(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2015-520184
(P2015-520184A)
(43)公表日　平成27年7月16日(2015.7.16)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 38/22	(2006.01)	A61K	37/24	4C076
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10	4C084
A61P 3/06	(2006.01)	A61P	3/06	4H045
A61P 3/04	(2006.01)	A61P	3/04	
A61K 47/34	(2006.01)	A61K	47/34	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 65 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-515646 (P2015-515646)
(86)(22)出願日　平成25年6月4日 (2013.6.4)
(85)翻訳文提出日　平成26年12月3日 (2014.12.3)
(86)国際出願番号　PCT/IL2013/050481
(87)国際公開番号　WO2013/183052
(87)国際公開日　平成25年12月12日 (2013.12.12)
(31)優先権主張番号　61/655,367
(32)優先日　平成24年6月4日 (2012.6.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　514026738
オプコ　バイオロジクス　リミテッド
イスラエル国ネスジオナ７４１４０・セカンドフロア・ゴルダメア　ストリート　７
(74)代理人　110001379
特許業務法人　大島特許事務所
(72)発明者　フィマ、ウディ　エヤル
イスラエル国ドビラ８５３３０・ピーオービー　２３８
(72)発明者　ヘルシュコビッツ、オレン
イスラエル国リションレジオン７５２５６・ルピン　ストリート　１０／１７

Fターム(参考)　4C076 AA95 BB01 BB11 CC30 CC41 EE23 EE59 FF31

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ペグ化ＯＸＭ変異体

(57)【要約】
９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）などの可逆的リンカーを介して連結されたオキシントモジュリンおよびポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を含む組成物が開示される。逆ペグ化オキシントモジュリンを含む医薬組成物およびその使用方法も開示される。
【選択図】図１

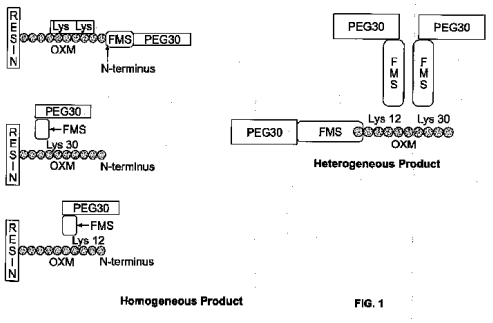


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
オキシントモジュリンと、
ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）と、
９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）とを含む組成物であって、
前記ＰＥＧポリマーが、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、前記オキシントモジュリンのアミノ末端に結合されたことを特徴とする組成物。
【請求項２】
前記オキシントモジュリンが、配列番号１に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記ＰＥＧポリマーが、スルフヒドリル部分を有するＰＥＧポリマーであることを特徴とする請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
前記ＰＥＧポリマーが、PEG_{30}であることを特徴とする請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項６】
オキシントモジュリンと、
ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）と、
９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）とを含む組成物であって、
前記ＰＥＧポリマーが、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基（Lys_{12}）に結合されたことを特徴とする組成物。
【請求項７】
前記オキシントモジュリンが、配列番号１に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
前記ＰＥＧポリマーが、スルフヒドリル部分を有するＰＥＧポリマーであることを特徴とする請求項６または７に記載の組成物。
【請求項９】
前記ＰＥＧポリマーが、PEG_{30}であることを特徴とする請求項６～８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
請求項６～９のいずれか一項に記載の組成物と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項１１】
オキシントモジュリンと、
ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）と、
９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）とを含む組成物であって、
前記ＰＥＧポリマーが、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、前記オキシントモジュリンの位置番号３０のリシン残基（Lys_{30}）に結合されたことを特徴とする組成物。
【請求項１２】
前記オキシントモジュリンが、配列番号１に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項１１に記載の組成物。

【請求項１３】
前記ＰＥＧポリマーが、スルフヒドリル部分を有するＰＥＧポリマーであることを特徴とする請求項１１または１２に記載の組成物。
【請求項１４】
前記ＰＥＧポリマーが、PEG_{30}であることを特徴とする請求項１１～１３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５】
請求項１１～１４のいずれか一項に記載の組成物と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項１６】
オキシントモジュリンの曲線下面積（ＡＵＣ）を改善するための方法であって、
ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基、位置番号３０のリシン残基、またはアミノ末端に結合させるステップを含むことを特徴とする方法。
【請求項１７】
前記オキシントモジュリンが、配列番号１に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記ＰＥＧポリマーを、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、前記オキシントモジュリンのアミノ末端またはリシン残基に結合させるようにしたことを特徴とする請求項１６または１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記ＰＥＧポリマーが、スルフヒドリル部分を有するＰＥＧポリマーであることを特徴とする請求項１６～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記ＰＥＧポリマーが、PEG_{30}であることを特徴とする請求項１６～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
オキシントモジュリンの投与頻度を低下させる方法であって、
ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基、位置番号３０のリシン残基、またはアミノ末端に結合させるステップを含むことを特徴とする方法。
【請求項２２】
前記オキシントモジュリンが、配列番号１に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記ＰＥＧポリマーが、スルフヒドリル部分を有するＰＥＧポリマーであることを特徴とする請求項２１または２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記ＰＥＧポリマーが、PEG_{30}であることを特徴とする請求項２１～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
オキシントモジュリンの生物学的半減期を延長させるための方法であって、
オキシントモジュリンと、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）と、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）とを互いに結合させるステップを含み、

前記ＰＥＧポリマーを、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基、位置番号３０のリシン残基、またはアミノ末端に結合させるようにしたことを特徴とする方法。

【請求項２６】

前記オキシントモジュリンが、配列番号１に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記ＰＥＧポリマーを、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、前記オキシントモジュリンのアミノ末端またはリシン残基に結合させるようにしたことを特徴とする請求項２５または２６に記載の方法。

【請求項２８】

前記ＰＥＧポリマーが、スルフヒドリル部分を有するＰＥＧポリマーであることを特徴とする請求項２５～２７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２９】

前記ＰＥＧポリマーが、PEG_{30}であることを特徴とする請求項２５～２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０】

前記ＦＭＳまたはＦｍｏｃリンカーを化学的に加水分解することによって、前記オキシントモジュリンが前記組成物から生体液中に放出されるようにしたことを特徴とする請求項２５～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３１】

前記放出されたオキシントモジュリンが損傷を受けておらず、ＧＬＰ－１およびグルカゴン受容体結合活性を回復することを特徴とする請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

前記生体液が、血液、血清、または脳脊髄液であることを特徴とする請求項３０または３１に記載の方法。

【請求項３３】

前記生体液が、ヒト対象の中にあることを特徴とする請求項３０～３２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４】

前記ＦＭＳまたはＦｍｏｃを化学的に加水分解することにより、前記生体液中の前記オキシントモジュリンペプチドの循環時間が延長されるようにしたことを特徴とする請求項３０～３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５】

前記オキシントモジュリンの循環時間を延長することにより、前記オキシントモジュリンが血液脳関門を通過し、ＣＮＳを標的にすることが可能になるようにしたことを特徴とする請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

治療を必要とする対象における耐糖能を誘導するための、請求項１～５、請求項６～１０、または請求項１１～１５のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項３７】

治療を必要とする対象における血糖のコントロールを誘導するための、請求項１～５、請求項６～１０、または請求項１１～１５のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項３８】

対象における摂食量を減少させるための、請求項１～５、請求項６～１０、または請求項１１～１５のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項３９】

対象の体重を減少させるための、請求項１～５、請求項６～１０、または請求項１１～１５のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項４０】

対象におけるコレステロール値を改善するための、請求項１～５、請求項６～１０、または請求項１１～１５のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【請求項４１】
対象におけるインスリン感受性を増加させる方法のための、請求項１～５、請求項６～１０、または請求項１１～１５のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【請求項４２】
対象におけるインスリン抵抗性を低下させるための、請求項１～５、請求項６～１０、または請求項１１～１５のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【請求項４３】
対象におけるエネルギー消費を増加させる方法のための、請求項１～５、請求項６～１０、または請求項１１～１５のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）などの可逆的リンカーを介して連結されたオキシントモジュリン（ＯＸＭ）およびポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を含む組成物が開示される。逆ペグ化（ｒｅｖｅｒｓｅ ｐｅｇｙｌａｔｅｄ）オキシントモジュリンを含む医薬組成物およびその使用方法も開示される。
【背景技術】
【０００２】
消化管は、膵臓タンパク質（ＰＰ）、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）、ペプチドＹＹ（ＰＹＹ）およびオキシントモジュリンを含む、摂食行動を調節する多くのペプチドホルモンの合成ならびに放出を担っている。ＯＸＭは、腸およびＣＮＳにおけるプログルカゴンの組織特異的な移行後のプロセシングから生じる。ＯＸＭは、インビトロおよびインビボの両方でＯＸＭの特性に寄与するが、単独ではペプチドの作用に十分ではないことが示された基礎的なオクタペプチド伸長をＣ末端に有する、完全なグルカゴン配列を含む３７個のアミノ酸を含む。食物摂取に応答して、ＯＸＭは、食事のカロリー含量に比例して、腸のＬ細胞によって血流中に分泌される。
【０００３】
ＯＸＭは、経口投与と腹腔内投与の両方の後にインスリン分泌の刺激を介してグルコースクリアランスを向上させる。ＯＸＭは摂食量も調節する。視床下部の室傍および弓状核（ＡＲＣ）へのＯＸＭの脳室内注射（ＩＣＶ）ならびに核内注射は、空腹のラットにおいて再摂食を抑制する。この抑制は、暗期の開始時に自由に摂食させたラットにおいても示されている。さらに、ＯＸＭの末梢投与は、空腹によって誘導される食物摂取および暗期の食物摂取の両方を用量依存的に抑制した。
【０００４】
短い血清半減期などの好ましくない薬物動態は、それ以外の点では有望な多くの薬剤候補の医薬品開発を妨げ得る。血清半減期は、実験によって得られる分子の特性であり、それぞれの新しい有望な薬物について実験的に決定する必要がある。例えば、低分子量タンパク質薬物を用いて、腎濾過などの生理的なクリアランス機構は、必要な投与計画のコストまたは頻度により実現不可能な薬物の治療レベルを維持することができる。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
タンパク質、特に短いペプチドは、血液、肝臓または腎臓において変性または酵素分解を受けやすい。したがって、タンパク質は、通常、循環半減期が数時間と短い。ペプチド薬は通常、安定性が低いため、活性ペプチドの有効血漿濃度を維持するために、持続的な頻度で送達される。さらに、ペプチド薬は通常、点滴により投与されるので、ペプチド薬の頻繁な注射は対象に対してかなりの不快感を引き起こす。したがって、その高い薬効を

維持しながら、治療用タンパク質およびペプチドの半減期を延長させる技術が必要である。このような所望のペプチド薬はまた、血清安定性が高いこと、活性が高いこと、および対象に注射した場合に望ましくない免疫応答を誘導する可能性の低いこと、の要件も満たすべきである。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本発明は、可逆的ペグ化技術を利用してペプチドの半減期を延長させたＯＸＭ誘導体に関する。

【０００７】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリン（ＯＸＭ）、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）からなる組成物に関し、前記ＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して前記オキシントモジュリンのアミノ末端に結合している。

【０００８】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）からなる組成物に関し、前記ＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基（Lys_{12}）に結合している。

【０００９】

別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）からなる組成物に関し、前記ＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号３０のリシン残基（Lys_{30}）に結合している。

【００１０】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの曲線下面積（ＡＵＣ）を改善する方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合するステップからなる方法に関する。

【００１１】

別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの投与頻度を低下させる方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合するステップからなる方法に関する。

【００１２】

別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの生物学的半減期を延長させるための方法であって、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を１：１：１のモル比で結合するステップからなる方法に関し、前記ＰＥＧポリマーは、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合している。

【００１３】

本発明の他の特徴および利点は、以下の発明を実施するための形態の中の実施例および図面から明らかになるであろう。しかし、本発明を実施するための形態から、本発明の趣旨および範囲内での様々な変更および改変が当業者に明らかとなるであろうから、本発明を実施するための形態および具体的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すものの、例示のみを目的として目的で提示されることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【００１４】

【図１】生成したＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ結合体の異なる変異体を示す図である。

【図２】ＧＬＰ－１受容体を過剰発現しているＣＨＯ－Ｋ１細胞とインキュベートした場合の異種PEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭおよび３種類のPEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体（アミノ、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）のインビトロ活性（ｃＡＭＰの定量）を示すグラフである。

【図３】ＩＰＧＴＴモデルにおける異種PEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭおよび３種類のPEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体（アミノ、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）のインビボ活性を示すグラフである。全ての化合物が、ビヒクル群と比較して耐糖能を誘導した。

【図４】雄のｏｂ／ｏｂマウスの体重に対する異種ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭおよび３種類のＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体（アミノ、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）の効果を示すグラフである。

【図５】雄のｏｂ／ｏｂマウスにおける摂食量に対する異種ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭおよび３種類のＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体（アミノ、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）の効果を示すグラフである。

【図６】雄のｏｂ／ｏｂマウスにおける非空腹時および空腹時のグルコースに対する異種ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭおよび３種類のＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体（アミノ、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）の効果を示すグラフである。

【図７】雄のｏｂ／ｏｂマウスにおける累積摂食量に対するＭＯＤ－６０３１、ＯＸＭおよびリラグルチドの効果を示すグラフである。

【図８】雄のｏｂ／ｏｂマウスにおける体重に対するＭＯＤ－６０３１、ＯＸＭおよびリラグルチドの効果を示すグラフである。

【図９】雄のｏｂ／ｏｂマウスにおける自由摂食時および空腹時の血糖値に対するＭＯＤ－６０３１、ＯＸＭおよびリラグルチドの効果を示すグラフである。

【図１０】雄のｏｂ／ｏｂマウスにおける試験の２日目の耐糖能（２ｇ／ｋｇ　ｐｏ）に対するＭＯＤ－６０３１および同時飼育群の効果を示すグラフである。

【図１１】雄のｏｂ／ｏｂマウスにおける試験の３０日目の耐糖能（２ｇ／ｋｇ　ｐｏ）に対するＭＯＤ－６０３１および同時飼育群の効果を示すグラフである。

【図１２】雄のｏｂ／ｏｂマウスにおける末梢血漿（ｔｅｒｍｉｎａｌ　ｐｌａｓｍａ）コレステロールに対するＭＯＤ－６０３１、ＯＸＭおよびリラグルチドの効果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００１５】

長時間作用型のオキシントモジュリン（ＯＸＭ）ならびにその生成法および使用法が本明細書に提供される。一態様において、本発明は、デュアルＧＬＰ－１／グルカゴン受容体アゴニスト、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）もしくは２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を含むか、またはそれらからなる組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）もしくは２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を含むか、またはそれらからなる組成物を提供する。別の実施形態において、ＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基（Lys_{12}）に結合している。一実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジ

ュリン、およびＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基（Ｌｙｓ$_{12}$）に結合しているポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を含むか、またはそれらからなる組成物である。

【００１６】

別の態様において、ペプチドの血清半減期を延長させるための新規な方法が本明細書に提供される。この方法は、天然ペプチドを血流中に徐放させる（ＦＭＳまたはＦｍｏｃと呼ばれる）化学リンカーを介したペプチドへのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖の可逆的結合に基づいている。その後、放出ペプチドは、血液脳関門を通過して中枢神経系（ＣＮＳ）に入るか、または任意の他の標的臓器に入ることもできる。一実施形態において、ＦＭＳリンカーの独特の化学構造は、特定の速度のペプチド放出につながる。

【００１７】

したがって、別の実施形態において、ＯＸＭペプチドの生物学的半減期を延長させるための方法が本明細書に提供される。別の実施形態において、生体液中のＯＸＭの循環時間を延長させるための方法であって、前記循環時間が無損傷のＯＸＭペプチドの徐放により延長される方法が本明細書に提供される。別の実施形態において、前記ＯＸＭペプチドの前記生物学的半減期または前記循環時間の延長により、前記ＯＸＭは血液脳関門を通過し、ＣＮＳを標的にすることが可能になる。生体液が、血液、血清、および脳脊髄液（ＣＳＦ）などであってもよいことは当業者には理解されよう。

【００１８】

一実施形態において、対象への本発明のＰＥＧ化オキシントモジュリン組成物の投与の際に、オキシントモジュリンは、前記組成物から前記ＦＭＳまたは前記Ｆｍｏｃリンカーの化学的加水分解の結果、対象の生体液中に放出される。別の実施形態において、放出されたオキシントモジュリンは損傷を受けておらず、完全なＧＬＰ－１およびグルカゴン受容体結合活性を回復する。別の実施形態において、前記ＦＭＳまたは前記Ｆｍｏｃを化学的に加水分解すると、前記生体液中の前記ＯＸＭペプチドの循環時間が延びる。別の実施形態において、前記ＯＸＭの循環時間の延長により、前記ＯＸＭが血液脳関門を通過し、ＣＮＳを標的にすることが可能になる。別の実施形態において、前記ＯＸＭの循環時間の延長により、前記ＯＸＭが血液脳関門を通過し、視床下部を標的にすることが可能になる。別の実施形態において、前記ＯＸＭの循環時間の延長により、前記ＯＸＭが血液脳関門を通過し、弓状核を標的にすることが可能になる。

【００１９】

一態様において、ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭのアミノ変異体（ＭＯＤ－６０３１と命名）は、二官能性リンカー（ＦＭＳまたはＦｍｏｃ）を介して連結したＯＸＭおよびｍＰＥＧ（３０）－ＳＨを含む部位特異的結合体である。別の実施形態において、ＯＸＭペプチドは、一方の側からリンカー上のＮ－スクシンイミドエステル（ＮＨＳ）基と反応するＮ末端側の末端アミンを介して連結されているが、ｍＰＥＧ（３０）－ＳＨは、そのチオール基によりＦＭＳリンカーのマレイミド部分に連結されている（本明細書の実施例を参照のこと）。Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０変異体は、それらのリシン残基のアミン基を介してＦＭＳリンカーに結合される。一実施形態において、可逆的ＰＥＧ化方法を本明細書で利用して、本明細書に提供される長時間作用型オキシントモジュリン（ＯＸＭ）ペプチド（例えば、ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ）を作製する。

【００２０】

一実施形態において、デュアル「ＧＬＰ－１／グルカゴン受容体アゴニスト」および「アゴニスト」という用語は、本明細書において互換的に使用される。別の実施形態において、この用語は、当技術分野で公知の任意のＧＬＰ－１／グルカゴン受容体アゴニストも含む。別の実施形態において、好ましいアゴニストは、オキシントモジュリンもしくはＯＸＭまたはその機能的変異体である。

【００２１】

一実施形態において、「機能的」という用語は、本明細書にさらに提供されるような体重減少、インスリン感受性の増加、インスリン抵抗性の低下、エネルギー消費の増加、耐

糖能の誘導、血糖のコントロールの誘導、コレステロール値の改善などを含むがこれらに限定されない生物活性を有する、本明細書に提供されるアゴニストまたはＯＸＭの能力を指す。

【００２２】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を含む組成物を提供し、このＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して前記オキシントモジュリンアミノ酸配列の位置番号３０のリシン残基（Lys_{30}）に結合している。一実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジュリン、およびＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基（Lys_{30}）に結合しているポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を含むか、またはそれらからなる組成物である。

【００２３】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）からなる組成物を提供し、このＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して前記オキシントモジュリンアミノ酸配列の位置番号３０のリシン残基（Lys_{30}）に結合している。一実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジュリン、およびＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基（Lys_{30}）に結合しているポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を含むか、またはそれらからなる組成物である。

【００２４】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を含む組成物を提供し、このＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して前記オキシントモジュリンのアミノ末端に結合している。一実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジュリン、およびＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンアミノ酸配列のアミノ末端に結合しているポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を含むか、またはそれらからなる組成物である。

【００２５】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）からなる組成物を提供し、このＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して前記オキシントモジュリンのアミノ末端に結合している。一実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジュリン、およびＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンアミノ酸配列のアミノ末端に結合しているポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を含むか、またはそれらからなる組成物である。

【００２６】

別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンペプチド、ならびに９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）リンカーを介してオキシントモジュリンペプチドの位置１２のリシンアミノ酸（Ｌｙｓ１２）もしくは位置３０のリシンアミノ酸（Ｌｙｓ３０）またはオキシントモジュリンペプチドのアミノ末端のリシンアミノ酸に結合しているポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマーを含む組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンペプチド、ならびに９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）リンカーを介

してオキシントモジュリンペプチドの位置１２のリシンアミノ酸（Ｌｙｓ１２）もしくは位置３０のリシンアミノ酸（Ｌｙｓ３０）またはオキシントモジュリンペプチドのアミノ末端のリシンアミノ酸に結合しているポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマーからなる修飾されたオキシントモジュリンペプチドを提供する。別の実施形態において、ＰＥＧがＬｙｓ１２、Ｌｙｓ３０またはアミノ末端でオキシントモジュリンに結合している組成物は、それぞれオキシントモジュリンの「Ｌｙｓ１２変異体」、「Ｌｙｓ３０変異体」または「アミノ変異体」と呼ばれる。一実施形態において、「アミノ変異体」という用語は、「Ｎ末端の変異体」、「Ｎ'変異体」または「Ｎ末端変異体」と同義である。当業者が、これらのリシン残基で本明細書に提供されるリンカー（ＦｍｏｃまたはＦＭＳ）／ＰＥＧ結合体を結合させるために、部位特異的にまたはランダムにＯＸＭ配列全体にリシン残基を容易に挿入するように本発明によって導かれ得ることは理解されたい。一実施形態において、１以上のリシン残基が、ＯＸＭ配列全体にわたって異なる位置に配置され、ＯＸＭをＰＥＧおよび切断可能なリンカー（例えば、ＦＭＳまたはＦｍｏｃ）に結合するために使用されている変異体も本発明に包含される。

【００２７】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンペプチド、ならびに９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）リンカーを介してオキシントモジュリンペプチドの位置１２のリシンアミノ酸（Ｌｙｓ１２）および位置３０のリシンアミノ酸（Ｌｙｓ３０）に結合しているポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマーを含む組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンペプチド、ならびに９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）リンカーを介してオキシントモジュリンペプチドの位置１２のリシンアミノ酸（Ｌｙｓ１２）およびアミノ末端のリシンアミノ酸に結合しているポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマーを含む組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンペプチド、ならびに９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）リンカーを介してオキシントモジュリンペプチドの位置３０のリシンアミノ酸（Ｌｙｓ３０）およびアミノ末端のリシンアミノ酸に結合しているポリエチレングリコール（ＰＥＧ）ポリマーを含む組成物を提供する。

【００２８】

別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、ペグ化オキシントモジュリンである。別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは逆ペグ化オキシントモジュリンである。別の実施形態において、「長時間作用型オキシントモジュリン」、「逆ペグ化オキシントモジュリン」、「可逆的ペグ化ＯＸＭ」、または「オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）もしくは２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を含むか、またはそれらからなる組成物」という語句は、互換的に使用される。別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してＰＥＧに連結されたＯＸＭである。別の実施形態において、長時間作用型ＯＸＭは、そのＬｙｓ１２残基、もしくはそのＬｙｓ３０残基またはそのアミノ（Ｎ'）末端を介してＦｍｏｃまたはＦＭＳに連結されている。

【００２９】

一実施形態において、本発明の長時間作用型オキシントモジュリンは、ＰＥＧポリマーを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型オキシントモジュリンは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンペプチドのアミノ末端に結合しているＰＥＧポリマーを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型オキシントモジュリンは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンペプチドのリシン残基１２または３０に結合しているＰＥＧポリマーを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジュリンペプチドのアミノ末端ならびにオキ

