用可能なポリペ  
プチドのレベルとほぼ同等である、請求項29に記載の方法。

【請求項35】

連続して配置され縫い合わせられた配置にあり、それによって第1分子鎖の末端と第2  
分子鎖の始点がポリペプチド中の共通残基を起源としている、少なくとも2つの分子鎖を  
含んでなる、請求項1に記載の構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（関連出願への参照及び参照による取り込み）

本出願は、2010年7月9日に出願された、米国仮特許出願第61／363, 097  
号の優先権を主張する。本出願は、2009年1月23日に出願されて発明の名称が「ウ  
ィルス感染症を治療する組成物及び方法」である、P C T国際出願第P C T／U S 2 0 0

50

9／000438号、及び2010年6月18日に出願されて発明の名称が「構造化ウィルスペプチド組成物及び使用方法」である、PCT国際出願第PCT／US2010／039223号（これは2009年6月18日に出願された米国仮特許出願第61／218,209号の優先権を主張している）とも関連している。それぞれの上記出願はその全てが参照により本明細書に取り込まれている。

#### 【0002】

米国又は外国の特許又は公開された特許出願、国際特許出願、更には製造会社の使用説明書を含む、非特許文献の何れもを含んでいる本特許出願の明細書で引用されているありとあらゆる文献は参照により本明細書に明確に取り込まれている。

#### 【背景技術】

10

#### 【0003】

糖尿病は、多種の要因に由来して上昇した血中グルコース濃度（すなわち、高血糖）を特徴とする、異常なグルコースホメオスタシスをもたらす疾患の過程を示す。持続している或いはコントロールされていない高血糖は増大したそして早すぎる死亡率及び死亡と関係がある。多くの場合、異常なグルコースホメオスタシスは、脂質、リポプロテイン及びアポリポプロテイン代謝の変化、並びにその他の代謝及び血行動態疾患とも直接的にそして間接的に関連している。従って、2型糖尿病の患者は、冠動脈性心疾患、卒中、末梢血管疾患、高血圧、腎症、神経症、及び網膜症を含む、大血管及び小血管合併症のリスクが特に増大している。従って、グルコースホメオスタシス、脂質代謝及び高血圧の治療的コントロールが、糖尿病の臨床管理及び治療に非常に重要である。

20

#### 【0004】

糖尿病には一般に認められている2つの形態がある。1型糖尿病、又はインスリン依存性糖尿病（IDDM）では、患者はグルコースの利用を調節するホルモンである、インスリンを殆ど産生しない。2型糖尿病、又はインスリン非依存性糖尿病（NIDDM）では、多くの場合、患者は非糖尿病対象と比べて同じか或いはさらに上昇している血漿インスリン濃度を有している；しかしながら、これらの患者は筋肉、肝臓及び脂肪組織である、主要なインスリン感受性組織におけるグルコースに対するインスリン及び脂質得代謝の刺激効果に耐性を生じていて、血漿インスリン濃度は上昇しているのに、顕著なインスリン耐性に打ち勝つのに不十分である。

#### 【0005】

30

インスリン抵抗は、減少した数のインスリン受容体が主な原因ではなく、ポストインスリン受容体結合不全が原因でありこれは未だ説明されていない。このインスリン反応性に対する耐性は筋肉におけるグルコースの摂取、酸化及び保管の不十分なインスリン活性化、並びに脂肪組織における脂肪分解及び肝臓におけるグルコース生産及び分泌の不適切なインスリン抑制をもたらす。

#### 【0006】

2型糖尿病に対する利用可能な治療には広く認められている限界がある。運動及びカロリーの摂食低減は糖尿病疾患を劇的に改善するのに対して、この治療のコンプライアンスは、広く定着した運動不足のライフスタイル及び過剰な食物、特に飽和脂肪酸を大量含有している食物の摂取のために芳しくない。主な投与方法である注射を圧倒的な患者が承諾することがないので、各種公知の抗糖尿病薬のコンプライアンスに関する問題も存在する。

40

#### 【0007】

2型糖尿病では、膵臓のβ細胞を刺激してより多くのインスリンを分泌する、スルホニルウレア（例えば、トルブタミド及びグリピジド）又はメグリチニドの投与、及び／又はスルホニルウレア又はメグリチニドが無効の場合のインスリンの注射によるインスリンの増大した血漿濃度が、まさにインスリン耐性組織を刺激するのに十分高いインスリン濃度をもたらす。しかし、危険なほどに低い血漿グルコース濃度が、インスリン又はインスリン分泌促進剤（スルホニルウレア又はメグリチニド）の投与によって引き起こされる得る。そして、それでも高い血漿インスリンレベルによる増大したインスリン耐性レベルが起り得る。ビグアニド類はインスリン感受性を増大して高血糖をかなり改善する。しかし

50

、2つのピグアニド、フェンホルミン及びメトホルミンは、乳酸アシドーシス及び嘔吐／下痢を誘発する。メトホルミンはフェンホルミンに比べて殆ど副作用を有していないので2型糖尿病の治療に頻繁に処方される。

#### 【0008】

これらの公知の治療にもかかわらず、2型糖尿病のグルコースレベルにおいて本質的に正常な変動を保持する、一般に適用できそして一貫して有効な手段はない。別の治療介入（例えば、GLP-1受容体作動薬及びDPP-4阻害剤のような、インクレチンによる治療）を含む疾患治療のさらなる方法及び薬剤使用及びコンプライアンスを改善するための医薬投与の改善された方法（例えば、舌下、鼻腔内、気管内、吸入、及び経口投与）は未だ開発中である。

10

#### 【0009】

インクレチンシステムー糖尿病治療への医療介入についての認められている可能性のあるポイントはグルカゴン様ペプチド（GLP-1）及びグルコース依存性インスリン分泌促進ポリペプチド（GIP）（「インクレチン」）を包含し、これらは一緒になって、膵臓によるインスリン分泌及び肝臓によるグルコース産生の調節に重要な役割を果たす。また、インクレチンは膵臓のβ細胞集団及び分化の維持、β細胞アポトーシスの阻止、グルカゴン分泌の減少、胃内容排出の減速、及び体重減少をもたらす早期満腹の促進に重要な役割を果たしていると広く認められている。

#### 【0010】

血中の正常なグルコース濃度は、ある程度、インスリン（血中グルコースの減少をもたらす）とグルカゴン（肝臓にグルコースの生産を伝達する）の作用のバランスによって調節される。これら2つのホルモンの間のバランスのとれた作用は血漿のグルコース濃度に応答して膵臓β細胞によるインスリンとグルカゴンの生産を介して正常個人において維持されている。インクレチンは、食物摂取時に引き起こされるグルコース濃度を調節する更なる層を提供する。GLP-1及びGIPは食物が摂取されると腸の細胞から放出されて、膵臓細胞上のGLP-1及びGIP受容体を介するインスリン分泌を刺激して、GLP-1の場合は、膵臓からのグルカゴン分泌も阻害し、それによって肝臓によるグルコース生産を減少して、全体として血中グルコース濃度を低下する。

20

#### 【0011】

しかし、2型糖尿病では、インクレチンシステムが大きく低下している。具体的には、GLP-1及びGIPのインスリン分泌促進及びグルカゴン減少効果が2型糖尿病を有する個人において正常に機能していない。この認識がリラグルチド及びその他のような、GLP-1受容体作動薬、エキセナチドのような、インクレチン模倣薬を包含する、インクレチンによる治療の最近の開発を導いていて、これは、GLP-1受容体及びインクレチンシステムの他の受容体と相互作用してインスリンの放出を促進してグルカゴン分泌を阻害することによって、全体として血漿グルコース濃度を低下する。Gutniak, M., et al. N. Engl. J. Med. 1992; 326:1316-1322; Grossman, S., "Differentiating incretin therapies based on structure, activity, and metabolism: Focus on Liraglutide," Pharmacotherapy, 2009; 29(12):25S-32S を参照されたい。

30

#### 【0012】

開発中の1つのインクレチンによる治療薬は、GLP-1の断片であって、グルカゴン様インスリン分泌促進ペプチド（GLIP）である、GLP-1受容体作動薬及びGLP-1類縁体を包含する。Gutniak et al., 1992。正常な対象では、GLIPの注入が、食事に関連する血中グルコース濃度、及びインスリン及びグルカゴンの血漿濃度を有意に低下する。NIDDMの患者では、この治療がインスリンに対する必要を8倍減少した。IDDMの患者では、GLIP治療が必要なインスリンを半分に減少した。このグルコース依存活性は、低血糖副作用の合併を避けて2型糖尿病を治療するために用いることができる治療剤に対して非常に望ましい特性である。

40

#### 【0013】

つい最近開発された2型糖尿病を治療するためのインクレチンによる治療剤はエクセナ

50

チドであって、これはその日の最初と最後の食事の30～60分前に腹部、大腿部又は腕の皮下注射（皮下に）として、食品医薬品局（FDA）に承認された。エクセナチド-エキセンディン-4の合成型、1992年に Dr. John Eng (Eng, J. et al., J. Biol. Chem. 267:742-7405 (1992)) によって最初に単離され、アメリカドクトカゲの唾液中に発見されたホルモン（米国特許第5,424,286号（Eng）に記載される）-は、GLP-1受容体におけるその作動薬的作用を介してグルコース代謝の調節剤としてそしてインスリン分泌促進剤（すなわち、インスリンの放出を増大する）として機能する、ヒトグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）活性を示す。

#### 【0014】

FDA添付文書によると、エクセナチドは膵臓β細胞によるグルコース依存性インスリン分泌を増強し、不適切に上昇したグルカゴン分泌を抑制して、食物の胃からの流出を遅らせるが、作用機序は未だ研究中である。エクセナチドは39アミノ酸のペプチドであって、GLP-1と同様な親和性及び能力で膵臓GLP-1受容体（GLP-1R）と結合して活性化することによってインスリン分泌を促進してグルコース依存的にグルカゴン分泌を阻害する、糖調節機能を有するインスリン分泌促進剤である。エクセナチドの効能は、食物の胃からの流出を遅らせること、食物摂取量及び体重の減少及び膵臓β細胞量及び機能の増大を包含すると報告されている。更に、これは、インクレチン（GLP-1及びIP）の除去に関与する正常な分解酵素であるジペプチジルペプチダーゼ-I V（DPP-IV）による分解の基質として本質的に弱い。エクセナチドは、他の経口抗糖尿病薬（例えば、メトホルミン、スルホニルウレア類、チアゾリジンジオン類）ではうまくコントロールされなかった糖尿病を有する患者に対して2005年4月28日にFDAによって承認された。

#### 【0015】

エクセナチドはインスリン濃度をすぐに上げ（投与の約10分以内に）、このインスリン濃度はその後1又は2時間をこえると実質的に低下する。食後の服用は、事前に摂取したものより血糖に対する効果は非常に弱い。血糖に対する効果は6～8時間で消失する。この薬剤は2つの用量：5mcg及び10mcgで入手できる。治療は通常5mcg用量で開始し、副作用が有意でない場合はこれを増大する。

#### 【0016】

エクセナチド及びその他のインクレチンによるポリペプチド抗糖尿病治療薬に対する2つの重要な制限は潜在的に（1）タンパク分解による投与後の比較的短い半減期（例えば、承認されている静脈内経路で送達したとき、エクセナチドの2.5時間半減期）及び（2）十分なバイオアベイラビリティをもたらず代替え投与経路（例えば、経口、舌下、又は経鼻）では、効果は欠如するが、侵襲性は少ない（のでより多くの患者に適合する）を包含する（Gedulin et al., "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of exenatide following alternative routes of administration," Int'l J Pharmaceuticals, 356 (2008) 231-238）。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0017】

従って、優れた安定性、プロテアーゼ耐性、及び薬理学的特性を付与されている、最適化されたエクセナチドのような、最適化されたインクレチンに基づく、或いはその他のインスリン分泌促進ペプチド治療剤の開発、更には、代替えの、より患者に適合した送達経路（例えば、エクセナチドの経口送達形態）によって十分に送達できる（例えば、改善されたバイオアベイラビリティ、胃腸吸収及び薬理学的特性を達成できる）ような治療薬の開発は技術における大幅な進歩となるだろう。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0018】

本発明は、その一部分が、インクレチンホルモン（例えば、グルカゴン様ペプチド-1）、インクレチン類縁体（例えば、リラグルチド）又はインクレチン模倣体（例えば、エ

10

20

30

40

50

クセナチド)を包含する、インスリン分泌活性を有するポリペプチドを安定に架橋結合(crosslinking)することが、異常なグルコースホメオスタシスに関連する疾患、例えば、2型糖尿病及び2型糖尿病に関連する疾患の治療において優れた予想外の恩恵をもたらすという意外な発見に基づいている。このような利益は、これに限定されないが、非架橋対応物質と比較した、延長された半減期、増強された $\alpha$ 螺旋性、改善された熱安定性及びプロテアーゼ耐性、増大した機能活性及び薬理学的特性、如何なる経路で投与しても改善されたバイオアベイラビリティ、並びに経口で送達したときの改善されたバイオアベイラビリティ及び胃腸吸収を包含する。従って、本発明は以前は得られなかった又は入手不可能であった利益をもたらすインスリン分泌促進ポリペプチドを投与する新規且つ有利な方法を提供する。従って、本発明は注射による経路で送達されたインスリン分泌促進ポリペ

10

プチドの改善された半減期(及びそれによる、バイオアベイラビリティ、有効性など)を可能にする。更に、本発明は、経口、経鼻、及び舌下経路を包含する、非注射経路を介するインスリン分泌促進ポリペプチド薬剤(例えば、GIP、GLP-1、GLP-2、エクセナチド、リラグルチド、タスボグルチド、又はアルビグルチド)の有効量を送達することを可能にする(すなわち、送達により生物利用が可能である)ので、優れた患者コンプライアンスの機会及び使用容易性を改善する。

#### 【0019】

従って、一態様では、本発明は、2型糖尿病及び2型糖尿病に関連している疾患の治療又は予防に用いるための、インクレチンホルモン(例えば、グルカゴン様ペプチド-1)、類縁体(例えば、リラグルチド)又は模倣体(例えば、エクセナチド)を包含する、構

20

造強化したインスリン分泌促進ポリペプチド薬剤を提供し、ここで当該薬剤は延長された半減期、増強された $\alpha$ 螺旋性、改善された熱安定性及びプロテアーゼ耐性、増大した機能活性及び薬理学的特性、並びに如何なる経路で投与されても改善されたバイオアベイラビリティを保有している。

#### 【0020】

別の態様では、本発明は、延長された半減期、増強された $\alpha$ 螺旋性、改善された熱安定性及びプロテアーゼ耐性、増大した機能活性及び薬理学的特性、並びに如何なる経路で投与されても改善されたバイオアベイラビリティを付与するために、インクレチンホルモン、類縁体及び模倣体を包含する、インスリン分泌促進ポリペプチド薬剤を構造強化する方法及び組成物を提供する。

30

#### 【0021】

更に別の態様では、本発明のインスリン分泌促進ポリペプチド薬剤の治療有効量を何れかの経路で(例えば、注射用又は経口用薬剤として)投与することによる2型糖尿病又は2型糖尿病に関連している疾患を治療又は予防するための治療方法を提供する。本発明のインスリン分泌促進ポリペプチド薬剤は、全長のインクレチンホルモン、類縁体又は模倣体、或いは生物活性を保持しているそれらの適切な機能的断片又は変異体を包含する化合物又はこれに基づいている。

#### 【0022】

更に別の実施態様では、本発明は、エクセナチドのアミノ酸1~39を有していて構造的に拘束されているポリペプチドを提供する。

40

ある特定の実施態様では、エクセナチドペプチドのアミノ酸1~39はペプチドの第一次配列における連続アミノ酸でよい。

ある特定の実施態様では、アミノ酸は互いに隣接していて、例えば、アミノ酸は、全長ポリペプチドの状況でペプチド配列の少なくとも1つの天然状態において、螺旋の同じ面に存在している。例えば、隣接アミノ酸は螺旋内の単一積み重ねカラム中に或いは構造化螺旋の単一面におけるアミノ酸の隣接する積み重ね中に存在していてよい。

実施態様では、構造的に拘束されているポリペプチドは、炭化水素架橋(staple)、アミノ酸突然変異、及び非天然アミノ酸の取り込みからなる群からの少なくとも1つの改変を含んでいる。

ある特定の実施態様では、構造的に拘束されているポリペプチドは、2、3、4、5又

50

はそれ以上の改変を含んでいる。

ある特定の実施態様では、拘束されているポリペプチドは、これに限定されないが、S 5-S 5 対（すなわち、 $i$ 、 $i+4$ ）、S 5-R 8 対（すなわち、 $i$ 、 $i+7$ ）、S 8-R 5 対（すなわち、 $i$ 、 $i+7$ ）、R 3-S 6 対（すなわち、 $i$ 、 $i+3$ ）、R 6-S 3 対（すなわち、 $i$ 、 $i+3$ ）、R 3-S 5 対（すなわち、 $i$ 、 $i+3$ ）、R 5-S 3 対（すなわち、 $i$ 、 $i+3$ ）、又はペプチド配列内の対の組合わせからなる群より選ばれる対を包含する多種の炭化水素架橋を含んでいる。

#### 【0023】

別の実施態様では、エクセナチドのアミノ酸 1~39 は、少なくとも 3 個の連続アミノ酸、又は螺旋上の単一面にある少なくとも 2 個のアミノ酸、又は少なくとも 2 個の相互作用面アミノ酸；或いはそれらの同類置換を含んでいる。螺旋の単一面は、1 個、2 個、3 個、又は 4 個のアミノ酸の積み重ねカラムを含んでいて、ここでアミノ酸の積み重ねカラムは、2 回転当たり 7 アミノ酸を有する  $\alpha$  螺旋（ここでアミノ酸は連続して一連に位置 a~g を割り当てられている）中の位置 a、d、及び g；位置 b 及び e；又は位置 c 及び f；によって（例えば、図 3 を参照されたい）；そして 2 回転あたり 2 個のアミノ酸を有している  $3^{10}$  螺旋中（ここでアミノ酸は連続して一連に位置 a~f を割り当てられている）中の位置 a 及び d；位置 b 及び e；又は位置 c 及び f；又はそれらの同族体によって規定されている。

#### 【0024】

本発明は別の実施態様で、本発明で用いるためのエクセナチド及びその他の生物活性インスリン分泌促進ポリペプチドを提供する。本発明の構造的に拘束されているエクセナチドペプチドは、位置 24 と 28 の間（すなわち、図 7 B の SAH-Ex (B)）に炭化水素架橋を、そして任意に位置 10 と 14 の間（すなわち、図 7 B の SAH-Ex (B)）に炭化水素架橋、並びに少なくとも 3 個の連続アミノ酸、又は少なくとも 2 個のアミノ酸を螺旋の単一面上に、或いは GLP-1 の少なくとも 2 個の相互作用面アミノ酸（図 2 A を参照されたい）又はこれらの同族体を含んでいる。本発明の構造的に拘束されるペプチドはエクセナチド又は GLP-1 配列のみ、又は C 末端、又は N-末端、或いは両方の側面に位置するエクセナチド又は GLP-1 配列を包含できる。本発明で提供されるペプチドは、ペプチドを構造的に拘束する改変に加えて、非アミノ酸改変を更に包含できる。例えば、インビボにおけるペプチドの標的化のため、或いはペプチドの薬物動態及び／又は薬力学的特性を変えるために官能基を包含できる。このような改変は当該技術分野で公知である。

#### 【0025】

アミノ酸の積み重ねカラムを構成するアミノ酸の位置を、配列番号 1 で示されるペプチド配列の螺旋輪上の位置に対応する位置で定義できる（図 3 を参照されたい）。構造的に拘束されているペプチドの配列を、GIPP、GIP、GLP-1 前駆体、GLP-1、GLP-2、リラグルチド、タスポグルチド、及びアルビグルチドを包含する、その他の同族インスリン分泌促進ペプチドの配列と位置合わせすることができる。配列位置合わせを実施する方法は当業者に公知である。更に、螺旋中の対応アミノ酸を多数の市販コイル決定プログラムの何れかを用いて決定できる。配列番号 1 で示される配列に関して、アミノ酸の積み重ねカラムは図 3 に描かれているものを包含できる。

#### 【0026】

本発明は、配列番号 1 で表されるエクセナチドポリペプチド配列又はその同族体由来する、少なくとも 3 個の相互作用面アミノ酸又は相互作用面アミノ酸の同類置換を有するポリペプチドも提供する。このポリペプチドの相互作用面はペプチドの単一面であって、ここで相互作用面アミノ酸は、H1、D9、F22、I23 及び L26 のような、配列番号 1 由来のアミノ酸に対応する位置、又は構造決定 (PDB ID 3C5T) 及び／又は配列番号 1 のアラニンスキャニングによって特定された、G4、F6、T17、G30、P31、P36、P37、P38 のような、生物活性に対して重要であることが知られているその他の重要な残基に対応する位置から選択される。本発明で提供される構造的に拘

10

20

30

40

50

束されるペプチドはエクセナチド由来のその他の配列又はその他のインスリン分泌促進ポリペプチド由来の配列の何れかの、更なるアミノ酸配列を包含できる。更なるアミノ酸配列は構造的に拘束されてもされていなくてもよい。本発明は、エクセナチド、或いはエクセナチド又は同族ペプチドの少なくとも3連続アミノ酸、或いはエクセナチド又は同族ペプチドの螺旋の単一面上の少なくとも2個のアミノ酸、或いはエクセナチド又は同族ペプチドの少なくとも2個の相互作用面アミノ酸；或いはそれらの同類置換を有する同族配列の使用を提供する。エクセナチド又は同族ペプチドの螺旋の単一面は、1個、2個、3個、又は4個の隣接するアミノ酸の積み重ねカラムを包含し、ここではアミノ酸の積み重ねカラムは、 $\alpha$ 螺旋中の、位置a、d、及びg；位置b及びe；又は位置c及びfによって定義され、ここで位置aは螺旋中のアミノ酸であって、アミノ酸は $\alpha$ 螺旋；又はその同族体中で連続的に順にaからgの文字を割り当てられている。

10

#### 【0027】

例えば、ペプチドの $\alpha$ 螺旋及びアミノ酸の積み重ねカラムは、配列番号1又はその同族体の位置1、4、5、8、11、12、15、18、19、22、25、26、29、32、及び33；又は位置2、5、6、9、12、13、16、19、20、23、26、27、30、33、及び34；又は位置3、6、7、10、13、14、17、20、21、24、27、28、31、及び34；又は位置4、7、8、11、14、15、18、21、22、25、28、29、32、及び35；又は位置5、8、9、12、15、16、19、22、23、26、29、30、及び33；又は位置6、9、10、13、16、17、20、23、24、27、30、31、及び34；又は7、10、11、14、17、18、21、24、25、28、31、32、及び35として定義される。本明細書で提供される、 $\alpha$ 螺旋構造を有するペプチドの単一面は、1個、2個、3個、又は4個の隣接するアミノ酸の積み重ねカラムを包含できる。

20

#### 【0028】

本発明は更に、エクセナチド又は同族ペプチドの相互作用面アミノ酸を有するペプチドを提供する。相互作用面は、本発明によって提供される螺旋ペプチド上の1つの面の例である。相互作用面のアミノ酸は配列番号1のH1、G2、T5、S8、D9、K12、E15、E16、V19、R20、F22、I23、I26、K27のような位置に対応するアミノ酸を包含するか、又は配列番号1上の位置H1、D9、F22、I23及びL26に対応するアミノ酸に更に限定されてもよい。

30

#### 【0029】

更なる実施態様では、本発明は薬学的に許容される担体中にある本発明の構造的に拘束されるペプチドの何れかを提供する。本発明は更に、単位剤形中の薬学的に許容される担体中にある本発明のペプチドを提供する。本発明は機能的に担体に結合している本発明の構造的に拘束されているペプチドを提供する。

ある特定の実施態様では、担体は、構造的に拘束されるペプチドの薬物動態及び／又は薬物動態特性を変えるタンパク質又は脂質を包含している。

ある特定の実施態様では、組成物の構造的に拘束されるペプチドは担体タンパク質と部位特異的連結(linkage)によって確立される特定の方位に機能的に結合している。

#### 【0030】

更なる実施態様では、本発明は、本発明の構造的に拘束されるペプチドの治療有効量を対象に投与することによって、例えば、対象の1型又は2型糖尿病を予防、改善、又は治療する方法を提供する。方法は更に、糖尿病の予防、改善又は治療が必要であるかについて対象を1つ又はそれ以上確認すること、又は糖尿病の予防、改善又は治療について対象を観察することの1つ又はそれ以上を包含する。

40

ある特定の実施態様では、本発明は糖尿病を予防、改善、及び治療する方法を提供し、そこではインスリン放出を増強することによる血糖正常値を促進することの少なくとも1つを包含している。

#### 【0031】

本発明は、注射、吸入、又は経口で送達されて正常血糖値を促進する、本発明の構造的

50

に拘束されるペプチドを包含している薬剤の製剤を提供する。薬剤は糖尿病の予防及び／又は治療のためになる。

【0032】

ある特定の実施態様では、本発明は少なくとも1つの構造的に拘束される本発明のペプチド及び使用説明書を包含しているキットを提供する。

【0033】

一態様では、本発明は、 $\alpha$ 螺旋及び1つ又はそれ以上の分子鎖を含んでいる構造的に強化されたインスリン分泌促進ポリペプチドを提供し、ここではそれぞれの分子鎖が当該ポリペプチドの $\alpha$ 螺旋上に存在している残基の1対を共有結合して、それによりインスリン分泌促進ポリペプチドを構造的に強化している。

10

【0034】

別の態様では、本発明は、本発明の構造的に強化したインスリン分泌促進ポリペプチド及び1つ又はそれ以上の薬学的に許容される担体を含んでいる医薬組成物を提供する。

【0035】

更なる態様では、本発明は、本発明の構造的に強化したインスリン分泌促進ポリペプチドの治療有効量、又は本発明の構造的に強化したインスリン分泌促進ポリペプチドを含んでいる組成物を投与することを含んでなる、糖尿病を治療又は予防する方法を提供する。

【0036】

一実施態様では、本発明の構造的に強化したインスリン分泌促進ポリペプチドはエクセナチド、GIPP、GIP、GLP-1前駆体、GLP-1、GLP-2、GLP-1 (7~37)、GLP-1 (7~36)、リラグルチド、タスポグルチド、アルビグルチド又はLY2189265であってよい。

20

【0037】

別の実施態様では、本発明の構造的に強化したインスリン分泌促進ポリペプチドはエクセナチドであってよい。

【0038】

更に別の実施態様では、ポリペプチド当りの分子鎖の数は1~2、2~3、2~4、2~5、2~6、2~7、2~8、2~9又は2~10の間であってよい。

【0039】

更に別の実施態様では、少なくとも1つの残基対はポリペプチドのN-末端半分内に存在している。

30

【0040】

少なくとも1つの残基対はポリペプチドのC-末端半分内に存在できる。

【0041】

少なくとも1つの残基対はポリペプチドに沿うどの位置に存在していてもよい。

【0042】

更に別の実施態様では、ポリペプチドのC-末端半分以内にポリペプチドは少なくとも1つの結合した残基対を、そしてポリペプチドのN-末端半分以内に別の結合した残基を含んでいる。

【0043】

更に別の実施態様では、ポリペプチドは、配列番号2又は15~38で表される配列の何れか1つを有しているエクセナチドに対応している。

40

【0044】

更なる実施態様では、ポリペプチドは、配列番号39~62で表される配列の何れか1つを有しているGLP-1に対応している。

【0045】

更なる実施態様では、ポリペプチドは、ポリペプチドの $\alpha$ 螺旋の残基位置に対して位置(i、i+3)、又は(i、i+4)又は(i、i+7)に位置する第1分子鎖を有している。ポリペプチドは、ポリペプチドの $\alpha$ 螺旋の残基位置に対して位置(i、i+3)、又は(i、i+4)又は(i、i+7)に位置する第2分子鎖を有していてもよいが、第

50

1 及び第 2 分子鎖は同一位置には位置していない。

【0046】

ある特定の実施態様では、少なくとも 2 つの分子鎖を用いる場合は、少なくとも 2 つの分子鎖を「縫い合わせた (stitched)」配置に構成できる。縫い合わされた分子鎖とは、連続的に配置されている結合が共通の起源から作られていることを示す。すなわち、「縫い合わせた」架橋の使用は、そこでは二重連結が共通の起源 (例えば、X 1、X 5、及び X 9、ここで X 5 は両架橋のアンカーポイントである) から作られていることである。従って、本発明は、配列を更に安定化するかあるいは、より長いポリペプチド伸張の構造安定性、タンパク質分解耐性、熱安定性、酸安定性、薬理学的特性、及び生物活性増強を促進するためにポリペプチド配列内に 1 つ又はそれ以上の架橋の組み込みを包含している。図 5 B は、「縫い合わせ」の配置にある複数の架橋又は分子鎖を有しているポリペプチドの実施態様を示している。

10

【0047】

従って、一実施態様では、本発明の連結されているポリペプチドは、縫い合わせ配置にある 1 対の分子鎖を含んでよく、それによって第 1 分子鎖の末端と第 2 分子鎖の開始点はポリペプチド中の共通残基に由来している。

【0048】

更に別の実施態様では、強化したポリペプチドは、強化していない対応ポリペプチドの半減期より少なくとも 2 倍、又は 3 倍、或いは 8 倍も長い半減期を有している。

【0049】

更に別の実施態様では、強化したポリペプチドは、強化していない対応ポリペプチドのインビトロにおけるキモトリプシンへの耐性の、少なくとも 2 倍、又は 3 倍、或いは 8 倍も大きいインビトロにおけるキモトリプシンへの耐性を有している。

20

【0050】

更に別の実施態様では、強化したポリペプチドは、強化していない対応ポリペプチドのインビトロにおけるキモトリプシンへの耐性の、少なくとも 6 倍、又は 13 倍大きいインビトロにおけるキモトリプシンへの耐性を有している。

