

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-533227

(P2013-533227A)

(43) 公表日 平成25年8月22日(2013.8.22)

| (51) Int.Cl.                | F 1        | テーマコード (参考)     |
|-----------------------------|------------|-----------------|
| <b>C07K 14/50</b> (2006.01) | C07K 14/50 | Z N A 4 B 0 2 4 |
| <b>A61K 38/00</b> (2006.01) | A61K 37/02 | 4 C 0 8 4       |
| <b>A61P 3/10</b> (2006.01)  | A61P 3/10  | 4 H 0 4 5       |
| <b>A61P 3/06</b> (2006.01)  | A61P 3/06  |                 |
| <b>A61P 3/04</b> (2006.01)  | A61P 3/04  |                 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

|               |                              |          |  |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2013-513645 (P2013-513645) | (71) 出願人 | 509091848<br>ノヴォ ノルディスク アー／エス<br>デンマーク、ハウスヴェア ディーケー<br>2880, ノヴォ アレー |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年6月6日 (2011.6.6)         | (74) 代理人 | 100108453<br>弁理士 村山 靖彦   |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成25年2月5日 (2013.2.5)         | (74) 代理人 | 100064908<br>弁理士 志賀 正武   |
| (86) 國際出願番号   | PCT/EP2011/059273            | (74) 代理人 | 100089037<br>弁理士 渡邊 隆  |
| (87) 國際公開番号   | W02011/154349                | (74) 代理人 | 100110364<br>弁理士 実広 信哉   |
| (87) 國際公開日    | 平成23年12月15日 (2011.12.15)     |          |  |
| (31) 優先権主張番号  | 61/373, 290                  |          |  |
| (32) 優先日      | 平成22年8月13日 (2010.8.13)       |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 米国(US)                       |          |  |
| (31) 優先権主張番号  | 2010/001099                  |          |  |
| (32) 優先日      | 平成22年7月21日 (2010.7.21)       |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 中国(CN)                       |          |  |
| (31) 優先権主張番号  | PCT/EP2010/057986            |          |  |
| (32) 優先日      | 平成22年6月8日 (2010.6.8)         |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 歐州特許庁(EP)                    |          |  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FGF 21 類似体および誘導体

## (57) 【要約】

糖尿病治療に対する特性が改善された線維芽細胞増殖因子21の誘導体は、組換え法によつて調製することができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21、

以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数を含んでいてもよく、4個以下のさらなる変異を有していてもよく、ならびに/または179および/もしくは180番目のアミノ酸が存在しなくてもよい、[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、ならびに

71番目にCysを含み、71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に一般式 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_n\text{-CONH-CH(COOH)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{-CH}_2\text{-CONH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_p\text{-CH}_2\text{-CO}$ NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>- (修飾部分)(式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合している前記類似体の誘導体。  
10

## 【請求項 2】

請求項1に記載の、[-1A, 71C, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21、

以下のアミノ酸置換(交換):121Q、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数を含んでいてもよく、4個以下のさらなる変異を有していてもよく、ならびに/または179および/もしくは180番目のアミノ酸が存在しなくてもよい、[-1A, 71C, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、ならびに

71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に一般式 $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_n\text{-CONH-CH(COOH)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{-CH}_2\text{-CONH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_p\text{-CH}_2\text{-CONH-(CH}_2\text{)}_q\text{-NHCO-CH}_2\text{-}$ (修飾部分)(式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合している前記類似体の誘導体。  
20

## 【請求項 3】

nが14である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。

## 【請求項 4】

nが16である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。

## 【請求項 5】

nが18である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。

## 【請求項 6】

qが2である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。  
30

## 【請求項 7】

qが3である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。

## 【請求項 8】

qが3である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。

## 【請求項 9】

qが4である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。

## 【請求項 10】

本明細書に記載の新規な方法。

## 【請求項 11】

本明細書、例えば上記項目のいずれか一項に記載の新規な使用。  
40

## 【請求項 12】

本明細書、例えば上記項目のいずれか一項に記載の新規な治療。

## 【請求項 13】

上記実施例のいずれか、例えば実施例1以下に記載の生成物。

## 【請求項 14】

上記実施例のいずれか、例えば実施例1に記載の方法。

## 【請求項 15】

本明細書に記載の任意の新規な特徴または特徴の組み合わせ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規な線維芽細胞増殖因子21(FGF21)の類似体に関し、さらに、修飾部分が共有結合しているその誘導体に関する。本発明はまた、特に糖尿病、脂質異常症、肥満、心血管疾患、メタボリック症候群、および/または、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の治療のための、こうした類似体および誘導体の医薬用途にも関する。

## 【0002】

本発明の誘導体は長期型であり、例えば、血中グルコースレベルが低い状態を長期間維持することができ、*in vivo*でのFGF21の半減期を増大することができ、および/またはFGF21のクリアランスの低下をもたらす。

## 【背景技術】

## 【0003】

線維芽細胞増殖因子は、発達組織及び成体組織で発現するポリペプチドである。線維芽細胞増殖因子は、例えば代謝調節および細胞分化を含めた、いくつかの生理機構に関与する。ファミリー全体で20を超える線維芽細胞増殖因子が存在する(FGFファミリー)。FGF19、FGF21及びFGF23を含むFGFファミリーの3メンバーは、代謝調節に関する内分泌因子として機能するサブファミリーを形成する。

## 【0004】

線維芽細胞増殖因子21またはFGF-21(本明細書ではFGF21と略す)は、優先的に肝臓で発現し、ホルモン様代謝的效果を発揮することが示されている。例えば、FGF21は、トランジエニックマウスで過剰発現させた場合には、マウス脂肪細胞におけるグルコースの取込みを活性化し食事性肥満からマウスを保護し、糖尿病のげっ歯類に投与した場合には、血中グルコースおよびトリグリセリドレベルを低下させることができ(Kharitonovら、*J. Clin. Invest.* (2005)、115:1627～1635)。血中グルコースおよびトリグリセリドに対するFGF21の低減効果は、糖尿病のサルでも示されている。糖尿病のサルにおいて、FGF21は、LDLを減少させ、HDLを有意に増加させることもできた(Kharitonovら、*Endocrinology* (2007)、148(2):774～81)。

## 【0005】

食事性肥満マウスおよびob/obマウスにおいて、FGF21は、主にエネルギー消費を増大させ脂肪蓄積を減少させることによって、体重を減少させることができ(Coskunら、*Endocrinology* (2008)、149(12):6018～6027)。

## 【0006】

これらの結果に基づいて、FGF21は、糖尿病、脂質異常症、肥満、心血管疾患およびメタボリック症候群を治療する可能性のある薬物として示唆されている。メタボリック症候群には、インスリン抵抗性、脂質異常症、内臓型肥満および高血圧のような態様が含まれ、例えば、Grundyら、*Circulation* (2004)、(109):433～438のメタボリック症候群の定義を指参照されたい。

## 【0007】

FGF21は、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を治療する可能性のある薬物としてさらに使用することができる。上記で引用したCoskunら*Endocrinology*、2008およびXuら、*Diabetes* (2009、58(1):250～9、印刷版出版前に2008年10月7日に電子出版)を参照されたい。NAFLDは、印刷物に先立ち2008年12月12日に電子出版されたErickson、*J. Lipid Res.* (2008)によって定義されている。Yieらは、受容体の相互作用および活性化におけるFGF21のN末端およびC末端の役割を研究した。FEBS Letters、583 (2009)、19～24を参照されたい。

## 【0008】

WO2003/011213A2は、FGF21前駆体のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するFGF21化合物を使用することによる、1型および2型の糖尿病または肥満の治療方法を開示している。WO2003/061712A1は、薬学的特性が向上したFGF21の変異タンパク質、例えばA145Eを開示している。

## 【 0 0 0 9 】

WO2005/091944A2は、FGF21、FGF21-K59CおよびFGF21-K122Cのペグ化された誘導体を開示している。

## 【 0 0 1 0 】

WO2005/113606A2は、IgG4免疫グロブリンのFc部分またはヒト血清アルブミンを有する様々なFGF21融合タンパク質を開示している。

## 【 0 0 1 1 】

WO2006/028595A2は、酵母で発現させると、O-グリコシル化能力(capacity)が低下するFGF21のさらなる変異タンパク質、例えばL118C-A134C-S167Aを開示している。

## 【 0 0 1 2 】

WO2006/028714A1は、酵母で発現させると、タンパク質分解に対する感受性が低下するFGF21の別の変異タンパク質、例えばL153Iを開示している。

## 【 0 0 1 3 】

WO2006/065582A2は、アミド分解が低下したFGF21のさらに別の変異タンパク質、例えばdes-HPIP-L118C-A134C-N121Dを開示している。

## 【 0 0 1 4 】

WO2006/078463A2は、天然の成熟FGF21またはそれらの特定の変異体を使用することによる、心血管疾患の治療方法を開示している。

## 【 0 0 1 5 】

WO2008/121563は、非天然にコードされたアミノ酸ならびにそれらの誘導体を含むように修飾されたFGF21ポリペプチドを開示している。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 1 6 】