シントモジュリンのリシン残基１２および３０の両方にＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して結合しているＰＥＧポリマーを含む。

【００３０】

別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を１：０．２～１０：０．２～１０のモル比で含むか、またはそれらからなる組成物である。別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を１：０．５～２：０．５～２のモル比で含むか、またはそれらからなる組成物である。別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を１：１：１のモル比で含むか、またはそれらからなる組成物である。別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してオキシントモジュリンのアミノ末端に結合しているＰＥＧポリマーを含む。別の実施形態において、ＯＸＭ－ＰＥＧ－リンカーのモル比は１：１：１～１：１：３．５である。別の実施形態において、モル比は１：１：１～１：１：１０．０である。別の実施形態において、リンカーの比率が高いと、組成物の収率を最適化できる。

【００３１】

別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、限定されないがＦｍｏｃおよびＦＭＳなどの可逆的リンカーを介してＰＥＧに連結されている。別の実施形態において、ＦｍｏｃおよびＦＭＳは、塩基に感受性があり、生理的条件下で除去可能である。別の実施形態において、可逆的リンカーは、塩基に感受性があり、生理的条件下で除去可能であるリンカーである。別の実施形態において、可逆的リンカーは、塩基に感受性があり、血液、血漿、またはリンパ液中の生理的条件下で除去可能であるリンカーである。別の実施形態において、可逆的リンカーは、塩基に感受性があり、体液中の生理的条件下で除去可能であるリンカーである。別の実施形態において、可逆的リンカーは、塩基性ｐＨを有する体液中で除去可能であるリンカーである。別の実施形態において、塩基に感受性があるリンカーは、塩基性環境への曝露時に切断され、リンカーおよびＰＥＧからＯＸＭを放出する。別の実施形態において、温度に感受性があるリンカーは、このような切断が生じることを可能にする特定の温度に曝されると切断される。別の実施形態において、リンカーの切断を可能にする温度は、生理学的範囲内である。

【００３２】

別の実施形態において、逆ペグ化オキシントモジュリンは、ＯＸＭが可逆的リンカーを介してＰＥＧに連結されている組成物である。別の実施形態において、逆ペグ化オキシントモジュリンは、塩基性環境にさらされると、遊離ＯＸＭを放出する。別の実施形態において、逆ペグ化オキシントモジュリンは、血液または血漿に曝露されると、遊離ＯＸＭを放出する。別の実施形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、標準的なペグ化手順のように、互いに直接連結されていないＰＥＧおよびオキシントモジュリンを含むが、両方の残基はむしろ、塩基に対して非常に感受性があり、通常の生理的条件下で除去可能であるＦｍｏｃまたはＦＭＳの異なる位置に連結されている。別の実施形態において、通常の生理的条件は、血液または血漿などの生理的環境を含む。

【００３３】

別の実施形態において、ＦｍｏｃおよびＦＭＳの構造および作製プロセスは、米国特許第７５８５８３７号に記載されている。米国特許第７５８５８３７号の開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【００３４】

別の実施形態において、逆ペグ化は、ＯＸＭを長時間作用型ＯＸＭにさせる。別の実施

形態において、長時間作用型オキシントモジュリンは、生物学的半減期が延長したオキシントモジュリンである。別の実施形態において、逆ペグ化は、ＯＸＭの劣化に対する保護を提供する。別の実施形態において、逆ＰＥＧ化は、ＯＸＭのC_{max}を与え、本明細書に提供される組成物の投与に関連する副作用を低減する。別の実施形態において、逆ペグ化は、ＯＸＭのT_{max}を延長する。別の実施形態において、逆ペグ化は、ＯＸＭの循環半減期を延長させる。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、非修飾ＯＸＭと比較してバイオアベイラビリティが改善している。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、非修飾ＯＸＭと比較して生物活性が改善している。別の実施形態において、逆ペグ化は、ＯＸＭの効力を増強する。

【００３５】

他の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、生化学的測定の観点から、非修飾ＯＸＭと少なくとも同等である。他の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、薬理学的測定の観点から、非修飾ＯＸＭと少なくとも同等である。他の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、結合能（Ｋｄ）の観点から、非修飾ＯＸＭと少なくとも同等である。他の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、消化器系を介した吸収の観点から、非修飾ＯＸＭと少なくとも同等である。他の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、非修飾ＯＸＭよりも消化器系を介した吸収の間に、より安定である。

【００３６】

別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、遊離ＯＸＭと比較して改善された血中濃度曲線下面積（ＡＵＣ）レベルを示す。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、遊離ＯＸＭと比較して改善された生物活性および血中濃度曲線下面積（ＡＵＣ）レベルを示す。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、遊離ＯＸＭと比較して改善された血液保持時間（$t_{1/2}$）を示す。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、遊離ＯＸＭと比較して改善された生物活性および血液保持時間（$t_{1/2}$）を示す。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、遊離ＯＸＭと比較して改善された血中C_{max}レベルを示し、別の実施形態において、本明細書に提供される逆ペグ化組成物の投与に関連する副作用を低減する、より遅い放出プロセスが与えられる。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、遊離ＯＸＭと比較して改善された生物活性および血中C_{max}レベルを示す。別の実施形態において、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介してポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を遊離ＯＸＭのアミノ末端に結合するステップを含むかまたはそれらからなるＯＸＭのＡＵＣ、C_{max}、$t_{1/2}$、生物活性、もしくはそれらの任意の組み合わせを改善する方法を本明細書に提供される。

【００３７】

別の実施形態において、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介してポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を遊離ＯＸＭのアミノ末端に結合することによるＯＸＭのＡＵＣ、C_{max}、$t_{1/2}$、生物活性、もしくはそれらの任意の組み合わせの改善は、ＯＸＭの投与頻度を低下させることができる。別の実施形態において、ＯＸＭの投与頻度を低下させるための方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介してポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をＯＸＭのアミノ末端またはリシン残基に結合するステップを含むか、またはそれからなる方法が本明細書に提供される。別の実施形態において、ＯＸＭの逆ペグ化は、使用する投与量を低くすることが可能になる点で有利である。

【００３８】

別の実施形態において、ＯＸＭは、配列番号１のアミノ酸配列を含む。別の実施形態においては、ＯＸＭは、配列番号１のアミノ酸配列からなる。別の実施形態において、配列番号１は、ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＱＤＦＶＱＷＬＭＮＴＫＲＮＲＮＮＩＡ（配列番号１）のアミノ酸（ＡＡ）配列を含むかまたはそれからなる。別の実施形態

において、ＯＸＭは、ＣＡＳ番号６２３４０－２９－８で表されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【００３９】

別の実施形態において、ＯＸＭは、ヒトＯＸＭまたは任意の哺乳類のＯＸＭである。別の実施形態において、ＯＸＭは、グルカゴン－３７または生物活性エンテログルカゴンとも呼ばれている。別の実施形態において、ＯＸＭは、デュアルＧＬＰ－１／グルカゴン受容体アゴニストである。別の実施形態において、ＯＸＭは、ＯＸＭの生物活性のある断片である。別の実施形態において、生物活性のあるＯＸＭは、配列番号１のアミノ酸３０～アミノ酸３７に及ぶ。別の実施形態において、生物活性のあるＯＸＭは、配列番号１のアミノ酸１９～アミノ酸３７に及ぶ。別の実施形態において、本発明のＯＸＭは、２個のＣ末端アミノ酸が除去されたオクタペプチド型に相当する。別の実施形態において、本発明のＯＸＭは、本明細書に提供されるようなＯＸＭ活性を保持する配列番号１の任意の断片に相当する。

【００４０】

一実施形態において、ＯＸＭは、配列番号１のペプチドのペプチド相同体を指す。一実施形態において、本発明のＯＸＭアミノ酸配列は、デフォルトパラメータを用いる米国立バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定した場合に、配列番号１に記載のＯＸＭ配列と少なくとも５０％相同である。一実施形態において、本発明のＯＸＭのアミノ酸配列は、デフォルトパラメータを用いるＮＣＢＩのＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定した場合に、配列番号１に記載のＯＸＭ配列と少なくとも６０％相同である。一実施形態において、本発明のＯＸＭのアミノ酸配列は、デフォルトパラメータを用いるＮＣＢＩのＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定した場合に、配列番号１に記載のＯＸＭ配列と少なくとも７０％相同である。一実施形態において、本発明のＯＸＭのアミノ酸配列は、デフォルトパラメータを用いるＮＣＢＩのＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定した場合に、配列番号１に記載のＯＸＭ配列と少なくとも８０％相同である。一実施形態において、本発明のＯＸＭのアミノ酸配列は、デフォルトパラメータを用いるＮＣＢＩのＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定した場合に、配列番号１に記載のＯＸＭ配列と少なくとも９０％相同である。一実施形態において、本発明のＯＸＭのアミノ酸配列は、デフォルトパラメータを用いるＮＣＢＩのＢｌａｓｔＰソフトウェアを用いて決定した場合に、配列番号１に記載のＯＸＭ配列と少なくとも９５％相同である。

【００４１】

一実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭは、未修飾ＯＸＭの生物活性を維持する。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭは、ＯＸＭの生物活性を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、消化分泌液を減少させることを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、胃内容排出を減少および遅延させることを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、小腸における摂食運動パターンの抑制を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、ペンタガストリンによって刺激される酸分泌の抑制を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、胃ソマトスタチン放出の増加を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、ペプチドＹＹの効果を増強することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、グレリン放出の抑制を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、アミノピリン蓄積およびｃＡＭＰ産生の刺激を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、ＧＬＰ－１受容体に結合することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、グルカゴン受容体に結合することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、アデニル酸シクラーゼを活性化することによりＨ＋産生を刺激することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、ヒスタミンに刺激された胃酸分泌を抑制することを含む。別の実施形態

において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、摂食量を抑制することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、インスリン放出を刺激することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、外分泌膵臓分泌を抑制することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、インスリン感受性を増加させることを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、グルコースレベルを低下させることを含む。

【００４２】

一実施形態において、本発明は、さらに、オキシントモジュリンの生物学的半減期を延長させるための方法であって、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を１：１：１のモル比で結合するステップからなる方法を提供し、別の実施形態において、このＰＥＧポリマーは、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合している。

【００４３】

別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの生物学的半減期を延長させるための方法であって、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を１：１：１のモル比で結合するステップからなる方法に関連し、前記ＰＥＧポリマーは、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介してオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基に結合している。

【００４４】

別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの生物学的半減期を延長させるための方法であって、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を１：１：１のモル比で結合するステップからなる方法に関連し、前記ＰＥＧポリマーは、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号３０のリシン残基に結合している。

【００４５】

別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの生物学的半減期を延長させるための方法であって、オキシントモジュリン、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）および９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を１：１：１のモル比で結合するステップからなる方法に関連し、前記ＰＥＧポリマーは、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列のアミノ末端に結合している。

【００４６】

別の実施形態において、ＯＸＭ－ＰＥＧ－リンカーのモル比は１：１：１～１：１：３．５である。別の実施形態において、このモル比は１：１：１～１：１：１０．０である。別の実施形態において、リンカーの比率が高いと、組成物の収率を最適化できる。

【００４７】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの曲線下面積（ＡＵＣ）を改善する方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合するステップからなる

方法に関する。

【００４８】

別の実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの曲線下面積（ＡＵＣ）を改善する方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基に結合するステップからなる方法に関する。

【００４９】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの曲線下面積（ＡＵＣ）を改善する方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号３０のリシン残基に結合するステップからなる方法に関する。

【００５０】

一実施形態において、本発明は、オキシントモジュリンの曲線下面積（ＡＵＣ）を改善する方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をオキシントモジュリンのアミノ酸配列のアミノ末端に結合するステップからなる方法に関する。

【００５１】

一態様において、オキシントモジュリンの投与頻度を低下させる方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合するステップからなる方法が本明細書に提供される。

【００５２】

別の態様において、オキシントモジュリンの投与頻度を低下させる方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基に結合するステップからなる方法が本明細書に提供される。

【００５３】

別の態様において、オキシントモジュリンの投与頻度を低下させる方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をオキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号３０のリシン残基に結合するステップからなる方法が本明細書に提供される。

【００５４】

別の態様において、オキシントモジュリンの投与頻度を低下させる方法であって、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）をオキシントモジュリンのアミノ酸配列のアミノ末端に結合するステップからなる方法が本明細書に提供される。

【００５５】

別の態様において、本発明は、さらに、対象における摂食量を減少させるための方法であって、可動性リンカーを介してポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）に結合しているオキシントモジュリンからなる組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供し、前記可動性リンカーは、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）であり、前記ＰＥＧポ

リマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合している。

【００５６】

別の実施形態において、本発明は、さらに、対象の体重を減少させるための方法であって、可動性リンカーを介してポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）に結合しているオキシントモジュリンからなる組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供し、前記可動性リンカーは、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）であり、前記ＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合している。

【００５７】

別の実施形態において、本発明は、さらに、対象の血糖のコントロールを誘導するための方法であって、可動性リンカーを介してポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）に結合しているオキシントモジュリンからなる組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供し、前記可動性リンカーは、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）であり、前記ＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基もしくは位置番号３０のリシン残基またはアミノ末端に結合している。

【００５８】

本明細書に例示されるように（実施例５参照）、本明細書に提供されるアミノ変異体は、摂食量の減少、体重管理および血糖のコントロールを予想外に達成する。一実施形態において、本明細書に提供されるＯＸＭペプチドのＰＥＧ修飾は、予想外にＯＸＭの機能を妨げない。

【００５９】

別の実施形態において、本発明は、対象のコレステロール値を改善するための方法であって、本明細書に提供される有効量の組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供する。別の実施形態において、コレステロール値を改善することは、対象においてＬＤＬコレステロールを低下させる一方で、ＨＤＬコレステロールを増加させることを含む。別の実施形態において、ＬＤＬコレステロール値は、０ｍｇ／ｄＬを超えるが、２００ｍｇ／ｄＬ未満まで低下する。別の実施形態において、ＬＤＬコレステロール値は約１００～１２９ｍｇ／ｄＬまで低下する。別の実施形態において、ＬＤＬコレステロール値は、０ｍｇ／ｄＬを超えるが、１００ｍｇ／ｄＬ未満まで低下する。別の実施形態において、ＬＤＬコレステロール値は、０ｍｇ／ｄＬを超えるが、７０ｍｇ／ｄＬ未満まで低下する。別の実施形態において、ＬＤＬコレステロール値は、０ミリモル／Ｌを超えるが、５．２ミリモル／Ｌ未満まで低下する。別の実施形態において、ＬＤＬコレステロール値は、約２．６～３．３ミリモル／Ｌまで低下する。別の実施形態において、ＬＤＬコレステロール値は、０ミリモル／Ｌを超えるが、２．６ミリモル／Ｌ未満まで低下する。別の実施形態において、ＬＤＬコレステロール値は、０ミリモル／Ｌを超えるが、１．８ミリモル／Ｌ未満まで低下する。

【００６０】

別の実施形態において、本発明は、さらに、対象におけるインスリン抵抗性を低下させる方法であって、本明細書に提供される有効量の組成物を対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【００６１】

別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、迷走神経の間接的な機構を介して膵臓分泌を抑制することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、小腸を通る水電解質輸送の低下を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、グルコースの取り込みを刺激することを

含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、ソマトスタチン分泌を調節／刺激することを含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、摂食量および体重増加の両方の低下を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、脂肪症の低下を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、食欲抑制を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、拒食症の誘導を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、過体重および肥満の対象における体重の減少を含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、脂肪ホルモンのレプチンおよびアディポネクチンのレベルの変化を誘導すること含む。別の実施形態において、本発明の長時間作用型ＯＸＭの生物活性は、過体重および肥満の対象におけるエネルギー摂取を減少させることに加えて、エネルギー消費を増加させることを含む。

【００６２】

別の実施形態において、ＰＥＧポリマーは、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、オキシントモジュリンのアミノ末端またはリシン残基に結合している。別の実施形態において、「結合」および「連結」という用語は、互換的に使用される。別の実施形態において、ＰＥＧポリマーは、ＯＸＭのα－アミノ酸側鎖に連結される。別の実施形態において、ＰＥＧポリマーは、ＯＸＭのε－アミノ酸側鎖に連結される。別の実施形態において、ＰＥＧポリマーは、ＯＸＭの１以上のε－アミノ酸側鎖に連結される。別の実施形態において、ＰＥＧポリマーはスルフヒドリル部分を含む。

【００６３】

別の実施形態において、ＰＥＧは直鎖である。別の実施形態において、ＰＥＧは分岐鎖である。別の実施形態において、ＰＥＧは、２００～２００，０００Ｄａの範囲の分子量を有する。別の実施形態において、ＰＥＧは、５，０００～８０，０００Ｄａの範囲の分子量を有する。別の実施形態において、ＰＥＧは、５，０００～４０，０００Ｄａの範囲の分子量を有する。別の実施形態において、ＰＥＧ、２０，０００Ｄａ～４０，０００Ｄａの範囲の分子量を有する。

【００６４】

別の実施形態において、長時間作用型ＯＸＭは、限定されないが、ＦｍｏｃまたはＦＭＳ部分のフルオレン環に存在するNH_2、ＯＨ、ＳＨ、ＣＯＯＨ、ＣＨＯ、－Ｎ＝Ｃ＝Ｏ、－Ｎ＝Ｃ＝Ｓ、$-SO_2Cl$、$-SO_2CH=CH_2$、$-PO_2Cl$、$-(CH_2)_x$Ｈａｌなどの官能基と反応することができる任意のＰＥＧ誘導体を意味するＰＥＧ化剤を用いて調製される。別の実施形態において、ＰＥＧ化剤は、通常、ＰＥＧ分子の一端にある１つだけのヒドロキシル基が結合に利用可能であるモノメトキシル化形態で使用される。別の実施形態において、両方の末端が結合に利用可能であるＰＥＧの二官能型は、例えば、単一のＰＥＧ部分に共有結合した２つのペプチドまたはタンパク質の残基との結合を得ることが望ましい場合などに使用することができる。

【００６５】

別の実施形態において、分岐鎖のＰＥＧ類は、$R(PEG-OH)_m$として表され、式中、Ｒは、ペンタエリスリトールまたはグリセロールなどの中心コア部分を表し、ｍは分岐アームの数を表す。分枝アームの数（ｍ）は、３～１００以上の範囲であってもよい。別の実施形態において、ヒドロキシル基は、化学的修飾を受けやすい。別の実施形態において、分枝鎖のＰＥＧ分子については、米国特許第６，１１３，９０６号、同第５，９１９，４５５号、同第５，６４３，５７５号、同第５，６８１，５６７号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【００６６】

別の実施形態において、本発明は、標準的なペグ化手順のように、ＯＸＭに直接結合していないＰＥＧ部分を有するＯＸＭを提供するが、このＰＥＧ部分はむしろ、ＦｍｏｃまたはＦＭＳなどのリンカーを介して結合している。別の実施形態において、このリンカーは、塩基に非常に感受性があり、温和な塩基性条件下で除去可能である。別の実施形態において、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してＰＥＧに連結されたＯＸＭは、遊離ＯＸＭと同等

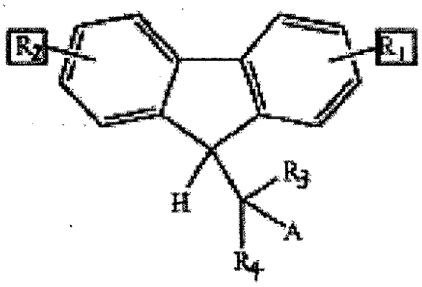
の活性がある。別の実施形態において、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してＰＥＧに連結されたＯＸＭは、遊離ＯＸＭよりも活性がある。別の実施形態において、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してＰＥＧに連結されたＯＸＭは、遊離ＯＸＭとは異なる活性を含む。別の実施形態において、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してＰＥＧに連結されたＯＸＭは、遊離ＯＸＭとは異なり、中枢神経系活性を有していない。別の実施形態において、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してＰＥＧに連結されたＯＸＭは、遊離ＯＸＭとは異なり、血液脳関門を通って脳に進入することができない。別の実施形態において、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してＰＥＧに連結されたＯＸＭは、遊離ＯＸＭと比較して延長した循環半減期を含む。別の実施形態において、ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介してＰＥＧに連結されたＯＸＭは、Ｆｍｏｃまたは ＦＭＳ部分と共にそのＰＥＧ部分を失い、したがって遊離ＯＸＭに戻る。

【００６７】

別の実施形態において、本発明は、（Ｘ）ｎ－Ｙの式の化合物およびその薬学的に許容される塩を提供し、式中、Ｙは、遊離アミノ基、カルボキシル基、またはヒドロキシル基を有するＯＸＭの部分であり、Ｘは、以下の式（ｉ）

【００６８】

【化１】



の基である。

【００６９】

別の実施形態において、R_1は、タンパク質またはポリマー担体部分；ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分を含む基であり、R_2は、水素、アルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アリール、アルカリル、アラルキル、ハロゲン、ニトロ、－SO_3H、－SO_2NHR、アミノ、アンモニウム、カルボキシル、PO_3H．ｓｕｂ．２およびＯＰO_3H_2からなる基から選択され、Ｒは、水素、アルキルおよびアリールからなる基から選択され、R_3およびR_4は、同一または異なるが、それぞれ、水素、アルキルおよびアリールからなる基から選択され、Ａは、この基がＯＸＭ－Ｙのアミノ基またはヒドロキシル基に連結しているときに共有結合であり、ｎは少なくとも１つの整数である。

【００７０】

別の実施形態において、「アルキル」、「アルコキシ」、「アルコキシアルキル」、「アリール」、「アルカリル」および「アラルキル」という用語を使用して、１～８個、好ましくは１～４個の炭素原子のアルキル基、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、およびブチル、ならびに６～１０個の炭素原子のアリール基、例えば、フェニルおよびナフチルを示す。「ハロゲン」という用語は、ブロモ、フルオロ、クロロおよびヨードを含む。

【００７１】

別の実施形態において、R_2、R_3およびR_4はそれぞれ水素であり、Ａは、－ＯＣＯ－、すなわち、９－フルオレニルメトキシカルボニル基（以下、「Ｆｍｏｃ」）である。別の実施形態において、Ｒは、フルオレン環の２位にある－SO_3Hであり、R_3およびR_4はそれぞれ水素であり、Ａは、－ＯＣＯ－、すなわち、２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル基（以下、「ＦＭＳ」）である。

【００７２】

別の実施形態において、ＯＸＭのペグ化および（ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ）ｎ－ＯＸＭまたは

（ＰＥＧ－ＦＭＳ）n－ＯＸＭ結合体の調製は、ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＮＨＳまたはＭＡＬ－Ｆｍｏｃ－ＮＨＳをＯＸＭのアミン成分に結合することによって、ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＯＸＭまたはＭＡＬ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭ結合体を取得し、次いで、マレイミド部分をＰＥＧ－ＳＨで置換して、それぞれ（ＰＥＧ－ＦＭＳ）ｎ－ＯＸＭまたは（ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ）ｎ－ＯＸＭ結合体を生成することを含む。