【0051】

更に別の実施態様では、強化したポリペプチドは、強化していない対応ポリペプチドのインビボにおける血清プロテアーゼへの耐性の、少なくとも 2 倍、又は 5 倍、又は 10 倍大きいインビボにおける血清プロテアーゼへの耐性を有している。

30

【0052】

ある特定の実施態様では、本発明の糖尿病を治療する方法は、経口送達経路を介して本発明のポリペプチドを投与することを含んでいる。

【0053】

ある特定の別の実施態様では、本発明の糖尿病を治療する方法は、注射による送達経路を介して本発明のポリペプチドを投与することを含んでいる。

【0054】

本発明の別の実施態様は、以下に提供した開示に基づいて理解できるだろう。

【図面の簡単な説明】

40

【0055】

以下の詳細な説明は、一例として提供されているが、記載されている特定の実施態様に本発明を限定することを意図するものではなく添付の図面を併用すると理解できるだろう。

【0056】

【図 1】図 1 (A) は、インスリン分泌促進ポリペプチド薬剤である、エキセンジン-4、エクセナチド、胃抑制ポリペプチド前タンパク質 (Gastric Inhibitory Polypeptide Reprotein; GIPR)、胃抑制ペプチド (Gastric Inhibitory Peptide; GIP)、グルカゴン様ペプチド-1 前駆体 (GLP-1P)、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2)、GLP-1 の断片、リラグルチド、タ

50

スボグルチド、アルビグルチド及び L Y 2 1 8 9 2 6 5 のポリペプチド配列を提供する。これらは炭化水素架橋によって構造強化するための本発明の多種の実施態様において鑄型として用いることができるインスリン分泌促進ポリペプチドの例である。図 1 (B) は、ヒトグルカゴンペプチドのサブファミリーの配列アラインメントを提供し、G L P-1 受容体と相互作用する重要なアミノ酸残基及び保存残基を強調表示している。G L P-1 R と相互作用するエキセンジン-4 の残基 (9 ~ 39) を青色で着色した (すなわち、15 E、19 V、20 K、22 F、23 I、26 L、27 K、32 S)。保存残基を黄色で着色した (すなわち、4、6、21、24、25 位の残基)。わずか 4 残基が保存されている位置を緑色で着色した (すなわち、1、5、8、9、11 位)。(Runge S et al. 2008 J Biol Chem 283:11340-11347)。

【図 2】図 2 A は、エクセナチドの  $\alpha$  螺旋領域 (P D B I D 3 C 5 T) と複合体を形成した G L P-1 受容体の構造を示し、球状及び棒状で示した相互作用面の残基を包含しているアミノ酸を強調表示している。これらは機能活性に対して特に重要であることがアラニンスキャンによって確認された (Runge, S. et al., 2008, J. Biol. Chem., 283: 11340-11347)。コアエクセナチド  $\alpha$  螺旋の非相互作用面上の非天然アミノ酸挿入のための置換部位の例も二重架橋エクセナチドペプチドの設計を実証するために空間充填方式で示した。図は更に、エキセンジン-4 のアミノ酸配列及びエキセンジン-4 の残基 9 ~ 33 を提供し、エクセナチドの相互作用面のアラニンスキャンで確認して上記重要アミノ酸 (オレンジ色、下線及び「\*」で印して示した)、及び炭化水素架橋の結合点を印したアミノ酸残基 (赤紫色、下線及び「^」で印して示した) を強調して示した。図 2 (B) は、G L P-1 (7 ~ 37) のアミノ酸配列を提供して、機能活性に対して重要なアミノ酸残基を示した (下線で)。(Contillo et al. Proceedings of the 16<sup>th</sup> American Peptide Symposium June 26-July 1, 1999, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.)。

【図 3】図 3 は、エクセナチドの  $\alpha$  螺旋領域の螺旋輪の描写を示し、G L P-1 受容体と相互作用するエクセナチド螺旋の面の位置を強調している。架橋挿入用の置換部位を、 $\alpha$  螺旋構造、受容体結合親和性、及び機能活性を増強するために螺旋の非相互作用面に局在させることができる。炭化水素架橋の結合部位の形成に関わる非相互作用面側の特定残基位置には制限がなく、N-末端、C-末端、又はポリペプチド端部の間の何れかの位置に位置している残基を包含できる。

【図 4】図 4 は、炭化水素鎖 (例えば、オレフィン鎖) を有する非天然アミノ酸をどのようにペプチド配列内に挿入して単一架橋されたペプチド作成するかを示す。鎖は、ペプチド螺旋の長さに沿って (A) ( $i$ 、 $i+3$ )、(B) ( $i$ 、 $i+4$ )、及び (C) ( $i$ 、 $i+7$ ) 位置に位置付けることができ、望ましい生物物理学的及び生物学的特性のための最適な位置決めを確認するための単一架橋ペプチド (すなわち、「架橋スキャン」) のライブラリーを作成できる。(D) は、目的のポリペプチド薬剤 (例えば、エクセナチド) の望ましい生物物理学的、生物学的、及び薬理学的特性を達成するための最適な架橋位置 (複数も) を確認する架橋スキャンニングをさらに説明している。架橋スキャンニングはペプチド配列鑄型の長さ方向に沿った架橋位置の順次評価を含む。N-末端から開始している  $i$ 、 $i+4$  架橋スキャンを示している。

【図 5 A】図 5 A は、同一又は異なった組成の複数架橋をどのように  $\alpha$  螺旋の長さに沿って挿入して、二重、三重又は多重の架橋ペプチドを作成するかを示している。架橋は、ペプチド螺旋の長さに沿った ( $i$ 、 $i+3$ )、( $i$ 、 $i+4$ )、及び ( $i$ 、 $i+7$ ) 位置に位置させて、望ましい生物物理学的及び生物学的特性のための最適な位置決めを確認するための複数架橋ペプチド (すなわち、「架橋スキャン」) のライブラリーを作成できる。(A ~ F) は、 $i$ 、 $i+3$ 、 $i$ 、 $i+4$ 、及び  $i$ 、 $i+7$  架橋の各種組合わせを用いる複数架橋ペプチドの例である。(G、H) 望ましい生物物理学的、生物学的、及び薬理学的特性を達成するための最適架橋位置を架橋スキャンニングによって確認でき、これはペプチド配列鑄型の長さ方向に沿った個々の架橋位置を組合わせた順次評価を含んでいる。(G) N-末端及び C-末端から開始した二重  $i$ 、 $i+4$  架橋スキャン; (H) ペプチド配列の中央部並びに N-末端及び C-末端架橋の間に位置している第 3 架橋の各種位置決め

を含んでいる三重  $i$ 、 $i + 4$  架橋スキャン。

【図 5 B】図 5 B は、N- 及び C- 末端架橋が  $\alpha$ 、 $\alpha$  位置内に 2 つのオレフィン側鎖変化を有している非天然アミノ酸の中央で結合できるように連続挿入される架橋を用いる構造的に安定化したインスリン分泌促進ペプチドの更なる例を示す。配置は連続  $i$ 、 $i + 3$  (I)、 $i + 4$  (J) 及び  $i + 7$  (K) 架橋、及び直列  $i$ 、 $i + 3 / i$ 、 $i + 4$  (L)、 $i$ 、 $i + 3 / i$ 、 $i + 7$  (M)、 $i$ 、 $i + 4 / i$ 、 $i + 3$  (N)、 $i$ 、 $i + 4 / i$ 、 $i + 7$  (O)、 $i$ 、 $i + 7 / i$ 、 $i + 3$  (P)、及び  $i$ 、 $i + 7 / i$ 、 $i + 4$  (Q) 架橋のような、これらの組合わせを包含する。図 5 A に上記するように、望ましい生物物理学的、生物学的、及び薬理学的特性を達成するための最適架橋の位置決めは架橋スキャンニングによって特定でき、これは矢印で示したように、ペプチド配列鑄型の長さ方向に沿って個々の直列架橋 (I ~ Q) の連続配置を包含する。

10

【図 6】図 6 (A) は、 $i$ 、 $i + 3$  架橋の作成に用いられたオレフィン非天然アミノ酸を合成する合成化学概要図である。図 6 (B) はオレフィン非天然アミノ酸の例を描写している。

【図 7】図 7 (A) は、エクセナチドの安定化  $\alpha$  螺旋 (「SAH」) (SAH-Ex) 及び GLP-1 の安定化  $\alpha$  螺旋 (SAH-GLP1) の組成である。エクセナチドの突然変異構築物 (Met14NorLeu) を一重及び二重架橋 SAH-Ex ペプチドの構築のための鑄型として用いた。図 7 (B) は、生物物理学、生物学、及び薬理学研究に用いた一重及び二重 SAH-Ex ペプチドの例である。X、架橋結合非天然アミノ酸；B、ノルロイシン。

20

【図 8】図 8 は、一重及び二重螺旋 SAH-Ex ペプチドの増強された  $\alpha$  螺旋性を明らかにしている、鑄型 (A) 及び SAH-Ex (B ~ D) ポリペプチドの広い温度範囲にわたる円二色性スペクトルを提供する。(E) は、一重及び二重架橋 SAH-Ex ペプチドの増強された熱安定性を明らかにしている、鑄型及び SAH-Ex ペプチドについての温度溶解度曲線を提供する。具体的には、(A) ~ (D) は Ex (Met14NorLeu)、SAH-Ex (A)、SAH-Ex (B)、及び SAH-Ex (A、B) の円二色性スペクトルを示し、広い温度範囲にわたる ( $5^{\circ}\text{C} \sim 83^{\circ}\text{C}$ ) 一重及び二重架橋ペプチドの増大した  $\alpha$  螺旋性を強調している。(E) は、Ex (Met14NorLeu)、SAH-Ex (A)、SAH-Ex (B)、及び SAH-Ex (A、B) の円二色性温度溶解度プロットを示し、対応する非架橋鑄型ペプチドと比較して一重及び二重架橋ペプチドの増強された熱安定性を明らかにしている。

30

【図 9】図 9 は、鑄型エクセナチドペプチド (SAH-Ex) の一重及び二重架橋によるプロテアーゼ耐性の増強を明らかにしている。具体的には、一重及び二重架橋した SAH-Ex ペプチドは、非改変エクセナチド鑄型ペプチドと比較してキモトリプシン (pH 7) に対してより耐性がある。この例では、一重架橋ペプチドが鑄型ペプチドと比較して 2 ~ 3 倍増強したキモトリプシン耐性を示したのに対して、二重架橋ペプチドは鑄型ペプチドと比較して 8 倍の増強を、そして対応する一重架橋ペプチドと比較して 2.7 ~ 4 倍の増強を示した。

【図 10】図 10 は、一重及び二重架橋した SAH-Ex ペプチドは非改変エクセナチド鑄型ペプチドと比較すると、ペプシン (pH 2) に対してより耐性があることを明らかにしている。この例では、SAH-Ex (B) は鑄型ペプチドと比較して 6 倍に増強されたペプシン耐性を示すのに対して、二重架橋ペプチドは鑄型ペプチドと比較して 13 倍の増強をそして一重架橋ペプチドと比較して 2 ~ 13 倍の増強を示す。

40

【図 11】図 11 は、本発明の架橋 SAH-Ex の検出のための ELISA によるアッセイの結果を説明している。具体的には、エクセナチドの ELISA によるアッセイキットは連続希釈した非改変 Ex (Met14NorLeu) 及び二重架橋 SAH-Ex (A、B) ポリペプチドを検出することをグラフが明らかにしている。(Exendin-4 (Heloderma suspectum), EIA Kit Phoenix Pharmaceuticals, Inc. EK-070-94)。明らかにされたように、エクセナチドの ELISA アッセイは鑄型突然変異エクセナチドペプチド及びその二重架橋誘導体を認識し、血漿中の SAH-Ex 濃度の測定を可能にする。

50

【図 1 2】図 1 2 は、経口強制投与又は静脈内注射の何れかで処置されたマウスの血漿中の全長二重架橋 S A H - E x ペプチドの検出を明らかにしている。両方の投与経路について同レベルの全長 S A H - E x ペプチドが検出された。担体のみで処置したマウスを陰性対照として供した。

【図 1 3】図 1 3 は、炭化水素架橋の挿入によってもたらされるタンパク分解耐性のメカニズムを明らかにしている。(A) 架橋せずに 2 対のオレフィン非天然アミノ酸の挿入(例えば、g p 4 1 の非架橋  $\alpha$  螺旋: U A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B)) はキモトリプシンのタンパク分解からの有意な保護をもたらさない。しかし、オレフィンメタセシスにより、対応する二重架橋類縁体、S A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) は、U A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) より 8 倍長い半減期を示して、架橋それ自体が著しいプロテアーゼ耐性をもたらすのに必要であることを示唆している。

(B) U A H - 及び S A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) は、それぞれ 2 7 °C 及び 2 2 °C の  $T_m$  値を有して、同様な円二色性溶解プロファイルを示した。温度依存性のアンフォールディングは、重複反復溶解度曲線から明らかのように、両ペプチドに対して可逆的であった。これらのデータは全体的な  $\alpha$  螺旋安定性(これは 2 つの構築物に対して同様である)は、S A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) の顕著なプロテアーゼ耐性の主要原因ではないことを明らかにしている。また、アンフォールディングの可逆性は、ペプチド凝集が無いことを強調していて、これも同様に S A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) の顕著なプロテアーゼ耐性の主要原因ではない。(C) 非改変、一重架橋、二重架橋、及び 4 ヶ所が置換されているが架橋されていないペプチドの競合的キモトリプシン分解パターン。これらのデータは N - 末端架橋が、架橋が配置されている切断部位のタンパク分解性加水分解を、L C / M S 分析で観察される対応する M + 1 8 種を伴わずに、独自に阻害することを明らかにしている。C - 末端架橋は、完全に阻害するよりはむしろ、架橋の上流部位におけるタンパク質分解を遅らせた。4 ヶ所が置換されているが架橋されていない誘導体、U A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) は、非天然アミノ酸の N - 末端対が配置されている位置におけるタンパク質分解を阻害できず、C - 末端一重架橋ペプチドのように有効にタンパク分解の速度を遅らせることもできなかった(S A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (B) について  $T_{1/2}$  は 7 7 分; U A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) について  $T_{1/2}$  は 3 6 分)。二重架橋ペプチド S A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) は、N - 末端及び C - 末端架橋の両方の抗タンパク質分解特性から相乗的に恩恵を得ていた。(D) S A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) と対応する非改変鋳型ペプチド、T 6 4 9 v の比較  $^1\text{H}$  NMR 分析。T 6 4 9 v の 2 つの N - 末端トリプトファン残基に対応するインドールプロトン ( $\sim 10.6 \text{ p.p.m}$ ) が T 6 4 9 v における 2 つのはっきりしたピークで表され、複数配座間の速い変換と一致した。対照的に、S A H - g p 4 1 ( 6 2 6 ~ 6 6 2 ) (A、B) の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル中のインドールプロトンピークは広がって分裂し、ペプチド架橋の結果である別々に構築された N - 末端を反映した。この機械的な解離は二重架橋 H I V - 関連ポリペプチドに特異的に関与しているが、同様の抗タンパク質分解及び構造補強の結果が本発明の二重架橋インスリン分泌促進ポリペプチドに関しても得られた(図 8 ~ 1 0)。

【図 1 4】図 1 4 は、構造的に安定化されてプロテアーゼ耐性がある S A H - E x (A) 及び S A H - G L P 1 (B) ペプチドは、単離した膵島からのグルコースの刺激を受けたインスリン放出を刺激することを明らかにしている。これらのデータは、S A H - E x 及び S A H - G L P 1 ペプチドの炭化水素架橋は、構造安定性及びプロテアーゼ耐性を最大化し、薬理学的に最適化されたインスリン分泌促進剤を産出しながら、機能活性を保存することを強調している。

【発明を実施するための形態】

【0057】

本発明は、インクレチンホルモン(例えば、グルカゴン様ペプチド-1)、インクレチン類縁体(例えば、リラグルチド)又はインクレチン模倣体(例えば、エクセナチド)を含む、インスリン分泌促進活性を有するポリペプチドを安定に架橋することが、異常なグ

ルコースホメオスタシスに関連する疾患、例えば、2型糖尿病及び2型糖尿病に関連している疾患の治療において優れた予期しない利益をもたらすという予期しない発見に関連している。このような利益は、これに限定されないが、架橋されていない対応物と比較して、延長された半減期、増強された $\alpha$ 螺旋性、改善された熱安定性及びプロテアーゼ耐性、増大した機能活性及び薬理学的特性、何れかの経路で投与したときの改善されたバイオアベイラビリティ、並びに経口で送達されたときの改善されたバイオアベイラビリティ及び胃腸吸収を包含する。従って、本発明は以前は得られなかったか又は入手可能ではなかった、利益をもたらすインスリン分泌促進ポリペプチドを投与する新規且つ有益な手法を提供する。従って、本発明は注射による経路で送達されたインスリン分泌促進ポリペプチドの改善された半減期（及びこれによるバイオアベイラビリティ、有効性、など）を可能にする。更に、本発明は、経口、経鼻及び舌下経路を包含する、非注射経路を介して、インスリン分泌促進ポリペプチド薬剤（例えば、GIP、GLP-1、GLP-2、エクセナチド、リラグルチド、タスポグルチド、又はアルビグルチド）の有効量を送達する（すなわち、これは送達されて生物学的に利用可能となる）ことを可能にし、それによってよりよい患者のコンプライアンスの可能性及び使いやすさを改善する。

10

#### 【0058】

従って、本発明は、異常なグルコースホメオスタシスを伴う疾患、例えば、2型糖尿病及び2型糖尿病に関連する疾患の治療及び／又は予防に用いるための、構造的に拘束されているインクレチンホルモン（例えば、グルカゴン様ペプチド-1）、インクレチン類縁体（例えば、リラグルチド）又はインクレチン模倣体（例えば、エクセナチド）を包含する、構造的に拘束されているインスリン分泌促進ポリペプチドを使用及び／又は製造する組成物、キット並びに方法を対象としている。

20

#### 【0059】

本発明は、少なくともその一部が、炭化水素で架橋された $\alpha$ 螺旋エクセナチドペプチド及びその機能的変異体が、 $\alpha$ 螺旋構造強化、中性及び酸性プロテアーゼ耐性、熱安定性、及び経口吸収、長いペプチド治療剤の従来欠点の改善を包含する、強化された薬理学的特性を示すことを明らかにしている本明細書で提供された結果に基づいている。その結果、このペプチドはその非改変対応物と比較してインビボにおける優れた薬理学的特性を有し、非改変ポリペプチド配列と比較して投与が必要な構造的に拘束されたペプチドの頻度及び量を低減する。さまざまな実施態様では、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの分子鎖、例えば炭化水素架橋、で安定化されている1つ又はそれ以上の $\alpha$ 螺旋ドメインを含んでいるが、2つ、3つ又はそれ以上のこのような炭化水素架橋を含んでもよい。複数の炭化水素架橋を包含することは長さが20又はそれ以上のアミノ酸である $\alpha$ 螺旋ペプチドに特に適している。1つ以上（ペプチドの長さにより、例えば、2、3、4、5つ）の炭化水素架橋の包含は、改変したポリペプチドの優れた構造、中性及び酸性プロテアーゼ耐性、及び熱安定性をもたらし、インビボにおける際立って改善された薬理学的特性を有する生物活性ペプチドを産生する。

30

#### 【0060】

本明細書で明らかにしたように、本発明の架橋したインスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、架橋したエクセナチド）安定化された $\alpha$ 螺旋性、タンパク質分解及び熱に対する安定性、及び相当する構造的に拘束されていないポリペプチドより、より望ましい薬物動態及びバイオアベイラビリティ特性を明らかにしている。重要なことは、本明細書で更に明らかにされるように、本発明の架橋されたポリペプチドは経口送達及び胃腸管暴露の間中プロテアーゼ作用に耐えることができ、これは特定のFDAに承認されている静脈内投与用インスリン分泌促進薬剤（例えば、エクセナチド又はリラグルチド）には不可能なことである。

40

#### 【0061】

（定義）

本発明は本明細書に記載されている特定の物質及び方法に限定されないことを理解されたい。本明細書で用いられている専門用語は特定の態様を記載することが目的であって、

50

添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図していないことも理解されたい。

#### 【0062】

別に定義されていない限り、本明細書で用いられている全ての技術及び科学用語は本発明が属する技術分野の当業者によって普通に理解されている意味を有している。本明細書で言及されている全ての刊行物は、細胞株、プロトコル、試薬及びベクターを記載及び開示することを目的として引用されていて、これらは刊行物中に報告されていて本発明に関連して用いることができる。本明細書中にはこのような引用文献が先行技術であることを承認すると解釈されるものは何もない。

#### 【0063】

本明細書で用いられているような、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が他のものを明確に指示していない限り複数への言及を含んでいる。例えば、「宿主細胞、a host cell」への言及は、当業者に公知の複数のこのような宿主細胞を含んでいる。

#### 【0064】

「薬剤」は、治療効果のある化合物又は潜在的に治療効果のある化合物を包含すると本明細書では理解されている。薬剤は以前に公知であるか又は未知である化合物である。本明細書で用いられるような、薬剤は細胞に基づいていない化合物であるが、薬剤は生物学的治療薬剤、例えば、ポリペプチド（例えば、インスリン分泌促進ポリペプチド）又は核酸治療剤、サイトカイン、抗体、等を含むことができる。薬剤は一重又は多重架橋されたインスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、エクセナチド）、及び機能的な同族体、断片、類縁体、誘導体又はその模倣体を含むことができる。

#### 【0065】

本明細書で用いられる用語「機能的断片」は、インクレチンホルモン（例えば、グルカゴン様ペプチド-1）、インクレチン類縁体（例えば、リラグルチド）、又はインクレチン模倣体（例えば、エクセナチドを包含する、本発明の何れかのインスリン分泌促進ポリペプチドのポリペプチド断片を示し、これはその対応する元のインスリン分泌促進ポリペプチド、例えば、エクセナチド又はGLP-1の生物学的又は薬理的活性又は特性の少なくとも約10%、又は約20%又は30%、又は40%、又は50%、又は60%、又は70%、又は80%、又は90%以上、又は少なくとも99%又はそれ以上を保持している。断片はそれが基になっているポリペプチドのアミノ酸の任意の連続領域であってよい。断片は、共に結合して断片を形成している、基になっているポリペプチドのアミノ酸の2つ又はそれ以上の異なった連続領域のキメラ配列の形態であってもよい。本発明の関連において、天然のインスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、GLP-1）の断片の1例は、GLP-1の残基1~20である（これはGLP-1<sub>1~20</sub>と、或いは当業者に明らかな命名法を用いて同様に表示できる）。

#### 【0066】

本明細書で用いられる用語「類縁体、analog 又は analogue」は、Xの機能活性に必要なXの化学構造を保持しているが、Xとは異なるある特定の化学構造も含んでいる、化合物X（例えば、ポリペプチド、ペプチド又はアミノ酸）を示す。本発明の関連において、天然のインスリン分泌促進ポリペプチドの類縁体の1例は、1つ又はそれ以上の非天然アミノ酸、例えば、本発明の炭化水素架橋に関与しているアミノ酸交換のようなもの、を含んでいるGLP-1ポリペプチドである。本発明の類縁体は、その対応する元のインスリン分泌促進ポリペプチド、例えば、エクセナチド又はGLP-1の生物学的又は薬理的活性又は特性の少なくとも約10%、又は約20%又は30%、又は40%、又は50%、又は60%、又は70%、又は80%、又は90%以上、又は少なくとも99%又はそれ以上を保持していることが好ましい。

#### 【0067】

本明細書で用いられるような、化合物Xの「模倣体」は、Xの機能活性に必要であるXの化学構造が、Xの配座を模倣している別の化学構造と置き換わっている化合物を示す。ペプチド模倣体の例は、ペプチド骨格が1つ又はそれ以上のベンゾジアゼピン分子で置換

10

20

30

40

50

されているペプチド化合物（例えば、James, G. L. et al. (1993) Science 260:1937-1942 を参照されたい）、全ての L - アミノ酸が対応する D - アミノ酸で置換されているペプチド、及び「逆-インベルソ」ペプチド（米国特許第 4, 522, 752 号 (Sisto) 公報を参照されたい）を包含する。本発明の関連において、模倣体はそれを比較する対応ポリペプチドと殆ど又は全く配列相同性を有しておらず非常に異なった長さであってもよい天然又は合成ポリペプチドも包含してもよく、よって模倣体はこれと比較される対応ポリペプチドの生物学的又は薬理学的活性又は特性の少なくとも約 10 %、又は約 20 %又は 30 %、又は 40 %、又は 50 %、又は 60 %、又は 70 %、又は 80 %、又は 90 %以上、又は少なくとも 99 %又はそれ以上を有している。例えば、エクセナチドは GLP-1 の模倣体であって、全体の配列（53 %の同一性）及び伸張した C - 末端領域を殆ど有していないが、GLP-1 受容体で GLP-1 の生物活性を共有している。

10

#### 【0068】

本明細書で用いられるような、化合物 X（例えば、ペプチド又はアミノ酸）の「誘導体」は、化合物上の 1 つ又はそれ以上の反応基が置換基で誘導体化されている X の一形態を示す。ペプチド誘導体の例は、そのアミノ酸側鎖、ペプチド骨格、又はアミノ-又はカルボキシー末端が誘導体化されているペプチド（例えば、メチル化アミド結合を有するペプチド化合物）を包含する。

#### 【0069】

本明細書で用いられる用語「機能的エクセナチド変異体」、「エクセナチド様ペプチド」、「エクセナチド同族体」、又は「その（エクセナチドの）機能的変異体」は、エクセナチドと類似の又は同種の配列を有していて、エクセナチド活性をアッセイする適切な方法の何れかで測定して、配列番号 1 で表わされるエクセナチドペプチドの活性の少なくとも 50 %、又は 60 %、又は 70 %、又は 80 %、又は 90 %、又は 95 %、或いは 99 %又はそれ以上を有している何れかのペプチドを参照することを意味している。

20

#### 【0070】

本明細書で用いられる用語「インスリン分泌促進ポリペプチド」又は「インスリン分泌促進剤」は、インスリン分泌促進活性を有しているポリペプチド又は小分子或いはその他の化合物を示す。本明細書で用いられるような、「インスリン分泌促進活性」を有しているポリペプチドは、インスリンの産生（例えば、発現、放出、分泌、形成、等）及び／又は活性及び／又は量を、直接的あるいは間接的に、刺激するか又はこれに影響を及ぼすものであると定義される。例えば、インスリン分泌促進ポリペプチドは、直接的あるいは間接的に、膵臓の  $\beta$  細胞からインスリンの放出を引き起こし、そして／又は、直接的あるいは間接的に、血漿中のインスリン濃度の増大を引き起こすものを示すことができる。インスリン分泌促進ポリペプチドは、天然又は合成ポリペプチドを包含でき、更にそれらの機能的断片、誘導体、変異体、同族体、又は模倣体の何れも包含できる。インスリン分泌促進ポリペプチドは、インクレチン系の成分（例えば、GLP-1、GIP）及びそれらの類縁体、機能的断片、誘導体又は模倣体の何れも包含できる。インスリン分泌促進活性はグルコース依存性又はグルコース非依存性であってよい。本発明のインスリン分泌促進ポリペプチドはその上に更なる又はその他の活性を有していてよく、この用語は、どんな方法によっても、そのような別の活性を限定することを意味していない。例えば、本発明のインスリン分泌促進ポリペプチド、例えば、エクセナチド又は GLP-1 は、直接的あるいは間接的に、グルカゴンの生産を阻害又は最小化することもできる。用語「インスリン分泌促進活性」は、特定の作用メカニズムの何れかと結び付けることを意味していない。例えば、DPP-IV は、GLP-1 及び GIP の正常な分解酵素として機能するインクレチン系の調節分解酵素である。突然変異 DPP-IV は、その分解活性が、GLP-1 及び GIP（両者はインスリンの生産を刺激する）の有効量が増大するように阻害されるか又は減少すると、インスリン分泌促進性になれる。従って、このような突然変異 DPP-IV は、間接的にインスリンの量を増大するので、インスリン分泌促進性である。

30

40

#### 【0071】

当然のことながら、インスリン分泌促進剤又はポリペプチド（すなわち、インスリン分

50

泌促進活性を有している)は、「糖調節」又は「血糖調節」活性を有する薬剤又はポリペプチドと見なすことができる。従って、本発明は、糖調節又は血糖調節活性を有しているポリペプチドも意図している。本明細書で用いられる用語「糖調節」又は「血糖調節活性」は直接的又は間接的に関与している活性が体内のグルコースの代謝に応答するか又はこれを調節することを示している。従って、本発明はインスリン分泌促進活性を有するポリペプチドに限定されず、代わりに糖を調節するか又は血糖調節活性を有するポリペプチドの何れかまで広げることができ、これは例えば、直接的或いは間接的に、グルコース、インスリン、又はグルカゴン等の産生(例えば、発現、放出、分泌、形成等)及び／又は活性及び／又は量に影響を及ぼすポリペプチドの何れかを包含できる。

#### 【0072】

本明細書で用いられる「改善」又は「治療」は、特定の病気又は疾患、例えば、2型糖尿病又はそれに関連する疾患の少なくとも1つの前兆、症状、兆候、影響を低下又は減少すること意味すると理解される。例えば、2型糖尿病の改善又は治療は、血中のグルコース濃度を安定化することであり、改善又は治療は薬剤の1以上の用量を単独で又は他の治療薬及び治療介入と組合わせて投与することを必要とすることができる。改善又は治療は疾患が治ることを必要としない。

#### 【0073】

本明細書で用いられる用語「アミノ酸」は、アミノ基とカルボキシル基の両方を含有している分子を示す。適切なアミノ酸は、限定されないが、ペプチド中に見出せる20個の通常天然アミノ酸(例えば、A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、V(1文字略号として知られている))のD-及びL-異性体の両方、並びに有機合成又はその他の代謝経路で製造されて、化学的多様性、機能性、結合能力、構造擬態、及び安定性を増大するような特定な用途に適用できるβアミノ酸を含む天然又は非天然アミノ酸を包含する。