【 特許文献 1 】 WO2003/011213A2

【 特許文献 2 】 WO2003/061712A1

【 特許文献 3 】 WO2005/091944A2

【 特許文献 4 】 WO2005/113606A2

【 特許文献 5 】 WO2006/028595A2

【 特許文献 6 】 WO2006/028714A1

【 特許文献 7 】 WO2006/065582A2

【 特許文献 8 】 WO2006/078463A2

【 特許文献 9 】 WO2008/121563

【 特許文献 1 0 】 US2001012628A1

【 特許文献 1 1 】 WO2003/011213

【 特許文献 1 2 】 WO2009/083549

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 1 7 】

【 非特許文献 1 】 Kharitonovら、J. Clin. Invest. (2005)、115:1627 ~ 1635

【 非特許文献 2 】 Kharitonovら、Endocrinology (2007)、148(2):774 ~ 81

【 非特許文献 3 】 Coskunら、Endocrinology (2008)、149(12):6018 ~ 6027

【 非特許文献 4 】 Grundyら、Circulation (2004)、(109):433 ~ 438

【 非特許文献 5 】 Xuら、Diabetes (2009)、58(1):250 ~ 9、印刷版出版前に2008年10月7日に電子出版)

【 非特許文献 6 】 Erickson、J. Lipid Res. (2008)

【 非特許文献 7 】 FEBS Letters、583 (2009)、19 ~ 24

【 非特許文献 8 】 Nishimuraら、in Biochim. Biophys. Acta1492(1):203 ~ 206(2000)

【 非特許文献 9 】 Protein Purification. Principles and Practice Series:Springer Advanced Texts in Chemistry Scopes、Robert K.第3版、1994

【 非特許文献 1 0 】 Yie, Jら:FGF21 N- and C-termini play different roles in recept

10

20

30

40

50

or interaction and activation、FEBS Letters 583(2009)19 ~ 24

【非特許文献 11】Micanovic Rら: Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21. J. Cell. Physiol. 2009 May; 219(2):227 ~ 34

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明の目的は、従来技術の少なくとも1つの欠点を克服または改善することであり、または有用な代替物を提供することである。

【0019】

本発明の別の態様は、例えばヒトFGF21と比較して、糖尿病治療に関する特性が改善されたFGF21の類似体または誘導体の提供に関する。 10

【0020】

本発明の別の態様は、例えばヒトFGF21と比較して、肥満治療に関する特性が改善されたFGF21の類似体または誘導体の提供に関する。

【0021】

本発明の別の態様は、例えばヒトFGF21と比較して、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)治療に関する特性が改善された、FGF21の類似体または誘導体の提供に関する。

【0022】

本発明の別の態様は、大腸菌(E. coli)で比較的容易に組換え体を調製することができる、FGF21の類似体または誘導体の提供に関する。 20

【0023】

本発明の別の態様は、N末端の分解に対して保護された、FGF21の類似体または誘導体の提供に関する。

【0024】

本発明の別の態様は、例えばヒトFGF21と比較して、3T3-L1細胞において、グルコースの取込みに関する効力が増大した、FGF21の類似体または誘導体の提供に関する。

【0025】

本発明の別の態様は、Met-FGF-21の平均半減期と比較して平均半減期が延長された、FGF-21の類似体および誘導体の提供に関する。下記の実施例9の試験を参照されたい。

【0026】

本発明のさらなる目的は、高血圧、重篤疾患、メタボリック症候群、てんかん、癌、先端巨大症、脂質異常症(高TG、高LDLおよび低HDL)および心血管疾患、例えばアテローム性動脈硬化症および高コレステロール血症を治療するために効果的に使用することができる化合物を提供することである。 30

【課題を解決するための手段】

【0027】

定義

天然のヒトFGF21タンパク質の配列は、アクセッション番号Q9NSA1でUNIPROTデータベースから入手可能である。209アミノ酸の前駆体タンパク質には、シグナルペプチド(アミノ酸1~28)および成熟タンパク質(アミノ酸29~209)が含まれる。本明細書において成熟タンパク質は、配列番号1(アミノ酸1~181)として、シグナルペプチドは配列番号2(アミノ酸1~28)として含まれる。 40

【0028】

本明細書において配列番号1の成熟タンパク質の146番目にLeuの代わりにProを有する、天然ヒトFGF21のアイソフォームまたは対立遺伝子型は、特にUS2001012628A1(刊行済みの米国出願の配列番号2の残基番号174)により既知である。

【0029】

本明細書において配列番号2の23番目のLeuが欠失している短いシグナルペプチドを有する別のアイソフォームは、WO2003/011213により既知である(27アミノ酸残基のシグナルペプチドが載っている国際公開刊行物の配列番号2を参照されたい)。 50

## 【0030】

したがって、天然のヒトFGF21の特定例は、配列番号1、置換L146Pを有する配列番号1ならびに上記の27または28アミノ酸のシグナルペプチドが先行するこれらの配列のいずれかである。天然のヒトFGF21の好ましい例は、成熟部分、すなわち配列番号1およびそのL146Pアイソフォームである。

## 【0031】

FGF21と関連して本明細書において言及する用語「類似体」、すなわちFGF21類似体は、天然のFGF21から、特に配列番号1から、そのアミノ酸配列の修飾によって、推定されるもしくは由来するまたは推定され得るもしくは由来し得るポリペプチドを指す。そのような修飾、修正または変更には、1つまたは複数のアミノ酸の置換、除去および/または付加が含まれてよい。例えば、アミノ酸をN末端に付加することができる。

10

## 【0032】

FGF21の修飾と関連して本明細書において言及する用語「アミノ酸」または「アミノ酸残基」には、タンパク質生合成において細胞で使用され、遺伝暗号によって指定される20種の標準アミノ酸、すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンが含まれる(アミノ酸残基は、アミノ基から水素が除去されたおよび/またはカルボキシ基からヒドロキシ基が除去されたならびに任意のメルカプト基から水素が除去された、対応する残基である)。本明細書において、アミノ酸は、好ましくは遺伝子工学によって調整することができるアミノ酸である。

20

## 【0033】

本目的に関しては、標準アミノ酸の認知されている2つのコード(1文字及び3文字)を互換的に使用し、または時々アミノ酸名を完全にスペルアウトする。当然ながら、こうした用語は、完全に同等であるとみなされる(例えばS=Ser=セリン)。

## 【0034】

本明細書で使用する場合、用語「誘導体」は、共有結合的に修飾されたFGF21類似体を指す。この用語は、それ自体限定的ではなく、FGF21ポリペプチド構成成分それ自体にされる変更(「類似体」とFGF21化合物への側鎖の共有結合(このことによって化合物が「誘導体化」される)とを区別することが意図されるため、むしろ記述的である。必要に応じて、この用語は、他の一般的な化学用語、例えば化合物を代わりに用いてもよい。

30

## 【0035】

命名法:本明細書において、類似体および誘導体は、問題になっている技術的事項の理解を容易にするのに最も適するとみなされるものはどんなものでも、ポリペプチド命名法、有機化合物命名法および化学式またはそれらの混合を互換的に用いて命名される。例えば、誘導体名S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[71C, 121Q, 166F, 168L, 173A, 174V, 179F] Ala-FGF21は、[71C, 121Q, 166F, 168L, 173A, 174V, 179F] Ala-FGF21が、71番目のCysのチオール基で、{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチルによって修飾されることを意味する。

40

## 【0036】

例えば類似体における置換は、「元のアミノ酸-位置-置換後のアミノ酸」(または「位置-置換後のアミノ酸」として)として示すことができる。3文字または1文字コードを使用することができる。したがって、表記「S71C」または「Ser71Cys」は、類似体が、ヒトFGF21(配列番号1)の71番目のアミノ酸に対応するアミノ酸位置のセリンがシステインで置換されていることを含むことを意味する。

## 【0037】

例えば置換などの複数の修飾は、コンマで分ける(コンマの後にスペースを伴う)ことが

50

でき、必要に応じて、それらが同じ変異体に属することを明確にするために括弧で囲んでよい。したがって、[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21と称される類似体は、1番目にAla(A)、166番目にPhe(F)、168番目にLeu(L)、174番目にVal(V)および179番目にPhe(F)を有するヒトFGF21である。

【0038】

重ねて関連する技術的ポイントの理解を容易にするために、伸長は、位置番号の付加(連続した、C末端における正数およびN末端における負数)によって、またはより単純に、それらの正しい配列を使用して、FGF21などの慣用名が与えられることが多い問題とする化合物に問題の伸長アミノ酸を付加することによって、配列番号1を参照することにより説明することができる。したがって、[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21は、[L1 10 66F, M168L, G174V, Y179F] Ala-FGF21と称することもできる。