【００７３】

別の実施形態において、ＯＸＭのペグ化は、ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＮＨＳまたはＭＡＬ－Ｆｍｏｃ－ＮＨＳとＰＥＧ－ＳＨとを反応させることによって、ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＮＨＳまたはＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＮＨＳ結合体を形成し、次いで、これをＯＸＭのアミン成分と反応させて、それぞれ所望の（ＰＥＧ－ＦＭＳ）ｎ－ＯＸＭまたは（ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ）ｎ－ＯＸＭ結合体を与えることを含む。別の実施形態において、ＯＸＭなどのペプチド／タンパク質のペグ化については、米国特許第７５８５８３７号に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に援用される。別の実施形態において、ＦｍｏｃまたはＦＭＳによるＯＸＭなどのペプチド／タンパク質の逆ペグ化については、米国特許第７５８５８３７号に記載されている。

【００７４】

別の実施形態において、「長時間作用型ＯＸＭ」および「逆ペグ化ＯＸＭ」という語句は、互換的に使用される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、（ＰＥＧ－ＦＭＳ）ｎ－ＯＸＭまたは（ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ）ｎ－ＯＸＭの式によって本明細書で特定されるＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭで構成され、式中、ｎは少なくとも１の整数であり、ＯＸＭは、少なくとも１つのアミノ基を介してＦＭＳまたはＦｍｏｃ基に連結されている。

【００７５】

別の実施形態において、ＯＸＭのＬｙｓ１２もしくはＬｙｓ３０またはアミノ末端へのＰＥＧ－ＦｍｏｃまたはＰＥＧ－ＦＭＳの結合は、ＯＸＭを不活性にさせない。

【００７６】

一実施形態において、Ｌｙｓ１２変異体は、本明細書に提供される他の変異体よりも体重を管理するのにより有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＬｙｓ３０変異体は、本明細書に提供される他の変異体よりも体重管理を達成することにおいてより有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるアミノ変異体は、本明細書に提供される他の変異体よりも体重管理を達成することにおいてより有効である。

【００７７】

一実施形態において、Ｌｙｓ１２変異体は、本明細書に提供される他の変異体よりも慢性的な血糖のコントロールを達成することにおいてより有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＬｙｓ３０変異体は、本明細書に提供される他の変異体よりも慢性的な血糖のコントロールを達成することにおいてより有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるアミノ変異体は、本明細書に提供される他の変異体よりも血糖のコントロールを達成することにおいてより有効である。

【００７８】

治療的使用

別の実施形態において、ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭならびにそれらを含む医薬組成物は、高血糖の予防のため、血糖のコントロールを改善するため、非インスリン依存性糖尿病（一実施形態において、２型糖尿病）、インスリン依存性糖尿病（一実施形態において、１型糖尿病）、および妊娠糖尿病、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される糖尿病の治療のために利用される。別の実施形態において、ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭならびにそれらを含む医薬組成物は、２型糖尿病を治療するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、インスリン感受性を増大させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－

ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、インスリン抵抗性を低下させるために利用される。

【００７９】

別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、食欲を抑制するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、満腹感を誘導するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、体重の減少のために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、体脂肪の減少のために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、肥満度指数の低下のために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、摂食量の低下のために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、肥満を治療するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、肥満に関連する糖尿病を治療するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、心拍数を増加させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、基礎代謝率（ＢＭＲ）を増加させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、エネルギー消費を増加させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、耐糖能を誘導するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、血糖のコントロールを誘導するために利用される。一実施形態において、血糖のコントロールは、高くないおよび／もしくは変動しない血糖値、ならびに／または高くないおよび／もしくは変動しないグリコシル化ヘモグロビン値を指す。

【００８０】

別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、体重増加を抑制するために利用され、別の実施形態において、この体重増加は脂肪の増加に起因する。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、血糖値を減少させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、カロリー摂取量を減少させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、食欲を減少させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、体重管理に利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、体重減少を誘導または促進するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、所望の体重、所望の肥満度指数、所望の外観および良好な健康状態のうち

のいずれか１以上を維持するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、脂質プロファイルを制御するために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、トリグリセリド値を低下させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、グリセロールレベルを低下させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、アディポネクチンレベルを増加させるために利用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、遊離脂肪酸値を低下させるために利用される。

【００８１】

一実施形態において、「レベルの低下」という用語は、元のレベル、野生型のレベル、正常なレベルまたは対照のレベルに対して約１～１０％の低下を指す。別の実施形態において、低下は、約１１～２０％である。別の実施形態において、低下は約２１～３０％である。別の実施形態において、低下は約３１～４０％である。別の実施形態において、低下は約４１～５０％である。別の実施形態において、低下は約５１～６０％である。別の実施形態において、低下は約６１～７０％である。別の実施形態において、低下は約７１～８０％である。別の実施形態において、低下は８１～９０％である。別の実施形態において、低下は約９１～９５％である。別の実施形態において、低下は約９６～１００％である。

【００８２】

一実施形態において、「レベルの増加」または「延長」という用語は、元のレベル、野生型のレベル、正常なレベルまたは対照のレベルに対して約１～１０％の増加を指す。別の実施形態において、増加は約１１～２０％である。別の実施形態において、増加は約２１～３０％である。別の実施形態において、増加は約３１～４０％である。別の実施形態において、増加は約４１～５０％である。別の実施形態において、増加は約５１～６０％である。別の実施形態において、増加は約６１～７０％である。別の実施形態において、増加は約７１～８０％である。別の実施形態において、増加は約８１～９０％である。別の実施形態において、増加は約９１～９５％である。別の実施形態において、増加は約９６～１００％である。

【００８３】

別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、コレステロール値を低下させるために利用される。一実施形態において、コレステロール値の低下は、天然のＯＸＭの投与後に観察される低下よりも大きい。一実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、コレステロール値を６０～７０％低下させる。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、コレステロール値を５０～１００％低下させる。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、コレステロール値を２５～９０％低下させる。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、コレステロール値を５０～８０％低下させる。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、コレステロール値を４０～９０％低下させる。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、ＨＤＬコレステロール値を増加させるために利用される。

【００８４】
一実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、投与の間に有効性が著しく低下することなく、本明細書に記載の目的のために使用することができる。一実施形態において、ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭならびにそれらを含む医薬組成物は、１日中有効である。別の実施形態において、ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭならびにそれらを含む医薬組成物は、２～６日間有効である。一実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、１週間有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、２週間有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、３週間有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、４週間有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、６週間有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、２ヶ月間有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、４ヶ月間有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、６ヶ月間有効である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、１年以上有効である。

【００８５】
一実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、本明細書に記載の目的のために使用することができ、第１の用量の投与時にすぐに有効になり得る。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびにそれらを含む医薬組成物は、２以上の用量が投与された後に有効になる。

【００８６】
別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびに上述したようなそれらを含む医薬組成物は、ＯＸＭによって軽減、抑制、および／もしくは治療され得る疾患または病状に罹患しているヒト対象に適用される。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびに上述したようなそれらを含む医薬組成物を利用する方法は、獣医方法である。別の実施形態において、本明細書に提供されるＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体ならびに上述したようなそれらを含む医薬組成物を利用する方法は、家畜、ペットおよび実験動物などの動物に適用される。したがって、一実施形態において、本発明の対象は、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、マウス、ウマなどである。

【００８７】
別の実施形態において、本発明は、ＯＸＭもしくはＯＸＭを含む医薬製剤により治療可能または修復可能な対象における疾患を治療または軽減するための方法であって、本明細書に提供される治療有効量のＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよび／またはＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体を対象に投与することによって、ＯＸＭにより治療可能または修復可能な対象における疾患を治療または軽減するステップを含む方法を提供する。

【００８８】
別の実施形態において、本明細書で使用するＯＸＭ、「ペプチド」または「タンパク質

」は、天然ペプチド（分解産物、合成タンパク質または組換えタンパク質のいずれか）およびペプチド模倣体（典型的には、合成タンパク質）、ならびに一部の実施形態において、これらのタンパク質を体内でより安定にさせるか、または細胞への浸透をより可能にするように修飾したタンパク質類似体であるペプトイドおよびセミペプトイドを包含する。

【００８９】

別の実施形態において、「ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよび／またはＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体」は、ＦＭＳもしくはＦｍｏｃのいずれかがＬｙｓ１２でＯＸＭに結合しているＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよび／またはＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体である。別の実施形態において、ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよび／またはＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体は、ＦＭＳもしくはＦｍｏｃのいずれかがＬｙｓ３０でＯＸＭに結合しているＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよび／またはＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体である。別の実施形態において、ＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよび／またはＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体は、ＦＭＳもしくはＦｍｏｃのいずれかがアミノ末端でＯＸＭに結合しているＰＥＧ－Ｆｍｏｃ－ＯＸＭおよび／またはＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体である。

【００９０】

別の実施形態において、修飾は、ＣＨ２－ＮＨ、ＣＨ２－Ｓ、ＣＨ２－Ｓ＝Ｏ、Ｏ＝Ｃ－ＮＨ、ＣＨ２－Ｏ、ＣＨ２－ＣＨ２、Ｓ＝Ｃ－ＮＨ、ＣＨ＝ＣＨまたはＣＦ＝ＣＨ、骨格修飾、および残基修飾を含むが、これらに限定されないＮ末端修飾、Ｃ末端修飾、ペプチド結合修飾を含むが、これらに限定されない。ペプチド模倣化合物を調製するための方法は、当技術分野で公知であり、例えば、定量的ドラッグデザイン（Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ）、Ｃ．Ａ．Ｒａｍｓｄｅｎ Ｇｄ．、１７．２章、Ｆ．Ｃｈｏｐｌｉｎ Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ（１９９２）に記載されており、同文献は、本明細書に完全に記載したものとして、参照により援用される。この点に関するさらなる詳細を以下に提供する。

【００９１】

別の実施形態において、ペプチド内のペプチド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）は置換されている。一部の実施形態において、ペプチド結合は、Ｎ－メチル化結合（－Ｎ（ＣＨ３）－ＣＯ－）で置換されている。別の実施形態において、ペプチド結合は、エステル結合（－Ｃ（Ｒ）Ｈ－Ｃ－Ｏ－Ｏ－Ｃ（Ｒ）－Ｎ－）で置換されている。別の実施形態において、ペプチド結合は、ケトメチレン結合（－ＣＯ－ＣＨ２－）で置換されている。別の実施形態において、ペプチド結合は、α－アザ結合（－ＮＨ－Ｎ（Ｒ）－ＣＯ－）で置換され、式中、Ｒは任意のアルキル、例えば、メチル、カルバ結合（－ＣＨ２－ＮＨ－）である。別の実施形態において、ペプチド結合は、ヒドロキシエチレン結合（－ＣＨ（ＯＨ）－ＣＨ２－）で置換されている。別の実施形態において、ペプチド結合は、チオアミド結合（－ＣＳ－ＮＨ－）で置換されている。一部の実施形態において、ペプチド結合はオレフィン二重結合（－ＣＨ＝ＣＨ－）で置換されている。別の実施形態において、ペプチド結合はレトロアミド結合（－ＮＨ－ＣＯ－）で置換されている。別の実施形態において、ペプチド結合は、ペプチド誘導体（－Ｎ（Ｒ）－ＣＨ２－ＣＯ－）で置換されており、式中、Ｒは、天然では炭素原子上に存在する「通常の」側鎖である。一部の実施形態において、これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った結合のいずれかで生じ、さらに同時に、いくつか（２～３個）の結合で生じる。

【００９２】

一実施形態において、Ｔｒｐ、ＴｙｒおよびＰｈｅなどのタンパク質の天然の芳香族アミノ酸は、フェニルグリシン、ＴＩＣ、ナフチルラニン（ｎａｐｈｔｈｙｌｅｌａｎｉｎｅ）（Ｎｏｌ）、Ｐｈｅの環メチル化誘導体、Ｐｈｅのハロゲン化誘導体またはＯ－メチル－Ｔｙｒなどの合成の非天然アミノ酸で置換されている。別の実施形態において、本発明のペプチドには、１以上の修飾アミノ酸または１以上の非アミノ酸モノマー（例えば、脂肪酸、複合糖質など）が含まれる。

【００９３】

本発明のＯＸＭ誘導体または変異体は、野生型ＯＸＭと比較して、いくつかのアミノ酸

置換を含み、かつ／またはＰＥＧ化または他の方法で（例えば、組換え的にまたは化学的に）修飾することができる。

【００９４】

本明細書に提供されるＯＸＭは、上記のＯＸＭ配列の任意の類似体も含む。配列内の任意の１以上のアミノ酸残基は、当技術分野で公知の保存的置換、すなわち、１つの疎水性アミノ酸を別の疎水性アミノ酸で置換することなどの同様の化学型の１つとアミノ酸を置換することにより独立して置換することができる。あるいは、非保存的なアミノ酸変異は、ＯＸＭの増強された効果または生物活性を与えるように行うことができる。一実施形態において、ＯＸＭは、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰ－ＩＶ）による切断および不活性化に耐性があるように修飾される。誘導体およびＯＸＭの変異体ならびにそれらの生成法は、米国特許出願公開第２０１１／０１５２１８２号、同第２０１１／００３４３７４号、同第２０１０／０１４４６１７号に開示されており、これらの全ては参照により本明細書に援用される。

【００９５】

一実施形態において、本明細書に提供されるデュアルＧＬＰ－１／グルカゴン受容体アゴニストは、化学的に修飾することができる。別の実施形態において、本明細書に提供されるＯＸＭは、化学的に修飾することができる。特に、アミノ酸側鎖、アミノ末端および／またはＯＸＭのカルボキシル末端を修飾することができる。例えば、ＯＸＭは、アルキル化、ジスルフィド形成、金属錯体形成、アシル化、エステル化、アミド化、ニトロ化、酸を用いた処理、塩基を用いた処理、酸化または還元のうちの１以上を受けることができる。これらのプロセスを実施するための方法は当技術分野で公知である。特に、ＯＸＭは、低級アルキルエステル、低級アルキルアミド、低級ジアルキルアミド、酸付加塩、カルボン酸塩またはそれらのアルカリ付加塩として提供される。特に、ＯＸＭのアミノ末端またはカルボキシル末端は、例えば、エステル化、アミド化、アシル化、酸化または還元によって誘導体化することができる。特に、ＯＸＭのカルボキシル末端は、アミド部分を形成するように誘導体化することができる。

【００９６】

一実施形態において、「アミノ酸」または「アミノ酸類」は、天然に存在する２０種類のアミノ酸を含むと理解される。これらのアミノ酸は、インビボで翻訳後修飾される場合が多く、例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホスレオニンを含み、他の独特なアミノ酸は、２－アミノアジピン酸、ヒドロキシリシン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシンおよびオルニチンを含むが、これらに限定されない。一実施形態において、「アミノ酸」は、Ｄ－およびＬ－アミノ酸の両方を含む。他の合成アミノ酸または修飾アミノ酸を使用することもできることを理解されたい。

【００９７】

一実施形態において、本発明のＯＸＭは、ＯＸＭが可溶性形態であることを必要とする治療に利用される。別の実施形態において、本発明のＯＸＭは、水酸基含有側鎖によりタンパク質の溶解度を増加させることができるセリンおよびスレオニンを含むがこれらに限定されない、１以上の非天然または天然の極性アミノ酸を含む。

【００９８】

一実施形態において、本発明のＯＸＭは、標準的な固相技術などを用いることによって生化学的に合成される。別の実施形態において、これらの生化学的方法には、排他的固相合成（ｅｘｃｌｕｓｉｖｅ　ｓｏｌｉｄ　ｐｈａｓｅ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）、部分的固相合成、フラグメント縮合、または古典的な溶液合成が含まれる。

【００９９】

一実施形態において、固相ＯＸＭ合成法は、当業者に公知であり、さらにＪｏｈｎ　Ｍｏｒｒｏｗ　Ｓｔｅｗａｒｔ　ａｎｄ　Ｊａｎｉｓ　Ｄｉｌｌａｈａ　Ｙｏｕｎｇ、固相タンパク質合成（（Ｓｏｌｉｄ　Ｐｈａｓｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｙｎｔｈｅｓｅｓ）、第２版、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ社、１９８４）に記載されている。別の実施形態において、合成タンパク質は、分取高速液体クロマトグラフィーによって精製され（Ｃｒｅｉ

ｇｈｔｏｎ Ｔ．（１９８３）Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ．ＷＨ Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．Ｎ．Ｙ．）、その組成は、当業者に公知の方法によりアミノ酸配列決定を介して確認することができる。

【０１００】

別の実施形態において、組換えタンパク質技術を用いて、本発明のＯＸＭを生成する。一部の実施形態において、組換えタンパク質技術は、本発明のＯＸＭの大量生成に使用される。別の実施形態において、組換え技術については、Ｂｉｔｔｅｒら（１９８７）酵素学の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ）１５３：５１６－５４４、Ｓｔｕｄｉｅｒら（１９９０）酵素学の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ）１８５：６０－８９、Ｂｒｉｓｓｏｎら（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ ３１０：５１１－５１４、Ｔａｋａｍａｔｓｕら（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：３０７－３１１、Ｃｏｒｕｚｚｉら（１９８４）ＥＭＢＯ Ｊ．３：１６７１－１６８０およびＢｒｏｇｌｉら（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２４：８３８－８４３、Ｇｕｒｌｅｙら（１９８６）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：５５９－５６５ならびにＷｅｉｓｓｂａｃｈ ＆ Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ，１９８８、植物分子生物学のための方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州，第ＶＩＩＩ節、ｐｐ４２１－４６３に記載されている。

【０１０１】

別の実施形態において、本発明のＯＸＭは、本発明のＯＸＭをコードするポリヌクレオチドを用いて合成される。一部の実施形態において、本発明のＯＸＭをコードするポリヌクレオチドは、シス調節配列（例えば、プロモーター配列）の転写制御を含む発現ベクターに連結される。一部の実施形態において、シス調節配列は、本発明のＯＸＭの構成的発現を指示するのに適する。

【０１０２】

一実施形態において、「ポリヌクレオチド」という語句は、ＲＮＡ配列、相補的ポリヌクレオチド配列（ｃＤＮＡ）、ゲノムポリヌクレオチド配列および／または複合ポリヌクレオチド配列（例えば、上記の組み合わせ）の形態で単離され、提供される一本鎖または二本鎖の核酸配列を指す。

【０１０３】

一実施形態において、「相補的ポリヌクレオチド配列」は、逆転写酵素または任意の他のＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼを用いてメッセンジャーＲＮＡの逆転写から生じる配列を指す。一実施形態において、その後、この配列は、ＤＮＡポリメラーゼを用いてインビボまたはインビトロで増幅することができる。

【０１０４】

一実施形態において、「ゲノムポリヌクレオチド配列」は、染色体由来の（単離された）配列を指し、したがって、染色体の連続した部分を表す。

【０１０５】

一実施形態において、「複合ポリヌクレオチド配列」は、少なくとも部分的に相補的で、少なくとも部分的にゲノムである配列を指す。一実施形態において、複合配列は、本発明のペプチドをコードするのに必要ないくつかのエクソン配列、ならびにそれらの間に介在するいくつかのイントロン配列を含むことができる。一実施形態において、イントロン配列は、他の遺伝子を含む、任意の供給源のものであり得、典型的には、保存されたスプライシングシグナル配列を含む。一実施形態において、イントロン配列には、シス作用性発現調節エレメントが含まれる。

【０１０６】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、当業者に公知のＰＣＲ技術、または任意の他の方法もしくは手順を用いて調製される。一部の実施形態において、この手順は、２つの異なるＤＮＡ配列のライゲーションを含む（例えば、「分子生物学の最新プロトコル（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ

）」、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、１９９２を参照されたい）。

【０１０７】

一実施形態において、様々な原核細胞または真核細胞を宿主－発現系として使用して、本発明のＯＸＭを発現させることができる。別の実施形態において、これらには、タンパク質コード配列を含む組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物、タンパク質コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母、組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）で感染させた植物細胞系またはタンパク質コード配列を含むＴｉプラスミドなどの組換えプラスミド発現ベクターで形質転換した植物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。

【０１０８】

一実施形態において、本発明のＯＸＭを発現させるために、非細菌発現系（ＣＨＯ細胞などの哺乳類発現系）が使用される。一実施形態において、哺乳類細胞において本発明のポリヌクレオチドを発現させるために用いられる発現ベクターは、ＣＭＶプロモーターおよびネオマイシン耐性遺伝子を含むｐＣＩ－ＤＨＦＲベクターである。

【０１０９】

別の実施形態において、本発明の細菌系において、タンパク質発現を意図した使用に応じて、いくつかの発現ベクターを有利に選択することができる。一実施形態において、大量のＯＸＭが望まれる。一実施形態において、おそらく、細菌のペリプラズムまたはタンパク質産物が容易に精製される培地に発現産物を導く疎水性シグナル配列との融合物として、高レベルのタンパク質産物の発現を指示するベクターが望まれる。一実施形態において、特異的切断部位を有するように遺伝子操作された特定の融合タンパク質は、タンパク質の回収を補助する。一実施形態において、このような操作に適応できるベクターには、大腸菌発現ベクターのｐＥＴシリーズが含まれるが、これらに限定されない［Ｓｔｕｄｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：６０－８９（１９９０）］。

【０１１０】

一実施形態において、酵母発現系が使用される。一実施形態において、米国特許出願第５，９３２，４４７号に開示されているものなどの構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むいくつかのベクターが酵母で使用できる。別の実施形態において、酵母染色体への外来ＤＮＡ配列の組込みを促進するベクターが使用される。

【０１１１】

一実施形態において、本発明の発現ベクターは、さらに、例えば、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）およびプロモーター－キメラタンパク質のゲノム組込みのための配列などの単一ｍＲＮＡからのいくつかのタンパク質の翻訳を可能にする追加のポリヌクレオチド配列を含むことができる。

【０１１２】

一実施形態において、哺乳類発現ベクターには、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社から入手可能なｐｃＤＮＡ３、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐＧＬ３、ｐＺｅｏＳＶ２（＋／－）、ｐＳｅｃＴａｇ２、ｐＤｉｓｐｌａｙ、ｐＥＦ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＳｉｎＲｅｐ５、ＤＨ２６Ｓ、ＤＨＢＢ、ｐＮＭＴ１、ｐＮＭＴ４１、ｐＮＭＴ８１、Ｐｒｏｍｅｇａ社から入手可能なｐＣＩ、Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅ社から入手可能なｐＭｂａｃ、ｐＰｂａｃ、ｐＢＫ－ＲＳＶおよびｐＢＫ－ＣＭＶ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社から入手可能なｐＴＲＥＳ、ならびにそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【０１１３】

別の実施形態において、レトロウイルスなどの真核生物ウイルス由来の調節エレメントを含む発現ベクターが、本発明によって使用される。ＳＶ４０ベクターは、ｐＳＶＴ７およびｐＭＴ２を含む。別の実施形態において、ウシパピローマウイルス由来のベクターは

、ｐＢＶ－１ＭＴＨＡを含み、エプスタイン・バーウイルス由来のベクターは、ｐＨＥＢＯおよびｐ２Ｏ５を含む。他の例示的なベクターとしては、ｐＭＳＧ、ｐＡＶ００９／Ａ＋、ｐＭＴＯ１０／Ａ＋、ｐＭＡＭｎｅｏ－５、バキュロウイルスｐＤＳＶＥ、および真核細胞における発現に有効性を示すＳＶ－４０初期プロモーター、ＳＶ－４０後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または他のプロモーターの指示下でタンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターが含まれる。