#### 【0074】

本明細書で用いられる用語「アミノ酸側鎖」または「アミノ酸のR基」は、アミノ酸のα炭素に結合している部分を示す。例えば、アラニンのアミノ酸側鎖又はR基はメチル基であり、フェニルアラニンのアミノ酸側鎖はフェニルメチルであり、システインのアミノ酸側鎖はチオメチルであり、アスパラギン酸のアミノ酸側鎖はカルボキシメチルであり、チロシンのアミノ酸側鎖は4-ヒドロキシフェニルメチルである、等である。その他の非天然アミノ酸側鎖も、例えば、天然のもの(例えば、アミノ酸代謝物)又は合成的に作られたもの(例えば、αジ置換アミノ酸、βアミノ酸)含まれる。

#### 【0075】

本発明の構造的に拘束されているペプチドと組成物中で用いる「担体タンパク質」は、拘束されているペプチド結合したときにインスリン産生の増大を引き起こすタンパク質又は液体のようなその他の物質であると理解される。担体複合体の例は当該技術分野で公知であって、例えば、一重又は多重架橋されたエクセナチドペプチド又はその同族体を標的にして適切な受容体にする分子を包含する。

#### 【0076】

本明細書で用いられる「コントロールサンプル又は対象と比較して変化した」は、正常な、未処置の又はコントロールサンプル由来のサンプルとは統計的に異なっているレベルで検出される被分析物或いは診断又は治療指標のレベルを有していると理解される。コントロールサンプルは、例えば、培養物中の細胞、1つ又はそれ以上の実験動物、1人又はそれ以上のヒト対象を包含する。コントロールサンプルを選択して試験する方法は当業者の能力の範囲内である。被分析物は細胞又は有機体(例えば、抗体)により特徴的に発現又は生産される天然物質又はレポータ構築物(例えば、β-ガラクトシダーゼ又はルシフェラーゼ)によって生産される物質であってよい。検出に用いた方法によって、変化の量及び計量は変化する。コントロール参照サンプルと比較して変化したものはリガンドの受容体、例えば膵臓GLP-1受容体への、抗体、拮抗剤、又はその他の阻害剤の存在下での、減少した結合も包含できる。統計的有意性の決定は当業者の能力の範囲内である。

## 【0077】

本明細書で用いられる用語「併用投与」は、薬剤が対象内で同時に存在して作用するように1つ又はそれ以上のの薬剤を対象に投与することであると理解される。併用投与は薬剤の混合剤を調剤すること及び薬剤の同時投与を必要としない。

## 【0078】

本明細書で用いられる用語「同類アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似した側鎖を有しているアミノ酸残基で置き換えられていることである。例えば、類似した側鎖を有しているアミノ酸残基のファミリーが当該技術分野で定義されている。これらのファミリーは塩基性の側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 $\beta$ 分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を包含する。その他の同類アミノ酸置換は、ペプチドの電荷を修正するためにアスパラギン酸をアスパラギンで置換する場合のような、アミノ酸側鎖ファミリーを越えて生じてもよい。よって、エクセナチドポリペプチド（配列番号1）にある予測非必須アミノ酸残基を、例えば、同じ側鎖ファミリー又はファミリーを越えた同族体（例えば、アスパラギン酸をアスパラギンに、グルタミン酸をグルタミンに）由来の別のアミノ酸残基で置き換えることができる。同類変更は更に、化学的に同族である非天然アミノ酸の置換（すなわち、ロイシンの代わりに合成非天然疎水性アミノ酸を、トリプトファンの代わりに合成非天然芳香族アミノ酸を）を含むことができる。

## 【0079】

本明細書で用いられる用語「細胞を接触させる」は、薬剤又は単離された細胞が試験細胞又は処置する細胞と相互作用するように、試験細胞又は処置される細胞に取り込まれる可能性のあるように、及び試験細胞又は処置される細胞に効果を及ぼすように、薬剤を試験細胞、例えば、培養液中で又は動物体内で試験される細胞に提供することであると理解される。薬剤又は単離された細胞は細胞に直接送達されるか（例えば、薬剤の培養培地への添加によって、又は目的の細胞又は組織内への注射によって）、或いは血液循環、リンパ循環、又はその他の方法で細胞へ送達するための投与の経腸又は非経口経路による生体への送達によるものでよい。

## 【0080】

本明細書で用いられる「検出すること」、「検出」等は、サンプル中の特定の被分析物、サンプル中のレポータ構築物由来の産物、又はサンプル中の薬剤の活性（例えば、結合阻害、合胞体の形成の阻害、伝染性阻害）を確認するために実施されるアッセイであると理解される。検出は、ELISAキット又はLC/MS分析による血中の架橋ペプチドの濃度、血清グルコース濃度、血清インスリン濃度又はヘモグロビンA1Cパーセントのような生理学的情報による架橋ペプチドの機能的効果の確定を包含できる。被分析物の量又はサンプル中で検出された活性は、特定のアッセイに関する検出、アッセイ又は方法の検出のゼロ、又は低いレベルの範囲内に入る。

## 【0081】

本明細書で用いられる用語「診断」とは、病気、障害、又は疾患の少なくとも1つの兆候又は症状の存在に基づいて病気、障害、又は疾患を有している対象を確認するための観察、試験又は状況に基づく対象の疾患の臨床的又はその他の評価を示す。典型的には、本発明の方法を用いる診断は、病気、障害、又は疾患、例えば、2型糖尿病のその他の兆候又は症状についての対象の観察を包含している。

## 【0082】

用語「有効量」、又は「有効用量」或いは「治療有効量又は用量」は、意図された薬理学、治療又は予防結果を生じるための薬剤のその量を示す。薬理学的有効量は2型糖尿病又は関連疾患の1つ又はそれ以上の兆候又は症状の改善をもたらす。例えば、治療有効量

は、好ましくは、治療されないコントロール対象と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上までに、血中のグルコース濃度を減少する治療剤の量を示す。量が有効量であるか否かの評価は、血中グルコース濃度の変化、血清インスリンの増大した濃度、減少したヘモグロビンA1Cパーセント（すなわち、長期の血糖状況及び糖尿病コントロール）を測定することを包含する、糖尿病の領域における当業者に公知の標準的な試験の何れかを用いて行うことができる。薬剤の1用量以上が有効用量をもたらすのに必要であろう。

10

#### 【0083】

本明細書で用いられる用語「効果がある」及び「有効性」は、薬理学的有効性と生理学的安全性の両方を含んでいる。薬理学的有効性は患者に所望の生物学的効果をもたらすその治療剤の能力を示す。生理学的安全性は、その治療の投与がもたらす細胞、臓器及び／又は生命体レベルにおける毒性、又はその他の有害な生理作用（副作用と言われることが多い）のレベルを示す。

一方、用語「効果がない」は、少なくとも無成層群において、有害作用は存在しなくても、治療が治療的に有用であるほど十分な薬理学的効果をもたらさないことを意味している。（このような治療は、発現プロファイル又は複数プロファイルで確認できるサブグループにおいて無効であろう）。「効果が弱い」は、薬理学的有効性の有意に低いレベル及び／又は有害な生理作用、例えば、肝毒性の治療的に高いレベルをもたらす治療を意味する。

20

#### 【0084】

従って、薬剤の投与に関連して、病気又は疾患に「対して有効」である薬剤は、臨床的に適切な方法による投与が、症状の改善、治癒、疾患の兆候又は症状の減少、余命の延長、生活の質の改善、或いは病気又は疾患の特殊なタイプの治療に通じている医師によって一般に肯定的に認識されているその他の効果のような、有益な効果を、少なくとも統計的に有意な数の患者にもたらすということを意味している。

#### 【0085】

本明細書で用いられる、螺旋、例えば、 $\alpha$ 螺旋又は $3_1 0$ 螺旋の「面」は、螺旋が垂直に配置されたときに、単面にあるアミノ酸が他のものの頂部にあるものとして表わされるように、タンパク質の螺旋に積み重ねられているアミノ酸と理解される（例えば、図3を参照されたい）。例えば、 $\alpha$ 螺旋は1回転当たり約3.6個のアミノ酸を有している。従って、配列a b c d e f g a' b' c' d' e' f' g'を有しているペプチドが $\alpha$ 螺旋を形成するときは、4番目と5番目のアミノ酸（ $i+3$ 及び $i+4$ ）、すなわち、アミノ酸d及びeは、1番目のアミノ酸上に「積み重なり」（位置 $1+\sim 3.6$ アミノ酸）、そして8番目のアミノ酸である、アミノ酸a'（ $i+7$ ）はアミノ酸aの上に積み重なって螺旋の面を形成してアミノ酸a'と新しい回転を開始する（例えば、図3を参照されたい）。 $\alpha$ 螺旋において、2番目のアミノ酸である、アミノ酸bは5番目と6番目のアミノ酸、すなわち+3と+4位でアミノ酸e及びf、及び+7位でアミノ酸b'と「積み重なって」螺旋の面を形成する。アミノ酸c、d、e、f、及びgで始まる螺旋の面は上記の開示に基づいて容易に確認できる。更に、螺旋の面は、2つの隣接した、3つの隣接した或いは4つの隣接した「積み重なった」残基のカラムを包含できる。

30

40

#### 【0086】

螺旋の「面」の例は、螺旋の「相互作用面」を包含する（例えば、図3は、GLP-1受容体と結合することが知られているエクセナチドのような相互作用面を示す）。「相互作用面」のアミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型配列から変化したときに、受容体と接触して（例えば、図2及び3を参照されたい）、ポリペプチドの機能活性を無効或いは実質的に無効にする残基である。実質的に無効にすることは、適切なアッセイ（例えば、受容体結合アッセイ、第2メッセンジャーのシグナル伝達又は受容体シグナル伝達の下流

50

エフェクターのリン酸化状態の変化を観察する機能アッセイ、或いはインビトロ又はインビボにおけるグルコース濃度又はグルコース刺激インスリン放出を観察するアッセイ)で野生型ペプチドの約50%未満、約40%未満、約30%未満まで、エクセナチド又は機能的に同族のペプチドの機能活性を減少させることであると理解される。エクセナチド及びエクセナチド様ペプチドの相互作用面のアミノ酸残基は、図2に描かれているように、GLP-1受容体及びエクセナチドの小断片(アミノ酸9~33)について報告されているような、構造確認及びアラニンスキャンニングのような、当該技術分野で周知の方法によって容易に確認できる。本明細書で用いられる用語「相互作用面」アミノ酸残基は、配列の機能を妨害しない相互作用面アミノ酸の同類置換を包含する。一般に「相互作用面」アミノ酸残基は $\alpha$ 螺旋の相互作用面で見られる(コアレクセナチド $\alpha$ 螺旋に関する図2及び3で定義されているように)。

10

#### 【0087】

いくつかのインスリン分泌促進ポリペプチド(例えば、エクセナチド)又はそれらの機能的同族体残基は置換されにくいものに対して、他のものは、本明細書で更に記載されているような、例えば、アラニン又は架橋スキャンニングによって確認できるような、変化をより受けやすい。エクセナチド、GLP-1、及びリラグルチドのようなインスリン分泌促進ポリペプチドは、当業者により、配列に基づく相同性、構造的相同性及び/又は機能的相同性により容易に確認できる同族の配列及び $\alpha$ 螺旋を含んでいる。このような方法は当該技術分野で周知であって、対残基相関に基づく生物情報学プログラム(例えば、[ch.emblnet.org/software/COILS\\_form.html](http://ch.emblnet.org/software/COILS_form.html))を包含し、これはタンパク質配列及びそれらの構造モデルからコイルドコイルを認識する能力がある(Lupas, A., et al. Science 1991. 252(5009); p. 1162-1164 を参照されたい)。

20

#### 【0088】

本明細書で用いられる用語「炭化水素架橋化(stapling)」は、ポリペプチドの生来の二次構造を配座的に与えるのを助ける少なくとも2つの改変アミノ酸を有するポリペプチドを安定に架橋結合する工程を示す。炭化水素架橋化は、螺旋二次構造、例えば、 $\alpha$ 螺旋二次構造を有しやすいペプチドの螺旋二次構造を促進又は保持して、その生来の $\alpha$ 螺旋配座を得るか或いは保持する。この二次構造はポリペプチドのタンパク分解的切断及び熱に対する耐性を増大し、そして疎水性も増大する。「炭化水素架橋化」を示すために用いられる代替え命名は、「炭化水素鎖化(tethering)又は架橋化(crosslinking)」、「分子鎖化(tethering)」、「残基内架橋化(stapling)、鎖化(tethering)、又は架橋結合化(crosslinking)」、「ペプチド内架橋化、鎖化又は架橋結合化」等を包含する。

30

#### 【0089】

炭化水素架橋は、 $\alpha$ 螺旋構造を熱力学的に促すペプチド内の $\alpha$ 螺旋二次構造を促進して保持する。述べたように、ポリペプチドの二次構造の強化はポリペプチドのタンパク分解的切断(例えば、キモトリプシン又は胃腸管内のその他のプロテアーゼによる)及び熱に対する耐性を増大し、そしてポリペプチドの疎水性も増大することができる。従って、炭化水素架橋された(そしてその結果、構造的に拘束及び強化された)本明細書に記載されているような本発明のポリペプチドは、対応する炭化水素で架橋されていない(構造的に拘束されていない)ポリペプチドと比較して、何れかの経路で投与したときの延長された半減期、増大した $\alpha$ 螺旋性、改善された熱安定性及びプロテアーゼ耐性、増大した機能活性及び薬理学的特性、並びに改善されたバイオアベイラビリティを含む、改善された生物学的活性を有している。

40

#### 【0090】

炭化水素で架橋されたポリペプチドは、2つの非天然アミノ酸の間に1つ又はそれ以上の鎖(結合)を含むことができ、この鎖(複数も)はポリペプチドの螺旋二次構造を有意に増強する。一般に、螺旋構造を促進するために、鎖を1つ又は2つの螺旋回転の長さ(すなわち、約3~3.6又は約7アミノ酸)にわたり広がっている。従って、 $i$ 及び $i+3$ ; $i$ 及び $i+4$ ;又は $i$ 及び $i+7$ に位置するアミノ酸は、化学修飾及び架橋のために理想的な候補である。従って、例えば、ペプチドが配列X1、X2、X3、X4、X5、X

50

6、X 7、X 8、X 9...を有していて、アミノ酸 X がそれぞれの位置で独立して選択される場合は、X 1 と X 4 の間、又は X 1 と X 5 の間、又は X 1 と X 8 の間の架橋結合は、X 2 と X 5 の間、又は X 2 と X 6 の間、又は X 2 と X 9 の間等の架橋結合と同様に有用である。多数の架橋結合の使用（例えば、2、3、4 又はそれ以上）も意図されている。多数の架橋結合の使用はペプチド、インスリン分泌促進性エクセナチド及びエクセナチド様ペプチドのようないくつかの非常に長いペプチドの場合と同様に、特に長さが伸びたペプチドでは、ペプチドの安定化及び最適化に効果的である。従って、本発明はポリペプチド配列内へ 1 つ以上の架橋を取り込むことを包含している。多数の架橋の使用は、ペプチド、特に長さが伸びているペプチドを安定化及び最適化するのに有効である。本発明はポリペプチド配列内に 1 つ又はそれ以上の架橋の取り込みも包含しており、ここでは架橋は「縫い合わせた」配置内で形成され、すなわち、2 つの連続的に発生している架橋（架橋結合）が共通の起源残基から生じている（例えば、図 5 B に描かれているように）。

10

#### 【0091】

本発明で用いられている用語「架橋スキャン」又は「架橋スキャンニング」は、ペプチド配列鑄型の長さ方向に沿った架橋位置のシーケンス評価に参与していることを示している。一実施態様では、架橋スキャンニングは架橋ペプチドライブラリーの合成によって達成でき、これによって  $i$  と  $i + 3$  ;  $i$  と  $i + 4$  ; 及び  $i$  と  $i + 7$  単一又は複数縫合（縫い合わせ配置にある）の位置をペプチド配列の長さによって順に置いて、全ての可能な位置にサンプリングして架橋又は縫合構築物について所望の又は最適な特性及び活性を確認する。

20

#### 【0092】

分子内鎖、例えば炭化水素架橋を形成する方法は、例えば、米国特許出願公開第 2006/0014675 A1 号、同第 2006/0008848 A1 号、同第 2004/0171809 A1 及び米国特許第 7,723,469 号、同第 7,192,713 号、及び同第 7,084,244 号公報に見出せ、これらはそれぞれ参照により本明細書に取り込まれている。分子内鎖は 1 つ又はそれ以上のエーテル、チオエーテル、エステル、アミン又はアミド部分を包含できる。ある場合では、天然のアミノ酸側鎖を鎖内に組み込むことができる。例えば、鎖を例えば、セリン中のヒドロキシル、システイン中のチオール、リジン中の 1 級アミン、アスパラ酸又はグルタミン酸中の酸或いはアスパラギン又はグルタミンのアミドのような官能基と結合できる。従って、2 つの非天然アミノ酸を結合して作られた鎖を用いるよりむしろ、天然のアミノ酸を用いて鎖を作成することが可能である。1 つの非天然アミノ酸を天然のアミノ酸と共に用いることも可能である。

30

#### 【0093】

鎖の長さは変更可能であることが更に想定されている。例えば、二次  $\alpha$  螺旋構造に対して比較的高度の拘束を与えることが望ましい場合は、より短い鎖を用いることができ、それに対してと同様に、特にある場合は、二次  $\alpha$  螺旋構造に低い拘束を与えることが望ましいので、より長い鎖が望まれる。

#### 【0094】

また、主に  $\alpha$  螺旋の単一面にある鎖を供給するようにアミノ酸  $i$  から  $i + 3$ 、 $i$  から  $i + 4$  ; 及び  $i$  から  $i + 7$  に渡る鎖の例を記載したが、多数のアミノ酸の組合わせの何れかに渡るように鎖を合成することができる。

40

#### 【0095】

場合によっては、 $\alpha$  ジ置換アミノ酸を、 $\alpha$  螺旋二次構造の安定性を改善するためにポリペプチド中で用いる。しかし、 $\alpha$  ジ置換アミノ酸は必要ではなく、そしてモノ  $\alpha$  置換体（例えば、連結されたアミノ酸において）を使用する例も想定されている。

#### 【0096】

本明細書で用いられる用語「同一性」又は「同一性パーセント」は、2 つの高分子、例えば、2 つのポリヌクレオチド又は 2 つのポリペプチドの間のサブユニット配列類似性を示す。2 つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じ単量体サブユニットでしめられている場合、例えば、2 つのペプチドのそれぞれ内のある位置がセリンで占められている

50

なら、これらはその位置で同一である。2つの配列間の同一性は、マッチングした或いは同一位置の数の一次関数である。例えば、2つのペプチド又は化合物配列の半分（例えば、長さが10サブユニットポリマー中で5つの位置）が同一なら、2つの配列は50%同一であり、位置の90%、例えば、10のうち9がマッチしているならば、2つの配列は90%の配列同一性を共有している。2つの配列間の同一性はマッチング又は同一の位置の数の一次関数である。従って、参照配列の一部が特定のペプチド中で欠失している場合は、欠失部分は配列同一性を算出する目的ではカウントしない。同一性は配列分析ソフトウェア、例えば、BLASTN又はBLASTP ([www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST) で入手できる)を用いて測定することが多い。BLASTN（ヌクレオチド配列用）によって2つの配列を比較するための初期設定パラメータ（例えば、互いに2つの配列を「Blast」-in 10 g）は、マッチ=1、ミスマッチに対するペナルティー=-2、オープンギャップ=5、エクステンションギャップ=2とする。タンパク質配列のためにBLASTPを用いる場合は、初期設定パラメータを、マッチ=0、ミスマッチに対するペナルティー=0、オープンギャップ=11、及びエクステンションギャップ=1とする。更に、同一性を確認するためのコンピュータプログラムは当該技術分野で公知である。

#### 【0097】

本明細書で用いられる、ポリペプチドを参照して用いるときの「単離された」又は「精製された」は、天然のポリペプチド又はタンパク質が正常な生理環境から取り除かれているか（例えば、血漿又は組織から単離されたタンパク質）又は非天然環境で合成された（例えば、インビトロの翻訳系で又は化学合成を用いて人工的に合成された）ことを意味する。従って、「単離された」又は「精製された」ポリペプチドは、無細胞溶液中に或いは異なった細胞環境に置くことができる（例えば、異種細胞型内で発現される）。用語「精製された」は、そのポリペプチドが存在する唯一のポリペプチドであることを意味しないが、自然にそれに付随している細胞又は有機物質を本質的に含まない（約90~95%、99~100%純粋である）ので、天然のポリペプチドと区別される。同様に、単離された核酸はその正常な生理環境から除去されている。細胞に関連して用いられる「単離された」は、  
初代細胞又は細胞株の細胞が、細胞培養又は臓器培養の何れかで、培養中である（動物内には無い）といことを意味する。細胞は、正常動物、形質転換動物、自然発症遺伝子変化を有する動物、及び／又は遺伝性及び／又は誘導性の病気又は疾患を有する動物から単離 30 できる。

#### 【0098】

本明細書で用いられる「キット」は、本発明の方法で用いる、少なくとも1つの基準外の実験用試薬を含んでいると理解される。例えば、キットは、少なくとも1つの改変用ペプチド、1つ又はそれ以上のペプチドの改変用アルデヒド分子、及び使用説明書ののうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つを、その全てを適切な包装中に含むことができる。キットは、乾燥粉末、濃縮溶液、又はすぐに使える溶液のような、本発明の方法を実施するのに必要なその他の成分の何れかを更に含むことができる。ある実施態様では、キットは本発明の方法で用いる試薬を含有する1つ又はそれ以上の容器を含んでいて；このような容器は箱、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、ポーチ、ブリスト 40 ーパック、又は当該技術分野で公知の適切な容器形態であってよい。このような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属ホイル、又は試薬を保持するのに適切なその他の物質から作ることができる。

#### 【0099】

「非必須」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型配列から、その機能的活性及び／又は二次構造（ $\alpha$ 螺旋構造）を無効にしないか或いは実質的に変更しないで、変えることができる残基である。

#### 【0100】

「得ること」は製造すること、入手すること、又はその他の方法で手に入れることと本明細書では理解される。

## 【0101】

本明細書で用いられる「操作可能に結合した」は、操作可能に結合した部分の活性を実施例に提供されている方法の少なくとも1つを用いてアッセイすることができ、そして検出可能な活性を有することができるように、操作可能に結合した2つ又はそれ以上の成分がそれらの最初の活性を保持しているか、又は結合によって活性を得ているという形式で、結合している、好ましくは共有結合により、例えば、1つのペプチドのアミノ末端と別のペプチドのカルボキシ末端が結合していると理解される。

## 【0102】

語句、「薬学的に許容される担体」は当該技術分野で認識されていて、本発明の化合物を哺乳動物に投与するのに適している、薬学的に許容される物質、組成物又は賦形剤を包含する。担体は、1つの臓器又は身体の部分から別の臓器又は身体の部分へ対象薬剤を輸送又は移送することに関わる、液体又は固体の増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒又は封入材料を包含する。それぞれの担体は、製剤の他の成分と適合して患者に有害ではないという意味で、「許容可能」でなくてはならない。例えば、細胞の投与のための薬学的に許容される担体は、典型的に、注射による送達に許容可能な担体であって、送達する細胞を損傷させ得る洗浄剤又はその他の化合物などの薬剤を包含していない。薬学的に許容される担体として働く物質のいくつかの例は：乳糖、ブドウ糖及び蔗糖のような糖類；トウモロコシ澱粉及びジャガイモ澱粉のような澱粉類；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロースのようなセルロース及びその誘導体；粉末トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバター及び坐薬ワックスのような賦形剤；落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及び大豆油のような油類；プロピレングリコールのようなグリコール類；グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコールのようなポリオール類；オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルのようなエステル類；寒天；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムのような緩衝剤；アルギン酸；発熱因子を含まない水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；リン酸緩衝溶液；及び医薬製剤中で用いられるその他の非毒性の適合可能物質を包含する。

## 【0103】

湿潤剤、乳化剤並びにラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムのような、滑沢剤、更に着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味、着香及び芳香剤、保存料並びに抗酸化剤も組成物中に存在させることができる。

## 【0104】

薬学的に許容される抗酸化剤の例は：アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等のような、水溶性抗酸化剤；パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、 $\alpha$ -トコフェロール等のような、油性抗酸化剤；並びにクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸等のような金属キレート化剤を包含する。

## 【0105】

本発明の製剤は、経口、経鼻、局所、経皮、皮下、口腔、舌下、吸入、筋肉内、腹腔内、直腸内、膈内及び／又は非経口投与に適しているものを包含する。製剤は便宜上単回剤形で存在してもよく、医薬品の技術分野で周知の何れかの方法で製造できる。担体物質と組合わせて単回剤形を生産できる活性成分の量は一般に、治療効果をもたらす化合物の量であろう。

## 【0106】

本明細書で用いられる「複数」は1つ以上を意味すると理解される。例えば、複数は少なくとも2、3、4、5、又はそれ以上を示す。

## 【0107】

本明細書で用いられる用語「ペプチド」、「ペプチド化合物」及び「ペプチド構造」は、天然のL-アミノ酸からなるペプチド、更に天然のL-アミノ酸構造のペプチド誘導体

10

20

30

40

50

、ペプチド類縁体及びペプチド模倣体を包含するように意図されている。本明細書で用いられる用語「ペプチド類縁体」、「ペプチド誘導體」及び「ペプチド模倣体」は、ペプチドの化学構造を模倣していてペプチドの機能特性（例えば、GLP-1受容体に結合する能力）を保持している分子を包含するように意図されている。ペプチド類縁体、誘導體及び模倣体を設計する方法は当該技術分野で公知である。例えば、Farmer, P. S. in Drug Design (E. J. Ariens, ed.) Academic Press, New York, 1980, vol. 10, pp. 119-143; Ball, J. B. and Alewood, P. F. (1990) J. Mol. Recognition 3:55; Morgan, B. A. and Gainor, J. A. (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243;及びFreidinger, R. M. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10:270を参照されたい。

#### 【0108】

10

本明細書で用いられる「ポリペプチド」は、2つ又はそれ以上の独立して選ばれた共有結合（例えば、ペプチド結合）で結合した天然又は非天然のアミノ酸と理解される。ポリペプチドは、ペプチド結合で連結している2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、又はそれ以上の天然又は非天然アミノ酸を含有できる。本明細書に記載されているポリペプチドは全長タンパク質（例えば、十分に処理されたタンパク質）を、更により短いアミノ酸配列（例えば、天然タンパク質の断片又は合成ポリペプチド断片）を包含する。本発明のポリペプチドの例は、本明細書に記載されている疎水性の架橋されたインスリン分泌促進ポリペプチド、及びその何れかの断片、類縁体、又は模倣体を包含する。

20

#### 【0109】

本明細書で用いられる「予防」は、発病の速度又は程度を制限し、減少し、或いは病気又は疾患の少なくとも1つの兆候又は症状の進展を阻害すると理解される。予防は薬剤又は治療法の少なくとも1つの用量の投与を必要とする。

#### 【0110】

本明細書で用いられる「サンプル」は、その環境（例えば、動物由来の血液又は組織、細胞、或いは組織培養由来の調製済み培地）から単離された生体材料で、ウィルス、抗体、又はレポータ構築物由来の産物のような被分析物を含有していることが疑われているか又は含有していることが知られているか、或いは、本発明のように、送達された架橋ペプチドの濃度又はインスリン及び／又はグルコースのような機能的に読み取れる被分析物の濃度が測定可能である。サンプルは、組織又は体液の部分的に精製された分画であってもよい。参照サンプルは、病気又は疾患体液を有していない提供者由来の、又は病気又は疾患を有している対象の正常組織（例えば、非感染組織対感染組織）由来の「正常」サンプルであってもよい。参照サンプルは非処置提供者、又は活性薬剤で処置されていない（非処置又は賦形剤のみ投与）細胞培養由来でもよい。参照サンプルは細胞又は対象を試験薬剤と接触させる前の「0時点」に採取することもできる。

30

#### 【0111】

2つ又はそれ以上のポリペプチド配列に関連している「類似性」又は「類似性パーセント」は、同一であるか又はアミノ酸残基の特定パーセント又はそれらの同類置換を有している、2つ又はそれ以上の配列又はサブ配列を示し、これは以下の配列比較アルゴリズムを用いて又は目視検査で測定して、最大一致について比較及び整列したときに同一である。

40

#### 【0112】

ポリペプチドに関して本明細書で用いられている用語「安定な」又は「安定化した」は、螺旋構造を促進及び／又は保持し、そして／又はプロテアーゼ耐性を改善し、そして／又は酸安定性を改善し、そして又は熱安定性を改善し、そして又は薬理学的特性を改善するために炭化水素架橋されているポリペプチドを示す。安定化されたポリペプチドは一種の構造的に拘束されているポリペプチドである。ポリペプチドは本明細書に記載されている方法に従って、同一又は異なった炭化水素架橋で一重に、二重に、三重に、又は多重に架橋できる。