【0039】

用語「化合物」は、類似体および誘導体を全体としてカバーする。

【0040】

簡潔に述べると、本発明は、下記の請求項および項目において定義される通りである。

【0041】

本発明は、新規なFGF21の類似体および誘導体に関する。前記誘導体では、修飾基がFGF21類似体に共有結合的に結合する。本発明は、医薬組成物における前記類似体および誘導体の使用にも関し、特に糖尿病、脂質異常症、肥満、心血管疾患、メタボリック症候群、および/または非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の治療のための使用にも関する。

【0042】

本発明の誘導体は長期型であり、例えば血糖値が低い状態を長期間維持することができ、in vivoでのFGF21の半減期を増大することができ、および/またはFGF21のクリアランスの低下をもたらす。このFGF21誘導体は、十分な生物活性を保持し、元となったFGF21類似体よりも少ない頻度で投与することができる。さらに前記誘導体は、アミド分解の危険性が低下している。

【発明を実施するための形態】

【0043】

一態様では、本発明はFGF21類似体に関する。

【0044】

一態様では、本発明の類似体および誘導体は、[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21、場合によっては以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数を含み、場合によっては4個以下のさらなる変異を有し、ならびに/または場合によっては179および/もしくは180のアミノ酸が存在しない[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、ならびに71番目にCysを含み、71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に一般式HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-(修飾部分)(式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合している前記類似体の誘導体である。

【0045】

したがって、上記の態様は、例えば、1)以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、173Aおよび/またはdes181の1つまたは複数を含む[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、2)(71C、121Q、173Aおよび/またはdes181からなる群から選択されるいずれの変異も除いて)4個以下のさらなる変異を有する[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、3)179および/または180番目のアミノ酸が存在しない[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、ならびに4)1)、2)および/または3)の任意の組み合わせを包含する。

【0046】

「4個以下のさらなる変異を有する」という上記の表現は、71C、121Q、173Aおよび/またはdes181からなる群から選択されるいずれの変異も除いて、FGF-21において4個以下の

10

20

30

40

50

アミノ酸残基が交換、挿入または削除されることを意味する。そのような交換例としては、146番目へのProの挿入がある。

【0047】

179および/または180番目のアミノ酸が存在しないFGF-21類似体は、des179および/またはdes180類似体と称することもできる。

【0048】

別の態様では、本発明の類似体および誘導体は、[-1A, 71C, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21、場合によっては以下のアミノ酸置換(交換):121Q、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数を含み、場合によっては4個以下のさらなる変異を有し、ならびに/または場合によっては179および/もしくは180番目のアミノ酸が存在しない[-1A, 71C, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、ならびに71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に一般式HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-(修飾部分)(式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合している前記類似体の誘導体である。10

【0049】

別の態様では、本発明の類似体は、[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、ならびに以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、171L、172E、173Aおよび/またはdes181の1つまたは複数をさらに含む[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21の類似体である。「以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、171L、172E、173Aおよび/またはdes181の1つまたは複数をさらに含む[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21の類似体」という表現の意味は、前記類似体が、ヒトFGF21(配列番号1)と比較して、1番目にAla(A)、166番目にPhe(F)、167番目にGly(G)、168番目にLeu(L)、174番目にVal(V)、179番目にPhe(F)および180番目にGlu(E)、さらに71番目にCys(C)、121番目にGln(Q)、171番目にLeu(L)、172番目にGlu(E)、173番目にAla(A)および/または181番目にアミノ酸残基なしのいずれかを含むことである。20

【0050】

別の態様では、本発明の類似体は、[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、および以下のアミノ酸置換(交換):121Q、171L、172E、173Aおよび/またはdes181の1つまたは複数をさらに含むその[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21類似体である。したがって、これらの類似体は、1番目にAla(A)、71番目にCys(C)、166番目にPhe(F)、167番目にGly(G)、168番目にLeu(L)、174番目にVal(V)、179番目にPhe(F)および180番目にGlu(E)に加えて、さらに121番目にGln(Q)、171番目にLeu(L)、172番目にGlu(E)、173番目にAla(A)および/または181番目にアミノ酸残基なしのいずれかを含む、[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21およびそのFGF21類似体である。したがって、本明細書において「121番目にGln(Q)、171番目にLeu(L)、172番目にGlu(E)、173番目にAla(A)および/または181番目にアミノ酸残基なしのいずれか」という表現は、「121Q、171L、172E、173Aおよび/またはdes181」とも表現される。30

【0051】

したがって、本発明による一類似体は、[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21であり、これは代わりに、[S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] Ala-FGF21または[71C, 166F, 167G, 168L, 174V, 179F, 180E] Ala-FGF21とも称すことができる。40

【0052】

別の態様では、本発明はFGF21類似体の誘導体に関する。一態様では、本発明の誘導体は、前記FGF21類似体の71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に一般式HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-(修飾部分)(式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合50

している[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、ならびに以下のアミノ酸置換(交換):121Q、171L、172E、173Aおよび/またはdes181の1つまたは複数をさらに含む[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21類似体である。本明細書において、一般式HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>- (式中、n、m、pおよびqは本明細書において定義された通りである)の基は、修飾部分と称される。この修飾部分は、in vivoの循環時間を増大する能力があることが見出されている。

## 【0053】

上記のFGF21類似体の誘導体は、FGF21類似体と比較して持続性作用を有する。

## 【0054】

FGF21の類似体または誘導体を含む医薬組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含むことができる。注射用には、担体は、必要に応じて他の材料、例えば生理食塩水などの食塩水を追加した水でよい。希釈剤および適切な緩衝液などの他の薬学的に許容される薬剤も使用することができる。必要に応じて、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、充填剤(filler)、增量剤(bulking agents)、補助剤(adjuvants)、防腐剤、抗酸化剤、着色剤および/または着香剤などの、さらなる薬学的に許容される薬剤も使用することができる。FGF21の類似体または誘導体は、精製ポリペプチドまたはそれらの誘導体の形で使用することができ、または、当技術分野で知られているように、薬学的に許容される適切な賦形剤を使用して製剤化することができる。医薬組成物は、当技術分野で知られているような任意の方法で、例えば注射で、例えば静脈内に(i.v.)または皮下に(s.c.)投与することができる。

## 【0055】

FGF21の類似体または誘導体は、治療的または予防的に有効な量で医薬組成物に含むことができる。患者に投与される量は、問題とする適応症、治療を必要としている患者の状態、所望の投与経路などの治療目的または予防目的によって決まる。熟練した医師は、これらの要素に従って、当技術分野での常法通りに用量を調整し、投与を修正しなければならないであろう。例えば、本発明の化合物は、1日1回または1週間につき1回または複数回投与することができる。

## 【0056】

## 本発明の好ましい特徴

上記の要約および補足のために、本発明の特徴および項目は次の通りである。

1. [-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21、場合によっては以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、173Aおよび/もしくはdes181の1つまたは複数を含み、場合によっては4個以下のさらなる変異を有し、ならびに/または場合によっては179および/もしくは180番目のアミノ酸が存在しない[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、ならびに1番目にCysを含み、71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に一般式HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>- (修飾部分)(式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合している誘導体。

2. 前記項目に記載の、[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21、場合によっては以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数を含み、場合によっては4個以下のさらなる変異を有し、ならびに/または場合によっては179および/もしくは180番目のアミノ酸が存在しない[-1A, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体。

3. 前記項目のいずれか一項に記載の、[-1A, 71C, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21、場合によっては以下のアミノ酸置換(交換):121Q、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数を含み、場合によっては4個以下のさらなる変異を有し、ならびに/または場合によっては179および/もしくは180番目のアミノ酸が存在しない[-1A, 71C, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体、ならびに71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に一般式HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-

10

20

30

40

50

$-(CH_2CH_2O)_p-CH_2-CONH-(CH_2)_q-NHCO-CH_2-$  (修飾部分) (式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合している前記類似体の誘導体。

4. 可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の、[-1A, 71C, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21、場合によっては以下のアミノ酸置換(交換):121Q、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数を含み、場合によっては4個以下のさらなる変異を有し、ならびに/または場合によっては179および/もしくは180のアミノ酸が存在しない[-1A, 71C, L166F, M168L, G174V, Y179F] FGF21の類似体。

5. 可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の、[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、場合によっては以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、171L、172E、173Aおよび/またはdes181の1つまたは複数をさらに含む[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21の類似体、ならびに71番目にCysを含み、71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に、一般式 $HOOC-(CH_2)_n-CONH-CH(COOH)-CH_2-CH_2-CONH-(CH_2CH_2O)_m-CH_2-CONH-(CH_2CH_2O)_p-CH_2-CONH-(CH_2)_q-NHCO-CH_2-$  (修飾部分) (式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合している前記類似体の誘導体。

6. [-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、ならびに以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、171L、172E、173Aおよび/またはdes181の1つまたは複数をさらに含む[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21の類似体。