【０１１４】

一実施形態において、植物発現ベクターが使用される。一実施形態において、ＯＸＭコード配列の発現は、いくつかのプロモーターによって促進される。別の実施形態において、ＣａＭＶの３５Ｓ ＲＮＡおよび１９Ｓ ＲＮＡプロモーターなどのウイルスプロモーター［Ｂｒｉｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３１０：５１１－５１４（１９８４）］、またはＴＭＶに対するコートタンパク質プロモーター［Ｔａｋａｍａｔｓｕ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．６：３０７－３１１（１９８７）］が使用される。別の実施形態において、例えば、ＲＵＢＩＳＣＯの小サブユニット［Ｃｏｒｕｚｚｉ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．３：１６７１－１６８０（１９８４）およびＢｒｏｇｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２４：８３８－８４３（１９８４）］または熱ショックプロモーター、例えば、ダイズｈｓｐ７．５－Ｅまたはｈｓｐ７．３－Ｂ［Ｇｕｒｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：５５９－５６５（１９８６）］などの植物プロモーターが使用される。一実施形態において、構築物は、Ｔｉプラスミド、Ｒｉプラスミド、植物ウイルスベクター、直接ＤＮＡ形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、および当業者に公知の他の技術を用いて植物細胞に導入される。例えば、Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ＆Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ［植物分子生物学のための方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，第ＶＩＩＩ節，ｐｐ４２１－４６３（１９８８）］を参照されたい。当技術分野で公知である昆虫および哺乳類宿主細胞系などの他の発現系も本発明によって使用することができる。

【０１１５】

（タンパク質をコードする）挿入されるコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含有すること以外に、本発明の発現構築物が、発現タンパク質の安定性、産生、精製、収量または活性を最適化するように遺伝子操作された配列も含むことができることを理解されたい。

【０１１６】

一部の実施形態において、様々な方法を用いて、宿主細胞系に本発明の発現ベクターを導入することができる。一部の実施形態において、このような方法は、一般的に、Ｓａｍｂｒｏｏｋらの分子クローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）：ラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバー研究所、ニューヨーク州（１９８９，１９９２）、Ａｕｓｕｂｅｌらの分子生物学の最新プロトコル（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、メリーランド州ボルチモア（１９８９）、Ｃｈａｎｇらの体細胞遺伝子治療（Ｓｏｍａｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ）、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、ミシガン州アナーバー（１９９５）、Ｖｅｇａらの遺伝子ターゲティング（Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ）、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、ミシガン州アナーバー（１９９５）、ベクター：分子クローニングベクターおよびそれらの使用の調査（Ａ Ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｕｓｅｓ，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ）、マサチューセッツ州ボストン（１９８８）およびＧｉｌｂｏａら［Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４（６）：５０４－５１２，１９８６］に記載されており、例えば、組換えウイルスベクターでの安定なまたは一過的なトランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび感染を含む。さらに、陽性－陰性選択法については米国特許第５，４６４，７６４号および同第５，４８７，９９２号を参照されたい。

【０１１７】
一実施形態において、形質転換細胞は、多量の組換えＯＸＭの発現を可能にする有効な条件下で培養される。別の実施形態において、有効な培養条件としては、タンパク質産生を可能にする有効な培地、バイオリアクター、温度、ｐＨおよび酸素条件を挙げることができるが、これらに限定されない。一実施形態において、有効な培地は、細胞が本発明の組換えＯＸＭを生成するために培養される任意の培地を指す。別の実施形態において、培地は、代表的には、同化可能な炭素、窒素およびリン酸源、適切な塩、ミネラル、金属ならびにビタミンなどの他の栄養素を有する水溶液を含む。一実施形態において、本発明の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュおよびペトリ皿で培養することができる。別の実施形態において、培養は、組換え細胞に適切な温度、ｐＨおよび酸素含有量で行われる。別の実施形態において、培養条件は、当業者の専門知識の範囲内である。

【０１１８】
一実施形態において、産生のために使用されるベクターおよび宿主系に応じて、結果として得られる本発明のＯＸＭは、組換え細胞内に残るか、発酵培地中に分泌されるか、大腸菌内のペリプラズムスペースなどの２つの細胞膜の間のスペースに分泌されるか、または細胞膜もしくはウイルス膜の外表面上に保持される。

【０１１９】
一実施形態において、培養の所定時間後に、組換えＯＸＭの回収が行われる。

【０１２０】
一実施形態において、本明細書で使用する「組換えＯＸＭの回収」という語句は、ＯＸＭを含む発酵培地全体を収集することを指し、分離または精製の追加のステップを意味する必要はない。

【０１２１】
一実施形態において、本発明のＯＸＭは、限定されないが、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、濾過、電気泳動、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、コンカナバリンＡクロマトグラフィー、クロマトフォーカシングおよび分画可溶化（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ ｓｏｌｕｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ）などの様々な、標準的なタンパク質精製技術を用いて精製される。

【０１２２】
一実施形態において、回収を容易にするために、発現させるコード配列は、本発明のタンパク質および融合された切断可能な部分をコードするように遺伝子操作することができる。一実施形態において、タンパク質が、アフィニティークロマトグラフィーによって、例えば、切断可能な部分に特異的なカラム上での固定によって容易に単離することができるように、融合タンパク質を設計することができる。一実施形態において、切断部位をタンパク質と切断可能な部分の間にあるように遺伝子操作し、この部位で融合タンパク質を特異的に切断する適切な酵素または薬剤での処理によって、タンパク質をクロマトグラフィーカラムから放出することができる［例えば、Ｂｏｏｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．１９：６５－７０（１９８８）；およびＧａｒｄｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：１５８５４－１５８５９（１９９０）を参照されたい］。別の実施形態において、本発明のＯＸＭは、「実質的に純粋な」形態で取り出される。別の実施形態において、「実質的に純粋な」という語句は、本明細書に記載の用途におけるＯＸＭの効果的な使用を可能にする純度を指す。

【０１２３】
一実施形態において、本発明のＯＸＭは、インビトロ発現系を用いて合成することもできる。一実施形態において、インビトロ合成法は当技術分野で公知であり、系の構成要素は市販されている。

【０１２４】
別の実施形態において、インビトロ結合活性は、本明細書に記載の天然の、組換え型の

および／または逆ペグ化されたＯＸＭならびにそれを含む医薬組成物の、限定されないが、糖尿病、肥満、摂食障害、代謝障害などの疾患もしくは病状を治療または改善する能力を測定することによって確認される。別の実施形態において、インビボ活性は、治療される疾患の既知の手段によって推定される。

【０１２５】

別の実施形態において、本発明のＯＸＭペプチドの投与量は、注射溶液中０．００５～０．１ｍｇ／ｋｇを含む。別の実施形態において、この投与量は、０．００５～０．５ｍｇ／ｋｇのＯＸＭペプチドを含む。別の実施形態において、この投与量は、０．０５～０．１μｇのＯＸＭペプチドを含む。別の実施形態において、この投与量は、注射溶液中０．００５～０．１ｍｇ／ｋｇのＯＸＭペプチドを含む。

【０１２６】

別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は１日１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、３６時間に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、４８時間に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、６０時間に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、７２時間に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、８４時間に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、９６時間に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、５日に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、６日に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、７日に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、８～１０日に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、１０～１２日に１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量ごとに１２～１５日１回投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭの投与量は、１５～２５日に１回投与される。

【０１２７】

別の実施形態において、本発明の逆ペグ化ＯＸＭは、筋肉内（ＩＭ）注射、皮下（ＳＣ）注射、または静脈内（ＩＶ）注射によって週に１回投与される。

投与される

【０１２８】

別の実施形態において、本発明の逆ペグ化ＯＸＭは、個人それ自体に提供することができる。一実施形態において、本発明の逆ペグ化ＯＸＭは、薬学的に許容される担体と混合される医薬組成物の一部として個人に提供することができる。

【０１２９】

別の実施形態において、「医薬組成物」は、生理学的に好適な担体および賦形剤などの他の化学成分を用いた本明細書に記載の長時間作用型ＯＸＮの製剤を指す。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を促進することである。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは生物学的効果を有する。

【０１３０】

別の実施形態において、本発明の組成物のいずれかは、少なくとも逆ペグ化ＯＸＭを含む。一実施形態において、本発明は複合製剤を提供する。一実施形態において、「組み合わせ製剤」は、上記で定義した組み合わせパートナーが、独立して投与されるか、または区別された量の組み合わせパートナーとの固定された異なる組み合わせの使用により、すなわち、同時に、並行して、別々にまたは連続して投与され得るという意味において、特に「パーツのキット」を定義する。一部の実施形態において、パーツのキットのパーツは、その後、例えば、同時に投与されるか、経時的に、すなわち、異なる時点でおよびパーツのキットの任意のパーツについて等しい時間間隔または異なる時間間隔で調製することができる。組み合わせパートナーの総量の割合は、一部の実施形態において、組み合わせ製剤で投与することができる。一実施形態において、例えば、患者の亜集団が治療されるニーズまたは異なるニーズが特定の疾患、疾患の重症度、年齢、性別、または体重によるものであり得る単一患者のニーズに対処するために、当業者が容易に行うことができるよ

うに、組み合わせ製剤を変更することができる。

【０１３１】

別の実施形態において、互換的に使用される「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という語句は、生物に対して著しい刺激を引き起こさず、投与される化合物の生物活性および特性を無効にしない担体または希釈剤を指す。アジュバントはこれらの語句に含まれる。一実施形態において、薬学的に許容される担体に含まれる成分の一つは、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、有機媒体および水性媒体の両方において広範囲の溶解性を有する生体適合性ポリマーであり得る（Ｍｕｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９７９））。

【０１３２】

別の実施形態において、「賦形剤」は、長時間作用型ＯＸＮの投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。一実施形態において、賦形剤としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖類および様々な種類のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールを挙げることができる。

【０１３３】

薬物の製剤化および投与のための技術は、参照により本明細書に援用される「レミントンの薬学」、マック出版社、ペンシルバニア州イーストン、最新版に見られる。

【０１３４】

別の実施形態において、本発明のペプチドの適切な投与経路としては、例えば、経口、直腸、経粘膜、経鼻、腸または筋肉内、皮下および髄内への注射を含む非経口送達、ならびに髄腔内、直接的な脳室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、もしくは眼内への注射を挙げることができる。

【０１３５】

本発明はまた、上記の治療方法のいずれかのために、脳への末梢経路による投与のための薬物の製造に使用するための逆ペグ化ＯＸＭも含む。末梢経路の例としては、吸入による投与を含め、経口、直腸、非経口、例えば、静脈内、筋肉内、もしくは腹腔内、粘膜、例えば、口腔、舌下、鼻腔、皮下または経皮投与が挙げられる。これらの薬物のためのＯＸＭの好ましい投与量を以下に示す。

【０１３６】

本発明は、吸入による投与を含め、経口、直腸、非経口、例えば、静脈内、筋肉内または腹腔内、粘膜、例えば、口腔、舌下、鼻腔、皮下もしくは経皮投与に適した形態で、逆ペグ化ＯＸＭおよび薬学的に適切な担体を含む医薬組成物を提供する。単位剤形の場合は、単位当たりの投与量は、例えば、下記のようにまたは以下に与えられる１ｋｇあたりの投与量に基づいて算出されるようなものであり得る。

【０１３７】

別の実施形態において、製剤は、全身的な方法よりもむしろ局所的に、製剤の注射を介して患者の身体の特定の領域に直接投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、鼻腔内剤形で製剤化される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、注射可能な剤形で製剤化される。

【０１３８】

投与量範囲の様々な実施形態が本発明によって企図される。逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭペプチド成分は、３日ごとに０．０１～０．５ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で投与される（ＰＥＧのサイズが実質的に異なり得るように、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭの重量のみが提供される）。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭペプチド成分は、７日ごとに０．０１～０．５ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭペプチド成分は、１０日ごとに０．０１～０．５ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭペプチド成分は、１４日ごとに０．０１～０．５ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で投与される。別の実施形態において、予想外に、逆ペグ化ＯＸＭ組成物中のＯＸＭの有効量は、遊離ＯＸＭの有効量の１／４～１／１０である。別の実施形態において、予想外に、ＯＸＭの

逆ペグ化は、遊離ＯＸＭと比較して、患者に処方されるＯＸＭの量を少なくとも５０％制限することができる。別の実施形態において、予想外に、ＯＸＭの逆ペグ化は、遊離ＯＸＭと比較して、患者に処方されるＯＸＭの量を少なくとも７０％制限することができる。別の実施形態において、予想外に、ＯＸＭの逆ペグ化は、遊離ＯＸＭと比較して、患者に処方されるＯＸＭの量を少なくとも７５％制限することができる。別の実施形態において、予想外に、ＯＸＭの逆ペグ化は、遊離ＯＸＭと比較して、患者に処方されるＯＸＭの量を少なくとも８０％制限することができる。別の実施形態において、予想外に、ＯＸＭの逆ペグ化は、遊離ＯＸＭと比較して、患者に処方されるＯＸＭの量を少なくとも８５％制限することができる。別の実施形態において、予想外に、ＯＸＭの逆ペグ化は、遊離ＯＸＭと比較して、患者に処方されるＯＸＭの量を少なくとも９０％制限することができる。

【０１３９】

別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭペプチド成分は、３日に１回、０．０１～０．５ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で投与される（ＰＥＧのサイズが実質的に異なり得るように、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭの重量のみ提供される）。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭペプチド成分は、７日に１回、０．０１～０．５ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭペプチド成分は、１０日に１回、０．０１～０．５ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭ組成物内のＯＸＭペプチド成分は、１４日に１回、０．０１～０．５ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で投与される。

【０１４０】

別の実施形態において、遊離ＯＸＭと比較して、逆ペグ化ＯＸＭは、有効投与頻度を少なくとも２倍低下させ、有効週用量を少なくとも２倍低下させ、したがって有害事象のリスクを制限し、ＯＸＭ療法の使用によるコンプライアンスを高める。別の実施形態において、遊離ＯＸＭと比較して、逆ペグ化ＯＸＭは、有効投与頻度を少なくとも３倍低下させ、有効週用量を少なくとも３倍低下させ、したがって有害事象のリスクを制限し、ＯＸＭ療法の使用によるコンプライアンスを高める。別の実施形態において、遊離ＯＸＭと比較して、逆ペグ化ＯＸＭは、有効投与頻度を少なくとも４倍低下させ、有効週用量を少なくとも４倍低下させ、したがって有害事象のリスクを制限し、ＯＸＭ療法の使用によるコンプライアンスを高める。別の実施形態において、遊離ＯＸＭと比較して、逆ペグ化ＯＸＭは、有効投与頻度を少なくとも５倍低下させ、有効週用量を少なくとも５倍低下させ、したがって有害事象のリスクを制限し、ＯＸＭ療法の使用によるコンプライアンスを高める。別の実施形態において、遊離ＯＸＭと比較して、逆ペグ化ＯＸＭは、有効投与頻度を少なくとも６倍低下させ、有効週用量を少なくとも６倍低下させ、したがって有害事象のリスクを制限し、ＯＸＭ療法の使用によるコンプライアンスを高める。別の実施形態において、有効投薬頻度および有効週用量は、（１）逆ペグ化ＯＸＭ組成物内の投与されるＯＸＭ成分の重量、および（２）遊離ＯＸＭ（非修飾ＯＸＭ）組成物内の投与されるＯＸＭ成分の重量に基づく。

【０１４１】

別の実施形態において、本発明の方法は、ＯＸＭ療法を必要としている慢性疾患に罹患した患者のコンプライアンスを高めることを含む。別の実施形態において、本発明の方法は、上述したように逆ＰＥＧ化ＯＸＭによりＯＸＭの投与頻度の低下を可能にする。別の実施形態において、本発明の方法は、ＯＸＭの投与の頻度を低下させることによってＯＸＭ治療を必要とする患者のコンプライアンスを高めることを含む。別の実施形態において、ＯＸＭの投与頻度の低下は、ＯＸＭをより安定させ、より強力にさせる逆ペグ化のおかげで達成される。別の実施形態において、ＯＸＭの投与頻度の低下は、ＯＸＭのＴ１／２の増加の結果として達成される。別の実施形態において、ＯＸＭの投与頻度の低下は、ＯＸＭの血液クリアランスの低下の結果として達成される。別の実施形態において、ＯＸＭの投与頻度の低下は、ＯＸＭのＴ１／２の増加の結果として達成される。別の実施形態において、ＯＸＭの投与頻度の低下は、ＯＸＭのＡＵＣ測定値の増加の結果として達成される。

【０１４２】
別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは１日に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、２日に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、３日に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、４日に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、５日に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、６日に１回患者に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、週に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、７～１４日に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、１０～２０日に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、５～１５日に１回対象に投与される。別の実施形態において、逆ペグ化ＯＸＭは、１５～３０日に１回対象に投与される。

【０１４３】
経口投与は、一実施形態において、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、チュアブル錠、懸濁液、および乳剤などを含む単位剤形を含む。このような単位剤形は、本発明の安全かつ有効な量のＯＸＭを含み、それらの各々は、一実施形態において、約０．７もしくは３．５ｍｇから約２８０ｍｇ／７０ｋｇ、または別の実施形態において、約０．５もしくは１０ｍｇから約２１０ｍｇ／７０ｋｇである。経口投与用の単位剤形の調製に適する薬学的に許容される担体は、当技術分野で公知である。一部の実施形態において、錠剤は、代表的には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、マンニトール、乳糖およびセルロースなどの不活性希釈剤、デンプン、ゼラチンおよびショ糖などの結合剤、デンプン、アルギン酸およびクロスカルメロースなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸およびタルクなどの潤滑剤のような従来の薬学的に適合性のあるアジュバントを含む。一実施形態において、二酸化ケイ素などの流動促進剤を用いて、粉末混合物の流動特性を改善することができる。一実施形態において、ＦＤ＆Ｃ染料などの着色剤は、外観のために添加することができる。アスパルテーム、サッカリン、メントール、ペパーミント、およびフルーツフレーバーなどの甘味料および香味剤は、チュアブル錠に有用なアジュバントである。カプセル剤は、代表的には、上記で開示した１以上の固体希釈剤を含む。一部の実施形態において、担体成分の選択は、本発明の目的にとって重要ではない味、コストおよび貯蔵安定性などの二次的考慮事項に依存し、当業者によって容易になされ得る。

【０１４４】
一実施形態において、経口剤形は、あらかじめ定義された放出プロファイルを含む。一実施形態において、本発明の経口剤形は、徐放性の錠剤、カプセル剤、トローチ剤またはチュアブル錠を含む。一実施形態において、本発明の経口剤形は、徐放性の錠剤、カプセル剤、トローチ剤またはチュアブル錠を含む。一実施形態において、本発明の経口剤形は、即時放出性の錠剤、カプセル剤、トローチ剤またはチュアブル錠を含む。一実施形態において、経口剤形は、当業者に公知の長時間作用型ＯＸＮの所望の放出プロファイルに従って製剤化される。

【０１４５】
別の実施形態において、本発明の方法で使用するための組成物は、溶液または乳濁液を含み、これらは、別の実施形態において、本発明の安全かつ有効な量の化合物、必要に応じて、局所鼻腔内投与用の他の化合物を含む水性溶液または乳濁液である。一部の実施形態において、これらの組成物は、鼻腔内経路によって化合物の全身送達のために使用される対象化合物を約０．００１％～約１０．０％ｗ／ｖ、より好ましくは、約０．０１％～約２．０％含む。

【０１４６】
別の実施形態において、これらの医薬組成物は、液体製剤の静脈内、動脈内、皮下、または筋肉内注射により投与される。別の実施形態において、液体製剤は、溶液、懸濁液、分散液、乳濁液、および油類などを含む。一実施形態において、これらの医薬組成物は、静脈内投与され、したがって、静脈内投与に適した形態で製剤化される。別の実施形態において、これらの医薬組成物は動脈内投与され、したがって、動脈内投与に適した形態で

製剤化される。別の実施形態において、これらの医薬組成物は筋肉内投与され、したがって、筋肉内投与に適した形態で製剤化される。

【０１４７】

さらに、他の実施形態において、これらの医薬組成物は体表面に局所的に投与され、したがって、局所投与に適した形態で製剤化される。適切な局所製剤としては、ゲル、軟膏、クリーム、ローション、および液滴などを挙げることができる。局所投与のために、本発明の化合物は、医薬担体の有無にかかわらず、追加の適切な治療剤と組み合わせて調製され、生理学的に許容される希釈剤中の液剤、懸濁剤、または乳剤として適用される。

【０１４８】

一実施形態において、本発明の医薬組成物は、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥のプロセスによって、当技術分野で公知のプロセスによって製造される。

【０１４９】

一実施形態において、本発明に従って使用するための医薬組成物は、薬学的に使用できる製剤へのＯＸＭのプロセシングを促進する賦形剤および補助剤を含む１以上の生理学的に許容される担体を用いて従来の方法で製剤化される。一実施形態において、製剤は、選択される投与経路に依存する。

【０１５０】

一実施形態において、本発明の注射剤は水溶液に製剤化される。一実施形態において、本発明の注射剤は、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理食塩緩衝液などの生理的に適合する緩衝液に製剤化される。一部の実施形態において、経粘膜投与のために、透過すべき障壁に適する浸透剤が製剤に使用される。このような浸透剤は当技術分野で公知である。

【０１５１】

一実施形態において、本明細書に記載の製剤は、例えば、ボーラス注射または持続注入による非経口投与用に製剤化される。別の実施形態において、注射用製剤は、例えば、必要に応じて防腐剤を添加したアンプルまたは多用量容器の中に単位剤形で提供される。別の実施形態において、組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁剤、液剤または乳剤であり、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤などの処方剤を含む。

【０１５２】

これらの組成物はまた、別の実施形態において、塩化ベンザルコニウムおよびチメロサールなどの保存剤、エデト酸ナトリウムなどのキレート剤、リン酸、クエン酸および酢酸などの緩衝剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、およびマンニトールなどの等張化剤、アスコルビン酸、アセチルシスチン、およびメタ重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、芳香剤、セルロースおよびその誘導体を含むポリマーなどの粘度調整剤、ポリビニルアルコール、ならびに必要に応じてこれらの水性組成物のｐＨを調整するための酸および塩基も含む。これらの組成物はまた、一部の実施形態において、局所麻酔薬または他の活性成分も含む。これらの組成物は、スプレー、ミスト、および液滴などとして使用することができる。

【０１５３】

一実施形態において、非経口投与用の医薬組成物は、水溶性形態の活性製剤の水溶液を含む。さらに、長時間作用型ＯＸＭの懸濁液は、一部の実施形態において、適切な油性または水系の注射用懸濁液として調製される。適切な親油性溶媒またはビヒクルは、一部の実施形態において、ゴマ油などの脂肪油類、またはオレイン酸エチル、トリグリセリドもしくはリポソームなどの合成脂肪酸エステル類を含む。水性注射用懸濁液は、一部の実施形態において、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの、懸濁液の粘度を増加させる物質を含む。別の実施形態において、懸濁液は、高濃度溶液の調製を可能にする長時間作用型ＯＸＭの溶解度を増大させる好適な安定化剤または薬剤も含む。

【０１５４】

別の実施形態において、活性化合物は、小胞、特に、リポソームに送達され得る（Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０）；Ｔｒｅａｔ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ，Ｌｏｐｅｚ－ Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｆｉｄｌｅｒ（編），Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．３５３－３６５（１９８９）；Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ，同書のｐｐ．３１７－３２７を参照されたい;一般的に同書を参照されたい）。

【０１５５】

別の実施形態において、制御放出系で送達される医薬組成物は、静脈内注入、植込み型浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、または他の投与様式のために製剤化される。一実施形態において、ポンプが使用される（Ｌａｎｇｅｒ，上記；Ｓｅｆｔｏｎ，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１（１９８７）；Ｂｕｃｈｗａｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７（１９８０）；Ｓａｕｄｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４（１９８９）を参照されたい）。別の実施形態において、高分子材料を用いることができる。さらに別の実施形態において、制御放出系は、治療標的、すなわち、脳の近傍に配置することができ、したがって、全身用量の一部しか必要ではない（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，ｉｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ、上記の第２巻、ｐｐ.１１５－１３８（１９８４）を参照されたい）。他の制御放出系は、Ｌａｎｇｅｒによる総説（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０））に記載されている。