50

## 【0113】

本明細書で用いられている「構造的に拘束されているポリペプチド」（又は「構造的に強化されている」）等は、構造的に拘束されているペプチドが非改変ペプチドより限られた数の構造を導入するように、幾らかの（すなわち、少なくとも1つの）化学修飾、例えば、元の又は天然の配列の天然又は非天然アミノ酸による突然変異；分子鎖を組み込む化学修飾；ジスルフィド架橋の形成を促進する化学修飾；等を有する改変ポリペプチドを包含すると理解される。構造的に拘束されているポリペプチドは、天然の、野生型配列と比べて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12又はそれ以上の突然変異を包含できる。例えば、分子鎖は安定な螺旋構造、特に $\alpha$ 螺旋及び $3_1 0$ 構造の形成を促進する炭化水素架橋、又は鎖の末端の位置と鎖の長さに応じたねじれを包含できる。天然又は非天然アミノ酸を、ねじれ（例えば、2つの隣接している構造間の可変角によって確定されるような構造中の屈曲）又はその他の好ましい配座を促進するために使用できる。例えば、天然アミノ酸、プロリンはアミノ酸R基の構造及び水素結合供与体の欠如によって、ペプチドにねじれを誘導できる。非天然アミノ酸、特に大きくてそして／又は荷電したR基、或いはN-メチル化アミド、N-置換グリシン、環状 $\alpha$ 、 $\alpha$ ジ置換、環状N、N-ジ置換を有するもの、及び $\beta$ アミノ酸は特定の、望ましい配座を促進できる。溶液中の「構造的に拘束されている」ペプチドの集団は全て常に望ましい配座を有しているとは限らないということが理解される。かわりに、溶液中の構造的に拘束されているペプチドの集団において、化学修飾以前の溶液中の天然又は元のペプチド配列より、その時点で望ましい配座が、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%又はそれ以上存在している。溶液中のペプチドの集団の配座は、これに限定されないが、円偏光2色性及びNMR分光法を包含する、当業者に公知の多種の方法によって確認できる。結晶形態にすると、拘束されているペプチドの構造を確認するためにX線結晶学を適用できる。

10

20

## 【0114】

本明細書で用いられる「小分子」は、化合物、典型的に、約1500Da、1000Da、750Da、又は500Daより大きくない分子量を有している有機化合物であると理解される。一実施態様では、小分子は天然のアミノ酸及び／又はヌクレオチドのみを含有しているポリペプチド又は核酸を包含しない。

## 【0115】

非特異的化合物、又は非特異的化合物のプールと比較して、少なくとも100倍、好ましくは少なくとも500倍、好ましくは少なくとも1000倍、好ましくは少なくとも5000倍、好ましくは少なくとも10,000倍優先的に標的分子を結合させる場合に、薬剤、抗体、ポリペプチド、核酸又はその他の化合物は、標的分子、例えば、抗原、ポリペプチド、核酸又はその他の化合物と「特異的に結合する」。特異的に結合するとは、物理学的に関連する構造を有する2つ又はそれ以上の関連化合物のうちの1つと結合することに関して用いることができる。絶対的又は相対的な、結合優先性及び親和性は、例えば、それぞれの対について個別に親和性を確認して、或いは競合アッセイ又は当業者に公知のその他の方法によって、確認できる。

30

## 【0116】

本明細書で用いられる「対象」は生きている有機体を示す。ある特定の実施態様では、生きている有機体は動物である。ある特定の好ましい実施態様では、対象は哺乳動物である。ある特定の実施態様では、対象は家畜である。対象の例は、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ヤギ、及びヒツジを包含する。ヒト対象を異常なグルコースホメオスタシス疾患、例えば、2型糖尿病を有しているか、又は2型糖尿病を発症する恐れがある患者をも示す。

40

## 【0117】

特定の病気、疾患、又は症候群「に罹っているか又は罹る恐れがある」対象は、対象が病気、疾患、又は症候群に罹っていると知識のある人間が診断又は疑いを持つような、十分な数の危険因子を有しているか、或いは病気、疾患、又は症候群の兆候又は症状の十分

50

な数又はこれらの組み合わせを有している。2型糖尿病のような疾患に罹っているか又は罹る恐れのある対象を識別する方法は当該技術分野に属するものの能力の範囲内である。特定の病気、疾患、又は症候群に罹っている対象と罹る恐れがある対象は必ずしも2つの異なった群ではない。

#### 【0118】

医薬品は好都合に単位剤形で投与でき、医薬分野における周知の方法の何れか、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1985)に記載されているような方法で製造できる。非経口投与用の製剤は、滅菌水又は食塩水、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール類、植物由来の油類、水素化ナフタレン類等のような一般的な賦形剤を含有することができる。特に、生体適合性があり、生物分解性があるラクチド重合体、ラクチド／グリコリド共重合体、又はポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体はある特定の薬剤の制御放出に有用な賦形剤であろう。ある特定の実施態様では、経口的に送達できる製剤を、医薬製剤に関するその他の論文のなかでも、とりわけRemington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1985)に記載されているものを包含する、公知の方法に基づいて製造することができる。

10

#### 【0119】

当然のことながら、所定の治療法で用いられる活性化合物の実際の好ましい量は、例えば、用いられる特定の化合物、製剤化された特定の組成物、投与方法及び対象の特徴、例えば対象の人種、性別、体重、全体的な健康及び年齢によって変化するだろう。投与の所定プロトコールに対する最適な投与速度は、前記ガイドラインに関して実施される従来の用量確認試験を用いて当業者が容易に確定できる。

20

#### 【0120】

本明細書で用いられている、特定の病気又は疾患などに「罹りやすい」又は「罹る傾向にある」又は「罹る素因がある」は、遺伝、環境、健康、及び／又はその他の危険因子に基づいて、一般集団より病気又は疾患を発症する可能性が高い個人を示す。疾患、例えば、2型糖尿病を発症する可能性の増大は、約10%、20%、50%、100%、150%、200%、又はそれ以上の増加であろう。

#### 【0121】

以下の化学物質を定義しなければならないと思われる。

30

#### 【0122】

用語「アルケニル」は、1つ又はそれ以上の炭素－炭素二重結合を有している直鎖又は分岐鎖であってよい炭化水素鎖を示す。アルケニル部分は表示された数の炭素原子を含有している。例えば、 $C_2-C_{10}$ は、その基がそこに2～10個（これを含む）の炭素原子を有していることを表わす。用語「低級アルケニル」は $C_2-C_8$ アルケニル鎖を示す。数の指定がない場合は、「アルケニル」はその中に2～20個（これを含む）の炭素原子を有している鎖（直鎖又は分岐鎖）である。

#### 【0123】

用語「アルキニル」は、1つ又はそれ以上の炭素－炭素三重結合を有している直鎖又は分岐鎖であってよい炭化水素鎖を示す。アルキニル部分は表示された数の炭素原子を含有している。例えば、 $C_2-C_{10}$ は、その基がそこに2～10個（これを含む）の炭素原子を有していることを表わす。用語「低級アルキニル」は $C_2-C_8$ アルケニル鎖を示す。数の指定がない場合は、「アルキニル」はその中に2～20個（これを含む）の炭素原子を有している鎖（直鎖又は分岐鎖）である。

40

#### 【0124】

用語「アリール」は、それぞれの環の0、1、2、3、又は4個の原子が置換基で置換されていてよい、6炭素の単環式又は10炭素の二環式芳香環系を示す。アリール基の例は、フェニル、ナフチルなどを包含する。用語「アリールアルキル」又は用語「アラールアルキル」はアリールで置換したアルキルを示す。用語「アリールアルコキシ」はアリールで置換したアルコキシを示す。

50

## 【0125】

本明細書で用いられる用語「シクロアルキル」は、3～12個の炭素、好ましくは3～8個の炭素、さらに好ましくは3～6個の炭素を有している飽和又は部分飽和の環状炭化水素基を示し、ここでシクロアルキル基はさらに置換されていてもよい。好ましいシクロアルキル基は、これに限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル及びシクロオクチルを包含する。

## 【0126】

用語「ハロ」はフッ素、塩素、臭素又はヨウ素の何れかの基を示す。

## 【0127】

用語「アルキル」は、表示されている数の炭素原子を含有している、直鎖又は分岐鎖であってよい炭化水素鎖を示す。例えば、 $C_1-C_{10}$ は、この基が1～10個（これを含む）の炭素原子をその中に有していてもよいことを表わす。数の指定がない場合は、「アルキル」は1～10個（これを含む、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個）の炭素原子をその中に有している鎖（直鎖又は分岐鎖）である。用語「アルキレン」は2価のアルキル（すなわち、--R--）を示す。

## 【0128】

用語「ヘテロアリアル」は、単環式の場合は1～3個のヘテロ原子、二環式の場合は1～6個のヘテロ原子、或いは三環式の場合は1～9個のヘテロ原子を有している、芳香族の5～8員単環式、8～12員の二環式、又は11～14員の三環式の環系を示し、当該ヘテロ原子はO、N、又はSから選択され（例えば、単環、二環、三環の場合は、それぞれ、炭素原子と1～3、1～6、又は1～9個のN、O、又はSのヘテロ原子）、ここで各環の0、1、2、3、又は4個の原子は置換基で置換されていてよい。ヘテロアリアル基の例は、ピリジル、フリル又はフラニル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、チオフェニル又はチエニル、キノリニル、インドリル、チアゾリルなどを包含する。用語「ヘテロアリアルアルキル」又は用語「ヘテロアラルキル」は、ヘテロアリアルで置換されているアルキルを示す。用語「ヘテロアリアルアルコキシ」は、ヘテロアリアルで置換されているアルコキシを示す。

## 【0129】

用語「ヘテロシクリル」は、単環式の場合は1～3個のヘテロ原子、二環式の場合は1～6個のヘテロ原子、或いは三環式の場合は1～9個のヘテロ原子を有している、非芳香族の5～8員単環式、8～12員の二環式、又は11～14員の三環式の環系を示し、当該ヘテロ原子はO、N、又はSから選択され（例えば、単環、二環、三環の場合は、それぞれ、炭素原子と1～3、1～6、又は1～9個のN、O、又はSのヘテロ原子）、ここで各環の0、1、2、又は3個の原子は置換基で置換されていてよい。ヘテロシクリル基の例は、ピペラジニル、ピロリジニル、ジオキサニル、モルホリニル、テトラヒドロフランニルなどを包含する。

## 【0130】

用語「置換基」は、アルキル、シクロアルキル、アリアル、ヘテロシクリル、又はヘテロアリアル基上の、その基の何れかの原子において「置換されている」基を示す。適切な置換基は、これに限定されないが、ハロ、ヒドロキシ、メルカプト、オキシ、ニトロ、ハロアルキル、アルキル、アルカリル、アリアル、アラルキル、アルコキシ、チオアルコキシ、アリアルオキシ、アミノ、アルコキシカルボニル、アミド、カルボキシ、アルカンシルホニル、アルキルカルボニル、及びシアノ基を包含する。

## 【0131】

本発明で提供する範囲は、その範囲内の全ての値に対する省略型であると理解される。配列番号の範囲が提供されている場合、これは個々の配列全てを包含している。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、1

10

20

30

40

50

4、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50よりなる群からの何れかの数、数の組合わせ、又は下位範囲を含むと理解される。

#### 【0132】

明確な記述がない限り或いは文脈から明らかでない限り、本明細書で用いられる用語「又は」は包括的であると理解される。

#### 【0133】

明確な記述がない限り或いは文脈から明らかでない限り、本明細書で用いられる用語「約」は、当該技術分野における通常の許容誤差の範囲内、例えば、平均値の2標準偏差以内であると理解される。約は、定められた値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、又は0.01%以内であると理解される。文脈から明確である場合を除いて、本明細書で提供された全ての数値は用語「約」で改変できる。

#### 【0134】

本明細書の可変基の定義の何れかにおける化学基のリストの記述は、1つの基又は列挙された基の組合わせとしてのその可変基の定義を包含する。本明細書の可変基又は態様に関する実施態様の記述は、1つの実施態様の何れか、又は他の実施態様或いはそれらの部分との組合わせとしてのその実施態様を包含している。

記号、

#### 【0135】

#### 【化1】



#### 【0136】

は分子構造の部分として用いられる場合、一重結合又はシス或いはトランス二重結合を示す。

本明細書で提供された組成物又は方法は何れも本明細書で提供された1つ又はそれ以上の他の組成物又は方法の何れかと組合わせることができる。

#### 【0137】

(インスリン分泌促進ポリペプチド)

本発明の別の態様は本発明のインスリン分泌促進ポリペプチドを提供し、これは本明細書で概説された方法に従って、本発明ポリペプチドのアミノ酸配列に沿った何れかの位置(複数も)を1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上の炭化水素架橋で改変できる。本発明は、エクセンジン-4、エクセナチド、胃抑制ポリペプチド前タンパク質(GIPP)、胃抑制ペプチド(GIP)、グルカゴン様ペプチド-1前駆体(GLP-1P)、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、グルカゴン様ペプチド-2(GLP-2)、GLP-1の断片、リラグルチド、タスポグルチド、アルビグルチド及びLY2189265(これらの全ては炭化水素架橋による構造強化のために本発明の各種実施態様において鋳型として用いることができる例示的なインスリン分泌促進ポリペプチドである(図1を参照されたい))を包含する、天然又は合成起源の、及びインスリン分泌促進特性を有していることが知られているか又は未だ確認されていないポリペプチドを含んでいるかもしれない、特定のインスリン分泌促進ポリペプチドの何れかに限定されない。インスリン分泌促進ポリペプチドは上記のこれらのポリペプチドの何れかの同族体、類縁体、誘導体、機能的な断片又は模倣体も包含できる。

#### 【0138】

本発明のインスリン分泌促進ポリペプチド、例えば、エクセナチドの何れかのα螺旋は、本明細書に記載されている炭化水素架橋のための方法を用いるか、又は米国特許出願公

開第2006/0014675A1号、同第2006/0008848A1号、同第2004/0171809A1号及び米国特許第7,723,469号、同第7,192,713号、及び同第7,084,244号公報（これらはそれぞれ参照により本明細書に取り込まれている）に記載の方法教示に従って、少なくとも1つの炭化水素架橋で安定化できる。別の実施態様では、少なくとも2つ、3つ、又は4つも或いは12まで又はそれ以上も含む、1つ以上の炭化水素架橋を本発明のエクセナチドを安定化するために用いることができる。改変されたポリペプチドの何れかで用いるのに適している炭化水素架橋は、本明細書に、又は米国特許出願公開第2005/0250680号公報に或いは米国特許第7,723,469号公報（「安定化した $\alpha$ 螺旋ペプチド及びその使用」）（これらそれぞれはその全てが参照により取り込まれている）に記載されている。炭化水素架橋化は、螺旋二次構造を有する傾向があるポリペプチドが、その生来の螺旋配座を保持してその安定性及び有効性を増大することを可能にする。一実施態様では、円偏光二色性で確認すると、水溶液中の改変ポリペプチドは少なくとも10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、又は90%又はそれ以上の螺旋性を有している。円偏光二色性を確認するアッセイは当該技術分野で公知であって本明細書に記載されている。

10

#### 【0139】

特定の実施態様では、本発明のインスリン分泌促進ポリペプチド、例えば、エクセナチドは、N-末端の近くに1つの炭化水素架橋を包含できる。別の特定の実施態様では、本発明のインスリン分泌促進ポリペプチド、例えば、エクセナチドは、C-末端の近くに1つの炭化水素架橋を包含できる。その他の特定の実施態様では、本発明のエクセナチドは配列の中間でN-及びC-末端の間の何れかの位置に炭化水素架橋を包含できる。更に別の実施態様では、本発明のエクセナチドは1つの炭化水素架橋をC-末端の近くに、そして別の炭化水素架橋をN-末端の近くに包含できる。更に別の実施態様では、本発明のエクセナチドは1つの炭化水素架橋をC-末端の近くにそして別の炭化水素架橋を配列の中間に、或いは1つの炭化水素架橋をN-末端の近くにそして別の炭化水素架橋を配列の中間に包含できる。

20

#### 【0140】

更に別の実施態様では、本発明のインスリン分泌促進ポリペプチドは、N-末端又はC-末端の何れかから連続的に、或いは短縮された変異体内に炭化水素架橋を挿入しているN-及びC-末端から代替え方法で切断できる。

30

#### 【0141】

本発明の架橋されたポリペプチドの例は図7に示されている。

#### 【0142】

炭化水素架橋されたポリペプチドは2つのアミノ酸の間に鎖を包含していて、この鎖はポリペプチドの螺旋二次構造を有意に強化する。一般に、この鎖は1つ又は2つの螺旋回転にわたり広がる（すなわち、約3,4又は約7アミノ酸）。従って、 $i$ と $i+3$ ； $i$ と $i+4$ ；又は $i$ と $i+7$ に位置しているアミノ酸は化学改変及び架橋結合の理想的な候補である。それにより、本発明の改変されたポリペプチドのアミノ酸残基の何れかを上記に適合させて連結（例えば、架橋結合）できる。適切な鎖は本明細書及び米国特許公開第2005/0250680号公報並びに米国特許第7,723,469号公報（両者は参照により本明細書に取り込まれている）に記載されている。炭化水素架橋のような鎖を別の間隔で位置づけて、螺旋変異体（例えば、異なった傾斜、角度又は回転当りのそれらの残基及び画分を伴い）又は螺旋以外の構造を進展できるということが理解される。

40

#### 【0143】

更なる実施態様では、第1アミノ酸（ $i$ ）と、第1アミノ酸の3アミノ酸下流にある、第2アミノ酸（ $i+3$ ）を結合するように、炭化水素架橋を位置づける。別の実施態様では、第1アミノ酸（ $i$ ）と、第1アミノ酸の4アミノ酸下流にある、第2アミノ酸（ $i+4$ ）を結合するように、炭化水素架橋を位置づける。更に別の実施態様では、第1アミノ酸（ $i$ ）と、第1アミノ酸の7アミノ酸下流にある、第2アミノ酸（ $i+7$ ）を結合する

50

ように、炭化水素架橋を位置づける。

#### 【0144】

(インスリン分泌促進ポリペプチドの突然変異、切断、及び延長)

本発明は同類又は非同類アミノ酸置換を有するインスリン分泌促進ペプチド（例えば、エクセナチド）を意図している。同類アミノ酸置換は、例えばグルタミン酸（E）をアスパラギン酸（D）に、アスパラギン酸（D）をアスパラギン（N）に、そしてグルタミン酸（E）をグルタミン（Q）にアミノ酸置換するような、1つ又はそれ以上のアミノ酸を電荷、大きさ、及び／又は疎水性特性が類似しているアミノ酸と置き換えることからなる。非同類置換は、例えば、グルタミン酸（E）をバリン（V）に置換するような、1つ又はそれ以上のアミノ酸を非類似の電荷、大きさ、及び／又は疎水性特性を保持しているアミノ酸と置き換えることからなる。置換は同類又は非同類の非天然アミノ酸の使用を包含

10

#### 【0145】

アミノ酸挿入は単一のアミノ酸残基又は残基の伸張からなる。挿入は、全長又は切断したエクセナチドペプチドのカルボキシ又はアミノ末端で、さらにはペプチドの内部の位置で行うことができる。このような挿入は一般に長さが2～15アミノ酸の範囲である。目的のペプチドのカルボキシ又はアミノ末端の何れかで行われる挿入は、好ましくは約2～約50アミノ酸による、広い大きさの範囲のものでよいことが意図されている。1つ又はそれ以上のこのような挿入は、そのような挿入により相当する出発ポリペプチド（例えば、配列番号1で表される改変エクセナチド）の活性を少なくとも約50%、又は60%、又は70%、又は80%、又は90%、又は95%、又は99%、又はそれ以上未だ示すことのできる改変ペプチドがもたらされる限り、全長又は切断型インスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、エクセナチド）に導入することができる。このような変更は、経口投与可能なままであり、そして／又は血液及び組織中での長期に渡る安定性を保持しているエクセナチド変異体ももたらす。

20

#### 【0146】

全長又は切断型エクセナチドペプチドの欠失も本発明の範囲内である。このような欠失は、エクセナチドペプチド；又はエクセナチド変異体から、得られるペプチド配列が4、5、又は6アミノ酸であるという長さの下限つきで、1つ又はそれ以上のアミノ酸を除去することからなる。このような欠失は、ペプチド配列の単一の隣接する或いは1つ以上の別々の位置を含む。このような欠失が、相当する出発ポリペプチド（例えば、配列番号1の改変エクセナチド）の活性を、少なくとも約50%、又は60%、又は70%、又は80%、又は90%、又は95%、又は99%又はより高く未だ示すことができ、好ましく経口投与可能であり、そして／又は血中及び組織中で長期に渡る安定性を保持しているペプチドをもたらし限り、1つ又はそれ以上のそのような欠失を全長又は切断型インスリン分泌促進ペプチド（例えば、エクセナチド）に導入できる。

30

#### 【0147】

(インスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、エクセナチド）の安定化)

本発明の改変したインスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、エクセナチド）は構造的に拘束されている（例えば、安定化させた、架橋した）螺旋であり、そして／又は生理学的状況から取り出されたときに生物活性形状を失い得るよう、元来の配列と比べてペプチドの構造的柔軟性を制限する天然及び／又は非天然アミノ酸を取り込むために、元来の（すなわち、野生型の或いは天然の）配列と比べて1つ又はそれ以上のアミノ酸配列の改変を含んでいる。好ましくは、本発明のインスリン分泌促進ポリペプチドは、炭化水素架橋のような、少なくとも1つの分子鎖を含んでいる。炭化水素架橋は米国特許出願公開第2005/0250680号公報又は米国特許第7,723,469号公報（これらはその全てが参照により本明細書に取り込まれている）に、更には Walensky et al. Science, 2004, 305: 1466-70; Walensky et al. Mol. Cell 2006, Oct 20;24(2):199-210; Bernal et al. J Am Chem Soc. 2007 Apr 25;129(16):5298; Danial et al Nat Med 2008, 2008 Feb;14(2):144-53. Epub 2008 Jan 27; Gavathiotis et al Nature 2008, Oct 23;455(

40

50

7216):1047-9; Stewart et al. Nature Chem Bio 2010 Jun 20 (electronically)に、更には米国特許出願公開第2006/0014675A1号、同第2006/0008848A1号、同第2004/0171809A1号、並びに米国特許第7,192,713号、及び同第7,084,244号（これらはそれぞれ参照により本明細書に取り込まれている）に記載されており、これらは全てが参照により本明細書に取り込まれている。

#### 【0148】

ペプチド $\alpha$ 螺旋は、比較的大きい接触表面に渡って順序よく正確に配列されている特定のアミノ酸残基を提示することにより非常に重要なタンパク質相互作用に参与している（Chittenden, T., et al., Embo Journal, 1995. 14(22):p. 5589-5996; Kussie, P.H., et al., Science, 1996. 274(5289):p. 948-953; Ellenberger, T.E., et al., Cell, 1992. 71(7):p. 1223-1237）。 $\alpha$ 螺旋ドメイン及び他のタンパク質構造特性は、タンパク質の残余部分の骨格配列によって安定化されることが多く、これは螺旋構造、例えば、 $\alpha$ 螺旋構造の形成及び維持を促す。文脈から切り離すと、 $\alpha$ 螺旋ペプチドのモチーフは広げることができ、生物活性の欠損を誘導する。重大な挑戦は、その天然の $\alpha$ 螺旋構造を促進及び／又は維持を含む $\alpha$ 螺旋ペプチドを開発すること及びタンパク質分解、酸及び熱分解に耐えて、よってインビボにおいて無傷のままを保つことができるペプチドを製造することである。

#### 【0149】

例えば、本発明の構造的に拘束されているペプチドはエクセナチドポリペプチドの $\alpha$ 螺旋ドメインを包含できる。ある例では、構造的に拘束されているペプチドはN-末端の炭化水素架橋で拘束されている。ある例では、構造的に拘束されているペプチドはC-末端の炭化水素架橋で拘束されている。別の例では、構造的に拘束されているペプチドはペプチドの中央にある炭化水素架橋で拘束されている。更に別の例では、構造的に拘束されているペプチドは1つ以上の炭化水素架橋で拘束されていて、例えば、そこでは鎖の少なくとも1つ又は両方がペプチドの末端又はその近くにある（すなわち、ペプチドのN-又はC-末端から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15番目の残基から始まる）。特定の実施態様では、エクセナチドペプチドは、N-及びC-末端の両方に又はその近くに鎖を含んでいる（すなわち、ペプチドのN-又はC-末端から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15番目の残基から始まる）。炭化水素架橋（多重架橋）の配置は所定のインスリン分泌促進ポリペプチドの長さ方向に沿ってどの位置（又は位置の組合わせ）であってもよいので、炭化水素架橋化についての特定の位置は決して限定されているわけではない。このような位置は、本明細書の図面に記載及び示されている架橋走査方法を用いて過度な実験無しで、経験的に決定及び最適化できる。

#### 【0150】

炭化水素架橋されたポリペプチドは、2つのアミノ酸の間に鎖（架橋）を含んでいて、この鎖はポリペプチドの螺旋二次構造を有意に強化する。一般に、鎖は1つ又は2つの螺旋回転にわたり広がっている（すなわち、約3～3.6又は約7アミノ酸）。従って、 $i$ と $i+3$ ； $i$ と $i+4$ ；又は $i$ と $i+7$ に位置するアミノ酸は化学修飾及び架橋のために理想的な候補である。従って、例えば、ペプチドが配列...X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9...を有している場合は、X1とX4の間、又はX1とX5の間、又はX1とX8の間の架橋は、X2とX5の間、又はX2とX6の間、又はX2とX9の間、などの架橋と同様に有用である。複数の架橋（例えば、2、3、4、又はそれ以上）も達成されていて、個々の架橋付加の利点を組合わせている。（例えば、改善された螺旋性及び活性；改善された螺旋性及び熱安定性；改善された螺旋性及び酸安定性；改善された螺旋性と薬理学的特性）。従って、本発明は、更に配列を安定化するためか、或いは構造的安定性、タンパク質分解耐性、熱安定性、酸安定性、薬理学的特性、及びより長いポリペプチドストレッチの生物学的活性増強を促進するために、ポリペプチド配列内に1つ以上の架橋を取り込むことを包含している。本発明は、連続して生じる架橋又は鎖の対を「縫い合わせ」配置中に形成できる、すなわち、ここでは、例えば、図5Bに例示

したように、最初に生じる鎖の終端を第2の連続して発生する架橋の開始と同じ残基を起源とすることも意図している。

【0151】

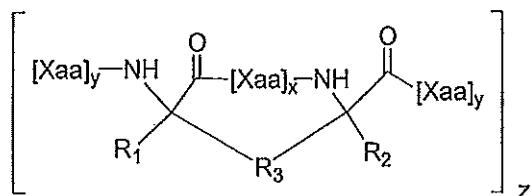
本発明のある実施態様では、鎖、例えば、炭化水素架橋を螺旋以外の構造を安定化するために用いる。このような場合は、鎖の末端を  $i$ 、 $i+3$ 、 $i+4$ 、及び  $i+7$  以外の間隔で配置させることができる。例えば、ペプチドドメインのねじれ領域を安定化して螺旋のような平坦な連続面ではなく湾曲した表面を産生するために分子鎖を用いることができる。アミノ酸配列及び鎖の端部の配置が、鎖が架けられているアミノ酸の数を決定する。このような検討は当業者によく理解されるだろう。

【0152】

一実施態様では、本発明の改変ポリペプチドは式(I)を有している。

【0153】

【化2】



【0154】

式中の、 $R_1$  及び  $R_2$  は、独立して、H、又は  $C_1 \sim C_{10}$  アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、或いはヘテロシクリルアルキルであり；

$R_3$  は、アルキル、アルケニル、アルキニル； $[R_4 - K - R_4]_n$  であり；これらはそれぞれ0～6個の  $R_5$  で置換されている；

$R_4$  は、アルキル、アルケニル、又はアルキニルであり；

$R_5$  は、ハロ、アルキル、 $OR_6$ 、 $N(R_6)_2$ 、 $SR_6$ 、 $SOR_6$ 、 $SO_2R_6$ 、 $CO_2R_6$ 、 $R_6$ 、蛍光性部分、又は放射性同位元素であり；

Kは、O、S、SO、 $SO_2$ 、CO、 $CO_2$ 、CONR<sub>6</sub>、又は

【0155】

【化3】



【0156】

であり、

$R_6$  は、H、アルキル、又は治療薬剤であり；

nは、1～4の整数であり；

xは、2～10の整数であり；

それぞれのyは、独立して0～100の整数であり；

zは、1～10（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）の整数であり；そして

それぞれのXaaは、独立してアミノ酸である。

【0157】

改変ポリペプチドは、 $\alpha$ 螺旋を形成して、配列番号1～4で表わされるアミノ酸配列と30%又はそれ以上同一であるか、又はこれに由来する7連続アミノ酸を含有しているアミノ酸配列を包含でき、ここでXは何れかのアミノ酸であって、更に炭化水素架橋によっ

て結合しているアミノ酸残基を特定し、そしてBはメチオニン又はノルロイシンである。

【0158】

鎖は、アルキル、アルケニル、又はアルキニル部分（例えば、 $C_5$ 、 $C_8$ 又は $C_{11}$ アルキル或いは $C_5$ 、 $C_8$ 又は $C_{11}$ アルケニル、或いは $C_5$ 、 $C_8$ 又は $C_{11}$ アルキニル）を包含できる。連結アミノ酸は $\alpha$ ジ置換（例えば、 $C_1 \sim C_3$ 又はメチル）されていてもよい。

【0159】

ある例では、 $x$ が2、3、又は6である。

【0160】

ある例では、それぞれの $y$ が独立して、3と15の間の整数である。

10

【0161】

ある例では、それぞれの $y$ が独立して1と15の間の整数である。

【0162】

ある例では、 $R_1$ と $R_2$ がそれぞれ独立して、H又は $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

【0163】

ある例では、 $R_1$ と $R_2$ がそれぞれ独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキルである。