7. 可能な範囲で、前記項目のいずれか一項に記載の、[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、場合によっては以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、171L、172E、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数を含み、ならびに/または場合によっては179および/もしくは180のアミノ酸が存在しない[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21の類似体、ならびに71番目にCysを含み、71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に、一般式 $HOOC-(CH_2)_n-CONH-CH(COOH)-CH_2-CH_2-CO-NH-(CH_2CH_2O)_m-CH_2-CONH-(CH_2CH_2O)_p-CH_2-CONH-(CH_2)_q-NHCO-CH_2-$  (修飾部分) (式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合している前記類似体の誘導体。

8. [-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、以下のアミノ酸置換(交換):71C、121Q、171L、172E、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数をさらに含み、ならびに/または場合によっては179および/もしくは180のアミノ酸が存在しない[-1A, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21の類似体

9. 可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の、[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、または以下のアミノ酸置換(交換)、121Q、171L、172E、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数をさらに含む[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21の類似体、ならびに71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に一般式 $HOOC-(CH_2)_n-CONH-CH(COOH)-CH_2-CH_2-CONH-(CH_2CH_2O)_m-CH_2-CONH-(CH_2CH_2O)_p-CH_2-CONH-(CH_2)_q-NHCO-CH_2-$  (修飾部分) (式中、nは10~20の範囲の整数であり、mは1~3の範囲の整数であり、pは1~3の範囲の整数であり、qは2~4の範囲の整数である)の基が共有結合しているその誘導体。

10. 可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の、[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21、または以下のアミノ酸置換(交換)、121Q、171L、172E、173Aおよび/もしくはdes181の1つもしくは複数をさらに含む[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21の類似体。

11. 以下のアミノ酸交換:121番目にGln(Q)、171番目にLeu(L)、172番目にGlu(E)、173番目にAla(A)または181番目にアミノ酸なしのうちの1つのみを含む、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。

12. 以下のアミノ酸交換:121番目にGln(Q)、171番目にLeu(L)、172番目にGlu(E)、173番目にAla(A)または181番目にアミノ酸なしのうちの2つのみを含む、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載のによる類似体。

10

20

30

40

50

13. 以下のアミノ酸交換:121番目にGln(Q)、171番目にLeu(L)、172番目にGlu(E)、173番目にAla(A)または181番目にアミノ酸なしのうちの3つのみを含む、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
14. 以下のアミノ酸交換:121番目にGln(Q)、171番目にLeu(L)、172番目にGlu(E)、173番目にAla(A)または181番目にアミノ酸なしのうちの4つのみを含む、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
15. [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
16. [-1A, S71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。 10
17. [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
18. [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
19. [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
20. [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
21. [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。 20
22. [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
23. [-1A, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
24. [-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, des179-181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
25. [-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 173A, 174V, 179F] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
26. [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。 30
27. [-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 174V, 179F, 180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。
28. [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF-21; [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E] FGF-21; [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E] FGF-21; [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181] FGF-21; [-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, des179-181] FGF-21, [-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 173A, 174V, 179F, 180E, des181] FGF-21; [-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 174V, 179F, 180E, des181] FGF-21; [-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 174V, 179F, 180E, des181] FGF-21または[-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 174V, 179F, 180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体。 40
29. 71番目のシステイン残基に存在するメルカプト基の硫黄原子に、項目1で言及した一般式の基が共有結合している、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
30. nが14である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
31. nが16である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
32. nが18である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
33. nが14、16または18である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
34. mが2である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。 50

35.  $p$ が2である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
36.  $q$ が2である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
37.  $q$ が3である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
38.  $q$ が4である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
39.  $n$ が14であり、 $m$ 、 $p$ および $q$ がそれぞれ2である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
40.  $n$ が16であり、 $m$ 、 $p$ および $q$ がそれぞれ2である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
41.  $n$ が18であり、 $m$ 、 $p$ および $q$ がそれぞれ2である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。 10
42. 元となったFGF21類似体が[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
43. 元となったFGF21類似体が[-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E] FGF-21; [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E] FGF-21; [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E] FGF-21; [-1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] FGF-21; [-1A, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181] FGF-21; [-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, des179-181] FGF-21, [-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 173A, 174V, 179F] FGF-21または[-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 174V, 179F, 180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。 20
44. 元となったFGF21類似体が[-1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181] FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
45. S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181] A1a-FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。 30
46. S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(15-カルボキシペンタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181] A1a-FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
47. S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E] A1a-FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。 40
48. S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, des179-181] A1a-FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。
49. S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 174V, 179F, 180E, des181] A1a-FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。 50



ミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[71C,166F,167G,168L,174V,179F,180E]Ala-FGF21;S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[S]-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[71C,166F,167G,168L,174V,179F,180E,des181]Ala-FGF21;S-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[S]-4-カルボキシ-4-(19-カルボキシノナデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[-1A,71C,121Q,166F,167G,168L,171L,172E,173A,174V,179F,180E,des181]Ala-FGF21またはS-71-({2-[2-(2-{2-[2-(2-[S]-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル)[-1A,71C,121Q,166F,168L,174V,179F,180E,des181]FGF21である、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の誘導体。

57. Met-FGF21の効力に対して少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、より好ましくは少なくとも10%、または最も好ましくは少なくとも20%の効力を有し、効力は3T3-L1脂肪細胞においてグルコースの取込みにより決定される、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体または誘導体。

58. Met-FGF21の効力に対して少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、または最も好ましくは少なくとも70%の効力を有する、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体または誘導体。

59. Met-FGF21の効力に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも100%、さらにより好ましくは少なくとも110%、または最も好ましくは少なくとも120%の効力を有する、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体または誘導体。

60. Met-FGF21の効力に対して少なくとも100%、好ましくは少なくとも120%、より好ましくは少なくとも140%、さらにより好ましくは少なくとも160%、または最も好ましくは少なくとも180%の効力を有する、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体または誘導体。

61. Met-FGF21の効力に対して少なくとも200%、好ましくは少なくとも250%、より好ましくは少なくとも300%、さらにより好ましくは少なくとも350%または最も好ましくは少なくとも400%の効力を有する、可能な範囲で前記項目のいずれか一項に記載の類似体または誘導体。

62. 具体例などで、特に実施例1以下のいずれか一つで本明細書において特に言及した化合物のいずれか一つである、前記項目のいずれか一項に記載の化合物。

63. 医薬として使用するための、または医薬において使用するための、前記項目のいずれか一項に記載の化合物。

64. 糖尿病、脂質異常症、肥満、心血管疾患、メタボリック症候群および/または非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の治療または予防のための、前記プロダクト項目のいずれか一項に記載の化合物。

65. 糖尿病、脂質異常症、肥満、心血管疾患、メタボリック症候群および/または非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の治療または予防用の医薬を調製するための、前記項目のいずれか一項に記載の化合物の使用。

66. 糖尿病、脂質異常症、肥満、心血管疾患、メタボリック症候群、および/または非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の治療用の医薬組成物を調製するための、前記プロダクト項目のいずれか一項に記載の化合物の使用。

67. 糖尿病、脂質異常症、肥満、心血管疾患、メタボリック症候群および/または非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を治療または予防する方法であって、治療有効量の前記プロダクト項目のいずれか一項に記載の化合物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

68. 本明細書に記載の任意の新規な特徴または特徴の組み合わせ、特に項目または請求項

10

20

30

40

50

に記載の特徴。

【0057】

本明細書に記載の項目および実施形態の1つまたは複数を組み合わせることによって、場合によっては、下記の請求項の1つまたは複数とも組み合わせることによって、さらなる例がもたらされ、そして本発明は、前記項目、実施形態および請求項の全ての可能な組み合わせに関する。本明細書の項目および請求項のいくつかにおいて、前記請求項または項目はそれぞれ、可能な範囲で前記項目または請求項のいずれか一項にそれぞれ従っていることが言及される。当業者ならだれでも、どの程度これが可能かを決定することができる。したがって、たとえ特にそう述べられていないとしても、そのような項目および請求項は、それぞれ前記項目および請求項のいくつかに従っているだけでよい。用語「前記項目または請求項のいずれか一項」は、それぞれ前記項目または請求項の任意の論理番号、例えば、それぞれそれらの前記項目および請求項の1、2、3または4をカバーする。