【０１５６】

一実施形態において、長時間作用型ＯＸＭは、適当なビヒクル、例えば、無菌の、発熱物質を含まない水ベースの溶液で使用前に構成するための粉末形態である。組成物は、一部の実施形態において、微粒化および吸入投与用に製剤化される。別の実施形態において、組成物は微粒化手段により容器に入れられる。

【０１５７】

一実施形態において、本発明の製剤は、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いて、坐剤または停留浣腸などの直腸用組成物に製剤化される。

【０１５８】

一実施形態において、本発明の文脈における使用に適する医薬組成物は、長時間作用型ＯＸＭが、意図された目的を達成するために有効量で含まれる組成物を含む。別の実施形態において、治療有効量は、治療される対象の疾患の症状を予防、緩和もしくは改善するか、または生存を延長するのに有効な長時間作用型ＯＸＭの量を意味する。

【０１５９】

一実施形態において、治療有効量の決定は十分に当業者の能力の範囲内である。

【０１６０】

これらの組成物は、塩化ベンザルコニウムおよびチメロサールなどの保存剤、エデト酸ナトリウムなどのキレート剤、リン酸、クエン酸および酢酸などの緩衝剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、およびマンニトールなどの等張化剤、アスコルビン酸、アセチルシスチン、およびメタ重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、芳香剤、セルロースおよびその誘導体を含むポリマーなどの粘度調整剤、ポリビニルアルコール、ならびに必要に応じてこれらの水性組成物のｐＨを調整するための酸および塩基も含む。これらの組成物は、局所麻酔薬、または他の活性物質も含む。これらの組成物はスプレー、ミスト、および液滴などとして使用することができる。

【０１６１】

薬学的に許容される担体またはその成分として機能し得る物質の一部の例としては、ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖類、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン類、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、およびメチルセルロースなどのセルロースおよびその誘導体、粉末トラガカント、麦芽、ゼラチン、タルク、ステアリン酸およびステアリン酸マグネシウムなどの固体潤滑

剤、硫酸カルシウム、落花生油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびカカオ油などの植物油類、プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール類、アルギン酸、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）ブランドの乳化剤などの乳化剤、ラウリル硫酸ナトリウムなどの湿潤剤、着色剤、香味剤、錠剤化剤、安定化剤、酸化防止剤、防腐剤、発熱物質を含まない水、等張食塩水、ならびにリン酸緩衝液が挙げられる。化合物と組み合わせて使用される薬学的に許容される担体の選択は、基本的に化合物が投与される方法により決定される。対象化合物が注入される場合に、一実施形態において、薬学的に許容される担体は、ｐＨが約７．４に調整されている、血液適合性懸濁剤を有する無菌の生理食塩水である。

【０１６２】

さらに、組成物は、結合剤（例えば、アカシア、コーンスターチ、ゼラチン、カルボマー、エチルセルロース、グアーガム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポビドン）、崩壊剤（例えば、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸、二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、グアーガム、デンプングリコール酸ナトリウム）、様々なｐＨおよびイオン強度の緩衝液（例えば、トリスＨＣＩ、酢酸塩、リン酸塩）、表面への吸収を防ぐためのアルブミンまたはゼラチンなどの添加剤、界面活性剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ８０、プルロニックＦ６８、胆汁酸塩）、プロテアーゼ阻害剤、界面活性剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）、透過促進剤、可溶化剤（例えば、グリセロール、ポリエチレングリセロール）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシアニソール）、安定化剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、増粘剤（例えば、カルボマー、コロイド状二酸化ケイ素、エチルセルロース、グアーガム）、甘味料（例えば、アスパルテーム、クエン酸）、防腐剤（例えば、チメロサール、ベンジルアルコール、パラベン）、滑剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム）、流動助剤（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）、可塑剤（例えば、フタル酸ジエチル、クエン酸トリエチル）、乳化剤（例えば、カルボマー、ヒドロキシプロピルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム）、ポリマーコーティング（例えば、ポロキサマーまたはポロキサミン）、コーティング剤およびフィルム形成剤（例えば、エチルセルロース、アクリレート、ポリメタクリレート）ならびに／またはアジュバントをさらに含む。

【０１６３】

シロップ剤、エリキシル剤、乳剤および懸濁剤用の担体の典型的な成分としては、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、液体スクロース、ソルビトールおよび水を挙げることができる。懸濁液については、典型的な懸濁剤としては、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、セルロース（例えば、Ａｖｉｃｅｌ（登録商標）、ＲＣ－５９１）、トラガカントおよびアルギン酸ナトリウムが含まれ、典型的な湿潤剤としては、レシチンおよびポリエチレンオキシドソルビタン（例えば、ポリソルベート８０）を挙げることができる。典型的な防腐剤としては、メチルパラベンおよび安息香酸ナトリウムを挙げることができる。別の実施形態において、経口液体組成物はまた、上記に開示した甘味料、香味剤および着色剤などの１以上の成分も含む。

【０１６４】

これらの組成物はまた、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなどの高分子化合物の粒子状製剤の中もしくは上、またはリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層の小胞、赤血球ゴースト、もしくはスフェロプラスト上への活性物質の取り込みも含む。このような組成物は、物理的状態、溶解度、安定性、インビボ放出速度、およびインビボクリアランス速度に影響を及ぼすであろう。

【０１６５】

ポリマー（例えば、ポロキサマーまたはポロキサミン）でコーティングされた微粒子組成物、および組織特異的な受容体、リガンドもしくは抗原に対する抗体に結合した化合物

または組織特異的受容体のリガンドに結合した化合物も本発明に包含される。

【０１６６】

一実施形態において、化合物は、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンまたはポリプロリンなどの水溶性ポリマーの共有結合によって修飾される。別の実施形態において、修飾された化合物は、実質的に、対応する非修飾化合物よりも静脈内注射後の血中半減期が長い。一実施形態において、修飾は、水溶液中の化合物の溶解度を増加させ、凝集を排除し、化合物の物理的および化学的安定性を高め、化合物の免疫原性および反応性を著しく低下させる。別の実施形態において、所望のインビボ生物活性は、非修飾化合物を用いた場合よりも少ない頻度または低い用量でこのような高分子化合物の投与により達成される。

【０１６７】

別の実施形態において、有効量または有効用量の製剤は、インビトロアッセイから最初に推定することができる。一実施形態において、動物モデルにおける用量を製剤化することができ、そのような情報を用いて、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。

【０１６８】

一実施形態において、本明細書に記載の長時間作用型ＯＸＭの毒性および治療効果は、細胞培養または実験動物における、インビトロの標準的な薬学的手順によって決定することができる。一実施形態において、インビトロアッセイおよび細胞培養アッセイならびに動物試験から得られたデータは、ヒトにおける使用のための用量範囲で製剤化するのに用いることができる。一実施形態において、投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に依存して変化する。一実施形態において、正確な製剤、投与経路および投薬量は、患者の病状を考慮して個々の医師が選択することができる［例えば、Ｆｉｎｇｌ，ｅｔａｌ．，（１９７５）"Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ", Ｃｈ．１、ｐ．１を参照されたい］。

【０１６９】

一実施形態において、治療すべき病状の重症度および応答性に依存して、投薬は、数日～数週間続く治療の過程か、治癒が得られるか、または病態の縮小が達成されるまでの単回または複数回投与であり得る。

【０１７０】

一実施形態において、投与されるべき組成物の量は、当然、治療される対象、苦痛の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存する。

【０１７１】

一実施形態において、適合する医薬担体中に製剤化される本発明の製剤を含む組成物も、調製され、適切な容器に入れられ、示される病状の治療について表示される。

【０１７２】

別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭは、全身投与によって投与される。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭは、静脈内、筋肉内または皮下注射によって投与される。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭは、非イオン性界面活性剤（ｓｕｒｆａｃｅ ａｃｔｉｖｅ ａｇｅｎｔ）（すなわち、界面活性剤（ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ））、各種糖類、有機ポリオール類および／またはヒト血清アルブミンなどの複合有機賦形剤および安定化剤と組み合わせた凍結乾燥（ｌｙｏｐｈｉｌｉｚｅ）（すなわち、凍結乾燥（ｆｒｅｅｚｅ－ｄｒｉｅｄ））製剤である。別の実施形態において、医薬組成物は、注射用滅菌水中に本明細書に記載の凍結乾燥逆ペグ化ＯＸＭを含む。別の実施形態において、医薬組成物は、注射用滅菌ＰＢＳ中に本明細書に記載の凍結乾燥逆ペグ化ＯＸＭを含む。別の実施形態において、医薬組成物は、注射用の滅菌０．９％ＮａＣｌ中に本明細書に記載の凍結乾燥逆ペグ化ＯＸＭを含む。

【０１７３】

別の実施形態において、この医薬組成物は、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭならびに

ヒト血清アルブミン、ポリオール類、糖類、アニオン性界面活性剤、および安定化剤などの複合担体を含む。例えば、国際公開第８９／１０７５６号（原ら、ポリオールおよびｐ－ヒドロキシ安息香酸を含む）を参照されたい。別の実施形態において、この医薬組成物は、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭならびにラクトビオン酸および酢酸／グリシン緩衝液を含む。別の実施形態において、この医薬組成物は、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭおよび水中におけるインターフェロン組成物の溶解性を高めるアルギニンまたはグルタミン酸などのアミノ酸を含む。別の実施形態において、この医薬組成物は、本明細書に記載の凍結乾燥逆ペグ化ＯＸＭならびにグリシンまたはヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、緩衝剤（例えば、酢酸）、および等張剤（例えば、ＮａＣｌ）を含む。別の実施形態において、この医薬組成物は、本明細書に記載の凍結乾燥逆ペグ化ＯＸＭならびにリン酸緩衝液、グリシンおよびＨＳＡを含む。

【０１７４】

別の実施形態において、本明細書に記載のペグ化または逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、ｐＨ約４～７．２の緩衝溶液中に置かれたときに安定化する。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、安定化剤としてアミノ酸および場合によって（アミノ酸が荷電側鎖を含まない場合）塩で安定化される。

【０１７５】

別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、約０．３％～５重量％のアミノ酸である安定化剤を含む液体組成物である。

【０１７６】

別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、投薬精度および製品の安全性を提供する。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、注射可能な用途に使用するための生物活性のある安定な液体製剤を提供する。別の実施形態において、この医薬組成物は、本明細書に記載の凍結乾燥されていない逆ペグ化ＯＸＭを含む。

【０１７７】

別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、保管を容易にし、投与前に出荷するために、液体状態で長期間保管できる液体製剤を提供する。

【０１７８】

別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、マトリックス材料として固体脂質を含む。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む注射可能な医薬組成物は、マトリックス材料として固体脂質を含む。別の実施形態において、噴霧凝固による脂質微粒子の生成は、Ｓｐｅｉｓｅｒ（Ｓｐｅｉｓｅｒ ａｎｄ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．８（１９９１）４７－５４）によって記載されており、その後、経口投与のための脂質ナノペレットにされる（Ｓｐｅｉｓｅｒの欧州特許第０１６７８２５号（１９９０））。別の実施形態において、使用される脂質（例えば、非経口栄養用の乳剤に存在する脂肪酸からなるグリセリド）は、体内で十分に耐容性を示す。

【０１７９】

別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、リポソームの形態である（Ｊ．Ｅ．Ｄｉｅｄｅｒｉｃｈｓ ａｎｄ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ．／ｎｄ．５６（１９９４）２６７－２７５）。

【０１８０】

別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、ポリマー微粒子を含む。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む注射用医薬組成物は、高分子微粒子を含む。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、ナノ粒子を含む。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、リポソームを含む。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、脂質乳剤を含む。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、マイクロスフェアを含む。別の

実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、脂質ナノ粒子を含む。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、両親媒性脂質を含む脂質ナノ粒子を含む。別の実施形態において、本明細書に記載の逆ペグ化ＯＸＭを含む医薬組成物は、薬物、脂質マトリックスおよび界面活性剤を含む脂質ナノ粒子を含む。別の実施形態において、脂質マトリックスは、少なくとも５０％ｗ／ｗであるモノグリセリド含量を有する。

【０１８１】

一実施形態において、本発明の組成物は、長時間作用型ＯＸＭを含む１以上の単位剤形を含有する米国食品医薬品局（ＦＤＡ）によって承認されたキットなどのパックまたはディスペンサーデバイスで提供される。一実施形態において、このパックは、例えば、金属またはブリスターパックなどのプラスチックホイルを含む。一実施形態において、このパックまたはディスペンサー装置は、投与のための説明書が添付されている。一実施形態において、このパックまたはディスペンサーは、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた形式で容器に添付された通知が収容されており、この通知は、組成物の形態またはヒトもしくは動物への投与についての当局による承認を反映する。このような通知は、一実施形態において、処方薬または承認された製品添付文書について米国食品医薬品局によって承認されたラベリングである。

【０１８２】

一実施形態において、本発明の逆ペグ化ＯＸＭは、各薬剤を単独で用いた治療と比較して改善された治療効果を達成するために、追加の活性薬剤を個体に提供することができることが理解されるであろう。別の実施形態において、併用療法に関連する有害副作用に対して措置（例えば、相補的な薬剤の投薬および選択）が行われる。

【０１８３】

さらなる目的、利点、および本発明の新規な特徴は、限定されるものではないが、以下の実施例を考察すれば、当業者に明らかになるであろう。さらに、上記で説明し、特許請求の範囲で請求される本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、以下の実施例の実験によって支持される。

【０１８４】

実施例

一般的に、本明細書で使用する用語および本発明で利用する実験方法として、分子、生化学、微生物学および組換えＤＮＡの技術を挙げることができる。このような技術は、各種文献に詳細に説明されている。例えば"分子クローニング：実験室マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）"Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）；"Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ"Ｉ－ＩＩＩ巻 Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｒ.Ｍ.（編）（１９９４）；Ａｕｓｕｂｅｌら"分子生物学の最新プロトコル（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）"、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、メリーランド州ボルチモア（１９８９）；Ｐｅｒｂａｌの"分子クローニングの実用ガイド（Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）"、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、ニューヨーク州（１９８８）；Ｗａｔｓｏｎらの"組換えＤＮＡ（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ）"、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｂｏｏｋｓ、ニューヨーク州；Ｂｉｒｒｅｎら（編）"ゲノム解析：実験室マニュアルシリーズ（Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｓｅｒｉｅｓ）"、１～４巻、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州（１９９８）；米国特許第４，６６６，８２８号、同第４，６８３，２０２号、同第４，８０１，５３１号、同第５，１９２，６５９号、同第５，２７２，０５７号に記載の方法；"細胞生物学：実験ハンドブック（Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ）"、Ｉ－ＩＩＩ巻 Ｃｅｌｌｉｓ、Ｊ.Ｅ.（編）（１９９４）；Ｆｒｅｓｈｎｅｙによる"動物細胞の培養－基本技術マニュアル（Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ－Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃ

hnique" Wiley－Liss, ニューヨーク州（１９９４）、第３版；"免疫学における最新プロトコル（Current Protocols in Immunology）"Ｉ－ＩＩＩ巻、Coligan J.E.（編）（１９９４）；Stitesら（編）"基本的な臨床免疫（Basic and Clinical Immunology）"（第８版）、Appleton & Lange、コネチカット州ノーウォーク（１９９４）；Mishell and Shiigi（編）"細胞免疫学の選択法（Selected Methods in Cellular Immunology）"、W.H.Freeman and Co.、ニューヨーク州（１９８０）；利用可能なイムノアッセイは広範囲に特許および科学文献に記載されている。例えば、米国特許第３，７９１，９３２号、同第３，８３９，１５３号、同第３，８５０，７５２号、同第３，８５０，５７８号、同第３，８５３，９８７号、同第３，８６７，５１７号、同第３，８７９，２６２号、同第３，９０１，６５４号、同第３，９３５，０７４号、同第３，９８４，５３３号、同第３，９９６，３４５号、同第４，０３４，０７４号、同第４，０９８，８７６号、同第４，８７９，２１９号、同第５，０１１，７７１号、同第５，２８１，５２１号；"オリゴヌクレオチド合成（Oligonucleotide Synthesis）"Gait, M.J.（編）（１９８４）；"核酸ハイブリダイゼーション（Nucleic Acid Hybridization）"Hames, B.D.およびHiggins S.J.（編）（１９８５）；"転写と翻訳（Transcription and Translation）"Hames, B.D.およびHiggins S.J.（編）（１９８４）；"動物細胞培養（Animal Cell Culture）"Freshney, R.I.（編）（１９８６）；"固定化細胞および酵素（Immobilized Cells and Enzymes）"IRL Press, （１９８６）；"分子クローニングの実用ガイド（A Practical Guide to Molecular Cloning）"Perbal, B.（１９８４）および"酵素学における方法（Methods in Enzymology）"１－３１７巻、Academic Press；"ＰＣＲプロトコル：方法と応用へのガイド（PCR Protocols：A Guide To Methods And Applications）"、Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ（１９９０）；Marshakらの"タンパク質の精製および特徴づけのための戦略－研究室コースマニュアル（Strategies for Protein Purification and Characterization － A Laboratory Course Manual）"CSHL Press（１９９６）を参照されたく、これらの全ては、参照により援用される。他の一般的な文献は本明細書の中に提供される。

【０１８５】

材料および方法

ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ合成－異種

１．１段階１：ＯＸＭ合成

以下のペプチド配列からなるオキシントモジュリンを合成した。

ＨＳＱＧＴＦＴＳＤＹＳＫＹＬＤＳＲＲＡＱＤＦＶＱＷＬＭＮＴＫＲＮＲＮＮＩＡ（配列番号１）

【０１８６】

このペプチドを、ペプチド鎖のアセンブリ全体にＦｍｏｃ戦略を用いた固相法により合成した（Almac Sciences社、スコットランド）。

【０１８７】

このペプチド配列を、以下のステップを用いて構築した：

１．キャッピング

樹脂をＤＭＦ（Rathburn社）中の０.５Ｍ無水酢酸（Fluka社）溶液を用いてキャップした。

【０１８８】

２．脱保護

Ｆｍｏｃ－保護基を、ＤＭＦ（Ｒａｔｈｂｕｒｎ社）中２０％ｖ／ｖのピペリジン（Ｒａｔｈｂｕｒｎ社）溶液を用いて、成長するペプチド鎖から除去した。

【０１８９】

３．アミノ酸のカップリング

ＤＭＦ（Ｒａｔｈｂｕｒｎ社）中０．５Ｍのアミノ酸（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ社）溶液を、ＤＭＦ（Ｒａｔｈｂｕｒｎ社）中１ＭのＨＯＢｔ（Ｃａｒｂｏｓｙｎｔｈ社）溶液およびＤＭＦ（Ｒａｔｈｂｕｒｎ社）中１ＭのＤＩＣ（Ｃａｒｂｏｓｙｎｔｈ社）溶液を用いて活性化した。カップリングごとに各アミノ酸の４当量を使用した。

【０１９０】

粗ペプチドを樹脂から切断し、保護基をトリイソプロピルシラン（Ｆｌｕｋａ社）、水、ジメチルスルフィド（Ａｌｄｒｉｃｈ社）およびヨウ化アンモニウム（Ａｌｄｒｉｃｈ社）およびＴＦＡ（アプライドバイオシステムズ社）の混合物中で４時間撹拌することにより除去する。粗ペプチドを冷ジエチルエーテルからの沈殿により回収する。

【０１９１】

ペプチド精製

粗ペプチドを、アセトニトリル（Ｒａｔｈｂｕｒｎ社）／水（ミリＱ）（５：９５）に溶解し、分取ＨＰＬＣカラム上に添加した。クロマトグラフィーのパラメータを以下に示す。

カラム：Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｌｕｎａ Ｃ１８ ２５０ｍｍ×３０、１５μｍ、３００Ａ

移動相Ａ：水＋０．１％ｖ／ｖのＴＦＡ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）

移動相Ｂ：アセトニトリル(Ｒａｔｈｂｕｒｎ社)＋０．１％ｖ／ｖのＴＦＡ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）

ＵＶ検出：２１４または２２０ｎｍ

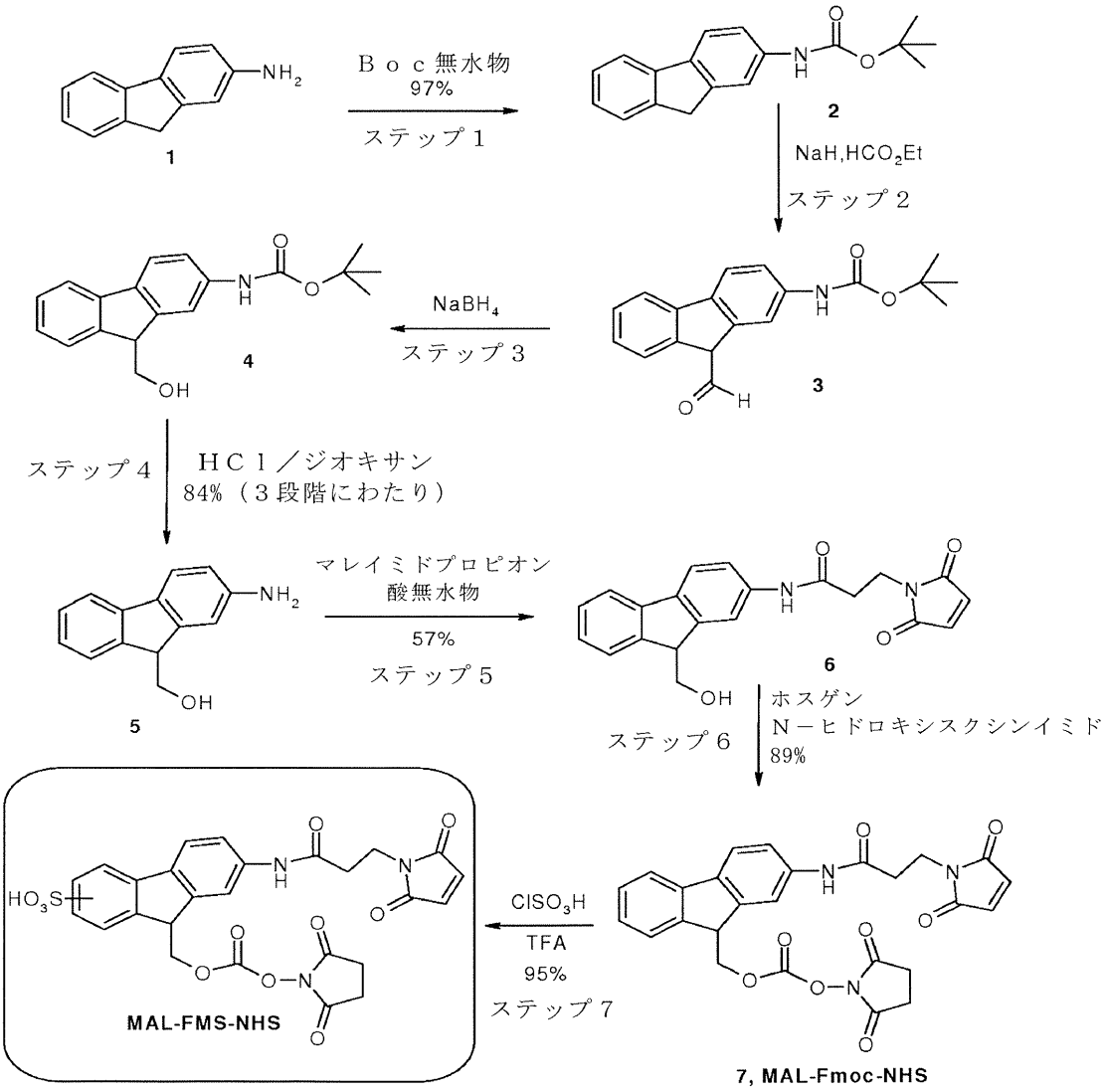
勾配：カラム体積の４倍を超える２５％Ｂ～３１％Ｂ

流速：４３ｍＬ／分

【０１９２】

段階２－リンカー合成

【化２】



スキーム１－ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＮＨＳリンカーの合成

【０１９３】

化合物２～５の合成は、ＡｌｂｅｒｉｃｉｏらのＳｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ,２００１,３１（２）,２２５－２３２に記載の手順に基づく。

【０１９４】

２－（Ｂｏｃ－アミノ）フルオレン（２）：

２－アミノフルオレン（１８ｇ、９９ミリモル）を、磁気撹拌しながら氷浴中でジオキサン：水（２：１）（２００ｍｌ）および２ＮのＮａＯＨ（６０ｍｌ）の混合物に懸濁した。次いで、Boc_2O（１０９ミリモル、１.１当量）を加え、室温で攪拌し続けた。反応をＴＬＣ（Ｒｆ＝０.５、ヘキサン／酢酸エチル２：１）によって監視し、２ＮのＮａＯＨの添加によりｐＨを９～１０に維持した。反応完了時に、懸濁液をｐＨ＝３まで１Ｍの$KHSO_4$で酸性化した。固体を濾過し、冷水（５０ｍｌ）、ジオキサン－水（２：１）で洗浄し、次いで、次のステップで使用する前に２回トルエンで共沸した。

【０１９５】

９－ホルミル－２－（Ｂｏｃ－アミノ）フルオレン（３）：

３口ＲＢＦに、ＮａＨ（油中６０％；３３０ミリモル、３.３当量）を、乾燥ＴＨＦ（５０ｍｌ）に懸濁し、ステップ２に記載の乾燥ＴＨＦ（２３０ｍｌ）中２－（Ｂｏｃ－アミノ）フルオレン溶液（２８ｇ；１００ミリモル）を２０分かけて滴加した。濃厚な黄色のスラリーが観察され、混合物を窒素下、室温で１０分間攪拌した。ギ酸エチル（２０.