【0164】

ある例では、少なくとも1つの $R_1$ と $R_2$ がメチルである。例えば、 $R_1$ と $R_2$ の両方がメチルである。

【0165】

20

ある例では、 $R_3$ がアルキル（例えば、 $C_8$ アルキル）であり、そして $x$ が3である。

【0166】

ある例では、 $R_3$ が $C_{11}$ アルキルであり、そして $x$ が6である。

【0167】

ある例では、 $R_3$ がアルケニル（例えば、 $C_8$ アルケニル）であり、そして $x$ が3である。

【0168】

ある例では、 $x$ が6であり、そして $R_3$ が $C_{11}$ アルケニルである。

【0169】

ある例では、 $R_3$ が直鎖のアルキル、アルケニル、又はアルキニルである。

30

【0170】

ある例では、 $R_3$ が  $--CH_2--CH_2--CH_2--CH=CH--CH_2--CH_2--CH_2--$  である。

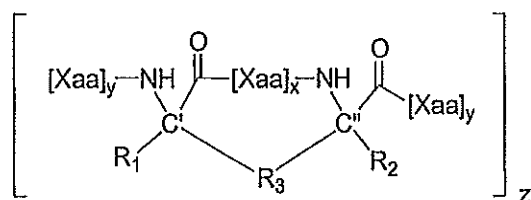
【0171】

ある特定の実施態様では、 $\alpha$ 、 $\alpha$ ジ置換立体中心の両方がR配置又はS配置である（例えば、 $i$ 、 $i+4$ 架橋）か、或いは一方の立体中心がRで他方がSである（例えば、 $i$ 、 $i+7$ 架橋）。従って、ここで式（I）を

【0172】

【化4】

40



【0173】

と描く。

例えば、 $x$ が3であるときは、 $C'$ 及び $C''$ ジ置換立体中心は共にR配置であるか、或

50

いはこれらは両方が S 配置にある。x が 6 のときは、C' ジ置換立体中心は R 配置にあり、そして C'' ジ置換立体中心は S 配置にある。R<sub>3</sub> 二重結合は E 又は Z の立体化学配置であってよい。

#### 【0174】

ある実施態様では、R<sub>3</sub> が [R<sub>4</sub>--K--R<sub>4</sub>] であり、そして R<sub>4</sub> が直鎖のアルキル、アルケニル、又はアルキニルである。

#### 【0175】

ある実施態様では、改変ポリペプチドは、インスリン分泌促進ポリペプチドの少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50 個、又はそれ以上の連続アミノ酸を含んでいる。それぞれの [Xaa]<sub>y</sub> は独立して、インスリン分泌促進ポリペプチド、例えば、図 1 の配列の少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25 個又はそれ以上の連続アミノ酸を含むことができる。

10

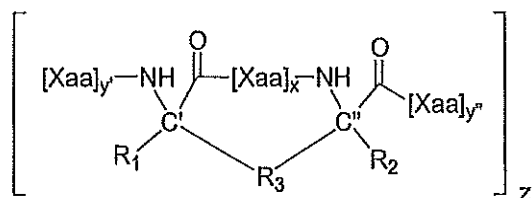
#### 【0176】

改変ポリペプチドは、インスリン分泌促進ポリペプチド、例えば図 1、の 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50 連続アミノ酸を含有でき、ここで 2、3 又は 6 個のアミノ酸により分離されている 2 つのアミノ酸は R<sub>3</sub> を介して結合しているアミノ酸置換基によって置き換えられている。従って、少なくとも 2 つのアミノ酸は連結アミノ酸又は連結アミノ酸置換によって置き換えることができる。従って、ここで式 (I) は

20

#### 【0177】

#### 【化 5】



30

#### 【0178】

と描け、[Xaa]<sub>y'</sub> 及び [Xaa]<sub>y''</sub> はそれぞれ同一又は異なった 7 回繰り返し又は 7 回繰り返し様ドメイン由来の連続ポリペプチド配列を包含できる。

#### 【0179】

本発明は、インスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、図 1 の配列）の 10（11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50 又はそれ以上）連続アミノ酸を含有している架橋されたポリペプチドを特徴としており、ここでは 2、3 又は 6 個のアミノ酸で分離されている 2 つのアミノ酸の α 炭素が R<sub>3</sub> を介して結合して、2 つの α 炭素のうちの 1 つが R<sub>1</sub> で置換され、他方が R<sub>2</sub> で置換されていて、それぞれがペプチド結合を介してさらなるアミノ酸と結合している。

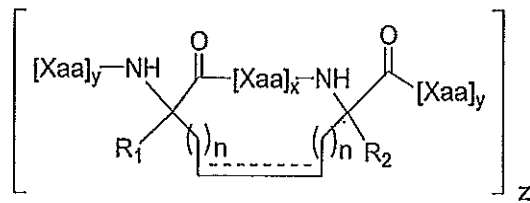
40

#### 【0180】

別の実施態様では、本発明の改変ポリペプチドは式 (II) を有している。

#### 【0181】

【化 6】



【 0 1 8 2 】

10

式中の、 $R_1$  及び  $R_2$  は、それぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、又はヘテロシクリルアルキルであり；

それぞれの  $n$  は独立して、 $1 \sim 15$  の整数であり；

$x$  は、2、3、又は6であり；

それぞれの  $y$  は独立して、 $0 \sim 100$  の整数であり；

z は 1 ~ 10（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）の整数であり；

それぞれの X a a は、独立してアミノ酸である。

【 0 1 8 3 】

20

改変ポリペプチドは、 $\alpha$ 螺旋を形成して、そして配列番号 2、15～38（エクセナチド）及び 39～62（GLP-1（7～37））で表わされるアミノ酸配列と 30%又はそれ以上同一であるか、又はこれに由来する 7 連続アミノ酸を含有していて  $\alpha$ 螺旋を形成するアミノ酸配列を有することができ、ここで X は何れかのアミノ酸であって、更に炭化水素架橋によって結合しているアミノ酸残基を特定して、そして B はメチオニン又はノルロイシンである。改変ポリペプチドは、 $\alpha$ 螺旋を形成して、配列番号 2、15～38（エクセナチド）及び 39～62（GLP-1（7～37））で表わされる配列を有するアミノ酸配列と少なくとも 30%又はそれ以上同一であるか、又はこれに由来する 3 連続、好ましくは 7 連続アミノ酸、或いはペプチドによって形成された螺旋の面からの少なくとも 2 個のアミノ酸を含有している、アミノ酸配列を包含でき、ここで X は何れかのアミノ酸であって、更に炭化水素架橋によって結合しているアミノ酸残基を特定し、そして B はメチオニン又はノルロイシンである。

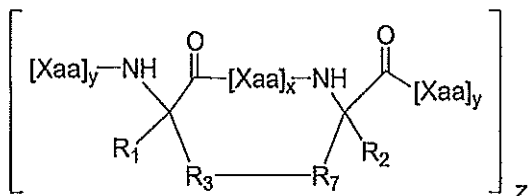
30

【 0 1 8 4 】

さらに別の実施態様では、本発明の改変ポリペプチドは式（ⅢⅢ）を有している。

【 0 1 8 5 】

【化 7】



40

【 0 1 8 6 】

式中の、 $R_1$  及び  $R_2$  は、それぞれ独立して、H、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、又はヘテロシクリルアルキルであり；

R<sub>3</sub> は、アルキル、アルケニル、アルキニル、[R<sub>4</sub>--K--R<sub>4</sub>] 又は天然アミノ酸側鎖であって、これらのそれぞれは 0～6 個の R<sub>5</sub> で置換されている；

R<sub>4</sub> は、アルキル、アルケニル、又はアルキニルであり；

50

$R_5$  は、ハロ、アルキル、 $OR_6$ 、 $N(R_6)_2$ 、 $SR_6$ 、 $SOR_6$ 、 $SO_2R_6$ 、 $CO_2R_6$ 、 $R_6$ 、蛍光性部分、又は放射性同位元素であり；

$K$  は、 $O$ 、 $S$ 、 $SO$ 、 $SO_2$ 、 $CO$ 、 $CO_2$ 、 $CONR_6$ 、又は

【0187】

【化8】



【0188】

10

であり；

$R_6$  は、 $H$ 、アルキル、又は治療薬剤であり；

$R_7$  は、アルキル、アルケニル、アルキニル、 $[R_4--K--R_4]$  又は天然アミノ酸側鎖であって、これらのそれぞれは0～6個の $R_5$ で置換されていて；

$n$  は、1～4の整数であり；

$x$  は、2～10の整数であり；

それぞれの $y$ は独立して、0～100の整数であり；

$z$  は、1～10（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）の整数であり；そして

それぞれの $X_{aa}$ は、独立してアミノ酸である。

20

【0189】

改変ポリペプチドは、 $\alpha$ 螺旋を形成して、配列番号2、15～38（エクセナチド）及び39～62（GLP-1（7～37））で表わされる配列を有するアミノ酸配列と少なくとも30%又はそれ以上同一であるか、又はこれに由来する7連続アミノ酸、或いはペプチドによって形成された螺旋の面からの少なくとも2個のアミノ酸を含有している、アミノ酸配列を包含でき、ここで $X$ は何れかのアミノ酸であって、更に炭化水素架橋によって結合しているアミノ酸残基を特定し、そして $B$ はメチオニン又はノルロイシンである。

【0190】

炭化水素鎖を記載しているが、別の鎖も想定されている。例えば、鎖は、1つ又はそれ以上のエーテル、チオエーテル、エステル、アミン、又はアミド部分を包含できる。ある場合は、天然アミノ酸側鎖を鎖の中に取り込むことができる。例えば、鎖はセリン中のヒドロキシル、システイン中のチオール、リジン中のアミン、アスパラギン酸又はグルタミン酸中の酸、或いはアスパラギン又はグルタミン中のアミドのような官能基と結合できる。従って、2つの非天然アミノ酸を結合して作られる鎖を用いるよりむしろ、天然アミノ酸を用いて鎖を作ることも可能である。単一の非天然アミノ酸を天然のアミノ酸と共に用いることも可能である。

30

【0191】

鎖の長さの変更可能であるということが更に想定されている。例えば、二次構造に比較的高度な拘束をもたらすことが望ましい場合により短い鎖を用いることができ、一方、ある場合は二次構造に低い拘束を与えることが望ましく、そのためにより長い鎖が望まれるだろう。アミノ酸配列が螺旋を形成する傾向を持たない場合は、アミノ酸配列部位に又はその中への鎖の挿入は螺旋形成をもたらさないということも更に理解できる。

40

【0192】

更に、 $\alpha$ 螺旋の単一面に主として存在する鎖を提供するために、アミノ酸 $i \sim i+3$ 、 $i \sim i+4$ 及び $i \sim i+7$ を架橋する鎖の例を記載しているが、 $\alpha$ 螺旋以外の構造を促進及び／又は保持するためにアミノ酸の数の任意の組み合わせを架橋するように鎖を合成できる。

【0193】

当業者には当然のことながら、本明細書に記載されている化合物を合成する方法は当業者には明白であろう。さらに、様々な合成工程を代替え順序又は順番で実施して望ましい

50

化合物を得ることができる。本明細書に記載されている化合物を合成するのに有用な合成化学変換及び保護基の手順（保護及び脱保護）は当該技術分野で公知であって、例えば、R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); 及び L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995)、並びにその続版に記載されているようなものを包含する。特定のペプチド合成方法は本発明を限定するものではない。

#### 【0194】

10

（本発明のポリペプチドの合成）

本発明のペプチドは、当業者に周知であって本明細書に記載されている、化学合成方法によって作成できる。例えば、Fields et al., Chapter 3 in *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, p. 77 を参照されたい。従って、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer Model 430A 又は 431 或いは the AAPPTEC multichannel synthesizer APEX 396 上で側鎖保護アミノ酸を用いる、t-Boc 又は Fmoc 化学の何れかで保護した  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> で固相合成の自動化メリフィールド技術を用いてペプチドを合成できる。

#### 【0195】

20

本明細書に記載されているペプチドを作る 1 つの方法は、固相ペプチド合成（SPPS）の利用である。C-末端アミノ酸をリンカー分子を用いて酸に不安定な結合によって架橋ポリスチレン樹脂に結合する。この樹脂は合成用の溶媒に不溶であるので、過剰な試薬及び副産物を比較的容易且つ迅速に洗浄できる。N-末端を、酸に安定であるが、塩基によって除去できる、Fmoc 基で保護する。側鎖官能基の何れもを塩基に安定で、酸に不安定な基で保護する。

#### 【0196】

30

より長いペプチドも天然の化学ライゲーションを用いて、個々の合成ペプチドを対等接続することによって作成できる。あるいは、より長い合成ペプチドを周知の組み換え DNA 技術によって合成できる。このような技術は、詳細なプロトコルを有する周知の標準マニュアルに提供されている。本発明のペプチドをコードするコード配列を構築するために、好ましくは遺伝子を発現する有機体に最適なコドンを用いて、アミノ酸配列を逆翻訳してアミノ酸配列をコードする核酸配列を得る。次に、典型的には、ペプチド及び、必要に応じて、いくつかの調節エレメントをコードするオリゴヌクレオチドを合成して、コード配列を作成する。コード配列を適切なクローニングベクターに挿入して宿主細胞内にトランスフェクトする。更に、炭化水素架橋のための非天然アミノ酸を取り込めるように宿主細胞を操作する。次いで、選択した発現系及び細胞に相応しい適切な条件下でペプチドを発現する。Liu et al. *Proc. Nat. Acad. Sci (USA)*, 94:10092-10097 (1997) を参照されたい。ペプチドを精製して、標準的な方法で特徴付ける。

#### 【0197】

40

ペプチドは、ハイスループットな、コンビナトリアル方法、例えば、Advanced Chemtec h/APPTTEC から入手できるような、ハイスループットポリケミカルコンビナトリアル合成器を用いて、作成できる。

#### 【0198】

（本発明のインスリン分泌促進ポリペプチドの活性をアッセイする）

本発明の構造的に拘束されているインスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、エクセナチド）の、インビトロ、インビボの何れか又は好ましくは両方における、インスリンの産生を増強する能力を評価する方法が本明細書に記載されている。特に、このようなアッセイは以下に及び実施例に記載されている。インスリンを増強するエクセナチドの活性を評価するためのさらなるアッセイは、当該技術分野の当業者に周知である。更に、経口送達されたときの改善されたバイオアベイラビリティ、及び、これに限定されないが、何れ

50

かの経路で投与されたときの延長された半減期、その増強された $\alpha$ 螺旋性、その改善された熱安定性及びプロテアーゼ耐性、並びにその増大された機能活性及び薬理学的特性、並びに改善されたバイオアベイラビリティを包含する、本発明のポリペプチドのその他の利点を含む、本発明のインスリン分泌促進ポリペプチド（例えば、エクセナチド）のその他の態様及び特性を評価する方法が本明細書に記載されている。これらの特性の多くは明細書に記載されていて明らかにされている；しかし、当業者は過度の実験をせずに本発明のインスリン分泌促進ポリペプチドにもたらされた改善された特性を公知の方法及びアッセイを用いて確認できるということに留意されたい。例えば、アッセイは、プロテアーゼ耐性のアッセイ、血漿安定性のアッセイ、薬物動態アッセイ、GLP-1受容体結合アッセイ、GLP-1受容体第2メッセンジャーシグナル伝達アッセイ、グルコース刺激インスリン放出細胞アッセイ、インスリン分泌促進ペプチド処置に応答する血清グルコース及びインスリン濃度のインビボ観察、及び血中のインスリン、グルカゴン又はその他の糖調節成分の量を測定する一般的なELISA又は抗体に基づく方法を包含し、これらの全ては本明細書の実施例の文脈において、更には当業者が保有している知識に基づいて理解されるだろう。このようなアッセイ及び測定の全ては過度な実験なしで実施できる。

10

#### 【0199】

特定の例では、インスリン分泌促進活性は、サンプル中のインスリンを検出することによって測定できる。本発明は非改変インスリン分泌促進ポリペプチドのインスリン分泌促進活性を上回るか又はそれと等しい改変インスリン分泌促進ポリペプチドに関する。薬剤のインスリン分泌促進特性は、薬剤を動物細胞に供給するか、又は薬剤を動物に注射して、免疫反応性インスリン（IRI）の、それぞれ培地中へ又は動物の循環系への放出を観察することによって確認できる。IRIの存在はインスリンを特異的に検出できるラジオイムノアッセイの使用によって検出できる。

20

#### 【0200】

IRIの存在を検出できるラジオイムノアッセイはどれも利用できるが、1つの特定方法は、Albano, J. D. M., et al., (Acta Endocrinol. 70:487-509 (1972))のアッセイ方法の改変を使用する。この改変では、pH 7.4のリン酸／アルブミン緩衝液を用いる。500  $\mu$ Lのリン酸緩衝液、50  $\mu$ Lのサンプル灌流液又はラット標準インスリンの灌流液、100  $\mu$ Lの抗インスリン抗血清（Wellcome Laboratories; 1:40, 000希釈）、及び100  $\mu$ Lの $[^{125}\text{I}]$ インスリンを、10 $\times$ 75 mmの使い捨てガラス管中で総容量750  $\mu$ Lにして、連続条件で培養を調製する。4 $^{\circ}\text{C}$ で2～3日培養した後、遊離インスリンを、抗体結合インスリンから活性炭分離で分離する。アッセイの感度は通常1～2  $\mu$ lU/mlである。組織培養中で細胞生育する細胞培養培地へのIRIの放出を測定するために、プロインスリンへ放射活性標識を取り込むことが好ましい。ポリペプチドを標識できる放射活性標識は何れも利用できるが、プロインスリンの標識を得るために、 $^3\text{H}$ ロイシンを使用することが好ましい。標識化はプロインスリン分子の検出可能な標識化プールを形成するために十分である期間の何れでも行うことができるが；しかし、放射活性標識の存在下で60分間細胞を培養することが好ましい。化合物がインスリン分泌促進効果を有しているか否かを確認するためにインスリンを発現できるどの細胞株も利用できるが、ラットインスリノーマ細胞、特にRIN-38ラットインスリノーマ細胞を使用することが好ましい。このような細胞は何れの適切な培地中でも生育できるが；しかし、0.1%のBSA及び25 mMのグルコースを含有しているDME培地を用いることが好ましい。

30

40

#### 【0201】

本発明の炭化水素架橋されたポリペプチドのインスリン分泌促進特性は膵臓インスリンによっても確認できる。in situ 単離された灌流ラット膵臓調製液はPenhos, J. C., et al. (Diabetes 18:733-738 (1969))の方法の改変である。このような方法によると、体重350～650 gの、絶食させたラット（好ましくは雄性チャールスリバー系シロネズミ）をアモバルビタール塩（Eli Lilly and Co., 160 mg/kg）の腹腔内注射で麻酔する。腎臓、副腎、胃、及び下部結腸の血管を結紮する。十二指腸の約4 cm並びに下

50

行結腸及び直腸以外の全ての腸を切除する。従って、腸のほんの一部分を灌流して、インスリン分泌促進性免疫反応性を有する腸溶性物質による可能性のある妨害を最小化する。灌流液は、4%のデキストランT70及びウシ血清アルブミン（画分V）を有する改変クレブスリンゲル重炭酸塩緩衝液であってよく、そして95%の $O_2$ 及び5%の $CO_2$ で泡立てることができる。非拍動流、4チャンネルのローラーベアリングポンプ（Buchler polystatic, Buchler Instruments Division, Nuclear-Chicago Corp.）を使用でき、そして一方灌流源から他方への切り替えを三方活栓を切り替えて行える。灌流を実施し、改変し、そして分析する方法は、Weir, G. C., et al., (J. Clin. Investigat. 54:1403-1412 (1974))の方法に従うことができ、これは参照により本明細書に取り込まれている。

#### 【0202】

10

（医薬組成物及び投与経路）

1つ又はそれ以上の本発明の構造的に拘束されているインスリン分泌促進ポリペプチドを、2型糖尿病及び関連疾患を予防及び／又は治療する医薬組成物中で用いることができる。医薬品の併用は糖尿病のような、複雑で危険な疾患の治療によく用いられる。本明細書で提供される治療及び予防方法は構造的に拘束されているインスリン分泌促進ポリペプチドの組み合わせを用いて実施でき、これは耐性の進展を抑えるように選択及び組み合わせ可能で、或いは対象の疾患の状態及び特質に基づいて選択又は組み合わせることができる。本発明の医薬組成物は2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又はそれ以上の構造的に拘束されているポリペプチドを包含できる。構造的に拘束されているペプチドを他の薬剤、例えば、糖尿病を治療するための公知処置剤又は治療剤と併用もできる。

20

#### 【0203】

本明細書で用いられるような、本発明の化合物は、その薬学的に許容される誘導体を包含すると定義される。「薬学的に許容される誘導体」は薬学的に許容される塩、エステル、エステルの塩又は本発明の化合物のその他の誘導体の何れかを意味し、これらは受容者に投与されると、本発明の化合物を（直接又は間接的に）提供可能である。特に好ましい誘導体は、このような化合物を哺乳動物に投与すると、本発明の化合物のバイオアベイラビリティを増大する（例えば、経口投与された化合物が、より速やかに血中に吸収され、血清安定性を増大し或いは化合物のクリアランス速度を減少できるように）か、又は親化合物の生体区画（例えば、脳又はリンパ系）への送達を親種と比べて増大するようなものである。誘導体は、水溶性又は腸膜を通過する能動輸送を増大する基が本明細書記載されている式の構造に付加している誘導体を包含する。

30

#### 【0204】

選択的な生物学的特性を増強するように適切な官能基を付加させることによって、本発明の化合物を改変できる。このような改変は当該技術分野で公知であって、所定の生体区画（例えば、血液、リンパ系、中枢神経系、脾臓）内への生物学的浸透を増大する、経口利用可能性を増大する、注射投与を可能にするよう溶解性を増大する、代謝を変える、そして排泄速度を変えるようなものを包含する。本発明の化合物の薬学的に許容される塩は、薬学的に許容される無機及び有機の酸及び塩基に由来するものを包含する。適切な酸塩の例は、酢酸塩、アジピン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸、ヨウ化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パルモ酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオンサン塩、サルチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩及びウンデカン酸塩を包含する。適切な塩基に由来する塩は、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）、アンモニウム及び $N-(アルキル)_4+$ 塩を包含する。本発明は本明細書に開示されている化合物の塩基性窒素含有基の何れかの四級化も想定している。水又は油に溶解又は分散可能な産物はこのような四級化で得ることができる。

40

#### 【0205】

50

本発明の化合物は、例えば、静脈内に、動脈内に、真皮下に、腹腔内に、筋肉内に、又は皮下に注射して；又は経口で、舌下に、経鼻で、経粘膜で、腔内に、子宮頸部に、局所的に、眼科用製剤で、又は吸入で、約0.001～約100mg／体重kg、又は特定の薬剤の必要に応じて、及びより好ましくは0.5～10mg／体重kg範囲の用量を投与できる。本明細書の方法は、望ましい或いは所定の効果を達成するための化合物又は化合物組成物の有効量を投与することを意図している。

#### 【0206】

好ましい組成物では、本発明のインスリン分泌促進ポリペプチドが経口投与用に製剤化される。適切な薬学的に許容される賦形剤、担体、溶媒、安定化剤等を本発明のエクセナチドペプチドの経口製剤を得るために用いることができる。経口送達は、錠剤、ピル、懸濁液、速放性ストリップ等によることを包含する、適切な方法の何れかでよい。

10

#### 【0207】

担体物質と混ぜて単回投与剤形を製造してもよい活性成分の量は、治療される宿主及び投与の特定の経路によって変化する。典型的な製剤は約1%～約95%（w／w）の活性成分を含有している。或いは、このような製剤は約20%～約80%の活性化化合物を含有している。

#### 【0208】

上で挙げたものより低いか又は高い用量も必要であろう。特定の患者に対する特定の用量及び治療計画は、用いられる特定化合物の活性、年齢、体重、全体的な健康状態、性別、食習慣、投与時刻、排泄の速度、薬剤の併用、病気、疾患又は症状の重症度及び経過、病気、疾患又は症状に罹りやすい患者の傾向、及び治療医師の判断を含む多種の因子によって決まる。

20

#### 【0209】

患者の疾患が改善されると、必要に応じて、本発明の化合物、組成物又は組み合わせの維持用量が投与されてもよい。続いて、投与の用量又は回数、又は両方を、症状に応じて、改善された疾患が維持されるレベルまで減少できる。しかし、患者は疾患症状の何らかの再発によって長期の間欠治療を必要とするかもしれない。

#### 【0210】

本発明の医薬組成物は、本発明の化合物又はその薬学的に許容される塩；及び、例えば、これに限定されないが、インスリン、スルホニル尿素類（トルブタミド（Orinase）、アセトヘキサミド（Dymelor）、トラザミド（Tolinase）、クロルプロバミド（Diabinese）、グリピジド（Glucotol）、グリブリド（Diabeta、Micronase、Glynase）、グリメピリド（Anaryl）、及びグリクラジド（Diamicron））、メグリチニド類（レパグリニド（Randin）、ナテグリニド（Starlix））、ビグアニド類（メトホルミン、フェンホルミン、ブホルミン）、チアゾリジンジオン類、αグルコシダーゼ阻害剤、DPP-4阻害剤、非架橋インクレチン模倣体、及びアミリン類縁体を包含する、糖尿病の予防及び／又は治療のための1つ又はそれ以上の治療薬剤を包含する追加の薬剤を含有している。

30

#### 【0211】

用語「薬学的に許容される担体又はアジュバント」は、本発明の化合物と一緒に、患者に投与できる担体又はアジュバントを示し、そしてこれは化合物の治療量を送達するのに十分な用量で投与したときに、その薬理学的活性を失わず、そして非毒性である。

40

#### 【0212】

薬学的に許容される担体、アジュバント及び賦形剤は、本発明の医薬組成物中で用いることができ、これに限定されないが、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、d-α-トコフェロールポリエチレングリコール100コハク酸塩のような自己乳化型薬物送達システム（SEDDS）、Tween（登録商標）又はその他の類似重合体送達マトリックスのような医薬剤形中で用いられる界面活性剤、ヒト血清アルブミンのような血清タンパク質、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウムのような緩衝物質、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩のような塩又は電解

50

質、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースからなる物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロック重合体、ポリエチレングリコール、及び羊毛脂を包含する。 $\alpha$  -、 $\beta$  -、及び $\gamma$  -シクロデキストリンのようなシクロデキストリンも本明細書に記載されている式の化合物の送達を増大するために有利に用いることができる。

#### 【0213】

本発明の医薬製剤は、経腸的に、例えば経口投与で、非経口で、吸入スプレーで、局所的に、経直腸で、経鼻で、舌下に、腔内に、又は移植した貯留槽を介して、好ましくは経口又は腔内投与、或いは注射による投与で、投与することができる。本発明の医薬組成物は、通常、非毒性の薬学的に許容される担体、アジュバント又は賦形剤の何れも含有できる。ある場合は、製剤のpHを、薬学的に許容される酸、塩基、又は緩衝剤を用いて調節して製剤化した化合物又は送達形態の安定性を増大することができる。本明細書で用いられる用語、非経口は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、病巣内、及び頭蓋内注射、又は輸液技術を包含する。

#### 【0214】

剤形の例は、これに限定されないが：錠剤；カプレット；ソフトゼラチンカプセルのような、カプセル；カシュエ；トローチ；薬用キャンディー；分散剤；坐剤；軟膏；パップ（湿布）；ペースト；粉剤；包帯剤；クリーム；プラスター；溶液；パッチ；エアゾール剤（例えば、経鼻スプレー又は吸入剤）；ゲル；懸濁液（例えば、水性又は非水性液体懸濁液、又は水中油型エマルジョン、又は油中水型液体エマルジョン）、溶液、及びエリキシル剤を包含する、患者への経口又は粘膜投与に適している液体剤形；患者への非経口投与に適している液体剤形；及び患者への非経口投与に適している液体剤形をもたらしように再構築できる滅菌固体（例えば、結晶又は非結晶固体）を包含する。

#### 【0215】

医薬組成物は滅菌注射製剤、例えば、滅菌注射水性又は油性の懸濁液のような形態にできる。この懸濁液は適切な分散及び湿潤剤（例えば、Tween 80（登録商標）のような）及び懸濁剤を用いて当該技術分野で公知の技術に従って製剤化できる。滅菌注射製剤も、非毒性で非経口投与に許容される希釈剤又は溶媒中の、例えば、1，3-ブタンジオール溶液のような、滅菌注射用溶液又は懸濁液であってよい。使用可能な許容される賦形剤又は溶媒には、マンニトール、水、リンゲル液及び等張食塩水がある。加えて、滅菌、固定油は溶媒又は懸濁媒体として従来通りに使用できる。この目的のために、合成モノー又はジグリセリドを包含する無菌固定油の何れかを使用できる。オリーブ油又はヒマシ油のような、天然の薬学的に許容される油が、特にそれらのポリオキシエチル化型において有用であるように、オレイン酸のような脂肪酸及びそのグリセリド誘導体は注射剤の製造に有用である。これらの油溶液又は懸濁液は、乳化剤又は懸濁液のような薬学的に許容される剤形の製剤化に通常用いられている長鎖アルコール希釈剤又は分散剤、又はカルボキシメチルセルロース或いは同様の分散剤も含むことができる。その他の通常用いられているツイーン或いはスパンのような界面活性剤及び／又は薬学的に許容される個体、液体、或いはその他の剤形の製造に通常用いられているその他の同様の乳化剤或いはバイオアベイラビリティ増強剤も製剤化の目的で用いることができる。

#### 【0216】

本発明の医薬組成物は、これに限定されないが、カプセル、錠剤、乳化剤及び水性懸濁剤、分散剤並びに溶液を包含する、経口投与が許容される何れかの剤形で経口投与できる。経口使用のための錠剤の場合は、通常用いられる担体は乳糖及びコーンスターチを包含する。ステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤も一般に加えられる。カプセル形態で経口投与する場合の、有用な希釈剤は乳糖及び乾燥コーンスターチを包含する。水性懸濁液及び／又は乳化剤を経口投与する場合は、活性成分を油層に懸濁又は溶解でき、これを乳化及び／又は懸濁剤と混合する。所望により、ある特定の甘味剤及び／又は着香料及び／又は着色剤を添加してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0217】

本発明の医薬組成物は、直腸内投与用の坐剤の形態でも投与できる。これらの組成物は、本発明の化合物を、室温では個体であるが直腸の温度では液体であるので直腸内で融解して活性化合物を放出する、適切な非刺激性賦形剤と混合することによって製造できる。このような物質は、これに限定されないが、ココアバター、蜜蝋及びポリエチレングリコールを包含する。