10

【0058】

以下の実施例は例示として提供するものであり、限定するものではない。

【0059】

略語

アルファベット順の次の略語を以下の通り使用する: BGは血中グルコースであり、BWは体重であり、DCMはジクロロメタンであり、DICはジイソプロピルカルボジイミドであり、DIPEAはジイソプロピルエチルアミンであり、DPBSはDulbeccoのリン酸緩衝食塩水であり、DVBはジビニルベンゼンであり、EDACは(3-ジメチルアミノプロピル)エチルカルボジイミド塩酸塩であり、Fmocは9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルであり、HEPESは4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸であり、HOAtは1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールであり、HOBtは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、HP CDはヒドロキシプロピルシクロデキストリンであり、HPLCは高速液体クロマトグラフィーであり、IBMXは3-イソブチル-1-メチルキサンチンであり、Inpはイソニペコチン酸であり、IPTGはイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド*check(isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside check)*であり、LCMSは液体クロマトグラフィー質量分光であり、MALDI-TOF MSはマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分光であり、MeOHはメタノールであり、NanoES-MSはナノエレクトロスプレーテンデム質量分析であり、NMPは1-メチル-ピロリジン-2-オンであり、OEGは8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸であり、OtBuはtert.ブチルエステルであり、PBSはリン酸緩衝食塩水であり、RTは室温であり、TFAはトリフルオロ酢酸であり、TGはトリグリセリドであり、THFはテトラヒドロフランであり、TIP Sはトリイソプロピルシランであり、トリスはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンまたは2-アミノ-2-ヒドロキシメチルプロパン-1,3-ジオールであり、Trxはトラネキサム酸であり、TSTUはO-(N-スックイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸塩であり、UPLCは超高速液体クロマトグラフィーである。

20

【0060】

一般的方法

LCMS方法1(LCMS1)

Agilent TechnologiesのLC/MSD TOF(G1969A)質量分析計を使用して、Agilent1200シリーズHPLCシステムから溶離した後の試料の質量を同定した。タンパク質スペクトルのデコンボリューションをAgilentのプロテインコンファーメーション(protein confirmation)ソフトウェアを使用して計算した。

30

溶離液:

A:0.1%トリフルオロ酢酸入りの水

B:0.1%トリフルオロ酢酸入りのアセトニトリル

カラム:Zorbax 5u、300SB-C3、4.8×50mm

グラジエント:15分かけて25%~95%アセトニトリル

【0061】

LCMS方法2(LCMS2)

40

50

Perkin ElmerのSciex API3000質量分析計を使用して、Perkin Elmerシリーズ200HPLCシステムから溶離した後の試料の質量を同定した。

溶離液：

A:0.05%トリフルオロ酢酸入りの水

B:0.05%トリフルオロ酢酸入りのアセトニトリル

カラム:WatersのXterra MS C-18 × 3mm id 5 μm

グラジエント:1.5ml/minで7.5分かけて5%～90%アセトニトリル

【0062】

LCMS方法3(LCMS3)

WatersのMicromass ZQ質量分析計を使用して、Waters Alliance HT HPLCシステムから溶離した後の試料の質量を同定した。

溶離液：

A:0.1%トリフルオロ酢酸入りの水

B:0.1%トリフルオロ酢酸入りのアセトニトリル

カラム:Phenomenex、Kinetex C18 50 × 4.60mm id 2.6 μm、100AA

グラジエント:1.0ml/minで7.5分かけて10%～90%B

【実施例1】

【0063】

FGF21のクローニングおよび発現

ヒトFGF21のDNA配列およびアミノ酸配列は、例えばNishimuraらによってBiochim. Biophys. Acta 1492(1):203～206(2000)で開示されている。これらの配列は、それぞれEMBL:AB021975およびUNIPROT:Q9NSA1のアクセション番号で公的なデータベースからも入手可能である。

【0064】

天然のポリペプチドは、分泌のための28アミノ酸のシグナルペプチドを有して合成される。

1 MDSDETGFEH SGLWVSVLAG LLLGACQAHP IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY

51 TDDAQQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR

101 FLCQRPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GPLHLPGNK

151 SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS

201 QGRSPSYAS

【0065】

上記でイタリック体により示されたシグナルペプチドは、配列番号2として添付の配列表に含まれる。残りの181アミノ酸から構成される成熟FGF21ポリペプチドは、配列番号1として配列表に含まれる。

【0066】

成熟FGF21ポリペプチドをクローニングして、シグナルペプチドを有さないが、N末端メチオニンまたは大腸菌でプロセシングされてN末端がAla(-1Ala)となるN末端Met-Alaが附加された細胞内タンパク質として大腸菌で発現させた。より詳細には、Met用のATGコドンを3'末端にならびにNde1およびBamH1の制限酵素部位をそれぞれ3'および5'末端に含む550bpのコード領域を、ファージT7プロモーター制御下で発現ベクターのpET11cのNde1-BamH1に挿入し、大腸菌B BL21(DE3)に導入した。この細胞を100ug/mLのアンピシリンを含むLBで、OD<sub>450</sub>が0.5まで生育させ、0.3mMのIPTGを使用して37℃で4時間発現を誘導した。細胞の粗抽出物を超音波処理で作製し、FGF21の発現を解析した。

【0067】

クマシーカラーカー染色したSDS-PAGEにより、FGF21の発現が成功したことが示され、FGF21は可溶性上清画分に主に確認され、不可溶性ペレットにはほとんど確認されなかった。このように発現させたFGF21(Met-FGF21)(化合物A)の計算MWは19.5kDであるにもかかわらず、25kDタンパク質としてゲルを移動した。これは、タンパク質の移動を遅らせる、高含量のプロリンが原因であると考えられる。

10

20

30

40

50

## 【実施例2】

## 【0068】

FGF21類似体のクローニングおよび発現

以下のFGF21の特定の類似体は、当技術分野で公知のように調整することができ、実施例1に概説されているように大腸菌で発現させることができる。

## 【0069】

## 【表1】

| 類似体番号 | ヒト FGF21(配列番号1)に対する配列修飾   |
|-------|---|
| 1     | -1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E, des181                             |
| 2     | -1A, S71C, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E                                     |
| 3     | -1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181        |
| 4     | -1A, S71C, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E                |
| 5     | -1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E, des181                      |
| 6     | -1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, G174V, Y179F, A180E                              |
| 7     | -1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181 |
| 8     | -1A, S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E         |
| 9     | -1A, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F, 180E, des181                 |
| 10    | -1A, 71C, 121Q, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, des179-181                    |
| 11    | -1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 173A, 174V, 179F  |

10

20

20

## 【0070】

同じFGF21類似体を、適切でこの生物で本来公知の方法で、出芽酵母(*S. cerevisiae*)で発現させ、調整することができる。

## 【実施例3】

30

## 【0071】

FGF21類似体の精製

実施例1～2に記載したFGF21類似体は、以下のようにまたは同様な技術を使用してさらに精製することができる。

## 【0072】

pH7.5の10mMリン酸カリウム緩衝液中の大腸菌のスラリー(20%w/v)を超音波処理した(5分間氷上で3秒のオン/オフ間隔)。ポリペプチドを遠心分離(10,000×g、30分間)によりペレット化し、超音波処理によって50mMのトリスpH8.0に再度可溶させ、残渣を遠心分離(10,000×g、30分間)によって除去した。得られた上清中のポリペプチドを、Protein Purification. Principles and Practice Series: Springer Advanced Texts in Chemistry Series、Robert K. 第3版、1994に概説されるように、Q Sepharose Fast Flow樹脂(GE Healthcare)を使用した陰イオン交換クロマトグラフィー(50mMトリスpH8.0、50～250mM NaCl)によって精製した。いくつかの例では、50mMトリスpH8.0および200mM NaClを用いて操作する、HiLoad26/60Superdex pg75カラム(GE Healthcare)を使用したサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。保存のためにポリペプチドをDPBSに移し、凍結保存した。

40

## 【0073】

類似体番号11: [-1A, S71C, N121Q, L166F, M168L, Q173A, G174V, Y179F]FGF21

LCMS1: 理論的質量:19495.03; 実測質量:19500.40

## 【実施例4】

50

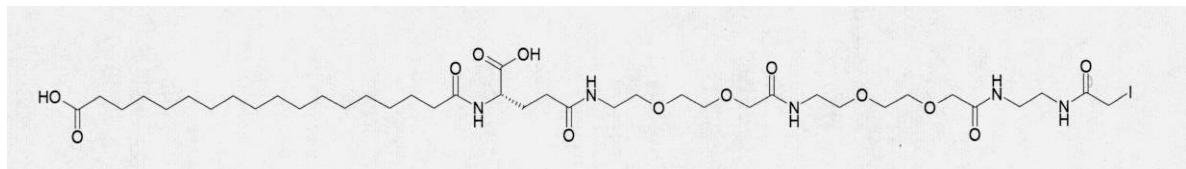
## 【0074】

FGF21類似体の71番目の遊離Cysの修飾に使用可能な反応試剤の調製

17-{(S)-1-カルボキシ-3-[2-(2-{[2-(2-ヨードアセチルアミノ)エチルカルバモイル]メトキシ}-エトキシ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチルカルバモイル]プロピルカルバモイル}ヘプタデカン酸の調製

## 【0075】

## 【化1】



10

## 【0076】

工程1:17-{(S)-3-(2-{2-{[2-(2-アミノエチルカルバモイル]メトキシ]エトキシ}-エチルカルバモイル}メトキシ)-エトキシ)エチルカルバモイル]-1-カルボキシプロピルカルバモイル}ヘプタデカン酸。