１ｍｌ、２５０ミリモル、２.５当量）を滴加した（注意：ガス発生）。このスラリーは淡褐色溶液に変化した。この溶液を２０分間攪拌した。反応をＴＬＣ（Ｒｆ＝０.５、ヘキサン／酢酸エチル１：１）によって監視し、出発材料の痕跡のみが観察された時に、氷水（３００ｍｌ）でクエンチした。混合物を、ＴＨＦの大部分が除去されるまで減圧下で蒸発させた。得られた混合物をｐＨ＝５まで酢酸で処理した。得られた白色沈殿物を酢酸エチルに溶解し、有機層を分離した。水層を酢酸エチルで抽出し、全ての有機層を合わせ、飽和重炭酸ナトリウム、ブラインで洗浄し、$MgSO_4$で乾燥させた。濾過および溶媒除去後、黄色固体が得られた。この物質を次のステップで使用した。

【０１９６】

９－ヒドロキシメチル－２－（Ｂｏｃ－アミノ）フルオレン（４）：

上記の化合物３をＭｅＯＨ（２００ｍｌ）に懸濁し、水素化ホウ素ナトリウムを１５分かけて少しずつ添加した。混合物を３０分間撹拌した（注意：発熱反応およびガス発生）。反応をＴＬＣ（Ｒｆ＝０.５、ヘキサン／ＥｔＯＡｃ １：１）により監視し、完成させた。水（５００ｍｌ）を添加し、酢酸でｐＨを５に調整した。仕上げ作業には、酢酸エチルでの２回抽出、合わせた有機層の重炭酸ナトリウムおよびブラインでの洗浄、$MgSO_4$での乾燥、濾過および濃縮乾燥が伴う。得られた粗生成物を、ヘプタン／ＥｔＯＡｃ（３：１）を用いるフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、黄色泡状物を得た（３６ｇ、純度９７.５％、酢酸エチルおよびジエチルエーテルの痕跡が１Ｈ－ＮＭＲで観察された）。

【０１９７】

ＭＡＬ－Ｆｍｏｃ－ＮＨＳ（７）：

オーバーヘッド撹拌によりクリーンな乾燥ＲＢＦ５００ｍｌに乾燥ＴＨＦ（５５ｍｌ）中のトリホスゲン（１.５８ｇ、０.３５当量）を添加し、周囲環境で溶液を形成させた。これを氷／水浴で０℃まで冷却し、乾燥ＴＨＦ（１９ｍｌ）中ＮＨＳ（０.６７ｇ、０.３８当量）の溶液を窒素下、０℃で１０分間かけて滴加した。得られた溶液を３０分間撹拌した。乾燥ＴＨＦ（３６ｍｌ）中のＮＨＳ（１.３４ｇ、０.７７当量）を、さらに０℃で１０分かけて滴加し、１５分間撹拌した。

【０１９８】

化合物６（５.５ｇ、１当量）、乾燥ＴＨＦ（５５ｍｌ）およびピリジン（３.０７ｍｌ、２.５当量）を共に撹拌し、懸濁液を形成させた。これを０～５℃でＮＨＳ溶液に少しずつ添加し、次いで、氷浴を除去して、室温まで放置した。

【０１９９】

２０時間後、反応を停止した（出発原料がまだ存在しており、反応が完了するまで、少し不純物が観察された）。

【０２００】

反応混合物を濾過し、濾液に、４％ブライン（２００ｍｌ）およびＥｔＯＡｃ（２００ｍｌ）を添加した。分離後、有機層を５％クエン酸（２２０ｍｌ）および水（２２０ｍｌ）で洗浄した。次いで、有機層を濃縮し、粗ＭＡＬ－Ｆｍｏｃ－ＮＨＳ７.６７ｇを得た。この物質を、７０:３０～４０:６０の勾配のシクロヘキサン／ＥｔＯＡｃを用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分を真空濃縮し、ＭＡＬ－Ｆｍｏｃ－ＮＨＳ３.４７ｇ（４５％）を得た。

【０２０１】

ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＮＨＳ

トリフルオロ酢酸（１０ｍｌ）中のＭＡＬ－Ｆｍｏｃ－ＮＨＳ（１００ｍｇ、０.２ミリモル）の溶液に、クロロスルホン酸（０.５ｍｌ）を加えた。１５分後、氷冷したジエチルエーテル（９０ｍｌ）を添加し、生成物が沈殿した。この物質を遠心分離により収集し、ジエチルエーテルで洗浄し、真空乾燥した。ベージュ色の固体４１.３ｍｇ（３５％）を得た。

【０２０２】

段階３－結合

ＯＸＭペプチド中の３つのアミン部位（Ｌｙｓ１２、Ｌｙｓ３０およびアミノ末端）の異種結合を「ワンポット反応」として行い、ＯＸＭ、ｍＰＥＧ－ＳＨおよびＦＭＳリンカーの各成分の１当量を、３０分間、ｐＨ７．２で混合した。ｐＨを４まで下げるために酢酸を添加することによって、反応を停止した。

【０２０３】

ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ合成－同種

段階１：スペーサー　ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＮＨＳ（ＦＭＳ）合成：異種結合体について説明した通りである。

【０２０４】

段階２：オキシントモジュリン（ＯＸＭ）の合成：

Ｎ末端部位特異的ＯＸＭ－異種結合体について上記で説明した通りである。

【０２０５】

Lys_{12}またはLys_{30}部位特異的ＯＸＭ－リシンの位置１２または３０中のＦｍｏｃ－Ｌｙｓ（ｉｖＤｄｅ）－ＯＨおよび結合される最後のアミノ酸としてＢｏｃ－Ｈｉｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨを用いること以外は同じ戦略を使用する。

【０２０６】

段階３：同種結合

ＦＭＳのＯＸＭへのカップリング：

ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＮＨＳリンカー溶液（０．７４６ｍｌ、ＤＭＦ中１０ｍｇ／ｍｌ、２当量）をＯＸＭ樹脂（１当量、樹脂２００ｍｇ、３１．９９８μモル／ｇの遊離アミン）に添加した。樹脂が自由に可動可能になるまでＤＭＦを添加し、次いで、１９時間超音波処理した。樹脂をＤＭＦおよびメタノールで洗浄し、真空デシケーター中で一晩乾燥した。切断カクテルは、ＴＦＡ／ＴＩＳ／H_2Oを含んでいた。切断を、室温で３．５時間かけて行った。樹脂を濾過した後、ＦＭＳ－ＯＸＭを冷ジエチルエーテルで沈殿させた。切断段階の最後に、粗ＦＭＳ－ＯＸＭ（３６％純度）４２．１ｍｇを得た。

【０２０７】

ＦＭＳのLys_{12}部位特異的ＯＸＭへのカップリング：

ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＮＨＳリンカー溶液（ＤＭＦ中１０ｍｇ／ｍｌ、２．５当量）を、（Ｌｙｓ１２）ＯＸＭ樹脂（１当量）に添加し、ＤＩＥＡ（５当量）を添加した。樹脂が自由に可動可能になるまでＤＭＦを添加し、次いで、一晩超音波処理した。樹脂をＤＭＦおよびメタノールで洗浄し、真空デシケーター中で一晩乾燥した。切断および沈殿を、Ｎ末端部位特異的ＯＸＭについて記載したように行った。

【０２０８】

ＦＭＳのLys_{30}部位特異的ＯＸＭへのカップリング：

ＭＡＬ－ＦＭＳ－ＮＨＳリンカー（２．５当量）をＤＣＭに溶解させ、ＤＩＥＡ（５当量）を加えた。このリンカー／ＤＩＥＡ溶液を（Ｌｙｓ３０）ＯＸＭ樹脂に添加し、次いで、一晩超音波処理した。樹脂をＤＣＭおよびメタノールで洗浄し、真空デシケーター中で一晩乾燥した。切断および沈殿を、Ｎ末端部位特異的ＯＸＭについて記載したように行った。

【０２０９】

精製

得られた粗ＦＭＳ－ＯＸＭを一度に精製した。

試料希釈剤：水中の１０％アセトニトリル

カラム：Ｌｕｎａ　Ｃ１８（２），１００Å，２５０×２１．２ｍｍ

注入流量：９ｍｌ／分

実行中の流速：９ｍｌ／分

緩衝液Ａ：水（０．１％ＴＦＡ）

緩衝液Ｂ：アセトニトリル（０．１％ＴＦＡ）

勾配：３２分かけて１０～４５％Ｂ

監視：２３０ｎｍ

【０２１０】
ＰＥＧ３０のＦＭＳ－ＯＸＭへの結合
ＦＭＳ－ＯＸＭ溶液（１当量、１．５ｍｌのＤＭＦ中１５．１ｍｇ）を調製した。ＰＥＧ３０（１当量、１０ｍｇ／ｍｌのリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）中９．２ｍｌ）をＦＭＳ－ＯＸＭ溶液に添加した。次いで、反応混合物を、室温で３０分撹拌し、氷酢酸（２００μｌ）を加え、ｐＨを低下させることによって反応をクエンチした。
【０２１１】
次いで、得られた反応混合物を、ＲＰ－ＨＰＬＣを用いて精製した。
カラム：Ｌｕｎａ Ｃ１８（２）、１００Å、２５０×２１．２ｍｍ
注入流量：５ｍｌ／分
実行中の流量：２０ｍｌ／分
緩衝液Ａ：水＆０．１％ＴＦＡ
緩衝液Ｂ：アセトニトリル／水（７５:２５）＆０．１％ＴＦＡ
勾配：４１分かけて１０～６５％Ｂ
監視：２２０ｎｍ、２４０ｎｍ、２８０ｎｍ
【０２１２】
ＩＰグルコース負荷試験
Ｃ５７ＢＬ／６雄マウスを一晩絶食させ、秤量し、血糖値を、ハンドヘルドグルコメーターを用いて尾静脈サンプリングにより測定した。マウスに、ＰＥＧ－ＳＨ（ビヒクル）、ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ（異種）およびＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭの３種類の同種変異体（アミノ、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）をＩＰ注射した。グルコース（１．５ｇｒ／ｋｇ）を試験品投与後１５分の時点でＩＰ投与した。血糖値を、グルコース投与前ならびにグルコース投与後１０、２０、３０、６０、９０、１２０および１８０分の時点でハンドヘルドグルコメーターを用いて尾静脈サンプリングにより測定した。
【０２１３】
インビトロでのＧＬＰ－１受容体活性化のキャラクタライゼーション
ＧＬＰ－１受容体活性化を、共にＧＬＰ－１受容体を過剰発現している２種類の異なる細胞株のＨＴＳ１６３Ｃ２（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）およびｃＡＭＰハンター（登録商標）ＣＨＯ－Ｋ１ ＧＬＰ１Ｒ（Ｄｉｓｃｏｖｅｒｘ社）を用いて評価した。ＨＴＳ１６３Ｃ２（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）を１００,０００細胞／ウェルの密度で９６ウェルハーフエリアホワイトプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社）に播種し、３７℃で２４時間インキュベートした。これらの細胞を、異種のＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭおよび３種類の同種ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体（アミノ、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）の濃度を増加させてインキュベートした。細胞のｃＡＭＰ濃度をＨＴＲＦアッセイ（Ｃｉｓｂｉｏ社６２ＡＭ４ＰＥＢ）によって定量し、ＥＣ５０パラメータをＰＲＩＳＭソフトウェアにより分析した。ｃＡＭＰハンター（登録商標）ＣＨＯ－Ｋ１ ＧＬＰ１Ｒは、リガンドの受容体への結合の際にｃＡＭＰを分泌する。５０万細胞／ｍｌの密度で細胞を９６ウェルプレートに播種し、５％CO_2、３７℃で２４時間インキュベートした。リガンドを、ＩＢＭＸを含む希釈剤で希釈し、５％CO_2、３７℃で３０分間、培養ウェルに２連で添加した。ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭの濃度範囲は、1.5×10^{-10}～1.2×10^{-6}Ｍであった。溶解緩衝液および検出試薬をウェルに添加し、ｃＡＭＰ濃度を、化学発光シグナルを用いて検出した。用量依存曲線を作成して、様々なリガンドの結合親和性（ＥＣ５０）を、最適用量反応モデル（４パラメータ）を適用することによってＰＲＩＳＭソフトウェアを用いて算出した。
【０２１４】
インビトロでのグルカゴン受容活性化のキャラクタライゼーション
グルカゴン受容体活性化を、グルカゴン受容体を過剰発現するｃＡＭＰハンター（登録商標）ＣＨＯ－Ｋ１ ＧＣＧＲ細胞株を用いて評価した。この細胞株は、リガンドのグルカゴン受容体への結合の際にｃＡＭＰを分泌する。細胞を９６ウェルプレートに５０００００細胞／ｍｌの密度で播種し、５％CO_2、３７℃で２４時間インキュベートした。リ

ガンドを、ＩＢＭＸを含む希釈剤で希釈し、５％CO_2、３７℃で３０分間、培養ウェルに２連で添加した。ＭＯＤ－６０３１の濃度範囲は、５．８×１０$^{-11}$～２．７×１０$^{-7}$Ｍであった。溶解緩衝液および検出試薬をウェルに添加し、化学発光シグナルを用いてｃＡＭＰ濃度を検出した。用量依存曲線を作成し、様々なリガンドの結合親和性（ＥＣ５０）を、最適用量反応モデル（４パラメータ）を適用することによってＰＲＩＳＭソフトウェアを用いて算出した。

【０２１５】

肥満（ｏｂ／ｏｂ）マウスモデル

試験１：２５匹の雄のｏｂ／ｏｂマウス（雄、Ｂ６．Ｖ－Ｌｅｐ＜ｏｂ／ＯｌａＨｓｄ、５～６週齢、Ｈａｒｌａｎ社）を、動物を扱う取扱プロトコルに従って、投与するかのように施設に順応させた（１０日間）が、実際には秤量または投与は行わなかった（１０日間）。その後、動物に、２０ｍｌ／ｋｇの容量で皮下経路により適切なビヒクルを週に２回投与する７日間のベースライン期間を受けさせた。体重、食物および水の摂取量を毎日記録し、非空腹時および空腹時のグルコース測定および非空腹時および空腹時インスリン測定のために試料を採取した。その後、動物を、体重および血糖プロファイルに基づいて５つの治療群（Ｎ＝５）に割り当てた。表１に記載したように４日ごと（１、５、９、１３および１６日目）に、動物に投与した。治療期間中、投与前に、摂食量、水分摂取量および体重を測定し、毎日記録した。２、６、１４および１７日目に非空腹時および空腹時のグルコース（１７日目のみ非空腹時のグルコースを測定した）、空腹時および非空腹時のインスリン（２、６および１４日目）のようないくつかの手順およびサンプリングを行った。１９日目の最後の試料はコレステロールについて分析した。

【０２１６】

【表１】

表１：試験計画

群	治療（ｓｃ）	頻度	ｎ
１	ＰＥＧ－ＳＨ（１４２．８６ｍｇ／ｍｌ）	１、５、９、１３および１６日目	５
２	ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ　異種（ＭＯＤ－６０３０）２０００ナノモル／ｋｇ	１、５、９、１３および１６日目	５
３	アミノＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ２０００ナノモル／ｋｇ	１、５、９、１３および１６日目	５
４	Ｌｙｓ１２　ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ２０００ナノモル／ｋｇ	１、５、９、１３および１６日目	５
５	Ｌｙｓ３０　ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ２０００ナノモル／ｋｇ	１、５、９、１３および１６日目	５

【０２１７】

試験２：

１００匹の雄のｏｂ／ｏｂマウス（５～６週齢、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ社）を、動物を扱う取扱プロトコルに従って、投与するかのように施設に順応させた（３日間）が、実際には秤量または投与は行わなかった（７日間）。その後、動物に、２０ｍｌ／ｋｇの容量で皮下経路によりＰＥＧ３０－ＳＨビヒクル（１４６ｍｇ／ｍｌ）を週に２回投与する７日間のベースライン期間を受けさせた。体重、食物および水の摂取量を毎日記録した。その後、動物を、８つの治療群（群Ａ～Ｈ、Ｎ＝８）、対照群、同時飼育群に割り当てた（表２）。同時飼育群を、高用量（６０００ナノモル／ｋｇ）のＭＯＤ－６０３１の群と同時飼育し、群Ｄのペアの相手が前日に摂取したのと同量の食事配給を毎日与えた。

３種類の追加群（群Ｉ～Ｋ、Ｎ＝１２）に、１０００、３０００および６０００ナノモル／ｋｇでＭＯＤ－６０３１を投与し、ＰＫ分析のサンプリングのために使用した。これらの同時飼育群に、ＰＥＧ－ＳＨビヒクル（２９２ｍｇ／ｍｌ）、１０００、３０００および６０００ナノモル／ｋｇのＭＯＤ－６０３１を３２日間、週に２回投与し、ＯＸＭ、リラグルチド（登録商標）、ＰＢＳを１日に２回投与した。体重、食物および水の摂取量を毎日測定した。非空腹時および空腹時のグルコースを週に１回測定し、ＯＧＴＴを２日目および３０日目に行った。末梢血液試料（３３日目）を、グルコース、インスリン、コレステロール、およびＭＯＤ－６０３１、ＰＥＧ－ＦＭＳおよびＯＸＭの濃度について分析した。ＰＫ群のマウスにＭＯＤ－６０３１を単回投与し、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ法によってＭＯＤ－６０３１およびその化合物の濃度の定量化を可能にするＰＫ分析のために、血液試料を４、８、２４、３６、４８、７２、９６および１２０時間の時点（各時点につきｎ＝３）で採取した。

【０２１８】

【表２】

表２：試験計画

群	治療（ｓｃ）	ｎ	頻度
Ａ	ＰＥＧ３０－ＳＨビヒクル（２９２ｍｇ／ｋｇ；２０ｍｌ／ｋｇ）	８	週に２回、１、４、８、１１、１５、１８、２２、２５、２９および３２日目
Ｂ	ＭＯＤ－６０３１　１０００ナノモル／ｋｇ	８	
Ｃ	ＭＯＤ－６０３１　３０００ナノモル／ｋｇ	８	
Ｄ	ＭＯＤ－６０３１　６０００ナノモル／ｋｇ	８	
Ｅ	ＰＥＧ３０－ＳＨビヒクル（２９２ｍｇ／ｋｇ）群Ｄと同時飼育	８	
Ｆ	ＰＢＳ　１日２回（１０ｍｌ／ｋｇ）	８	３２日間１日２回
Ｇ	ＯＸＭ　６０００ナノモル／ｋｇ　１日２回（１０ｍｌ／ｋｇ）	８	
Ｈ	リラグルチド０．１ｍｇ／ｋｇ　１日２回（１０ｍｌ／ｋｇ）	８	
Ｉ	ＭＯＤ－６０３１　１０００ナノモル／ｋｇ　ＰＫ群	１２	１日目に単回注射
Ｊ	ＭＯＤ－６０３１　３０００ナノモル／ｋｇ　ＰＫ群	１２	
Ｋ	ＭＯＤ－６０３１　６０００ナノモル／ｋｇ　ＰＫ群	１２	

【０２１９】

結果

実施例１

製造および開発合成

ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ結合体の組成はその合成手順に依存する。ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ結合体の異なる変異体を作製した（図１）。

【０２２０】

異種結合体：

ＭＯＤ－６０３０（ＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭ）の合成を以下のように行った：ＦＭＳスペーサーを、（ワンポット反応として）ＯＸＭおよびＰＥＧ（３０）－ＳＨと混合した。このＦＭＳスペーサーを、一方の側でそのＮＨＳ活性化エステルによってＯＸＭに結合させ、同時に反対側でマレイミド基に連結されたＰＥＧ－ＳＨによってＯＸＭに結合させた。このように、ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ結合体の異種混合物は、ＯＸＭペプチドの３つのアミン（Ｎ末端、Ｌｙｓ$_{12}$およびＬｙｓ$_{30}$）のうちの１つによって連結された３種類の変異体で構成されている。

【０２２１】

同種結合体：

結合手順を、制御された部位特異的な方法でＦＭＳスペーサーへの付着を実行する２段階プロセスでさらに進めた。最初のステップでは、ＦＭＳスペーサーをＯＸＭ（樹脂上の部分的に保護されたＯＸＭ）に結合させ、次いで、切断し、その後、（ＲＰ－ＨＰＬＣによる）ＦＭＳ－ＯＸＭの脱保護および精製を行った。第２のステップは、精製された同種のＦＭＳ－ＯＸＭにＰＥＧ３０－ＳＨを取り付けた。最終的な結合生成物をさらにＲＰ－ＨＰＬＣにより精製する。追加の精製ステップには、イオン交換もしくはＳＥＣ－ＨＰＬＣまたは任意の他の精製ステップなどを適用することができる。

【０２２２】

樹脂上の３種類のペプチドを、Ｆｍｏｃ固相法を用いて合成した。ＯＸＭの位置１２または３０にアミノ酸リシンで連結された同種結合体の合成には、ｉｖＤｄｅ（１－[（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキサ－１－イリジン）エチル]）としてＯＸＭのＬｙｓ１２またはＬｙｓ３０のいずれかのために選択的な保護基を適用し、これは、ペプチドの残りの部分が他の保護基を有する樹脂上にまだ存在している間に、塩基性条件下で除去することができる。