## 【0218】

本発明の医薬組成物は局所に又は腔内に投与できる。この医薬組成物は担体に懸濁又は溶解した活性成分を含んでいる適切な軟膏を用いて製剤化される。本発明の化合物を局所投与するための担体は、これに限定されないが、鉱物油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン ポリオキシプロピレン化合物、乳化蠟及び水を包含する。あるいは、医薬組成物は、担体に懸濁又は溶解した活性化合物を含有している適切なローション又はクリームを用いて製剤化できる。更に別の実施態様では、医薬組成物を腔リングとして製剤化される。適切な担体は、これに限定されないが、鉱物油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール及び水を包含する。本発明の医薬組成物は直腸坐薬製剤で、又は適切な注腸製剤で下部腸管に局所適用することもできる。局所経皮パッチ及びイオン導入投与も本発明に含まれる。一実施態様では、本発明の化合物は性行為感染症の予防的治療として腔内に投与される。

## 【0219】

本発明の医薬組成物は鼻エアゾール又は吸入によって投与できる。このような組成物は医薬製剤の技術分野で周知の技術によって製造でき、そしてベンジルアルコール又はその他の適切な保存剤、バイオアベイラビリティを増強する吸収促進剤、フッ化炭素類、及び／又は当該技術分野で公知の溶解又は懸濁化剤を用いて、生理食塩水溶液として製造できる。

## 【0220】

本発明の組成物が本明細書に記載されている式の化合物と追加の治療又は予防薬剤との組み合わせを含んでいる場合は、化合物と追加の薬剤の両方を、単独療法計画で通常投与される用量の約1～100%の間、好ましくは約5～95%間の用量レベルで存在させるべきである。追加薬剤は、複数回投与計画の一部として、本発明の化合物と別に投与できる。あるいは、これらの薬剤を本発明の化合物と共に単一の組成物に混合した、単一剤形の一部にしてもよい。

## 【0221】

本発明の本明細書で標的にしているペプチド又は抗体の投与すべき有効用量は、生物学的半減期、バイオアベイラビリティ、及び毒性のようなパラメータを扱う技術分野の当業者に周知の手順を経て確認できる。

## 【0222】

治療有効用量は、患者の症状の改善又は生存期間の延長をもたらすのに十分な化合物又は抗体の量を示す。

## 【0223】

## (治療方法)

本発明は、例えば、インスリン依存性糖尿病（1型糖尿病）及び非インスリン依存性糖尿病（2型糖尿病）を包含する、異常或いは基準を外れたグルコースホメオスタシスに関連する疾患に罹る危険性がある（罹りやすい）或いは疾患を有する対象を治療する予防的及び治療的方法の両方を提供する。本明細書で用いられる用語「治療」は、疾患、疾患の症状又は疾患になりやすい傾向を、治療する、治す、軽減する、改める、修復する、改善する、改良する或いはこれに影響を及ぼす目的で、疾患、疾患の症状又は疾患になりやすい傾向を有する患者への治療薬剤の適用又は投与、或いは患者由来の単離された組織又は細胞株への治療薬剤の適用又は投与であると定義される。治療薬剤は、これに限定されないが、小分子、ペプチド、抗体、リボザイム及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを包

含する。

【0224】

本発明のポリペプチドは、糖尿病、空腹時血糖異常、グルコース耐性異常、高血糖、及び肥満の治療に有用な他の医薬品と併用して用いることもできる。適切な薬剤は、インスリン分泌促進剤、インスリン増感剤、及びメトフォルミンHClを包含する。

【0225】

本発明は糖尿病及び関連する病気及び疾患を治療する方法を包含している。このような方法の1つは、本発明の1つ又はそれ以上の炭化水素架橋インスリン分泌促進ポリペプチドの治療有効量を、これを必要としている対象に投与する段階を含んでいる。

【0226】

本発明のポリペプチドは2型糖尿病を包含する、糖尿病のような疾患を治療するために本発明の方法で用いることができる。このような方法は糖尿病及び糖尿病合併症の発症を遅らせることもできる。本発明の方法で本発明のポリペプチドを用いて治療又は予防できる他の病気及び疾患は：若年者の成人発症型糖尿病（MODY）（Herman, et al., Diabetes 43:40 (1994)）、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）（Zimmet, et al., Diabetes Med. 11:299 (1994)）、耐糖能障害（IGT）（Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1) S5 (1999)）、空腹時血糖異常（IFG）（Charles, et al., Diabetes 40:796 (1991)）、妊娠糖尿病（Metzger, Diabetes, 40:197 (1991)）、及びメタボリックシンドロームXを包含する。

【0227】

本発明のポリペプチドは糖尿病の第二病因（Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1), S5 (1999)）を治療するために本発明の方法で使用することもできる。このような第二病因は、グルココルチコイド過剰、成長ホルモン過剰、褐色細胞腫、及び薬物誘発性糖尿病を包含する。糖尿病を誘発する可能性がある薬物は、これに限定されないが、ピリミニール、ニコチン酸、グルココルチコイド類、フェニトイン、甲状腺ホルモン、 $\beta$ アドレナリン作動薬、 $\alpha$ インターフェロン、及びHIV感染症の治療に用いられる薬剤を包含する。

【0228】

本発明のポリペプチドは、脂質異常症に関連しているもの、及び例えば、コレステロール胆石、癌（例えば、大腸、直腸、前立腺、乳腺、卵巣、子宮内膜、子宮頸部、胆嚢、及び胆管）、生理不順、不妊、多嚢胞性卵巣、変形性関節症、及び睡眠時無呼吸のようなその他の肥満及び過剰体重に関連している合併症を包含している拒食症及び肥満の治療に、更には、食欲及び食物摂取量の調節、脂質異常症、高トリグリセリド血症、心不全のようなアテローム性動脈硬化症、高脂血症、高コレステロール血症、低いHDLレベル、高血圧、心血管系疾患（アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、冠動脈疾患、及び高血圧を含む）、脳血管疾患及び末梢血管疾患のようなこれらに関連するその他の多数の医薬用途に有用である。本発明のポリペプチドは、例えば、インスリン感受性、炎症応答、血漿トリグリセリド、HDL、LDL、及びコレステロール濃度の等の調節に関連する生理学的障害を治療するためにも有用である。

【0229】

本発明の方法及びポリペプチドは、単独で或いは糖尿病及び関連疾患の治療における分野の当業者に公知の追加の治療及び／又は化合物と組合わせて用いることができる。あるいは、本明細書に記載されている方法及びポリペプチドを併用療法において、部分的に又は完全に、用いることができる。

【0230】

本発明のポリペプチドは糖尿病を治療するために、PPAR作動薬、スルホニル尿素剤、非スルホニル尿素分泌促進剤、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤、インスリン増感剤、インスリン分泌促進剤、肝臓グルコース生産低下剤、インスリン及び抗肥満薬を包含する、他の公知治療薬と組合わせても投与できる。このような治療薬は本発明の化合物の投与の前に、同時に、又はそれに続いて投与できる。インスリンは、インスリンの長期間作用型及び

短時間作用型の形態及び製剤の両方を含んでいる。PPAR作動薬はPPARサブユニット又はそれらの組み合わせの何れかの作動薬を含んでいてよい。例えば、PPAR作動薬は、PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、PPAR- $\delta$ の作動薬、又はPPARサブユニットの2つ又は3つの組み合わせの何れかを含むことができる。このようなPPAR作動薬は、例えば、ロシグリタゾン及びピオグリタゾンを包含する。スルホニル尿素剤は、例えば、グリブリド、グリメピリド、クロルプロパミド、及びグリピジドを包含する。本発明の化合物と共に投与すると糖尿病の治療に有用な $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤は、アカルボース、ミグリトール及びボグリボースを包含する。式(I)の化合物と共に投与すると糖尿病の治療に有用なインスリン増感剤は、チオゾリジンジオン及び非チオゾリジンジオンを包含する。本発明の化合物と共に投与すると糖尿病の治療に有用な肝臓グルコース生産低下剤は、GLUCOPHAGE（登録商標）及びGLUCOPHAGE XR（登録商標）のような、メトホルミンを包含する。本発明の化合物と共に投与すると糖尿病の治療に有用なインスリン分泌促進剤は、スルホニル尿素剤及び非スルホニル尿素剤：GLP-1、GIP、PAC/VPAC受容体作動薬、セクレチン、ナテグリニド、メグリチニド、レバグリニド、グリベンカルミド、グリメピリド、クロルプロパミド、グリピジドを包含する。GLP-1は、例えば、脂肪酸誘導体化されたGLP-1及びエクセンジンのような、天然のGLP-1より長い半減期を有するGLP-1の誘導体を包含する。本発明の一実施態様では、本発明のポリペプチドは、膵臓 $\beta$ 細胞のインスリン分泌促進剤に対する感受性を増大するためにインスリン分泌促進剤と併用して用いられる。

10

#### 【0231】

20

本発明のポリペプチドは抗肥満薬と併用して本発明の方法で用いることもできる。抗肥満薬は、 $\beta$ -3作動薬；CB-1拮抗薬；例えば、シブトラミン（MERIDIA（登録商標））のような、食欲抑制剤；及び例えば、オルリスタット（XENICAL（登録商標））のような脂質阻害剤を包含する。

#### 【0232】

本発明のポリペプチドは糖尿病患者の脂質異常症を治療するために通常用いられる薬剤と併用して本発明の方法で用いることもできる。このような薬剤は、これに限定されないが、HMG-CoA還元酵素阻害剤、ニコチン酸、胆汁酸抑制薬、及びフィブリン酸誘導体を包含する。本発明のポリペプチドは、例えば、 $\beta$ -遮断薬及びACE阻害剤のような、抗高血圧薬と併用しても用いることもできる。

30

#### 【0233】

このような併用治療法は、2つ又はそれ以上の薬剤の何れかの組合わせで投与できる（例えば、本発明の化合物をインスリン増感剤及び抗肥満薬と組合わせて）。このような併用治療法は、上記のような医薬組成物の形態で投与できる。

#### 【0234】

（キット）

本発明は、包装済みでラベルが貼られている医薬製品又は実験用試薬も包含する。この製造品は密封されている、ガラス製の薬瓶又はその他の容器のような、適切な器又は容器内に適切な使用説明書を含んでいる。医薬品は、例えば、第1容器に単回投与剤形にある本発明の化合物を、そして第2容器内に、注射用滅菌水又はアジュバントを含有することができる。あるいは、単回投与剤形は、経口、経皮、鼻内、腔内、子宮頸部リング、又は局所送達に適している固体であってよい。

40

#### 【0235】

特定の実施態様では、単回投与剤形は、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、経口、腔内、子宮頸部に、局所又は皮下送達に適している。従って、本発明は、それぞれの送達経路に適している、好ましくは滅菌した溶液、固体、フォーム、ゲルを包含する。

#### 【0236】

別の特定の実施態様では、単回投与剤形は経口投与に適している。従って、本発明は経口経路に適している、好ましくは滅菌した溶液、固体、フォーム、ゲルを包含する。

#### 【0237】

50

何れの医薬品とも同様に、包装材料及び容器は保管及び輸送中に製品の安定性を保護するように設計されている。更に、本発明の製品は、使用説明書又は、医師、技師、又は患者に、問題になっている病気又は疾患を如何に適切に予防又は治療するかについてアドバイスするその他の情報資料を包含する。すなわち、製品は、これに限定されないが、実際の用量、観察方法（例えば、感染の検出及び定量）、及びその他の観察情報を包含する、投与計画を示すか示唆する説明書を包含している。

#### 【0238】

具体的には、本発明は、箱、ボトル、チューブ、バイアル、容器、噴霧器、吸入器、静脈内（i. v.）バッグ、薬袋などのような、包装材料；及び当該包装材料内に含まれている医薬品の少なくとも1つの単回投与剤形を包含し、ここで当該医薬品は本発明の化合物を含み、そして当該包装材料は、本明細書に記載されるように、特定用量を投与して特定の投与計画を用いることにより、疾患に関連する1つ又はそれ以上の症状を予防、管理、治療、及び／又は改善する、或いは免疫応答を刺激して疾患を予防するために当該化合物を用いることができることを示す指示手段を包含している。

#### 【0239】

以下の実施例は本発明の多種の態様の説明としてのみ提供されていて、本発明を限定することを決して意図していない。

#### 【実施例】

#### 【0240】

実施例1. 材料及び方法

（炭化水素架橋された $\alpha$ 螺旋ポリペプチドの合成）

構造分析と化学合成を組合わせた方法を改変した、構造的に拘束されたペプチドを構築するために適用した。（R）-Fmoc-（2'-ペンテニル）アラニン（“R5”）、（S）-Fmoc-（2'-ペンテニル）アラニン（“S5”）、（R）-Fmoc-（2'-オクテニル）アラニン（“R8”）、（S）-Fmoc-（2'-オクテニル）アラニン（“R8”） $\alpha$ 、 $\alpha$ -ジ置換アミノ酸の不斉合成を先に報告されたように実施した（Schafmeister, C.E., J. Po, and G.L. Verdine, Journal of the American Chemical Society, 2000. 122(24): p. 5891-5892; Walensky, L.D., et al., Science, 2004. 305(5689): p. 1466-1470）。（R）又は（S）Fmoc-（2'-プロペニル）アラニン類縁体の合成を図6に図式化して以下に記載する新しい方法を用いて製造した。

#### 【0241】

（R）プロリンとKOHのイソプロパノール溶液を製造し、そこに塩化ベンジルを加えて室温で3時間攪拌した。酸性を徐々に上げて89%の収率で沈殿物を単離した。この産物を氷冷した塩化メチレンに溶解し、そこに塩化チオニル及び2-アミノベンゾフェノンを加えて反応混合物を10時間攪拌して室温まで暖めた。塩基性にして、（R）-2-[N-（N'-ベンジルプロリル）アミノ]ベンゾフェノン（BPB）を収率81%で得た。KOHのMeOH溶液を、不活性ガス雰囲気中、40℃で攪拌しているMeOH中のBPB、Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O、アラニンの混合物に注入した。得られた混合物を2時間攪拌し、塩基性にしてAla-Ni(II)-BPB-複合体を91%の収率で得た（Tetrahedron:Asymmetry 9 (1998) 4249-4252）。

#### 【0242】

Ala-Ni(II)-BPB-複合体をアセトン中、塩基性条件下で、3-ブロモ-1-プロペンと反応させて、（R）-BPB-（R）-トランス-（2'-プロペニル）アラニンのシッフ塩基のNi(II)複合体〔（R）-2〕と（S）-BPB-（S）-トランス-（2'-プロペニル）アラニンのシッフ塩基のNi(II)複合体〔（S）-2〕の混合物を6：1の比で得た。

#### 【0243】

シリカゲルカラムで分離した後に、ジアステレオマー的に純粋な（R）-2複合体を収率44%で得た。（R）-2複合体を3NのHCL/MeOHで分解して、（R）-（2'-プロペニル）アラニンを、そしてDCMで抽出してキラルリガンドも得た。作成後に

、(R)－(2'－プロペニル)アラニンをFmoc－OSuで保護して(R)－Fmoc－(2'－プロペニル)アラニンを収率93%で得た(2工程)。(Tetrahedron 56 (2000) 2577-2582)

#### 【0244】

少なくとも2つの天然アミノ酸を2、3又は6アミノ酸の何れか離れた位置、すなわちそれぞれ「i、i+3」、「i、i+4」又は「i、i+7」の位置で $\alpha$ 、 $\alpha$ －ジ置換された非天然アミノ酸と置き換えた。

#### 【0245】

非天然アミノ酸及びそれに続く炭化水素架橋(複数も)の位置を、重要なGLP-1受容体の相互作用を妨げないように、或いはインスリン分泌促進活性にとって重要であることが知られている残基が置き換わらないように注意深く選択した(図2及び3)。

#### 【0246】

改変ポリペプチド、SAH-Ex及びSAH-GLP1(図7)を、固相Fmoc化学及びルテニウム触媒化オレフィンメタセシスを用いて生成し、次いでペプチド脱保護及び開裂、逆相高速液体クロマトグラフィーで精製し、そしてLC/MS質量分析及びアミノ酸分析を用いて化学的に特性化した。

#### 【0247】

これに代えて、確立されている断片に基づく手法を遂行できる([Bray, B.L.. Nature Reviews Drug Discovery, 2003. 2(7): p. 587-593; MYUNG-CHOL KANG, B.B., et al., Methods and compositions for peptide synthesis, U.S.P.a.T. Office, Editor. January 18, 2000 USA)。この手法では、N-末端部、中央部、及びC-末端部を個別に合成するように、ペプチドを3つの断片に分割する。これらのペプチド断片は超酸開裂樹脂上で固相Fmoc化学及びルテニウム触媒化オレフィンメタセシスを用いて生成しなければならず、これはN-末端、及びC末端アミド(C-末端断片について)又は遊離カルボキシレート(中央及びN-末端断片について)の何れかがFmocを有している完全に保護されているペプチドを生じる。これらの完全保護断片を逆相高速液体クロマトグラフィーで精製し、次いで連続脱保護、カップリング、及び精製すると全長の完全保護ポリペプチドが得られる。全体的な脱保護、次いで逆相高速液体クロマトグラフィーによって最終生成物が得られ、これをLC/MS質量分析及びアミノ酸分析を用い特性化できるだろう。

#### 【0248】

ペプチドを、ApeX396(Apptec)自動ペプチドシンセサイザー上で、RinkアミドAMLL樹脂(EMD Biosciences、0.2ミリモル/樹脂)を用い、50ミリモルスケールで生産した。標準Fmocプロトコールは、20%のピペリジン/NMP中で10分の脱保護を2回、次いで連続メタノール及びジメチルホルムアミド(DMF)の対の洗浄を採用した。組み込んだ非天然アミノ酸を20%のピペリジン/NMP中での10分間培養を4回行って完全脱保護を達成した。アミノ酸のカップリングは、Fmoc-保護アミノ酸の0.4Mの原液、0.67Mの2-(6-クロロ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロリン酸(HCTU)、及び2MのN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)を用いて実施して、1mLの0.2M活性エステル(4当量)を得た。カップリング頻度及び培養時間は、標準残基に30分で2回、オレフィン非天然アミノ酸に45分で2回、非天然アミノ酸に続く残基に45分で3回であった。オレフィンメタセシスは1,2-ジクロロエタンで樹脂を第1次膨張し、次いで1,2-ジクロロエタン(樹脂置換に基づいて0.20モル%)中のビス(トリシクロヘキシン)-ベンジリデンルテニウム(IV)ジクロライド(Grubbの第1次生成触媒)10mM溶液に2時間、暴露する。架橋反応を2回実施する。次いで、樹脂に結合したペプチドを1,2-ジクロロエタンで3回洗浄して、窒素気流下で乾燥する。完成したペプチドを樹脂から解離し、TFA/トリイソプロピルシラン(TIS)/水(95%、2.5%、2.5%)のようなトリフルオロ酢酸(TFA)から作られる開裂カクテルに暴露して脱保護して、メチルtert-ブチルエーテルを用いて沈殿させ、次いで凍結乾燥する。凍結乾燥したSAHBをC18カラムを用いる逆相HP

LCで精製する。陽イオンモード中の電気スプレーによって得られた質量スペクトルを用いる、LC/MSで化合物を特性化する。定量化は、Beckman 6300 高速アミノ酸アナライザーによるアミノ酸分析で達成する。

#### 【0249】

(改変ポリペプチドの二次構造及び熱安定性の確認)

架橋化改変ポリペプチドの $\alpha$ 螺旋性をその非改変対応物と円偏光2色性によって比較した。CDスペクトルを、以下の標準測定パラメータを用いてAriv分光偏光計上で20℃で得た：波長、190～260nm；ステップ分解、0.5nm；速度、20nm/秒；蓄積、10；応答、1秒；バンド幅、1nm；路長、0.1cm。それぞれのペプチドの $\alpha$ 螺旋含量は、平均残基楕円率 $[\theta]_{222}^{\text{obs}}$ をモデル螺旋ペプチドについて報告されている $[\theta]_{222}^{\text{obs}}$ で割るか(Forood, B., E.J. Feliciano, and K.P. Nambiar, PNAS, 1993. 90(3): p. 838-842; J. Martin Scholtz, Biopolymers, 1991. 31(13): p. 1463-1470; Lawless, M.K., et al., Biochemistry, 1996. 35(42): p. 13697-13708)、或いは、例えば、異なった5つの二次構造比(螺旋、平行及び逆平行 $\beta$ シート、 $\beta$ 回転及びランダムコイル)を推定するためにBrohmによって開発されたCDNNソフトウェアを用いるArivマシンを用いて、算出する。Protein Engineering, 1992. 5(3); p. 191-195。熱安定性は、広範囲の温度に渡る円偏光2色性スペクトルを得て、それぞれの拘束されたペプチドの融点を測定して評価する。

10

#### 【0250】

(ハイスループット法で合成された多様な改変ペプチドライブラリーを評価することによる改変ポリペプチドの生物物理学的及び生物化学的特性の最適化)

20

ハイスループット技術を用いて改変ポリペプチド活性を細胞及びインビボ研究について最適化した。例えば、Apex 396 マルチチャンネルシンセサイザー(AAPPTec; Louisville, Kentucky)を用いて生物学的評価のためにポリペプチドライブラリーを作り出した。ポリペプチド化合物を、伸張、切断、又は天然アミノ酸及び選択非天然アミノ酸にわたるアミノ酸置換によって多様化し、そして異なった架橋位置を作成して所望の生物物理学的及び生物化学的特性を最大化した。ハイスループット固相Fmoc化学及びルテニウム触媒化オレフィンメタセシス並びにペプチド脱保護及び開裂を用いてライブラリーを作成した。ペプチド精製は逆相C18 HPLCによって行い、生成物をLC/MS質量分析及びアミノ酸分析によって特性化した。

30

#### 【0251】

(プロテアーゼ耐性のアッセイ)

構造化ペプチドのインビトロでのタンパク質分解を以下のパラメータを用いるLC/MS(Agilent 1200)で測定した：20 $\mu$ Lの注入、0.6mLの流速、10分にわたる水(0.1%ギ酸)から20～80%アセトニトリル(0.075%ギ酸)の勾配からなる15分のランタイム、洗浄から勾配条件の開始に戻るのに4分、そして0.5分のポストタイム。DADシグナルを8nmのバンド幅をもたせて280nmに設定して、MSDを、1つのチャンネルが(M+2H)/2、+1質量単位にあり、そして別のチャンネルが(M+3H)/3、+1質量単位にあるスキャンモードに設定した。それぞれのMSDシグナルの積分が $10^8$ より大きいカウントの曲線下面積を生じた。反応サンプルは、DMSO(1mMの原液)中のペプチド(5 $\mu$ L)及び2mMのCaCl<sub>2</sub>を含有しているpH7.4の50mMリン酸緩衝液からなる195 $\mu$ Lの緩衝液で構成されていた。0時間時点にサンプルを注入したらすぐ、50ng/ $\mu$ Lのキモトリプシン(Sigma)を2 $\mu$ L添加して、徐々に連続注入して無傷ペプチドの量を定量した。各MSDデータ時点を正規化するために、100 $\mu$ Mの濃度でアセチル化トリプトファンカルボキサミドの内部コントロールを用いた。時間に対するMSD領域のプロットが指数減衰曲線を生じ、そしてPrismソフトウェア(GraphPad)を用いる非線回帰分析によって半減期を確認した。アッセイはトリプシン及びペプシンをそれらの適切な緩衝条件中で用いても実施した。

40

#### 【0252】

50

(血漿安定性及び薬物動態)

ペプチド (5~10  $\mu$ g) をマウス血漿と共に 37℃ で培養し、雄性 C57/BL6 マウスに尾静脈内に注入又は経口強制投与した (10、20 mg/kg)。各種時間間隔 (例えば、0.5、1、2、4、8、12 時間; n=3 時点当り) のエクスピボ及びインビボサンプル (後眼窩放血によって採取) を LC/MS 分析、又は入手可能な ELISA キット (例えば、Exendin-4 (Heloderma suspectum) EIA Kit Phoenix Pharmaceuticals, Inc. EK-070-94) による定量のために処理した。エクスピボ血清安定性の検討のために、Prism ソフトウェア (GraphPad) を用いてプロットした指数減衰曲線の非線回帰分析によってペプチドの半減期を算出した。示された時点におけるインビボ血清濃度を、血清半減期、血清最高濃度、総血清クリアランス、及び非コンパートメント分析を用いる分配の見掛け容量を算出するために用いる。生成されたプロテアーゼ耐性及び PK プロファイルはインビボ適用のために最も安定に構造化されたペプチドを選択するための尺度としての機能を果たす。

### 【0253】

(GLP-1 受容体結合アッセイ)

高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の N-末端と融合している、ヒト GLP-1 受容体を安定に発現する組み換え U2OS 細胞を製造会社の指示書に従って実施される、GLP-1 R Redistribution Assay (Thermo Scientific) で用いた。GLP-1 R アッセイは、GLP-1 R の内在化を最も有利に引き起こす架橋インスリン分泌促進ポリペプチド作動薬をスクリーニングするために用いられる。GLP-1 はこのアッセイで参照化合物として用いられ、そしてリガンドは、スポット検出画像分析アルゴリズムによって、GLP-1 内在化を誘発するそれらの能力についてアッセイされる。GLP-1 R-EGFP の転移は蛍光顕微鏡上に画像化される。フィルターを Hoechst (350/461 nm) 及び GFP/FITC (488/509 nm) (最大励起及び放射の波長) に設定する。転移は 20 倍又はそれ以上の倍率で撮った画像上で分析する。GLP-1 R 再分配アッセイにおける最初のアウトプットは細胞質におけるスポットの形成である。従って、データ分析は細胞質におけるスポットの数、領域又は強度に対応しているアウトプットを報告している。

### 【0254】

(GLP-1 受容体関与の第 2 メッセンジャーのシグナル伝達アッセイ)

GLP-1 作動薬は、多数の前臨床モデルにおいて実験的糖尿病を予防或いは改善して、 $\beta$  細胞量を保存するということが既に示されている。従って、賦形剤のみで又は架橋されたインスリン分泌促進ポリペプチドで処理した細胞における ER ストレスへの応答に重要なマーカーの発現を検討できる。ER ストレスは、ATF-4、XBP-1、phospho-eIF2 $\alpha$  Ser51 (P[Ser51]-eIF2 $\alpha$ )、及び CHOP のような多くのシグナル伝達タンパク質のリン酸化に関与する広げられたタンパク質応答によって引き起こされるシグナル伝達経路を活性化する (Druker, et. al., Cell Metabolism, 2006 v4 p391-406)。そのため、ラット INS-1 又はマウス MIN6 インスリノーマ細胞を架橋したインスリン分泌促進ポリペプチドの連続希釈の非存在下又は存在下で、賦形剤のみ、タプシガルジン、又はツニカマイシンで最大 4 時間処置した。あるいは、培養物を、架橋したインスリン分泌促進ポリペプチドの非存在下又は存在下でタプシガルジンで 4 時間処理する前、又はその間に、培養物を賦形剤のみ、又は H89、U0126、又は Ly294002 の何れかに 20 分間暴露する。総ての細胞抽出物を ATF-4、XBP-1、phospho-eIF2 $\alpha$  Ser51 (P[Ser51]-eIF2 $\alpha$ )、及び CHOP に関して時間に対するイムノブロットングで分析した。

### 【0255】

(グルコース刺激インスリン放出の細胞アッセイ)

INS-1 細胞を、5 mM のグルコース及び 10% のウシ胎仔血清を含んでいるダルベッコ変性イーグル培地中、希釈剤のみ又は各種濃度の架橋されたインスリン分泌促進ポリペプチドの存在下で、1 晩培養する。3.3 mM グルコースの存在下で前培養した後、次

いで 3 mM 又は 20 mM の何れかの存在下で細胞を 37℃ で 45 分間培養する。次いで上澄液を除去し、300 g で 10 分間遠心分離して、インスリンについてアッセイする。インスリン含量を算定するために、先に記載されているように、細胞を酸/エタノール混合物中で 1 晩抽出する。次いで、インスリンの量を ELISA で定量する (American Laboratory Products Company, Amin, et. al., The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002, v303, p82-88)。

#### 【0256】

(インスリン分泌促進ペプチド処置への応答における血清グルコース及びインスリン濃度のインビボ観察)

レプチン受容体を欠損している db/db マウス (C57BLKS/J-Lepr<sup>db</sup>/Lepr<sup>db</sup>) 及びその同腹子を 4 週齢で、Jackson Laboratories (Bar Harbor, Mass., USA) から入手する。これらをケージ当り 2 匹飼育して、不断給餌も行う。試験期間中は同じマウスと一緒にケージに入れた。我々の施設に 2 日間馴化させた後、後眼窩洞から採取した、全血グルコース濃度を、Glucometer Elite (Bayer, Elkhart, Ind., USA) を用いて確認する。その後 (07:00~09:00 時)、インスリン分泌促進ポリペプチド (例えば、24 ナノモル/kg のエクセンジン-4 を毎日 i.p. で) を 6 匹の糖尿病動物及び 6 匹の非糖尿病動物に投与して、10 匹の糖尿病動物及び 10 匹の非糖尿病動物に NaCl を i.p. で与えた。このレジメンを 8 日間続ける。動物を毎日体重測定して、インスリン及びグルコース濃度の確認のために後眼窩洞から血液サンプルを採取する。レジメンの終わりに、空腹時血液サンプルを得て、これらの濃度及び EDTA を含有している全血を HbA1c (Greig, et. al., Diabetologia, 1999 v42, p45-50) についてアッセイした。同じ実験をインスリン分泌促進ポリペプチド (非改変コントロール及び架橋した誘導体) の経口強制投与を用いても実施する。