エタノール(10ml)およびエチレンジアミン(1ml)の溶液に、17-{(S)-1-カルボキシ-3-{2-[2-{2-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシカルボニルメトキシ)エトキシ}-エチルカルバモイル}メトキシ)-エトキシ}エチルカルバモイル]プロピルカルバモイル}ヘプタデカン酸(500mg、WO2009/083549に以前記載したように調製した)を加えた。室温で一晩攪拌後、この混合液を40℃で真空濃縮した。残留物を分取HPLC(10~65%アセトニトリル、0.1%TFA、20mL/min、C18、30mm×250mm、110℃)によって精製した。収量332mg(70%)。

LCMS: 理論的質量:776.0 実測質量:776.6(M+1)

20

## 【0077】

工程2:17-{(S)-1-カルボキシ-3-[2-(2-{[2-(2-ヨードアセチルアミノ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)-エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチルカルバモイル]プロピルカルバモイル}ヘプタデカン酸

アセトニトリル(1ml)にヨード酢酸(92mg)を入れた溶液にTSTU(142mg)およびDIPEA(0.085ml)を加えた。室温で60分間攪拌後、0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(12ml)に17-{(S)-3-(2-{2-[2-{2-(2-アミノエチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ}-エチルカルバモイル}メトキシ)-エトキシ}エチルカルバモイル]ヘプタデカン酸(0.320g)を入れた溶液を加えた。120分間攪拌後、混合液のpHを1N HClで1に調整した。沈殿物を濾過し、水で洗浄して、真空乾燥させた。収量350mg(90%)。

30

LCMS3: 理論的質量:943.9 実測質量:944.6(M+1)

## 【0078】

FGF類似体の修飾に次の反応試剤が有用であり得、それらは同様な方法で調製することができる。

## 【0079】

【表2】

| 修飾反応<br>試剤番号 | 構造                            |
|--------------|-------------------------------|
|              | X = 適切な脱離基 非限定例は I または Br である |
| I            |                               |
| II           |                               |
| III          |                               |
| IV           |                               |
| V            |                               |
| VI           |                               |
| VII          |                               |
| VIII         |                               |
| IX           |                               |
| X            |                               |
| XI           |                               |
| XII          |                               |

## 【実施例5】

## 【0080】

修飾基を用いた、71CysでのFGF21化合物の誘導体化

FGF21類似体の71Cys誘導体の調製

誘導体番号102(-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 173A, 174V, 179F) FGF21誘導体S-71-({2-[2-({2-[2-({2-[{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エチルカ

10

20

30

40

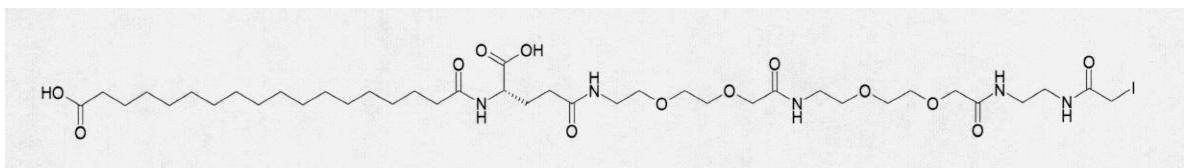
50

ルバモイル}メチル)[71C,121Q,166F,168L,73A,174V,179F]Ala-FGF21の調製

実施例2および3に概説したように調製した(-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 173A, 174V, 179F)FGF21類似体11の71番目のCys残基を、上記のように調製した次の反応試剤：

〔 0 0 8 1 〕

【化 2】



10

[ 0 0 8 2 ]

を用いて71番目のチオール基において修飾した。

[ 0 0 8 3 ]

[71C, 166F, 167G, 168L, 171L, 172E, 173A, 174V, 179F]Ala-FGF21(17mg、0.00087mmol)を20mMトリスおよび0.5M NaCl pH8.28に入れたものに、17-{(S)-1-カルボキシ-3-[2-(2-{(2-[(2-ヨードアセチルアミノ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチルカルバモイル]プロピルカルバモイル}ヘプタデカン酸(4.05mg 0.0035mmol)を0.1M NaHCO3(0.081ml)に入れたものを加えた。3時間後に、MilliQ水を加えて伝導率を8.0mS/cmへ低下させた。この混合液を、緩衝液A:20mMトリス、pH7.5; 緩衝液B:20mMトリス、500mM NaCl、pH7.5、流速0.5mL/min、グラジエント:0~100%B60CV超を使用して、MonoQ10/100カラムで陰イオン交換を用いて精製した。HiPrep26/10脱塩カラムを使用して、回収画分をリン酸塩緩衝液にバッファー交換した。溶出液を回収し、0.22μmの滅菌Millipore GVを通して濾過した。収量:4.65mg

MS-TOF: 理論的質量:20311.03、実測質量:20311.44

〔 0 0 8 4 〕

次の表では、特定のFGF21類似体を述べることおよび特定の修飾剤を述べることによって、本発明による特定のFGF21誘導体をいくつか例示する。この表では、本発明のこれら全ての化合物は誘導体番号で識別される。本発明のこれら全ての化合物は、上記と同様の方法で調製することができる。この表では、修飾部分が共有結合的に結合する特定のFGF21類似体のいずれも、上記の実施例2の表で述べた「類似体番号」で識別される。さらにこの表では、特定のFGF21類似体を修飾するのに使用される反応試剤のいずれも、上記の実施例4の表で述べた「修飾反応試剤番号」で識別される。下記の表に例示される全ての誘導体では、修飾反応試剤は、FGF21類似体の71番目のCysに存在するメルカプト基と反応する。

〔 0 0 8 5 〕

20

30

【表3A】

| 誘導体番号 | 類似体番号 | 修飾反応試剤番号 |
|-------|-------|----------|
| 1.    | 1     | I        |
| 2.    | 2     | I        |
| 3.    | 3     | I        |
| 4.    | 4     | I        |
| 5.    | 5     | I        |
| 6.    | 6     | I        |
| 7.    | 7     | I        |
| 8.    | 8     | I        |
| 9.    | 1     | II       |
| 10.   | 2     | II       |
| 11.   | 3     | II       |
| 12.   | 4     | II       |
| 13.   | 5     | II       |
| 14.   | 6     | II       |
| 15.   | 7     | II       |
| 16.   | 8     | II       |
| 17.   | 1     | III      |
| 18.   | 2     | III      |
| 19.   | 3     | III      |
| 20.   | 4     | III      |
| 21.   | 5     | III      |
| 22.   | 6     | III      |
| 23.   | 7     | III      |
| 24.   | 8     | III      |
| 25.   | 1     | IV       |
| 26.   | 2     | IV       |
| 27.   | 3     | IV       |
| 28.   | 4     | IV       |
| 29.   | 5     | IV       |
| 30.   | 6     | IV       |
| 31.   | 7     | IV       |
| 32.   | 8     | IV       |
| 33.   | 1     | V        |
| 34.   | 2     | V        |
| 35.   | 3     | V        |
| 36.   | 4     | V        |
| 37.   | 5     | V        |
| 38.   | 6     | V        |
| 39.   | 7     | V        |
| 40.   | 8     | V        |
| 41.   | 1     | VI       |
| 42.   | 2     | VI       |
| 43.   | 3     | VI       |
| 44.   | 4     | VI       |
| 45.   | 5     | VI       |

10

20

30

40

【表3B】

|     |   |      |
|-----|---|------|
| 46. | 6 | VI   |
| 47. | 7 | VI   |
| 48. | 8 | VI   |
| 49. | 1 | VII  |
| 50. | 2 | VII  |
| 51. | 3 | VII  |
| 52. | 4 | VII  |
| 53. | 5 | VII  |
| 54. | 6 | VII  |
| 55. | 7 | VII  |
| 56. | 8 | VII  |
| 57. | 1 | VIII |
| 58. | 2 | VIII |
| 59. | 3 | VIII |
| 60. | 4 | VIII |
| 61. | 5 | VIII |
| 62. | 6 | VIII |
| 63. | 7 | VIII |
| 64. | 8 | VIII |
| 65. | 1 | IX   |
| 66. | 2 | IX   |
| 67. | 3 | IX   |
| 68. | 4 | IX   |
| 69. | 5 | IX   |
| 70. | 6 | IX   |
| 71. | 7 | IX   |
| 72. | 8 | IX   |
| 73. | 1 | X    |
| 74. | 2 | X    |
| 75. | 3 | X    |
| 76. | 4 | X    |
| 77. | 5 | X    |
| 78. | 6 | X    |
| 79. | 7 | X    |
| 80. | 8 | X    |
| 81. | 1 | XI   |
| 82. | 2 | XI   |
| 83. | 3 | XI   |
| 84. | 4 | XI   |
| 85. | 5 | XI   |
| 86. | 6 | XI   |
| 87. | 7 | XI   |
| 88. | 8 | XI   |
| 89. | 1 | XII  |
| 90. | 2 | XII  |
| 91. | 3 | XII  |