【０２２３】

したがって、Ｎ末端には、Ｆｍｏｃを用いる固相合成法（通常は、Ｂｏｃ保護基は、εアミンのために使用される）に適する保護基を用い、Ｌｙｓ１２またはＬｙｓ$_{30}$にはｉｖＤｄｅ保護基を用い、３種類の樹脂結合ＯＸＭを合成した。これらのＯＸＭペプチドは、ＦＭＳリンカーとの更なる選択的な結合が意図されていた。

【０２２４】

同種結合体を、「樹脂上合成」として行った。以下の２つのステップで結合体を合成した。１．ＯＸＭとＦＭＳの結合、切断および精製、２．ＯＸＭ－ＦＭＳのＰＥＧ$_{30}$－ＳＨによるペグ化。この手順では、ＦＭＳリンカーの結合をＯＸＭで行い、これを樹脂に結合する。ＯＸＭを完全に保護することで、ＯＸＭ上の特定の保護されていない所望のアミノ酸部位がＮＨＳ部分と反応することが可能になった。精製したＦＭＳ－ＯＸＭをＰＥＧ－ＳＨに結合させた。粗結合体を、ＨＰＬＣ（ＲＰもしくは陽イオン交換またはその両方）を用いて精製した。

【０２２５】

実施例２

インビトロでのＧＬＰ－１受容体活性化のキャラクタライゼーション

ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ（ＭＯＤ－６０３０；異種）のＧＬＰ－１受容体結合活性化ならびにＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭの３種類の異なる同種変異体であるアミノ（ＭＯＤ－６０３１）、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０を、ＧＬＰ－１受容体を過剰発現する２種類の異なる細胞株：Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社のＨＴＳ１６３Ｃ２細胞株およびｃＡＭＰハンター（登録商標）ＣＨＯ－Ｋ１　ＧＬＰ１Ｒを用いて評価した。各変異体のＥＣ５０を算出し、その後、異種（ＭＯＤ－６０３０）変異体に対する各変異体の相対的効力を算出する（各同種変異体のＥＣ５０を異種変異体のＥＣ５０で割り、それに１００を掛ける）ことにより効力を決定した。ＥＣ５０値および算出した相対的効力を表３に示す。比較のために、ｃＡＭＰハンターＣＨＯ－Ｋ１　ＧＬＰ１Ｒ細胞株のＧＬＰ－１受容体に対するＯＸＭおよびＧＬＰ－１の結合親和性を測定した。

【０２２６】

【表３】

表３：ＧＬＰ－１受容体およびグルカゴン受容体の結合活性化

	Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社のＨＴＳ１６３Ｃ２		ｃＡＭＰ Ｈｕｎｔｅｒ（商標）ＣＨＯ－Ｋ１ ＧＬＰ１Ｒ		ｃＡＭＰ Ｈｕｎｔｅｒ（商標）ＣＨＯ－Ｋ１ ＧＣＧＲ	
	ＥＣ５０（ｎＭ）	異種変異体に対する相対的効力（％）	ＥＣ５０（ｎＭ）	異種変異体に対する相対的効力（％）	ＥＣ５０（ｎＭ）	異種変異体に対する相対的効力（％）
異種ＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭ	７６．２	１００	８．１４±１．３５	１００	１１．３２±３．２６	１００
ＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭアミノ	５５．２	７２．２４	８．０７±０．２１	９９．１	１０．３１±２．８７	９１．１
ＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭ Ｌｙｓ$_{12}$	１７９	２３４．９	９．４２±１．７７	１１５．７	２０．２１±４．１２	１７８．５
ＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭ Ｌｙｓ$_{30}$	３０７	４０２．９	１７．３４±２．３７	２１３．０	６．１２±１．７５	５４．１
オキシントモジュリン（ＯＸＭ）			１．３８±０．６８		１．０２±０．３２	
ＧＬＰ－１			０．０１６±０．００６		ＮＡ	
グルカゴン			ＮＡ		０．０４±０．０１１	

【０２２７】

同種変異体の相対的効力を異種変異体と比較し、表３にまとめた。アミノ変異体および異種変異体の同程度の生物活性は、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社のＨＴＳ１６３Ｃ２およびｃＡＭＰハンター（登録商標）ＣＨＯ－Ｋ１ ＧＬＰ１Ｒを用いて測定した場合に、それぞれ７２．２％および９９．１％の相対的効力を示した。

【０２２８】

Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０変異体は、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社のＨＴＳ１６３Ｃ２細胞株を用いた場合に、ＧＬＰ－１受容体結合活性化をそれぞれ２および４倍低下させたが、ｃＡＭＰハンター（登録商標）ＣＨＯ－Ｋ１ ＧＬＰ１Ｒ細胞株を用いた場合は、それぞれわずかな低下および２倍の低下を示した。ＯＸＭのＮ末端が、ＧＬＰ－１受容体へのＯＸＭの結合に関与することが報告された（Ｄｒｕｃｅら、２００８）ように、他の変異体と比較して、アミノ変異体が優れた結合活性を示したという事実は予想外である。全体的に、アミノ変異体および異種変異体について同程度の生物活性が示された。ＯＸＭおよびＧＬＰ－１ペプチドのＧＬＰ－１受容体結合活性化を測定した。ＯＸＭおよびＧＬＰ－１は、異種ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭと比較して、５．９および５０８．７倍高い受容体結合活性化を示すことが判明した。

【０２２９】

実施例３

インビトロでのグルカゴン受容体活性化のキャラクタライゼーション

ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体のグルカゴン受容体への結合親和性を、グルカゴン受容体を過剰発現するｃＡＭＰハンター（登録商標）ＣＨＯ－Ｋ１ ＧＣＧＲ細胞株を用いて決定した。この細胞株を用いて、異種ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ（ＭＯＤ－６０３０）およびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭの３種類の異なる同種変異体であるアミノ（ＭＯＤ－６０３１）、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０をキャラクタライゼーションした。各変異体のＥＣ５０を算出し、その後、異種変異体に対する各変異体の相対的効力を算出する（各同種変異体のＥＣ５０を異種変異体のＥＣ５０で割り、それに１００を掛ける）ことにより効力を決定した。ＥＣ５０値および算出した相対的効力を表３に示す。アミノ変異体は、異種変異体と同程度の結合活性を示した。Ｌｙｓ３０変異体は、最も高い生物活性を示し、Ｌｙｓ１２は１.８倍の低下を示した。ＯＸＭおよびグルカゴンペプチドのグルカゴン受容体結合活性化を測定した。ＯＸＭおよびグルカゴンが、異種ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭと比較して、１１.１倍および２８３倍高い受容体結合活性化を示すことが判明した。

【０２３０】

実施例４

ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体による耐糖能の誘導

異種PEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭおよび３種類のPEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体（アミノ、Lys_{12}およびLys_{30}）のインビボ活性を評価するために、ＩＰＧＴＴモデルを適用した。一晩絶食させたＣ５７ＢＬ／６マウスに異なる化合物およびビヒクル（ＰＥＧ－ＳＨ）をＩＰ注射し、その後、グルコースのＩＰ注射を行い、グルコメーターを用いて尾静脈から血糖値を測定した。ＰＥＧ－ＳＨ（２３８.１０ナノモル／ｋｇ）、異種および同種のPEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭ（１００ナノモル／ｋｇのペプチド含量）を、グルコースのＩＰ注射（１.５ｇｒ／ｋｇ）の１５分前にＩＰ投与した。全ての化合物は、ビヒクル群と比較して耐糖能を誘導した。意外にも、同種のアミノ変異体は、インビトロ活性の結果と対照的に、他の２つの変異体および異種PEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭと比較して効力はわずかに低く（表４、図３）、他の変異体と比較してわずかに高いグルコースＡＵＣを反映した。しかし、ビヒクルＰＥＧ－ＳＨ対照と比較して、全ての変異体において耐糖能が著しく改善した。

【０２３１】

【表４】

表４：Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおける耐糖能

	ＡＵＣ（－６０－１８０）	対照群のＡＵＣ（％）	ＡＵＣ（０－１８０）	対照群のＡＵＣ（％）
ＰＥＧ－ＳＨ	２６８５７	１００	２２５２２	１００
異種PEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭ	１８２００	６７．８	１３５４１	６０．１
ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ アミノ変異体	１９８９１	７４．１	１５７８１	７０．１
ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ Ｌｙｓ１２変異体	１７６５２	６５．７	１３９５３	６２．０
ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ Ｌｙｓ３０変異体	１７８１８	６６．３	１３１５９	５８．４

【０２３２】

可逆的PEG_{30}－ＦＭＳ－ＯＸＭの異種および同種変異体は、インビトロおよびインビボのＩＰＧＴＴモデルの両方において活性があることが示された。意外にも、インビト

ロの結果は、天然のＯＸＭのＮ末端がＧＬＰ－１受容体へのペプチド結合に関与しているという文献において提案されているものと整合しなかった。したがって、アミノ末端変異体がインビトロおよびインビボの両方で最も低い効力を示すことが予想された。しかし、同種のアミノ変異体ＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭは、２種類の異なる細胞株を用いて他の２種類の同種変異体と比較した場合に改善されたＧＬＰ－１受容体活性化を示すが（表３）、インビボモデルにおいてはＩＰＧＴＴと同程度の効力を示した。ＩＰＧＴＴインビボモデルは、（動物間のばらつきを考慮して）同程度の活性を示すように思われる。ＧＬＰ－１ＲおよびＧＣＧＲへの異なるインビトロ結合活性化がＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭの異なる変異体間で観察されたが、耐糖能を誘導する能力は同程度であることが示された（表３および表４）。意外なことに、ｃＡＭＰ誘導アッセイにおいて示されるように、同種のアミノＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭの優れたインビトロ活性は、インビボＩＰグルコース負荷試験には反映されなかった。同種のアミノ変異体ＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭは、他の２種類の変異体および異種のＰＥＧ$_{30}$－ＦＭＳ－ＯＸＭと比較して、最も低い耐糖能プロフィールを示した。しかし、ビヒクルと比較して、依然として有意な耐糖能効果を示した（図３）。

【０２３３】

実施例５

ｏｂ／ｏｂマウスモデルにおけるＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ変異体による体重、血糖および脂質プロファイルの改善

ｏｂ／ｏｂマウスモデルは、レプチンを産生することができず、高インスリン血症、肥満、過食症、インスリン抵抗性およびその後の高血糖症を特徴とする表現型を発現するようなｏｂ遺伝子の変異を示す。これらのマウスを、ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭ（異種）およびＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭの３種類の同種変異体（アミノ酸、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）の有効性を評価するために、２つの異なる試験で糖尿病の遺伝モデルとして用いた。

【０２３４】

試験１：この試験では、２０００ナノモル／ｋｇで投与した場合の同種変異体（アミノ、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０）および異種ＭＯＤ－６０３０の有効性を比較した。ビヒクル（ＰＥＧ－ＳＨ）群と比較して全ての試験品について体重が減少し、Ｌｙｓ１２、ＭＯＤ－６０３０、アミノおよびＬｙｓ３０変異体は、最終的（１８日目）にそれぞれ３．１％、４．７％、４．９％および６．５％減少した（図４）。体重減少は、１日目、５日目、１３日目および１６日目における薬物注射後に観察された（図４）。摂食量の減少が、薬物投与後の全ての治療群について観察された（９日目を除く）（図５）。試験中の血糖パラメータの測定により、アミノおよびＬｙｓ１２治療群では非空腹時血糖の改善が示され（図６ａ）、全ての治療群で空腹時血糖の改善が示された（図６ｂ）。全ての治療群は、対照と比較して、著しく低いインスリンレベルを示した。注目すべきは、この試験において投与される用量は、ＭＯＤ－６０３０のより低い有効用量である２０００ナノモル／ｋｇであり、したがって体重、摂食量および血糖プロファイルの改善は比較的緩やかであった。予想外にも、アミノ変異体は、体重を減らし、摂食量を抑制し、血糖のコントロールを改善する能力に優れた有効性を示した唯一の変異体であった。製造の観点から、樹脂上でのアミノ変異体の合成は、固相合成のペプチドがアミノ末端から延長されることを考慮すると、最も単純な手順である。末端アミンは、位置１２および３０のリシンの内部アミン基よりもカップリングに対して好ましい有用性を有する。このアクセシビリティは、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０変異体と比較して、アミノ変異体のより高い製造収率に反映されている。さらなる利点は、アミノ変異体に向けた合成が異種変異体のためのＯＸＭ合成と比較して変わらず、Ｌｙｓ１２およびＬｙｓ３０変異体の合成が、ペプチド合成のために使用されるＬｙｓの変更および追加の選択的切断ステップ（Ｌｙｓの保護基を選択的に除去すること）により変えられたことである。異種変異体のために以前に開発されたようなＯＸＭ合成は、優れた収率および堅牢性を実現するためにすでに最適化されていた。全体的に、製造の観点から、樹脂上でのアミノ変異体の合成は単純であり、代替的な変異

体に勝る利点を有する。同種変異体であるので、薬物開発および薬物治療に対してより適しているという点で異種変異体を上回る利点も有する。

【０２３５】

試験２：本試験では、ｏｂ／ｏｂマウスモデルにおいて、薬理学的および薬物動態学的パラメータに対する、１０００、３０００および６０００ナノモル／ｋｇでのＭＯＤ－６０３１（アミノ変異体）の週２回投与の慢性的影響を調べ、ＯＸＭおよびリラグルチド（長時間作用型ＧＬＰ－１受容体アゴニスト）を参照化合物として評価した。測定した薬理学的パラメータは、体重、食物および水の摂取量、血糖のコントロールおよび脂質プロファイルであった。高用量のＭＯＤ－６０３１（６０００ナノモル／ｋｇ）の週２回投与は、摂食量および体重を著しく減少させたが（図７、図８）、低用量（３０００および１０００ナノモル／ｋｇ）はより低い効果を示した。試験終了時（３３日目）に、１０００、３０００および６０００ナノモル／ｋｇを投与された動物は、それぞれ５．２％、１２．３％および２８．３％の体重減少を示した。同様の食物摂取を受けている間、高用量群とペアにした同時飼育群は、等量の食物を摂取し（絶食時を除く）、体重は１２．７％減少した。この現象は、ＰＥＧ３０－ＦＭＳ－ＯＸＭのアミノ変異体のエネルギー消費を増加させる能力に起因し得、したがって６０００ナノモル／ｋｇのアミノ変異体で治療した動物は、同時飼育群の体重減少を上回るほど体重が減少した。試験の間、ＯＸＭおよびリラグルチドは両方とも、それぞれ体重を１０．３％および８．３％著しく減少させた。１、５、１２、１９、２６および２９日目に非空腹時血糖値ならびに２、９、１６、２３および３０日目に空腹時血糖値を監視する血糖プロファイルの測定は、特に６０００ナノモル／ｋｇについて、これらのパラメータの著しい改善を示した（図９ａ、図９ｂ）。経口耐糖能試験（ＯＧＴＴ）試験を２日目および３０日目に行った（それぞれ、図１０および１１図）。これらの結果は、ＭＯＤ－６０３１（アミノ変異体）が、有意かつ用量依存的に耐糖能を改善、血糖値が１０００、３０００および６０００ナノモル／ｋｇの群において著しく低下したことを示した。最高用量のＭＯＤ－６０３１群と同時飼育した動物は、試験の時点のいずれにおいても対照と有意な差はないグルコース投与後のグルコース可動域を示した。ＯＧＴＴ試験の２日目におけるグルコースプロファイルの改善はインスリン反応の遅延に関連し、これはわずかに遅延し、ＡＵＣ　０－１２０分についてより高い刺激を与えた（図１０）。これは、血液中へのグルコース放出の遅延および第２のインスリン分泌期を生じさせるＭＯＤ－６０３１の薬理学的活性によって誘発される胃内容排出の抑制によるものであり得る。ＯＧＴＴ試験の３０日目には、化合物がインスリン感受性を改善することを示す対照と比較して、インスリン応答の低下が伴った（図１１）。さらに、ＭＯＤ－６０３１は、用量依存的に末梢コレステロールを低下させた。６０００ナノモル／ｋｇの用量のＭＯＤ－６０３１で観察された低下は、同時飼育対応物の低下よりもはるかに大きかった（図１２）。体重、摂食量、血糖および脂質プロファイルにおけるこれらの薬理学的な改善の全ては、ＯＸＭまたはリラグルチドで１日に２回治療した動物よりも高いだけでなく、同時飼育対応物で観察された効果よりも著しく高かった。

【０２３６】

ＭＯＤ－６０３１（ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ）およびその加水分解化合物（ＰＥＧ－ＦＭＳおよびＯＸＭ）の末梢血中濃度を、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ定量法を用いて測定した。ＭＯＤ－６０３１治療群の結果は、用量依存性濃度を示した（表５）。（単回投与後）このデータと２日目の化合物レベルとを比較すると、１週間に２回投与した場合は、ＯＸＭペプチドが試験期間中に蓄積されなかったことが示された。ＰＥＧ－ＦＭＳおよびＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭは、試験期間中、中程度の蓄積を示した（表５）。最後の注射（３３日目）後２４時間の時点での最高用量のＭＯＤ－６０３１についてのＭＯＤ－６０３１およびＯＸＭペプチドの実際の濃度は、それぞれ４９０μｇ／ｍｌおよび０．３７μｇ／ｍｌであった。対照動物からの全ての試料は、アッセイの下限未満であった。

【０２３７】

【表５】

表５：単回投与（２日目）およびＭＯＤ－６０３１の反復投与計画の最後の注射（３３日目）後２４時間の時点での血漿濃度の比較

用量	化合物	２日目	３３日目	倍
１０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ	５１．５７	６７．５１	１．３１
３０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ	１８３．３３	２６６．７５	１．４６
６０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ	２９６．３３	４９３．６０	１．６７

用量	化合物	２日目	３３日目	倍
１０００	ＯＸＭ	０．０７	０．０９	１．２９
３０００	ＯＸＭ	０．２３	０．２３	１．００
６０００	ＯＸＭ	０．３８	０．３７	０．９７

用量*	化合物	２日目	３３日目	倍
１０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ	６５．７３	７８．０４	１．１９
３０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ	２１１．６７	２９５．７５	１．４０
６０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ	３５９．３３	７４０．００	２．０６

*不純物を含む用量は、１５１５、４５４５、９０９０ナノモル／ｋｇである。

【０２３８】

実施例６

ｏｂ／ｏｂマウスモデルにおけるＭＯＤ－６０３１変異体による薬物動態パラメータの改善

ｏｂ／ｏｂマウスの３群（ｎ＝１２）に、１０００、３０００および６０００ナノモル／ｋｇのＭＯＤ－６０３１を単回投与し、ＰＫ分析のために投与後４、８、２４、３６、４８、７２、９６および１２０時間の時点で採血し（時点当たりｎ＝３）、ＭＯＤ－６０３１の量およびその化合物濃度をＬＣ－ＭＳ／ＭＳ法により決定した。Ｃｍａｘ、Ｔｍａｘ、ＡＵＣ、Ｔ１／２ＣｌおよびＶｚなどの薬物動態パラメータをＭＯＤ－６０３１（ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ）およびその加水分解物であるＰＥＧ－ＦＭＳおよびＯＸＭについて算出し、これらのパラメータをそれぞれ、表６ａ、図６ｂおよび図６ｃに示す。ＡＵＣ　０－∞は、全投与量において全成分のＡＵＣ　０－ｔの１５％以内であり、サンプリング計画が各成分の薬物動態プロファイルをキャラクタライゼーションするのに十分であったことを示す。全３種類の成分について、暴露は用量に比例しているように思われた。一般的に、ＣｍａｘおよびＡＵＣ０－ｔは投与量と共に増加し、投与量が増加するのとほぼ同じ割合で増加した。

【０２３９】

各成分のパラメータを表７にモル濃度で示す。Ｃｍａｘ値は、ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭおよびＰＥＧ－ＦＭＳではほぼ同等であり、ＯＸＭについては低かった。ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭおよびＯＸＭの観測された$T_{1/2}$は、それぞれ約９時間および１２時間であった。ＰＥＧ－ＦＭＳの末梢$T_{1/2}$は、はるかに長く、約３０時間であった。対照動物からの全ての試料および投与前に収集された全ての試料は、アッセイの下限未満であった。

【０２４０】

薬物動態学的および薬理学的データから、ＭＯＤ－６０３１の長時間作用型の性質が裏付けられる。３０００ナノモル／ｋｇのＭＯＤ－６０３１の週２回投与は、体重および食

物消費を著しく減少させ、６０００ナノモル／ｋｇ用量で１日に２回投与したＯＸＭペプチド治療群に匹敵し、薬物負荷の著しい低下にもつながった。

【０２４１】

【表６】

表６ａ：１０００、３０００、または６０００ナノモル／ｋｇのＳＣ注射後のＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭの薬物動態パラメータ

パラメータ	単位	１０００ナノモル／ｋｇ、３４．９ｍｇ／ｋｇ	３０００ナノモル／ｋｇ、１０５ｍｇ／ｋｇ	６０００ナノモル／ｋｇ、２１０ｍｇ／ｋｇ
Ｃｍａｘ	μｇ／ｍＬ	７０．２	２２４	３１１
Ｔｍａｘ	ｈｒ	８．００	８．００	８．００
AUC_{0-T}	ｈｒ×μｇ／ｍＬ	１８４０	６３３０	１０７００
$AUC_{0-\infty}$	ｈｒ×μｇ／ｍＬ	１８５０	６３３０	１０７００
$t_{1/2}$	ｈｒ	８．５７	８．８０	１２．３
ＣＬ／Ｆ	ｍＬ／ｈｒ／ｋｇ	１８．９	１６．５	１９．５
Ｖｚ／Ｆ	ｍＬ／ｋｇ	２３４	２１０	３４６
Ｃｍａｘ／Ｄ	（μｇ／ｍＬ）／（ｍｇ／ｋｇ）	２．０１	２．１４	１．４８
$AUC_{0-\infty}$／Ｄ	（ｈｒ×μｇ／ｍＬ）／（ｍｇ／ｋｇ）	５２．９	６０．５	５１．３

【０２４２】

【表７】

表６ｂ：１０００、３０００、または６０００ナノモル／ｋｇのＭＯＤ－６０３１のＳＣ注射後のＰＥＧ－ＦＭＳの薬物動態パラメータ

パラメータ	単位	１０００ナノモル／ｋｇ、３４．９ｍｇ／ｋｇ	３０００ナノモル／ｋｇ、１０５ｍｇ／ｋｇ	６０００ナノモル／ｋｇ、２１０ｍｇ／ｋｇ
Ｃｍａｘ	μｇ／ｍＬ	６５．７	２１２	４０７
Ｔｍａｘ	ｈｒ	２４．０	２４．０	３６．０
AUC_{0-T}	ｈｒ×μｇ／ｍＬ	３０６０	１０７００	２２８００
$AUC_{0-\infty}$	ｈｒ×μｇ／ｍＬ	３２８０	１１２００	２５８００
$t_{1/2}$	ｈｒ	３３．５	２２．８	３５．０
ＣＬ／Ｆ	ｍＬ／ｈｒ／ｋｇ	１４．０	１２．４	１０．８
Ｖｚ／Ｆ	ｍＬ／ｋｇ	６７８	４０８	５４４
Ｃｍａｘ／Ｄ	（μｇ／ｍＬ）／（ｍｇ／ｋｇ）	１．４３	１．５２	１．４６
$AUC_{0-\infty}$／Ｄ	（ｈｒ×μｇ／ｍＬ）／（ｍｇ／ｋｇ）	７１．３	８０．５	９２．８