#### 【0257】

実施例 2. 一重及び二重架橋したエクセナチドペプチドは非改変鑄型ペプチドと比べて増強した  $\alpha$  螺旋性を示す (図 8)。

エクセナチドペプチドの  $\alpha$  螺旋構造上の炭化水素架橋化の効果を測定するために、エクセナチド (Met14NorLeu)、SAH-Ex (A)、SAH-Ex (B)、及び SAH-Ex (A、B) を円偏光二色性で分析した。非改変エクセナチド鑄型ペプチドは pH 7 の水溶液中、21℃ で殆どが非構造化されて、25% より低い  $\alpha$  螺旋性を示した。架橋された誘導体の全てが、比較的増大した  $\alpha$  螺旋含量を示した。1 つ又は 2 つの炭化水素架橋の何れかの挿入は一貫して、円偏光二色性スペクトルを、204 nm にある顕著な単一最小値を有するランダムコイルパターンから、208 及び 222 nm の二重最小値を有する  $\alpha$  螺旋カウンターへ変形した。

#### 【0258】

実施例 3. 一重及び二重架橋したエクセナチドペプチドは非改変鑄型ペプチドと比べて増強した熱安定性を示す (図 8)。

熱解鎖に対する SAH-Ex ペプチドの耐性を評価するために、全ての構築物について 5~83℃ の温度範囲に渡って円偏光二色性試験を実施した。どのペプチドも温度の上昇に伴う古典的な協同的解鎖を示さなかったが、その代わり温度の関数として漸増溶解を示した。全ての SAH-Ex ペプチドは、全温度範囲に渡って高度の  $\alpha$  螺旋性を保持した。エクセナチド (Met14NorLeu)、SAH-Ex (A)、及び SAH-Ex (B) の傾斜は類似していたのに対して、SAH-Ex (A、B) はより平坦な傾斜線を有していて、二重架橋したペプチド螺旋の  $\alpha$  螺旋性は、温度の上昇に殆ど影響されず、そして強固な熱安定性を反映することを示唆している。

#### 【0259】

実施例 4. 一重及び二重架橋したエクセナチドペプチドは非改変鑄型ペプチドと比べて、中性及び酸性 pH において増強したタンパク分解安定性を示す (図 9、10)。

ペプチドの治療薬としての重要な制約は、それらの速いタンパク質分解に対する脆弱性である。長く、部分的に又は大部分が広げられていて、そしてプロテアーゼ部位が豊富で

あるエクセナチド及びGLP-1のような生物活性ペプチドは、特に脆弱である。ペプチドのα螺旋性を強化するための共有結合架橋手法の1つの重要な利点は、タンパク質分解から脆弱なアミド結合を保護することである。プロテアーゼは、ペプチドがアミド結合を加水分解するように広がった配座を有していることを必要としているので、炭化水素架橋によって生じた構造の拘束は架橋したペプチドをプロテアーゼ耐性にできる。炭化水素架橋が39-merエクセナチドペプチドをタンパク質分解から保護できるか否かを確認するために、エクセナチド(Met14NorLeu)、並びに一重及び二重架橋誘導体を、インビトロで直接プロテアーゼに暴露した。0.5 ng/μLのキモトリプシンの存在下で、Ex4(25 μM)は、半減期が38分の、比較的速い分解を示した。それに引き換え、一重架橋したSAH-Ex(A)及びSAH-Ex(B)化合物は、それぞれ、94分及び128分のより長い半減期を示した。二重架橋ペプチドSAH-Ex(A、B)は、その一重架橋対応物を最大4倍そしてエクセナチド鑄型ペプチドを8倍上回る、295分の半減期を示した。特に、二重架橋ペプチドが対応する一重架橋ペプチドより低いパーセントの螺旋性を有しているにもかかわらず優れたプロテアーゼ耐性を示したので、二重架橋自体が全般的なペプチドα螺旋性に対するよりタンパク質分解に対してより強い影響力を有していた。

#### 【0260】

ペプチドは、一部には近位消化管における酸加水分解に起因して低い経口バイオアベイラビリティを有している。中性pHにおける架橋SAH-Exペプチドの増強したプロテアーゼ耐性が、酸性条件下でのそれらの安定性を検討するように促した。0.5 ng/μLのペプシンに暴露すると、エクセナチド(Met14NorLeu)は、半減期が13分で、速い分解を示した。N-末端架橋はこの実験でペプシン耐性を増強しなかったのに対して、ペプチドのC-末端部分内の架橋は、非改変鑄型ペプチドより6倍以上の改善を表わす、半減期の81分への増大をもたらした。pH7におけるキモトリプシン耐性と同様に、二重架橋ペプチド、SAH-Ex(A、B)は、非改変ペプチド鑄型より13倍の改善を表わす、172分の半減期を提示し、pH2における顕著なペプシン耐性を示した。

#### 【0261】

実施例5. 二重架橋したエクセナチドペプチドは、静脈内投与であろうと経口強制送達であろうと類似した血清濃度をもたらす(図11、12)。

エキセンジン-4 EIAキット(Phoenix Pharmaceuticals, Inc. EK-070-94)が、血漿中のSAH-Ex(A、B)の濃度を測定できる、鑄型エクセナチド(Met14NorLeu)ペプチド及びその二重架橋誘導体を首尾よく認識した(図11)。この競合ELISAにおいて、連続希釈したエクセナチド誘導体を、固定化した抗体に対してビオチン化したコントロールエキセンジン-4ペプチドと競合させる；競合結果は、ストレプタビジン-HRPによるビオチン化ペプチドの検出を用いて読み出して、効果的な競合は固定化抗体複合体におけるビオチン化エキセンジン-4のSAH-Exペプチドによる置換により減少した吸収を反映している。

#### 【0262】

インビボ検出検討のために、SAH-Ex(A、B)を滅菌5%ブドウ糖水溶液(1 mg/mL)に溶解して、8~10週齢の雄性C57BL/6マウス(Jackson Laboratory、治療群当り3動物)にボーラス尾静脈注射(4 mg/kg、125 mcg)又は経口強制投与(4 mg/kg、125 mcg)によって投与した。マウスの追加群を賦形剤のみで処置した。処置の30分後に、後眼窩穿刺によって氷上で凝固した後に~200 μLの血清を得るのに十分な血液を採取し、次いで20,000 gで1分間4℃で遠心分離した。血清サンプルをC18固相抽出カラム(Phoenix Pharmaceuticals)用い、製造会社のプロトコールに従って精製した。水-アセトニトリル溶出液を1晩凍結乾燥してELISAキットの緩衝液0.5 mL中で元に戻した。この戻した溶液を引き続き10倍に連続希釈して製造会社のプロトコールに従ってEIA分析に付した。際立って、当量のSAH-Ex(A、B)が静脈内又は経口強制投与の何れかで処置したマウスの血清中に検出され

、二重架橋化がエクセナチドペプチドを、非改変エクセナチドに対して以前は実現できなかった送達経路である (Gedulin et al., Int' l J Pharmaceuticals, 356 (2008) 231-238)、胃腸系により全身循環へ吸収されるような、経口投与可能な形態へ変換する能力を強調している。陰性コントロールとしての、賦形剤で処置された動物の血清では E I A によってシグナルが検出されなかった。

### 【0263】

実施例 6. 架橋したインスリン分泌促進ペプチドの構造確認。

G L P-1 受容体に結合している架橋したインスリン分泌促進ペプチドの明確な構造を定義付けるために、記述されている (Runge, S et al. 2008 J Biol Chem, 283:11340-11347) ようにして X 線結晶方法を適用できるだろう。架橋したインスリン分泌促進ペプチドに対する結晶化条件をフェニックス結晶化ロボットを用いてセットした 96 ウェル sitting-drop 法用プレート (Crystal Quick, Hampton Research) を用いてスクリーニングする。初期条件は H T I n d e x S c r e e n (Hampton Research)、J S C G + S u i t e (Qiagen) 及び P r o - C o m p l e x S u i t e (Qiagen) を包含する。種々の pH 並びに塩及び洗浄剤の濃度を包含する、結晶生育に対する最良の条件を特定するために、ベストヒット周辺のスクリーニングを実施する。生成するとすぐに、結晶を取り出し、結晶化緩衝液中で洗浄して、質量分析に付して結晶中のペプチドの存在を確認する。次いで、結晶を抗凍結剤中に浸し、急速冷凍して、液体窒素中で保管する。適切な結晶を Argonne National Laboratory のシンクロトロン施設で試験した。分子置換、それに続くデータ分析及び微調整 (Phaser、Phenix、及び Coots ソフトウェア) によって相を得る。

### 【0264】

構造分析のための代替的で補完的なアプローチは  $^1\text{H}$ -NMR 分析を利用する。溶液中の架橋したインスリン分泌促進ペプチドのスペクトルは、 $z$ -シールド勾配及び三重共鳴クリオプローブを備えた B r u k e r A v a n c e D R X スペクトロメーター上 600 MHz で得られる。二次元の D Q F - C O S Y、T O C S Y、及び N O E S Y スペクトルを 100%  $\text{D}_2\text{O}$  及び 90%  $\text{H}_2\text{O}$  / 10%  $\text{D}_2\text{O}$  中で測定する。T O C S Y データセットは 40 及び 80 ms の混合時間を用いて、N O E S Y スペクトルは 75、100、125 及び 200 ms の混合時間を用いて得られる。NMR データセットは、NMR P i p e スペクトル分析パッケージを用いて処理されて、プロトン共鳴の割り当ては C a r a を用いて実施する。構造計算は標準プロトコルを用いるプログラム C Y A N A を用いて実行する。最終構造ファミリーは、最も低い標的機能、並びにプログラム W H A T C H E C K 及び P R O C H E C K - N M R で測定したキラリティー及び立体化学に対する最も良い総合的価値を有する 20 の構造からなっている。構造はプログラム P Y M O L 及び M O L M O L を用いて提示し、そして分析した。

### 【0265】

構造データを、架橋したインスリン分泌促進ペプチド構造を、個々に及び G L P-1 R との複合体として、本明細書に記載されているアッセイで評価した機能活性と関連付けるために用いる。

### 【0266】

実施例 7. 炭化水素架橋の挿入によってもたらされるタンパク質分解耐性のメカニズム (図 13)。

炭化水素架橋が非常に長いペプチド治療薬にプロテアーゼ耐性をもたらしメカニズムを、g p 41 に由来する H I V-1 融合阻害ペプチド鋳型を用いて検討した。2 対のオレフィン非天然アミノ酸の架橋しない挿入 (例えば、g p 41 の非架橋  $\alpha$  螺旋: U A H - g p 41 (626-662) (A、B)) はキモトリプシンのタンパク質分解からの有意な保護をもたらしさない。しかし、オレフィンメタセシスによって、対応する二重架橋類縁体、S A H - g p 41 (626-662) (A、B) は U A H - g p 41 (626-662) (A、B) より 8 倍長い半減期を示し、著しいプロテアーゼ耐性をもたらしするためには、架橋自体が必要であることを示唆している (図 13 A)。U A H- 及び S A H - g p 41 (626-662) (A、B) は、それぞれ 27°C と 22°C の  $T_m$  値を有して、同様な円偏

光二色性溶解プロファイルを示した。温度依存性のアンフォールディングは、重複している繰り返し溶解曲線（図13B）から分かるように、両ペプチドに関して可逆的であった。これらのデータは、全体的な $\alpha$ 螺旋安定性が、2つの構造に関して類似していて、SAH-gp41 (626-662) (A、B)の顕著なプロテアーゼ耐性の主要因とはならないことを明らかにしている。加えて、アンフォールディングの可逆性はペプチド凝集の非存在を強調しており、これも同様にSAH-gp41 (626-662) (A、B)の顕著なプロテアーゼ耐性の主要因とはならない。

#### 【0267】

非改変、一重架橋、二重架橋、及び4ヶ所置換されているが架橋されていないペプチドの競合キモトリプシン分解パターンは、N-末端架橋がその架橋に隣接する切断部位のタンパク質分解的加水分解を、LC/MS分析で観察された対応するM+18種を伴わずに、固有に阻止したことを明らかにした（図13C）。C-末端架橋は、架橋の上流部のタンパク質分解を完全に遮断した、というよりむしろ遅らせた。4ヶ所置換されているが架橋されていない誘導体UAH-gp41 (626-662) (A、B)は、非天然アミノ酸のN-末端対に隣接している位置のタンパク質分解を阻害できず、C-末端一重架橋ペプチドのように効果的にはタンパク質分解の速度を遅らせることもできなかった（SAH-gp41 (626-662) (B)の $T_{1/2}$ は77分；UAH-gp41 (626-662) (A、B)の $T_{1/2}$ は36分）。二重架橋ペプチド（SAH-gp41 (626-662) (A、B)は、N-末端及びC-末端架橋の両方の抗タンパク質分解特性から相乗的に有利性をもたらされた。

#### 【0268】

SAH-gp41 (626-662) (A、B)及び対応する非改変鋳型ペプチド、T649vの競合 $^1\text{H}$  NMR分析は、T649vの2つのN-末端トリプトファン残基に対応するインドールプロトン（ $\sim 10.6\text{ p.p.m}$ ）が、複数の配座間の速い変換と一致して、T649vの2つの鋭いピークによって表わされていることを明らかにした（図13D）。対照的に、SAH-gp41 (626-662) (A、B)の $^1\text{H}$  NMRスペクトルは、ペプチド架橋の結果として個々に構造化されたN-末端を反映して、広がって分割されている。纏めると、これらのデータは、ペプチド二重架橋によってもたらされたタンパク質分解の有利性は、プロテアーゼ開裂部位の突然変異生成、 $\alpha$ 螺旋性のみの最大化、4ヶ所非天然アミノ酸置換、或いはペプチド凝集に由来していないことを示す。かわりに、二重架橋ペプチドの顕著なプロテアーゼ耐性は、（1） $\alpha$ 螺旋構造の導入によるタンパク質分解の減少した速度、及び（2）（i、i+4）架橋部分内またはこれに直接隣接した局所的な部位におけるペプチド開裂の完全な阻害の組み合わせによってもたらされると言うことを確認した

#### 【0269】

実施例8. 構造的に安定化されてプロテアーゼ耐性のSAH-Ex及びSAH-GLPペプチドはグルコース刺激インスリン放出（GSIS）を増進する。

SAH-Ex及びSAH-GLPペプチドの原液を、凍結乾燥粉末を脱イオン水に100  $\mu\text{M}$ で溶解して作成した。バッチGSISアッセイのために以下の処置溶液を作成した：1. 67 mMのグルコース、16. 7 mMのグルコース、1. 67 mMのグルコース+10 nMのペプチド、16. 7 mMのグルコース+10 nMのペプチド、全てが1×KRB緩衝液、2 mMのCaCl<sub>2</sub>、0. 05% BSA中。野生型マウスの脾臓から単離した脾島をKRB緩衝液で3回洗浄して、試験管当たり5個の脾島を1. 67 mMのグルコースを含有しているKRB緩衝液中で30分37℃で培養した。次いで、脾島をペレット状にして緩衝液を上記の処置溶液に置き換えた。それぞれの実験をn=8で繰り返して実験した。37℃で1時間培養した後、脾島をペレット状にして、グルコース刺激インスリン放出測定のために上澄液を採取した。ペレットを可溶化して細胞数を正規化するために細胞内インスリン含有量を評価した。インスリンは標準としてマウスインスリンを用いるELISAで測定した（Insulin ELISA Kit, cat. 80-INSMS-E01、ALPCO）。インスリンのELISAプロットについては、1. 67 mMから16. 7 mMの範囲で測定した。

7 m Mのグルコース用量の段階的増大に応答して放出されたインスリンの量に微増がみられる。しかし、インスリン分泌促進性 E X 4 及び G L P 1、並びに選択した S A H 類縁体に応答して、G S I S の実質的な増大がみられる。これらのデータは、E x 4 及び G L P 1 の構造安定性、プロテアーゼ耐性、及び薬理学的特性を改善する炭化水素架橋がインクレチンの重要な機能的 G S I S 活性も保存することを強調している。

#### 【 0 2 7 0 】

(追加参考文献)

Walensky, L. D., Kung, A. L., Escher, I., Malia, T. J., Barbuto, S., et al. (2004) Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. Science, 305(5689), 1466-1470.

10

Bird, G. H., Bernal, F., Pitter, K., and Walensky, L. D. (2008) Synthesis and biophysical characterization of stabilized alpha-helices of BCL-2 domains. Methods Enzymol, 446, 369-386.

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., et al. (2008) BAX activation is initiated at a novel interaction site. Nature, 455, 1076-1081.

#### 【 0 2 7 1 】

(参照による取り込み)

本明細書で引用された全ての特許、特許出願、G e n B a n k / P B D ナンバー、及び公表された文献は、これらが個々に取り込まれているようにその全てが参照により本明細書に取り込まれている。本発明はその好ましい実施態様に関して具体的に示され記載されているが、形態及び詳細の様々な変更が、添付されている特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、そこで実施できるということを当業者は理解できるだろう。

20

#### 【 0 2 7 2 】

(均等物)

当業者は、本明細書に記載されている具体的な実施態様の均等物を認識できるか、或いは通常の実験のみを用いて確かめることができるだろう。このような均等物は以下の特許請求の範囲に包含されることが意図されている。

【図 1 A - 1】

図 1A-1

エクセナジン-4 [アムカトカゲ] GI:1916067 (配列番号 1)

MKIIILWLCVFGFLATLFPISWQMPVESGLSSDSASSEFASKIKRHGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAP  
PPSG

エクセナチド (配列番号 2)

HGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS

胃抑制ペプチド前タンパク質 [人類(ヒト)] GI:475843 (配列番号 3)

MVATKTFALLILSLFLAVGLGKKEGHEFSALPSLFGSHAKVSSPQPRPRVAEGTFTSDYSIAMDKIHQDFFVNWLLAQKGR  
KNDWKHNITQREARALEIASQANKKEEAVEPQSSPAKNPSDELLIRDLIIQELLACLIDQTNLCRLRSR

胃抑制ペプチド(GIP) (配列番号 4)

YAEGETISDYSIAMDKIHQDFFVNWLLAQKGRKNDWKHNITQ

グルカゴン様ペプチド1 前駆体 [人類(ヒト)]GI:31778 (配列番号 5)

MKSIYFVAGLFWMLVQGSWORSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNEDKRHSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKR  
NRNNTAKRHDEFERHAEGETFTSDVSSYLEGQAAKEFIAMLVKGRGRDFEEVAIVEELGRRHADGSGFSDMNITILDNLAAAD  
FINWLIQTKITDR

【図 1 A - 2】

図 1A-2

グルカゴン様ペプチド2 (GLP-2) (配列番号 6)

HADGSGFSDMNITILDNLAAARDEFINWLIQTKITD

グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) (配列番号 7)

HDEFFERHAEGETFTSDVSSYLEGQAAKEFIAMLVKGRGR

GLP-1-(7-37) (配列番号 8)

HAEGETFTSDVSSYLEGQAAKEFIAMLVKGRGR

GLP-1-(7-36) (配列番号 9)

HAEGETFTSDVSSYLEGQAAKEFIAMLVKGRGR

リラグルチド (配列番号 10)

HAEGETFTSDVSSYLEGQAAK (E-palm)EFIAMLVKGRG (Arg34Lys26-(N-ε-(γ-Glu(N-α-hexadecanoyl))-GLP-1[7-37]))

【図 1 A - 3】

図 1A-3

タスボグルチド (配列番号 11)

H2N-His-2-methyl-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-2-methyl-Ala-Arg-CONH2

アルビグルチド (配列番号 12)

アルブミンとGLP-1の遺伝的融合

LY2189265

IeGの断片と結合した GLP-1 類似体

【図 1 B】

図 1B

エクセナチド

GLP-1 (7-37)

グルカゴン

GLP-2

GIP

1 5 10 15 20 25 30 35

YAEGETISDYSIAMDKIHQDFFVNWLLAQKGRKNDWKHNITQ

HADGSGFSDMNITILDNLAAARDEFINWLIQTKITD

HSQGETFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAMLVKGRG

GEGETFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS

(配列番号 2)

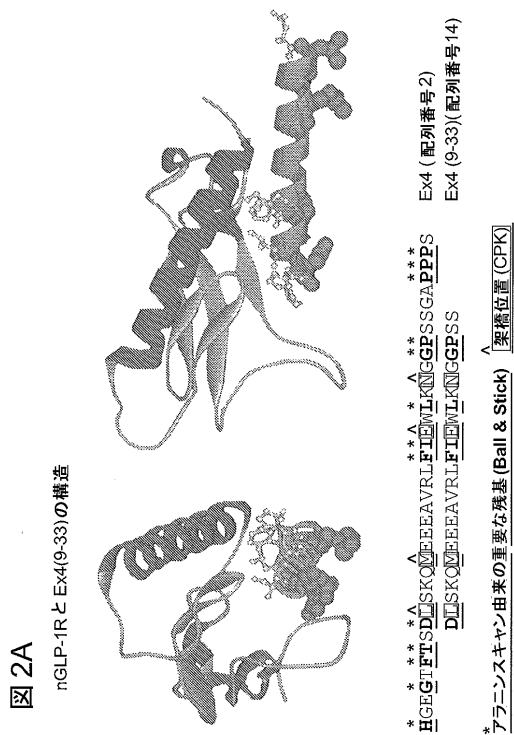
(配列番号 8)

(配列番号 13)

(配列番号 6)

(配列番号 4)

【図 2 A】



Runge, S et al. 2008 J Biol Chem, 283:11340-11347.

【図 2 B】

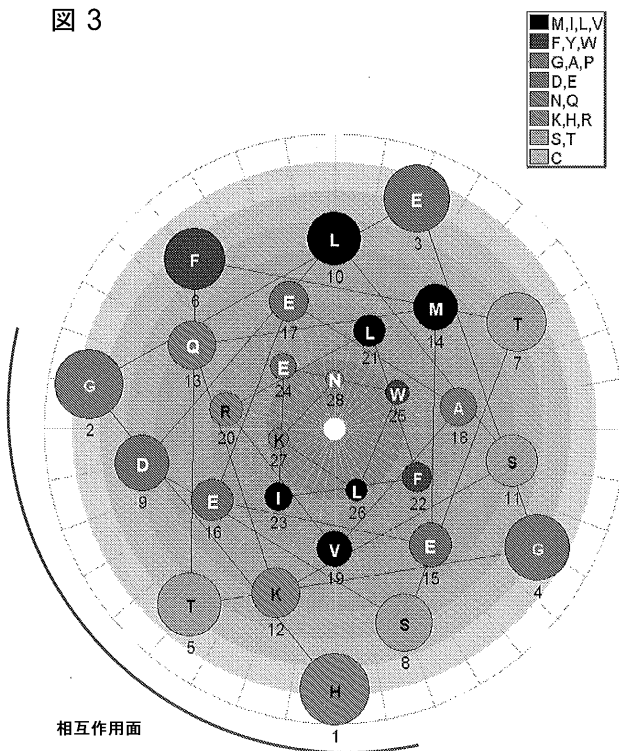
図 2B

GLP-1 (7-37)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGR (配列番号 8)

【図 3】

図 3



【図 4】

図 4A

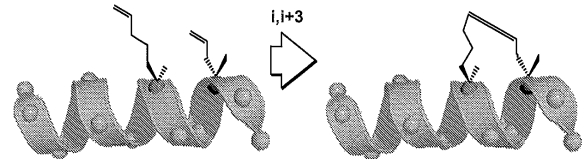


図 4B

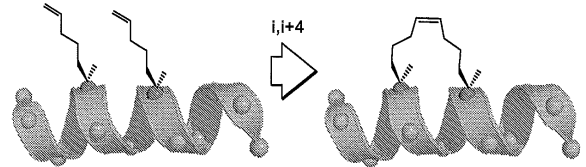


図 4C

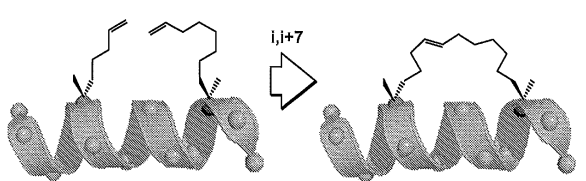
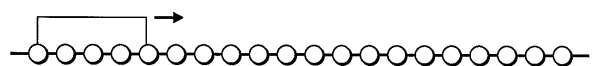
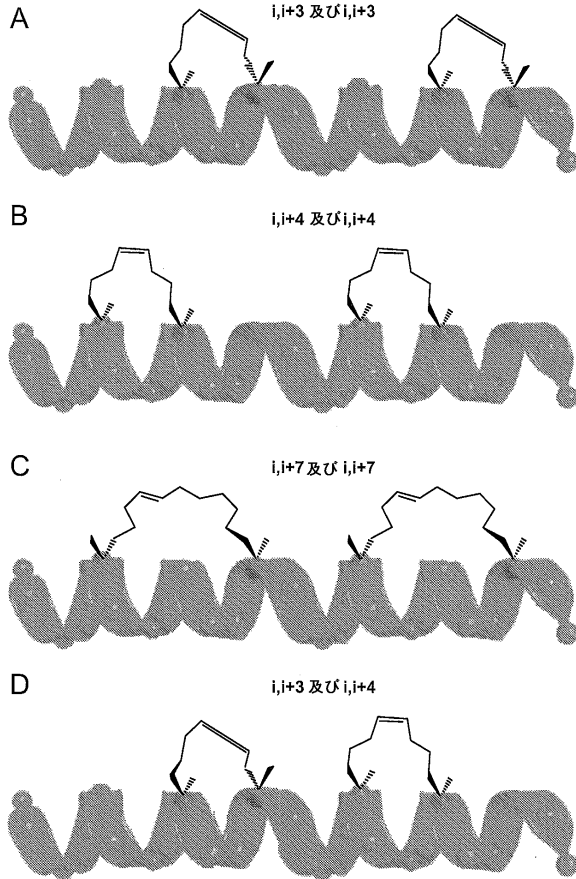


図 4D



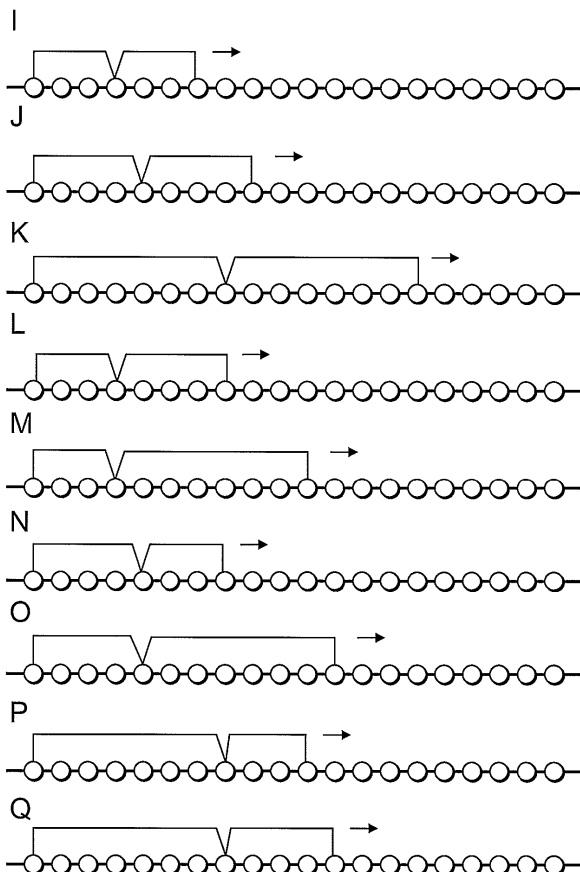
【図 5 A - 1】

図 5A-1



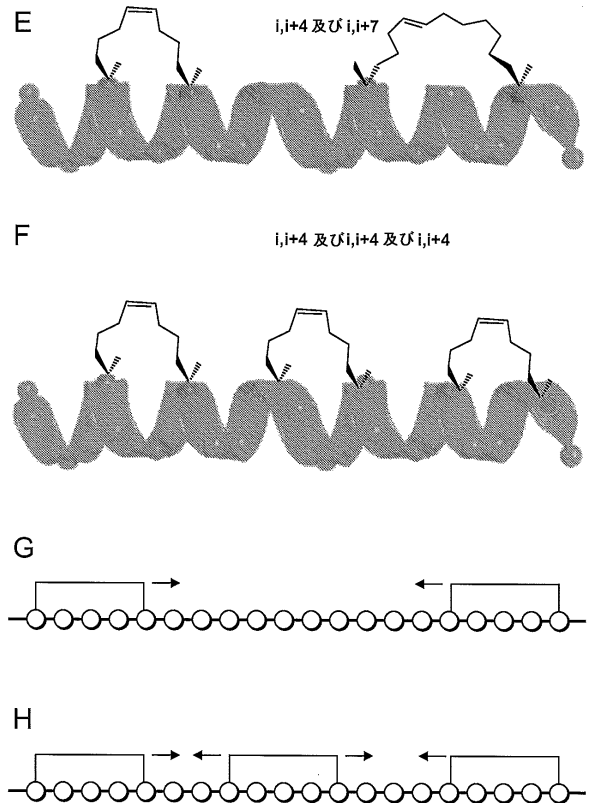
【図 5 B】

図 5B

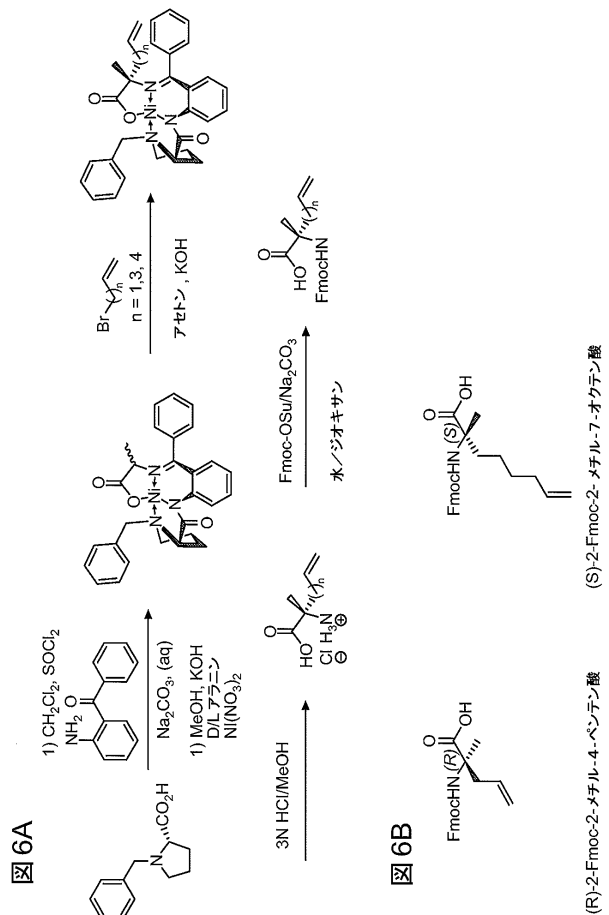


【図 5 A - 2】

図 5A-2



【図 6】



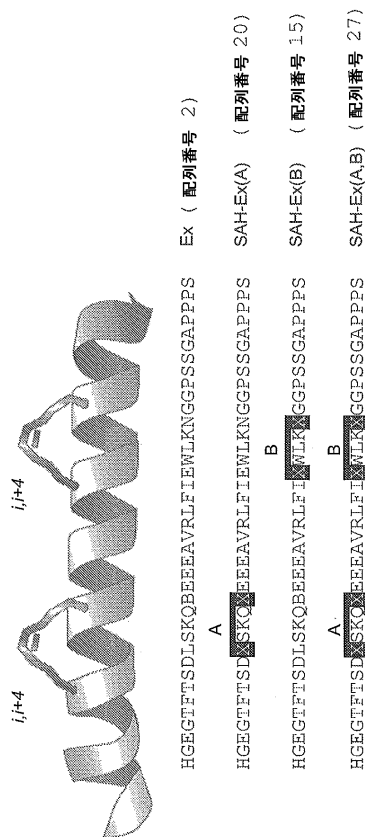
【図 7 A - 1】

SAH-Ex ベプチド

HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 2)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 15)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 16)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 17)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 18)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 19)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 20)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 21)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 22)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 23)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 24)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 25)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 26)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 27)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 28)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 29)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 30)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 31)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 32)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 33)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 34)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 35)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 36)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 37)  
HGEGTFTSDLSKQBEAEAVRLFIEWLKNKGPSSGAPPPS (配列番号 38)