10

20

30

40

## 【表3C】

|      |    |      |
|------|----|------|
| 92.  | 4  | XII  |
| 93.  | 5  | XII  |
| 94.  | 6  | XII  |
| 95.  | 7  | XII  |
| 96.  | 8  | XII  |
| 97.  | 10 | I    |
| 98.  | 11 | I    |
| 99.  | 10 | II   |
| 100. | 11 | II   |
| 101. | 10 | III  |
| 102. | 11 | III  |
| 103. | 10 | IV   |
| 104. | 11 | IV   |
| 105. | 10 | V    |
| 106. | 11 | V    |
| 107. | 10 | VI   |
| 108. | 11 | VI   |
| 109. | 10 | VII  |
| 110. | 11 | VII  |
| 111. | 10 | VIII |
| 112. | 11 | VIII |
| 113. | 10 | IX   |
| 114. | 11 | IX   |
| 115. | 10 | X    |
| 116. | 11 | X    |
| 117. | 10 | XI   |
| 118. | 11 | XI   |
| 119. | 10 | XII  |
| 120. | 11 | XII  |

10

20

30

40

## 【0088】

例えば、誘導体102は、71番目のシステインの遊離チオールが修飾部分I<sub>1</sub>I<sub>2</sub>I<sub>3</sub>I<sub>4</sub>I<sub>5</sub>I<sub>6</sub>I<sub>7</sub>I<sub>8</sub>I<sub>9</sub>I<sub>10</sub>I<sub>11</sub>I<sub>12</sub>I<sub>13</sub>I<sub>14</sub>I<sub>15</sub>I<sub>16</sub>I<sub>17</sub>I<sub>18</sub>I<sub>19</sub>I<sub>20</sub>I<sub>21</sub>I<sub>22</sub>I<sub>23</sub>I<sub>24</sub>I<sub>25</sub>I<sub>26</sub>I<sub>27</sub>I<sub>28</sub>I<sub>29</sub>I<sub>30</sub>I<sub>31</sub>I<sub>32</sub>I<sub>33</sub>I<sub>34</sub>I<sub>35</sub>I<sub>36</sub>I<sub>37</sub>I<sub>38</sub>I<sub>39</sub>I<sub>40</sub>I<sub>41</sub>I<sub>42</sub>I<sub>43</sub>I<sub>44</sub>I<sub>45</sub>I<sub>46</sub>I<sub>47</sub>I<sub>48</sub>I<sub>49</sub>I<sub>50</sub>I<sub>51</sub>I<sub>52</sub>I<sub>53</sub>I<sub>54</sub>I<sub>55</sub>I<sub>56</sub>I<sub>57</sub>I<sub>58</sub>I<sub>59</sub>I<sub>60</sub>I<sub>61</sub>I<sub>62</sub>I<sub>63</sub>I<sub>64</sub>I<sub>65</sub>I<sub>66</sub>I<sub>67</sub>I<sub>68</sub>I<sub>69</sub>I<sub>70</sub>I<sub>71</sub>I<sub>72</sub>I<sub>73</sub>I<sub>74</sub>I<sub>75</sub>I<sub>76</sub>I<sub>77</sub>I<sub>78</sub>I<sub>79</sub>I<sub>80</sub>I<sub>81</sub>I<sub>82</sub>I<sub>83</sub>I<sub>84</sub>I<sub>85</sub>I<sub>86</sub>I<sub>87</sub>I<sub>88</sub>I<sub>89</sub>I<sub>90</sub>I<sub>91</sub>I<sub>92</sub>I<sub>93</sub>I<sub>94</sub>I<sub>95</sub>I<sub>96</sub>I<sub>97</sub>I<sub>98</sub>I<sub>99</sub>I<sub>100</sub>I<sub>101</sub>I<sub>102</sub>I<sub>103</sub>I<sub>104</sub>I<sub>105</sub>I<sub>106</sub>I<sub>107</sub>I<sub>108</sub>I<sub>109</sub>I<sub>110</sub>I<sub>111</sub>I<sub>112</sub>I<sub>113</sub>I<sub>114</sub>I<sub>115</sub>I<sub>116</sub>I<sub>117</sub>I<sub>118</sub>I<sub>119</sub>I<sub>120</sub>I<sub>121</sub>I<sub>122</sub>I<sub>123</sub>I<sub>124</sub>I<sub>125</sub>I<sub>126</sub>I<sub>127</sub>I<sub>128</sub>I<sub>129</sub>I<sub>130</sub>I<sub>131</sub>I<sub>132</sub>I<sub>133</sub>I<sub>134</sub>I<sub>135</sub>I<sub>136</sub>I<sub>137</sub>I<sub>138</sub>I<sub>139</sub>I<sub>140</sub>I<sub>141</sub>I<sub>142</sub>I<sub>143</sub>I<sub>144</sub>I<sub>145</sub>I<sub>146</sub>I<sub>147</sub>I<sub>148</sub>I<sub>149</sub>I<sub>150</sub>I<sub>151</sub>I<sub>152</sub>I<sub>153</sub>I<sub>154</sub>I<sub>155</sub>I<sub>156</sub>I<sub>157</sub>I<sub>158</sub>I<sub>159</sub>I<sub>160</sub>I<sub>161</sub>I<sub>162</sub>I<sub>163</sub>I<sub>164</sub>I<sub>165</sub>I<sub>166</sub>I<sub>167</sub>I<sub>168</sub>I<sub>169</sub>I<sub>170</sub>I<sub>171</sub>I<sub>172</sub>I<sub>173</sub>I<sub>174</sub>I<sub>175</sub>I<sub>176</sub>I<sub>177</sub>I<sub>178</sub>I<sub>179</sub>I<sub>180</sub>I<sub>181</sub>I<sub>182</sub>I<sub>183</sub>I<sub>184</sub>I<sub>185</sub>I<sub>186</sub>I<sub>187</sub>I<sub>188</sub>I<sub>189</sub>I<sub>190</sub>I<sub>191</sub>I<sub>192</sub>I<sub>193</sub>I<sub>194</sub>I<sub>195</sub>I<sub>196</sub>I<sub>197</sub>I<sub>198</sub>I<sub>199</sub>I<sub>200</sub>I<sub>201</sub>I<sub>202</sub>I<sub>203</sub>I<sub>204</sub>I<sub>205</sub>I<sub>206</sub>I<sub>207</sub>I<sub>208</sub>I<sub>209</sub>I<sub>210</sub>I<sub>211</sub>I<sub>212</sub>I<sub>213</sub>I<sub>214</sub>I<sub>215</sub>I<sub>216</sub>I<sub>217</sub>I<sub>218</sub>I<sub>219</sub>I<sub>220</sub>I<sub>221</sub>I<sub>222</sub>I<sub>223</sub>I<sub>224</sub>I<sub>225</sub>I<sub>226</sub>I<sub>227</sub>I<sub>228</sub>I<sub>229</sub>I<sub>230</sub>I<sub>231</sub>I<sub>232</sub>I<sub>233</sub>I<sub>234</sub>I<sub>235</sub>I<sub>236</sub>I<sub>237</sub>I<sub>238</sub>I<sub>239</sub>I<sub>240</sub>I<sub>241</sub>I<sub>242</sub>I<sub>243</sub>I<sub>244</sub>I<sub>245</sub>I<sub>246</sub>I<sub>247</sub>I<sub>248</sub>I<sub>249</sub>I<sub>250</sub>I<sub>251</sub>I<sub>252</sub>I<sub>253</sub>I<sub>254</sub>I<sub>255</sub>I<sub>256</sub>I<sub>257</sub>I<sub>258</sub>I<sub>259</sub>I<sub>260</sub>I<sub>261</sub>I<sub>262</sub>I<sub>263</sub>I<sub>264</sub>I<sub>265</sub>I<sub>266</sub>I<sub>267</sub>I<sub>268</sub>I<sub>269</sub>I<sub>270</sub>I<sub>271</sub>I<sub>272</sub>I<sub>273</sub>I<sub>274</sub>I<sub>275</sub>I<sub>276</sub>I<sub>277</sub>I<sub>278</sub>I<sub>279</sub>I<sub>280</sub>I<sub>281</sub>I<sub>282</sub>I<sub>283</sub>I<sub>284</sub>I<sub>285</sub>I<sub>286</sub>I<sub>287</sub>I<sub>288</sub>I<sub>289</sub>I<sub>290</sub>I<sub>291</sub>I<sub>292</sub>I<sub>293</sub>I<sub>294</sub>I<sub>295</sub>I<sub>296</sub>I<sub>297</sub>I<sub>298</sub>I<sub>299</sub>I<sub>300</sub>I<sub>301</sub>I<sub>302</sub>I<sub>303</sub>I<sub>304</sub>I<sub>305</sub>I<sub>306</sub>I<sub>307</sub>I<sub>308</sub>I<sub>309</sub>I<sub>310</sub>I<sub>311</sub>I<sub>312</sub>I<sub>313</sub