【０２４３】

注：投与溶液中のＰＥＧ－ＦＭＳ不純物により、ＰＥＧ－ＦＭＳ（ＭＯＤ－６０３１プラスＰＥＧ－ＦＭＳ不純物）の投与量は、１０００、３０００および６０００ナノモル／ｋｇに代えて、それぞれ１５１５、４５４５、および９０９０ナノモル／ｋｇであった。

【０２４４】

【表８】

表６ｃ：１０００、３０００、または６０００ナノモル／ｋｇのＭＯＤ－６０３１のＳＣ注射後のＯＸＭ薬物動態パラメータ

パラメータ	単位	１０００ナノモル／ｋｇ、３４．９ｍｇ／ｋｇ	３０００ナノモル／ｋｇ、１０５ｍｇ／ｋｇ	６０００ナノモル／ｋｇ、２１０ｍｇ／ｋｇ
Ｃｍａｘ	μｇ／ｍＬ	０．１５９	０．３６５	０．７４９
Ｔｍａｘ	ｈｒ	８．００	８．００	８．００
AUC_{0-T}	ｈｒ×μｇ／ｍＬ	３．１９	９．２９	１８．５
$AUC_{0-\infty}$	ｈｒ×μｇ／ｍＬ	ＮＣ	９．４２	１８．５
$t_{1/2}$	ｈｒ	ＮＣ	１１．７	１１．８
ＣＬ／Ｆ	ｍＬ／ｈｒ／ｋｇ	ＮＣ	１４２０	１４４０
Ｖｚ／Ｆ	ｍＬ／ｋｇ	ＮＣ	２３９００	２４４００
Ｃｍａｘ／Ｄ	（μｇ／ｍＬ）／（ｍｇ／ｋｇ）	０．０３５７	０．０２７４	０．０２８０
$AUC_{0-\infty}$／Ｄ	（ｈｒ×μｇ／ｍＬ）／（ｍｇ／ｋｇ）	ＮＣ	０．７０５	０．６９４

ＮＣは、濃度対時間プロファイルの形状により、パラメータが算出できなかったことを表す。

【０２４５】

【表９】

表７：モル基準で３種類の成分を比較した時の薬物動態パラメータ

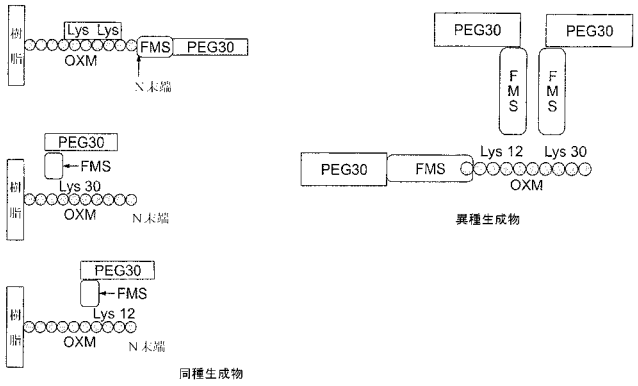
用量[a]	成分	C_{max}	C_{max}／D	AUC_{0-T}	AUC_{0-t}／D	$t_{1/2}$
ナノモル／kg		ナノモル／mL	（ナノモル／mL）／（μモル／kg）	Hr＊ナノモル／mL	（hr＊ナノモル／mL）/（μモル／kg）	Hr
１０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ	２．０１	２．０１	５２．６	５２．６	８．５７
１５１５	ＰＥＧ－ＦＭＳ[a]	２．１６	１．４３	１００	６６．０	３３．５
１０００	ＯＸＭ	０．０３５７	０．０３５７	０．７１６	０．７１６	ＮＣ
３０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ	６．４２	２．１４	１８１	６０．３	８．８０
４５４５	ＰＥＧ－ＦＭＳ[a]	６．９６	１．５３	３５３	７７．７	２２．８
３０００	ＯＸＭ	０．０８２１	０．０２７３	２．０９	０．６９７	１１．７
６０００	ＰＥＧ－ＦＭＳ－ＯＸＭ	８．９０	１．４８	３０７	５１．２	１２．３
９０９０	ＰＥＧ－ＦＭＳ[a]	１３．４	１．４７	７５０	８２．５	３５．０
６０００	ＯＸＭ	０．１６８	０．０２８０	４．１５	０．６９２	１１．８

[a]ＰＥＧ－ＦＭＳの用量に不純物が含まれる（ＭＯＤ－６０３１プラスＰＥＧ－ＦＭＳ不純物）。

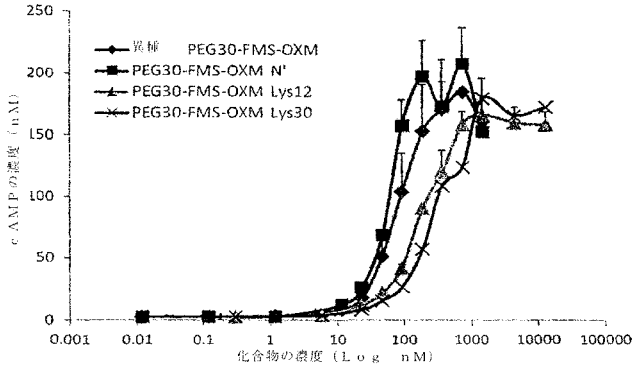
【０２４６】

本発明の特定の特徴を図示および本明細書で説明してきたが、当業者であれば、多くの改変、置換、変更、および均等物を想到しうるであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨内に入るような全ての改変および変更を網羅することを意図していることを理解されたい。

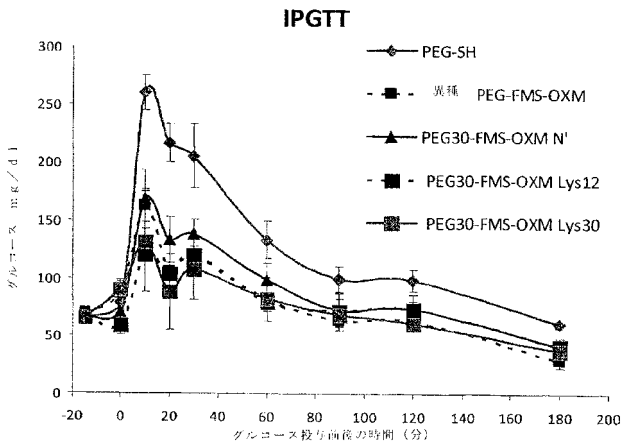
【図１】


樹脂
Lys Lys
OXM
FMS
PEG30
N末端
PEG30
FMS
Lys 30
OXM
N末端
PEG30
FMS
Lys 12
OXM
N末端
同種生成物
PEG30
PEG30
FMS
FMS
PEG30
FMS
Lys 12
Lys 30
OXM
異種生成物

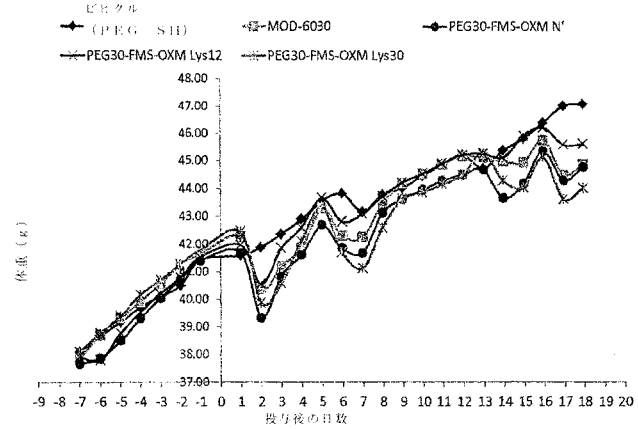
【図２】


異種 PEG30-FMS-OXM
PEG30-FMS-OXM N'
PEG30-FMS-OXM Lys12
PEG30-FMS-OXM Lys30
cAMPの濃度（nM）
化合物の濃度（Log nM）

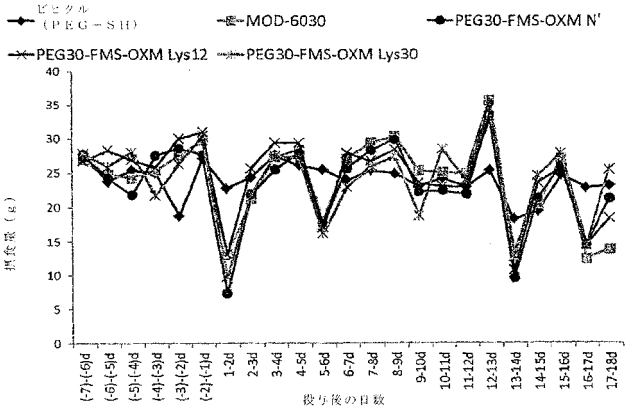
【図３】


IPGTT
PEG-SH
異種 PEG-FMS-OXM
PEG30-FMS-OXM N'
PEG30-FMS-OXM Lys12
PEG30-FMS-OXM Lys30
グルコース mg/dl
グルコース投与前後の時間（分）

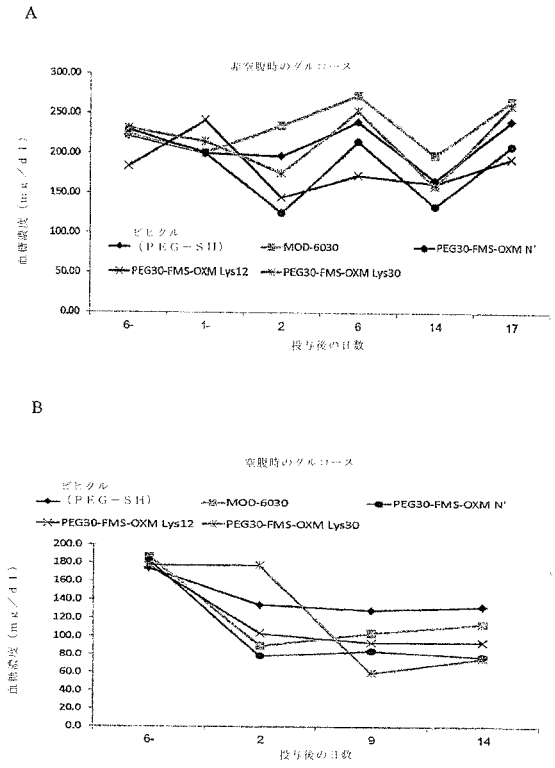
【図４】


ビヒクル（PEG－SH）
MOD-6030
PEG30-FMS-OXM N'
PEG30-FMS-OXM Lys12
PEG30-FMS-OXM Lys30
体重（g）
投与後の日数

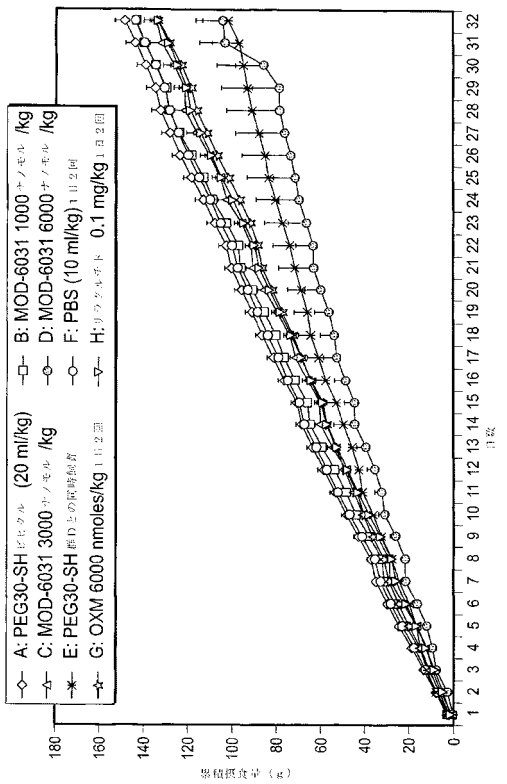
【図５】


ビヒクル（PEG－SH）
MOD-6030
PEG30-FMS-OXM N'
PEG30-FMS-OXM Lys12
PEG30-FMS-OXM Lys30
摂食量（g）
投与後の日数

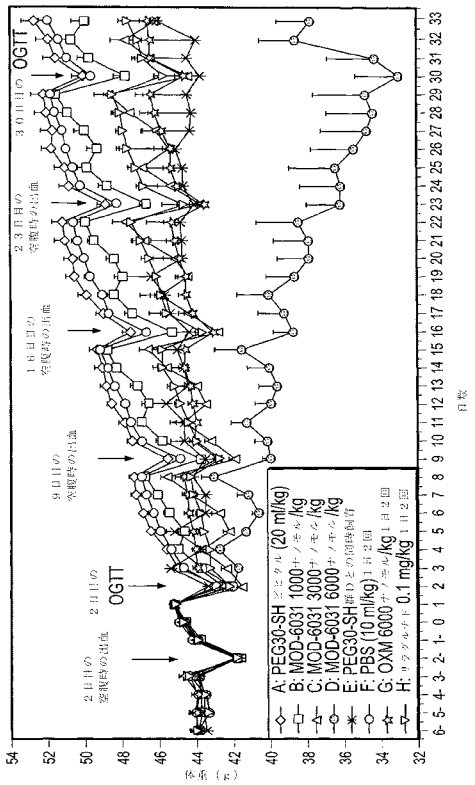
【図６】


A
非空腹時のグルコース
血糖濃度（mg／dl）
投与後の日数
ビヒクル（PEG－SH）
MOD-6030
PEG30-FMS-OXM N'
PEG30-FMS-OXM Lys12
PEG30-FMS-OXM Lys30
B
空腹時のグルコース
血糖濃度（mg／dl）
投与後の日数
ビヒクル（PEG－SH）
MOD-6030
PEG30-FMS-OXM N'
PEG30-FMS-OXM Lys12
PEG30-FMS-OXM Lys30

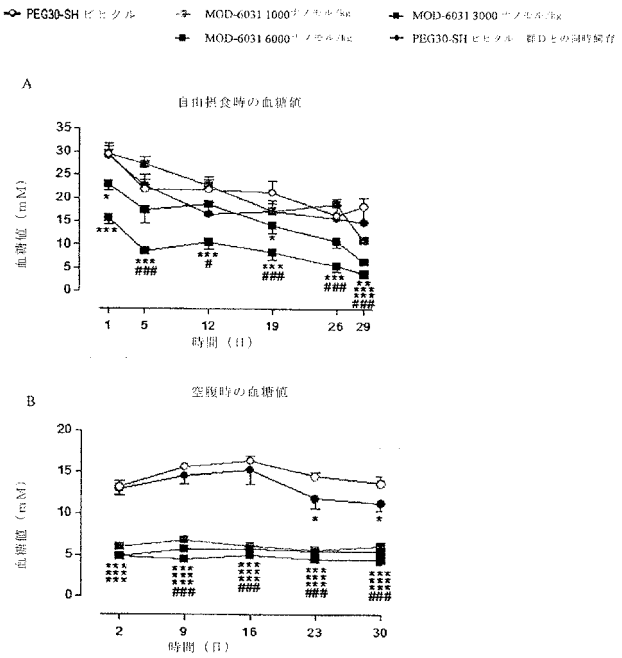
【図７】


A: PEG30-SH ビヒクル (20 ml/kg)
B: MOD-6031 1000ナノモル /kg
C: MOD-6031 3000ナノモル /kg
D: MOD-6031 6000ナノモル /kg
E: PEG30-SH 群Dとの同時飼育
F: PBS (10 ml/kg) 1日2回
G: OXM 6000 nmoles/kg 1日2回
H: リラグルチド 0.1 mg/kg 1日2回
累積摂食量（g）
日数

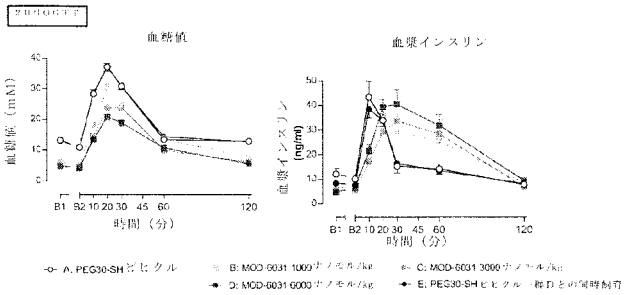
【図８】


2日目の空腹時の出血
OGTT
16日目の空腹時の出血
30日目の空腹時の出血
A: PEG30-SH ビヒクル (20 ml/kg)
B: MOD-6031 1000ナノモル /kg
C: MOD-6031 3000ナノモル /kg
D: MOD-6031 6000ナノモル /kg
E: PEG30-SH 群Dとの同時飼育
F: PBS (10 ml/kg) 1日2回
G: OXM 6000ナノモル /kg 1日2回
H: リラグルチド 0.1 mg/kg 1日2回
体重（g）
日数

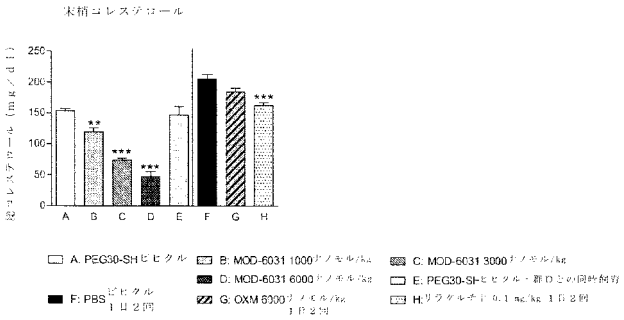
【図９】


PEG30-SH ビヒクル
MOD-6031 1000ナノモル/kg
MOD-6031 3000ナノモル/kg
MOD-6031 6000ナノモル/kg
PEG30-SH ビヒクル 群Dとの同時飼育
A
自由摂食時の血糖値
血糖値（mM）
時間（日）
B
空腹時の血糖値
血糖値（mM）
時間（日）

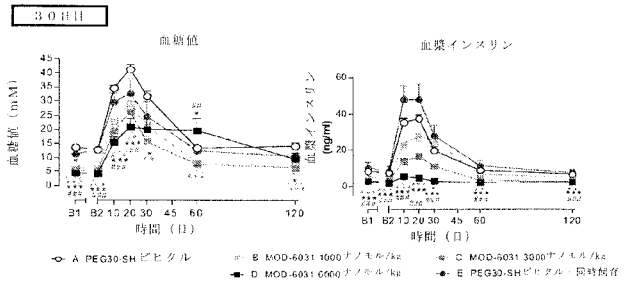
【図１０】



【図１２】



【図１１】



【配列表】
2015520184000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成26年12月5日(2014.12.5)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
オキシントモジュリンと、
ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）と、
９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）とを含む組成物であって、
前記ＰＥＧポリマーが、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、前記オキシントモジュリンのアミノ末端に結合されたことを特徴とする組成物。
【請求項２】
オキシントモジュリンと、
ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）と、
９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）とを含む組成物であって、
前記ＰＥＧポリマーが、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、前記オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基（Lys_{12}）または位置番号３０のリシン残基（Lys_{30}）に結合されたことを特徴とする組成物。

【請求項３】
前記オキシントモジュリンが、配列番号１に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
前記ＰＥＧポリマーが、スルフヒドリル部分を有するＰＥＧポリマーであることを特徴とする請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５】
前記ＰＥＧポリマーが、ＰＥＧ$_{30}$であることを特徴とする請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】
請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項７】
オキシントモジュリンの曲線下面積（ＡＵＣ）を改善するか、またはオキシントモジュリンの投与頻度を低下させるか、あるいはオキシントモジュリンの生物学的半減期を延長させるための方法であって、
ポリエチレングリコールポリマー（ＰＥＧポリマー）を、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）または２－スルホ－９－フルオレニルメトキシカルボニル（ＦＭＳ）を介して、オキシントモジュリンのアミノ酸配列の位置番号１２のリシン残基、位置番号３０のリシン残基、またはアミノ末端に結合させるステップを含むことを特徴とする方法。
【請求項８】
前記オキシントモジュリンが、配列番号１に記載のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記ＰＥＧポリマーが、前記ＦｍｏｃまたはＦＭＳを介して、前記オキシントモジュリンのアミノ末端またはリシン残基に結合されたことを特徴とする請求項７または８に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＰＥＧポリマーが、スルフヒドリル部分を有するＰＥＧポリマーであることを特徴とする請求項７～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＰＥＧポリマーが、ＰＥＧ$_{30}$であることを特徴とする請求項７～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記オキシントモジュリンの生物学的半減期を延長させる場合、前記ＦＭＳまたはＦｍｏｃリンカーを化学的に加水分解することによって、前記オキシントモジュリンが前記組成物から生体液中に放出されるようにしたことを特徴とする請求項７～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記放出されたオキシントモジュリンが損傷を受けておらず、ＧＬＰ－１およびグルカゴン受容体結合活性を回復することを特徴とする請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記生体液が、血液、血清、または脳脊髄液であることを特徴とする請求項１２または１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記生体液が、ヒト対象の中にあることを特徴とする請求項１２～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記ＦＭＳまたはＦｍｏｃを化学的に加水分解することにより、前記生体液中の前記オ

キシントモジュリンペプチドの循環時間が延長されるようにしたことを特徴とする請求項１２～１５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７】

前記オキシントモジュリンの循環時間を延長することにより、前記オキシントモジュリンが血液脳関門を通過し、ＣＮＳを標的にすることが可能になるようにしたことを特徴とする請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

治療を必要とする対象における耐糖能を誘導するための、及び／または治療を必要とする対象における血糖のコントロールを誘導するための、及び／または対象における摂食量を減少させるための、及び／または対象の体重を減少させるための、及び／または対象におけるコレステロール値を改善するための、及び／または対象におけるインスリン感受性を増加させる方法のための、及び／または対象におけるインスリン抵抗性を低下させるための、及び／または対象におけるエネルギー消費を増加させる方法のための請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2013/050481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/26 (2013.01)
USPC - 530/308
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 38/00, 38/22, 38/26; A61P 3/00, 3/10, 7/12; C07K 14/605 (2013.01)
USPC - 514/1.1, 6.8, 6.9, 11.7, 21.3; 530/300, 308

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - A61K 38/1709, 38/26; C07K 14/575, 14/605 (2013.01)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Patbase, Google Patents, Google, Pubmed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/134340 A2 (BLOOM et al) 21 December 2006 (21.12.2006) entire document	16, 17, 21, 22
Y		18, 23
Y	US 2006/0171920 A1 (SHECHTER et al) 03 August 2006 (03.08.2006) entire document	18, 23
A	US 2010/0144617 A1 (SINHA ROY et al) 10 June 2010 (10.06.2010) entire document	1-3, 6-8, 11-13, 16-18, 21-23, 25-27
P, X	WO 2012/167251 A1 (FIMA et al) 06 December 2012 (06.12.2012) entire document	1-3, 6-8, 11-13, 16-18, 21-23, 25-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September 2013	11 OCT 2013

Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2013/050481

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c 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 sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ 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:

Specifically, SEQ ID NO:1 was searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2013/050481

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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.: 4, 5, 9, 10, 14, 15, 19, 20, 24, 28-43
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 47/48	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/48		
Ｃ０７Ｋ 14/575	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/575	ＺＮＡ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

Ｆターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA03 BA01 BA08 BA19 CA18 CA32 CA59 DB33
DB36 MA52 MA65 NA12 ZC331 ZC351
4H045 AA10 AA20 AA30 BA19 BA50 BA57 CA40 DA30 EA27 FA33
FA51 GA25