図 7A-1

【図 7 B】



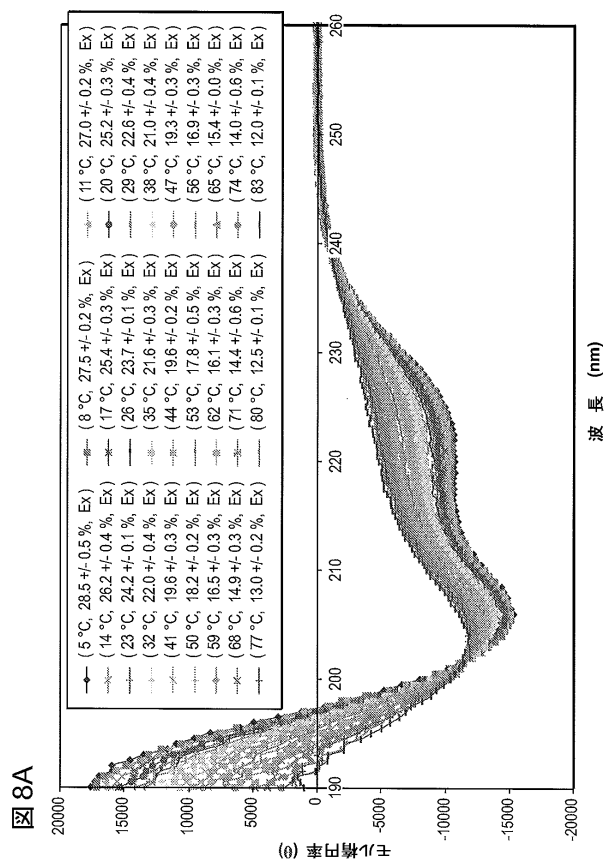
【図 7 A - 2】

図 7A-2

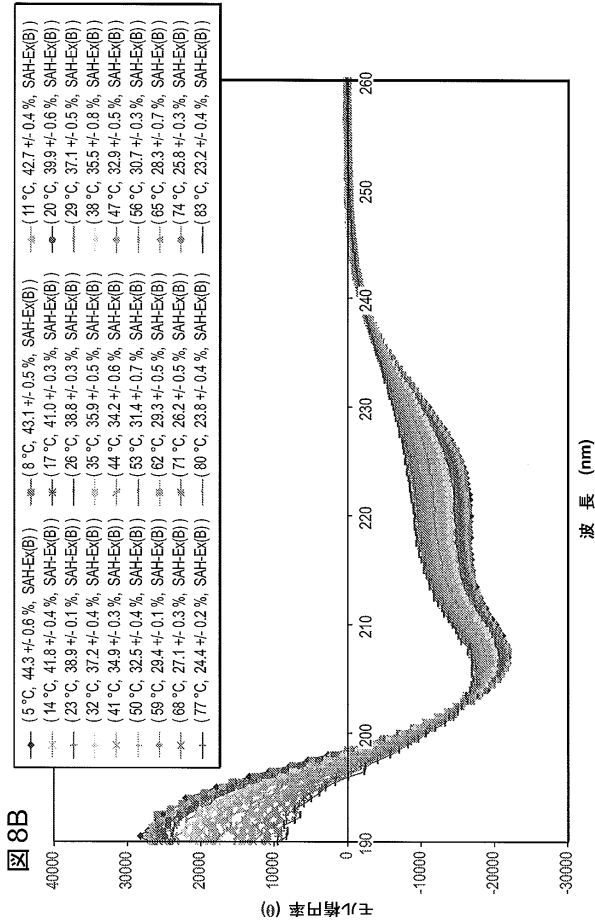
SAH-GLP1 (7-37)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 39)  
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 40)  
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 41)  
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 42)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEG~~X~~AAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 43)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEGQAAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 44)  
HAEG~~X~~FT~~X~~DVSSYLEGQAAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 45)  
HAEG~~X~~FTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 46)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEG~~X~~AAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 47)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEG~~X~~AAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 48)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEG~~X~~AAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 49)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEG~~X~~AAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 50)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEGQAAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 51)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 52)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 53)  
HAEGTFTSD~~X~~SSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 54)  
HAEG~~X~~FT~~X~~DVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 55)  
HAEG~~X~~FT~~X~~DVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 56)  
HAEG~~X~~FT~~X~~DVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 57)  
HAEG~~X~~FT~~X~~DVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 58)  
HAEG~~X~~FTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 59)  
HAEG~~X~~FTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 60)  
HAEG~~X~~FTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 61)  
HAEG~~X~~FTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 62)  
H~~X~~EGTFTSD~~X~~VSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 63)  
H~~X~~GTFTSD~~X~~SSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 64)  
HAEG~~X~~FTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 65)  
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 66)  
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI~~X~~FI~~X~~WLV~~X~~KGRGR (配列番号 67)

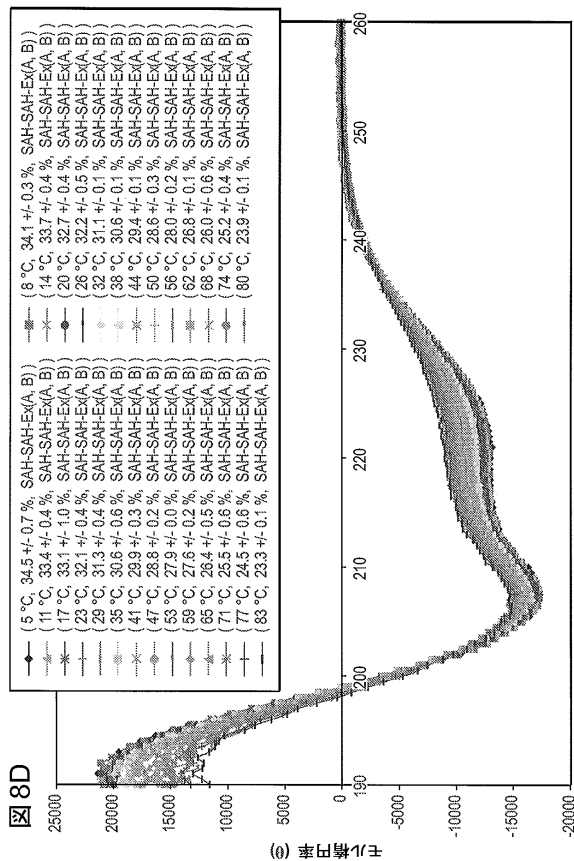
【図 8 A】



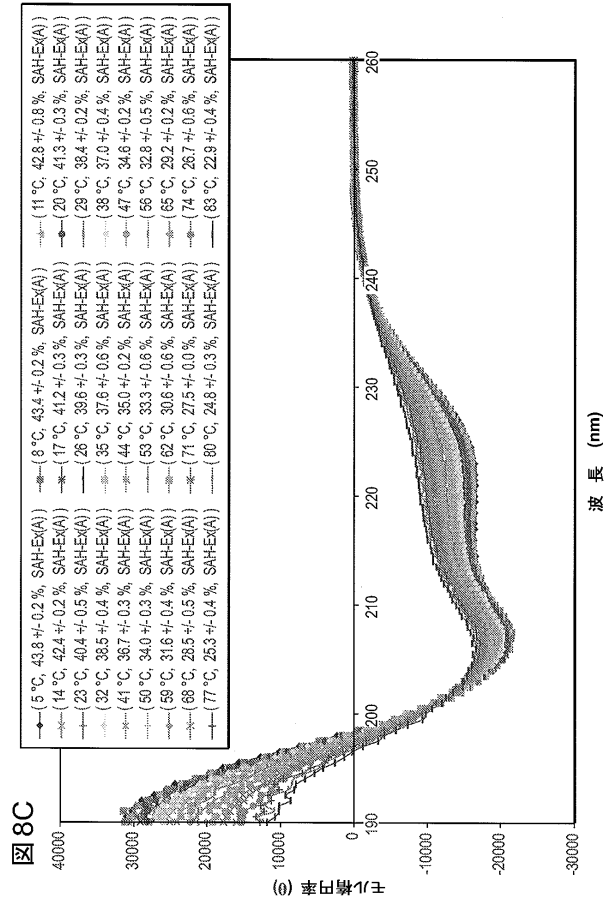
【図 8 B】



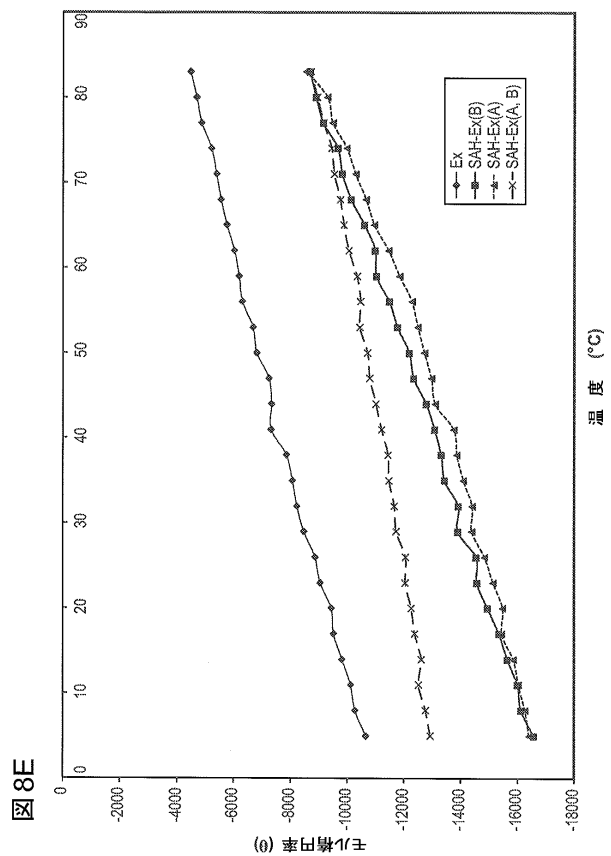
【図 8 D】



【図 8 C】

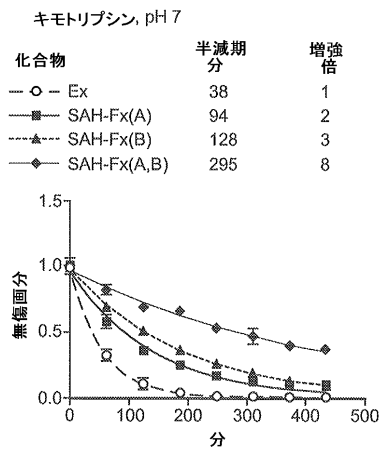


【図 8 E】



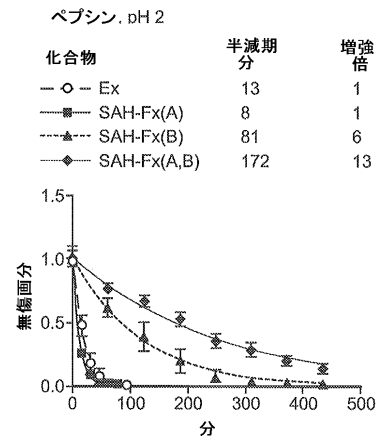
【図 9】

図 9



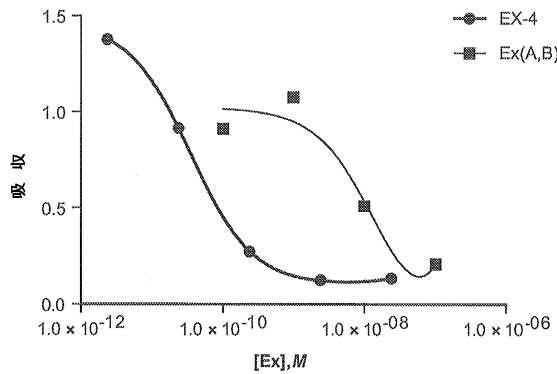
【図 10】

図 10



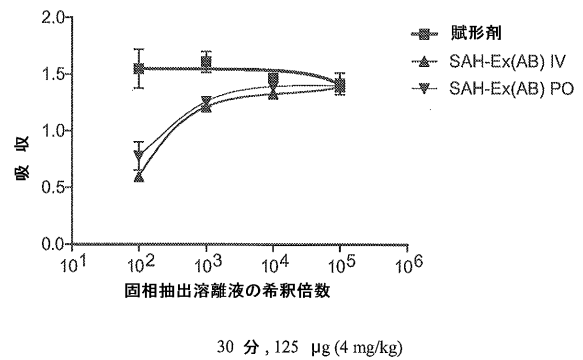
【図 11】

図 11



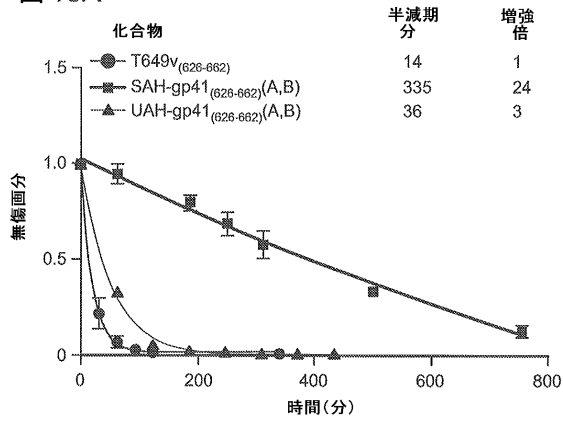
【図 12】

図 12



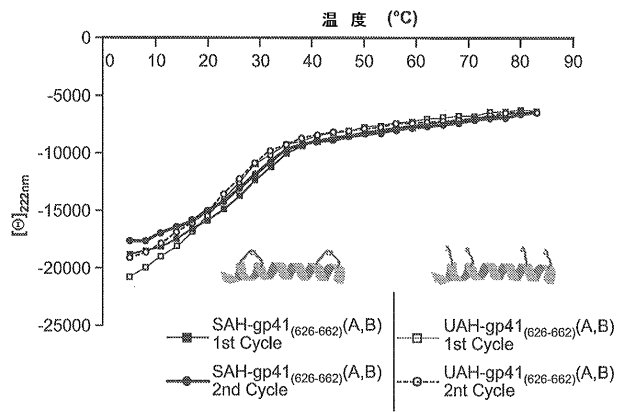
【図 1 3 A】

図 13A



【図 1 3 B】

図 13B



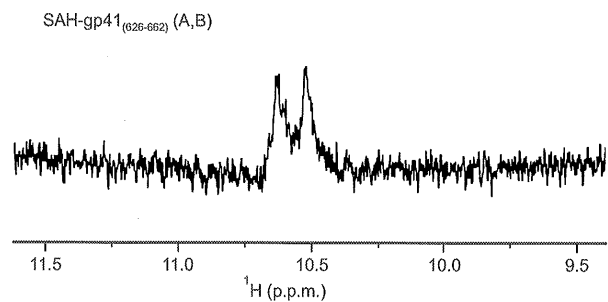
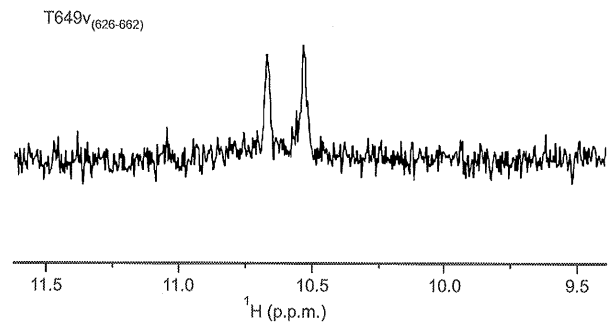
【図 1 3 C】

図 13C

| 化合物                                           | キモトリプシン 開裂部位 (実際)                    |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------|
| T649v <sub>(626-662)</sub> (配列番号 63)          | BTWBWDREINNYTSLIHSLIEESQNOQEKNEQELLE |
| SAH-gp41 <sub>(626-662)</sub> (A) (配列番号 64)   | BTWBWDREINNYTSLIHSLIEESQNOQEKNEQELLE |
| SAH-gp41 <sub>(626-662)</sub> (B) (配列番号 65)   | BTWBWDREINNYTSLIHSLIEESQNOQEKNEQELLE |
| SAH-gp41 <sub>(626-662)</sub> (A,B) (配列番号 66) | BTWBWDREINNYTSLIHSLIEESQNOQEKNEQELLE |
| UAH-gp41 <sub>(626-662)</sub> (A,B) (配列番号 67) | BTWBWDREINNYTSLIHSLIEESQNOQEKNEQELLE |

【図 1 3 D】

図 13D



【図 14A-1】

| 名称                  | 配列                                                             | 配列番号      | 賦形剤と比較したGSISの増強倍数 |
|---------------------|----------------------------------------------------------------|-----------|-------------------|
| Ex4 (9-39)          | HGEGFTSDLSKQBEEAAVRLFI <del>EWL</del> KNGPSSGAPPPS             | (配列番号 2)  | 11.5              |
| SAH-Ex4 (9-39)(A)   | HGEGFTSD <del>XSQ</del> EEAAVRLFI <del>EWL</del> KNGPSSGAPPPS  | (配列番号 20) | 9.2               |
| SAH-Ex4 (9-39)(B)   | HGEGFTSDLSKQBEEAAVRLFI <del>EWL</del> KXGGPSSGAPPPS            | (配列番号 15) | 10.9              |
| SAH-Ex4 (9-39)(A,B) | HGEGFTSD <del>XSQ</del> EEAAVRLFI <del>EWL</del> KXGGPSSGAPPPS | (配列番号 27) | 7.7               |
| SAH-Ex4 (9-39)(C)   | HGEGFT <del>DL</del> SKQBEEAAVRLFI <del>EWL</del> KNGPSSGAPPPS | (配列番号 21) | 0.8               |
| SAH-Ex4 (9-39)(D)   | HGEGFTSDLS <del>Q</del> BEEAAVRLFI <del>EWL</del> KNGPSSGAPPPS | (配列番号 22) | 1.3               |
| SAH-Ex4 (9-39)(E)   | HGEGFTSD <del>XSQ</del> BEEAAVRLFI <del>EWL</del> KNGPSSGAPPPS | (配列番号 19) | 9.2               |
| SAH-Ex4 (9-39)(F)   | HGEGFTSDLSKQBEEAAVRLFI <del>EWL</del> KXGGPSSGAPPPS            | (配列番号 18) | 3.3               |
| SAH-Ex4 (9-39)(G)   | HGEGFTSDLSKQBEEAAVRLFI <del>EWL</del> KXGGPSSGAPPPS            | (配列番号 17) | 4.5               |
| SAH-Ex4 (9-39)(H)   | HGEGFTSDLSKQBEEAAVRLFI <del>EWL</del> KXGGPSSGAPPPS            | (配列番号 16) | ND                |

図 14A-1

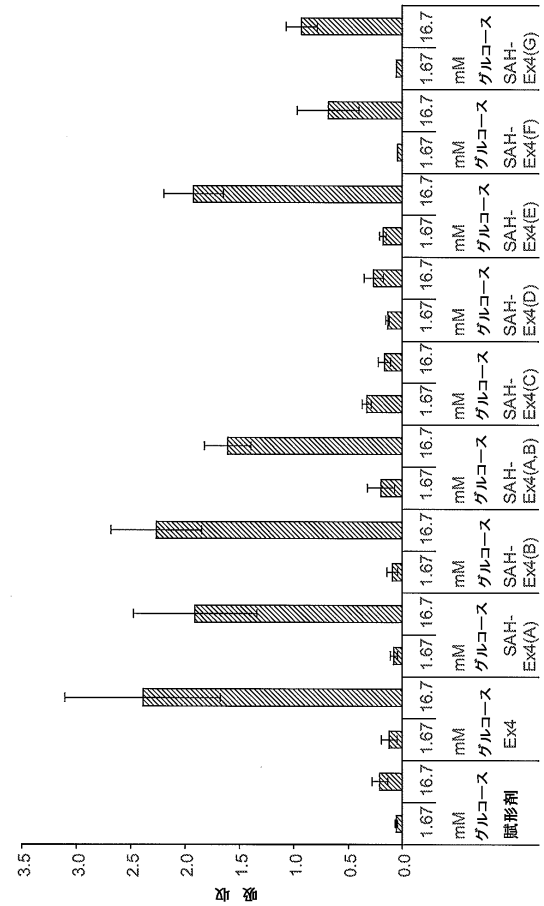
【図 14B-1】

| 名称                 | 配列                                                        | 配列番号      | 賦形剤と比較したGSISの増強倍数 |
|--------------------|-----------------------------------------------------------|-----------|-------------------|
| GLP1 (7-38)        | HAEGFTSDVSSYLEGQAAKEFTIAWLKGRGR                           | (配列番号 39) | 7.7               |
| SAH-GLP1 (7-38)(A) | H <del>EG</del> FTSDVSSYLEGQAAKEFTIAWLKGRGR               | (配列番号 63) | ND                |
| SAH-GLP1 (7-38)(B) | HA <del>XG</del> FTSDVSSYLEGQAAKEFTIAWLKGRGR              | (配列番号 64) | ND                |
| SAH-GLP1 (7-38)(C) | HA <del>EG</del> FTSDVSSYLEGQAAKEFTIAWLKGRGR              | (配列番号 65) | ND                |
| SAH-GLP1 (7-38)(D) | HAEG <del>FT</del> SDVSSYLEGQAAKEFTIAWLKGRGR              | (配列番号 45) | 1.0               |
| SAH-GLP1 (7-38)(E) | HAEG <del>FT</del> SDVSSYLEGQAAKEFTIAWLKGRGR              | (配列番号 46) | 0.7               |
| SAH-GLP1 (7-38)(F) | HAEGFTSD <del>VS</del> SSYLEGQAAKEFTIAWLKGRGR             | (配列番号 44) | ND                |
| SAH-GLP1 (7-38)(G) | HAEGFTSDVSSYLEG <del>Q</del> AAKEFTIAWLKGRGR              | (配列番号 48) | 6.8               |
| SAH-GLP1 (7-38)(H) | HAEGFTSDVSSYLEGQAAKEFTIAWLKGRGR                           | (配列番号 66) | 4.7               |
| SAH-GLP1 (7-38)(I) | HAEGFTSDVSSYLEGQAA <del>X</del> FTIAWLKGRGR               | (配列番号 67) | ND                |
| SAH-GLP1 (7-38)(J) | HAEGFTSDVSSYLEGQAAK <del>FT</del> IAWLKGRGR               | (配列番号 42) | 4.2               |
| SAH-GLP1 (7-38)(K) | HAEGFTSDVSSYLEGQAAK <del>FT</del> IAWL <del>V</del> XGRGR | (配列番号 41) | 3.3               |
| SAH-GLP1 (7-38)(L) | HAEGFTSDVSSYLEGQAAKEFTI <del>EWL</del> KXGRGR             | (配列番号 40) | 3.0               |
| SAH-GLP1 (7-38)(M) | HAEGFTSDVSSYLEGQAAKEFTI <del>EWL</del> VXGRGR             | (配列番号 39) | 1.1               |

図 14B-1

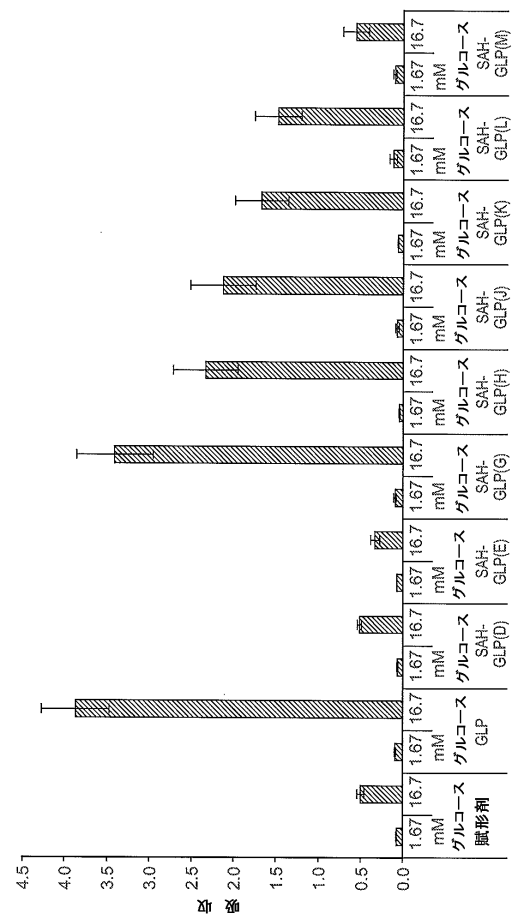
【図 14A-2】

図 14A-2



【図 14B-2】

図 14B-2



【配列表】

2013532172000001.app

## 【国際調査報告】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                      | International application No.<br><b>PCT/US2011/043465</b>                                                                                                     |
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| <i>C07K 14/605(2006.01)i, C07K 14/575(2006.01)i, C07K 14/62(2006.01)i, A61K 38/26(2006.01)i, A61K 38/22(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K 14/605                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean utility models and applications for utility models<br>Japanese utility models and applications for utility models                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>cKOMPASS(KIPO internal), Google & PubMed                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                   | Relevant to claim No.                                                                                                                                         |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | DANIAL, N. N. et al., 'Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival', Nature Medicine, Feb. 2008, Vol. 14, No. 2, pp. 144-153                                                                           | 1,4-7,10,11,23,35                                                                                                                                             |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | See abstract; figure 5.                                                                                                                                                                                                              | 2,3,8,9,12-22,24                                                                                                                                              |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | NEUMILLER, J. J., 'Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors', J. Am. Pharm. Assoc., 2009, Vol. 49, suppl. 1, pp. S16-S29<br>See abstract; figure 2. | 2,3,8,9,24                                                                                                                                                    |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WALENSKY, L. D. et al., 'Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix', Science, 3 Sep. 2004, Vol. 305, No. 5689, pp. 1466-1470<br>See abstract; figure 1.                                                     | 12-22                                                                                                                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | KIM, Y.-W. et al., 'Introduction of All-Hydrocarbon i,i+3 Staples into $\alpha$ -Helices via Ring-Closing Olefin Metathesis', Organic Letters, 2 July 2010, Vol. 12, No. 13, pp. 3046-3049<br>See the whole document.                | 1-24,35                                                                                                                                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                               |
| Date of the actual completion of the international search<br>27 MARCH 2012 (27.03.2012)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                      | Date of mailing of the international search report<br><b>28 MARCH 2012 (28.03.2012)</b>                                                                       |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br> Korean Intellectual Property Office<br>Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro,<br>Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea<br>Facsimile No. 82-42-472-7140                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                      | Authorized officer<br>Park, Jung Min<br>Telephone No. 82-42-481-8291<br> |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                                                           |
|-----------------------------------------------------------|
| International application No.<br><b>PCT/US2011/043465</b> |
|-----------------------------------------------------------|

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                      |                       |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
| A                                                     | SCHAFMEISTER, C. E. et al., 'An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides',<br>J. Am. Chem. Soc., 2000, Vol. 122, pp. 5891-5892<br>See the whole document. | 1-24,35               |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/043465**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| None                                      |                     |                            |                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/043465

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. a sequence listing filed or furnished

- ☐ on paper  
☒ in electronic form

b. time of filing or furnishing

- ☐ contained in the international application as filed  
☐ filed together with the international application in electronic form  
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/043465

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 25-34  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 25-34 pertain to methods of treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

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

(72)発明者 ローレン ディー. ワレンスキー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02467 チェスナット・ヒル グッドナフ・ロード  
9

(72)発明者 グレゴリー バード

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー州 03076 ペラム シーニック・ビュー・ドライブ  
15

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA08 BA19 BA25 CA59 DB34 DB35 MA52 MA66

NA14 ZC03 ZC35

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA31 DA46 EA20 FA10