>I<sub>314</sub>I<sub>315</sub>I<sub>316</sub>I<sub>317</sub>I<sub>318</sub>I<sub>319</sub>I<sub>320</sub>I<sub>321</sub>I<sub>322</sub>I<sub>323</sub>I<sub>324</sub>I<sub>325</sub>I<sub>326</sub>I<sub>327</sub>I<sub>328</sub>I<sub>329</sub>I<sub>330</sub>I<sub>331</sub>I<sub>332</sub>I<sub>333</sub>I<sub>334</sub>I<sub>335</sub>I<sub>336</sub>I<sub>337</sub>I<sub>338</sub>I<sub>339</sub>I<sub>340</sub>I<sub>341</sub>I<sub>342</sub>I<sub>343</sub>I<sub>344</sub>I<sub>345</sub>I<sub>346</sub>I<sub>347</sub>I<sub>348</sub>I<sub>349</sub>I<sub>350</sub>I<sub>351</sub>I<sub>352</sub>I<sub>353</sub>I<sub>354</sub>I<sub>355</sub>I<sub>356</sub>I<sub>357</sub>I<sub>358</sub>I<sub>359</sub>I<sub>360</sub>I<sub>361</sub>I<sub>362</sub>I<sub>363</sub>I<sub>364</sub>I<sub>365</sub>I<sub>366</sub>I<sub>367</sub>I<sub>368</sub>I<sub>369</sub>I<sub>370</sub>I<sub>371</sub>I<sub>372</sub>I<sub>373</sub>I<sub>374</sub>I<sub>375</sub>I<sub>376</sub>I<sub>377</sub>I<sub>378</sub>I<sub>379</sub>I<sub>380</sub>I<sub>381</sub>I<sub>382</sub>I<sub>383</sub>I<sub>384</sub>I<sub>385</sub>I<sub>386</sub>I<sub>387</sub>I<sub>388</sub>I<sub>389</sub>I<sub>390</sub>I<sub>391</sub>I<sub>392</sub>I<sub>393</sub>I<sub>394</sub>I<sub>395</sub>I<sub>396</sub>I<sub>397</sub>I<sub>398</sub>I<sub>399</sub>I<sub>400</sub>I<sub>401</sub>I<sub>402</sub>I<sub>403</sub>I<sub>404</sub>I<sub>405</sub>I<sub>406</sub>I<sub>407</sub>I<sub>408</sub>I<sub>409</sub>I<sub>410</sub>I<sub>411</sub>I<sub>412</sub>I<sub>413</sub>I<sub>414</sub>I<sub>415</sub>I<sub>416</sub>I<sub>417</sub>I<sub>418</sub>I<sub>419</sub>I<sub>420</sub>I<sub>421</sub>I<sub>422</sub>I<sub>423</sub>I<sub>424</sub>I<sub>425</sub>I<sub>426</sub>I<sub>427</sub>I<sub>428</sub>I<sub>429</sub>I<sub>430</sub>I<sub>431</sub>I<sub>432</sub>I<sub>433</sub>I<sub>434</sub>I<sub>435</sub>I<sub>436</sub>I<sub>437</sub>I<sub>438</sub>I<sub>439</sub>I<sub>440</sub>I<sub>441</sub>I<sub>442</sub>I<sub>443</sub>I<sub>444</sub>I<sub>445</sub>I<sub>446</sub>I<sub>447</sub>I<sub>448</sub>I<sub>449</sub>I<sub>450</sub>I<sub>451</sub>I<sub>452</sub>I<sub>453</sub>I<sub>454</sub>I<sub>455</sub>I<sub>456</sub>I<sub>457</sub>I<sub>458</sub>I<sub>459</sub>I<sub>460</sub>I<sub>461</sub>I<sub>462</sub>I<sub>463</sub>I<sub>464</sub>I<sub>465</sub>I<sub>466</sub>I<sub>467</sub>I<sub>468</sub>I<sub>469</sub>I<sub>470</sub>I<sub>471</sub>I<sub>472</sub>I<sub>473</sub>I<sub>474</sub>I<sub>475</sub>I<sub>476</sub>I<sub>477</sub>I<sub>478</sub>I<sub>479</sub>I<sub>480</sub>I<sub>481</sub>I<sub>482</sub>I<sub>483</sub>I<sub>484</sub>I<sub>485</sub>I<sub>486</sub>I<sub>487</sub>I<sub>488</sub>I<sub>489</sub>I<sub>490</sub>I<sub>491</sub>I<sub>492</sub>I<sub>493</sub>I<sub>494</sub>I<sub>495</sub>I<sub>496</sub>I<sub>497</sub>I<sub>498</sub>I<sub>499</sub>I<sub>500</sub>I<sub>501</sub>I<sub>502</sub>I<sub>503</sub>I<sub>504</sub>I<sub>505</sub>I<sub>506</sub>I<sub>507</sub>I<sub>508</sub>I<sub>509</sub>I<sub>510</sub>I<sub>511</sub>I<sub>512</sub>I<sub>513</sub>I<sub>514</sub>I<sub>515</sub>I<sub>516</sub>I<sub>517</sub>I<sub>518</sub>I<sub>519</sub>I<sub>520</sub>I<sub>521</sub>I<sub>522</sub>I<sub>523</sub>I<sub>524</sub>I<sub>525</sub>I<sub>526</sub>I<sub>527</sub>I<sub>528</sub>I<sub>529</sub>I<sub>530</sub>I<sub>531</sub>I<sub>532</sub>I<sub>533</sub>I<sub>534</sub>I<sub>535</sub>I<sub>536</sub>I<sub>537</sub>I<sub>538</sub>I<sub>539</sub>I<sub>540</sub>I<sub>541</sub>I<sub>542</sub>I<sub>543</sub>I<sub>544</sub>I<sub>545</sub>I<sub>546</sub>I<sub>547</sub>I<sub>548</sub>I<sub>549</sub>I<sub>550</sub>I<sub>551</sub>I<sub>552</sub>I<sub>553</sub>I<sub>554</sub>I<sub>555</sub>I<sub>556</sub>I<sub>557</sub>I<sub>558</sub>I<sub>559</sub>I<sub>560</sub>I<sub>561</sub>I<sub>562</sub>I<sub>563</sub>I<sub>564</sub>I<sub>565</sub>I<sub>566</sub>I<sub>567</sub>I<sub>568</sub>I<sub>569</sub>I<sub>570</sub>I<sub>571</sub>I<sub>572</sub>I<sub>573</sub>I<sub>574</sub>I<sub>575</sub>I<sub>576</sub>I<sub>577</sub>I<sub>578</sub>I<sub>579</sub>I<sub>580</sub>I<sub>581</sub>I<sub>582</sub>I<sub>583</sub>I<sub>584</sub>I<sub>585</sub>I<sub>586</sub>I<sub>587</sub>I<sub>588</sub>I<sub>589</sub>I<sub>590</sub>I<sub>591</sub>I<sub>592</sub>I<sub>593</sub>I<sub>594</sub>I<sub>595</sub>I<sub>596</sub>I<sub>597</sub>I<sub>598</sub>I<sub>599</sub>I<sub>600</sub>I<sub>601</sub>I<sub>602</sub>I<sub>603</sub>I<sub>604</sub>I<sub>605</sub>I<sub>606</sub>I<sub>607</sub>I<sub>608</sub>I<sub>609</sub>I<sub>610</sub>I<sub>611</sub>I<sub>612</sub>I<sub>613</sub>I<sub>614</sub>I<sub>615</sub>I<sub>616</sub>I<sub>617</sub>I<sub>618</sub>I<sub>619</sub>I<sub>620</sub>I<sub>621</sub>I<sub>622</sub>I<sub>623</sub>I<sub>624</sub>I<sub>625</sub>I<sub>626</sub>I<sub>627</sub>I<sub>628</sub>I<sub>629</sub>I<sub>630</sub>I<sub>631</sub>I<sub>632</sub>I<sub>633</sub>I<sub>634</sub>I<sub>635</sub>I<sub>636</sub>I<sub>637</sub>I<sub>638</sub>I<sub>639</sub>I<sub>640</sub>I<sub>641</sub>I<sub>642</sub>I<sub>643</sub>I<sub>644</sub>I<sub>645</sub>I<sub>646</sub>I<sub>647</sub>I<sub>648</sub>I<sub>649</sub>I<sub>650</sub>I<sub>651</sub>I<sub>652</sub>I<sub>653</sub>I<sub>654</sub>I<sub>655</sub>I<sub>656</sub>I<sub>657</sub>I<sub>658</sub>I<sub>659</sub>I<sub>660</sub>I<sub>661</sub>I<sub>662</sub>I<sub>663</sub>I<sub>664</sub>I<sub>665</sub>I<sub>666</sub>I<sub>667</sub>I<sub>668</sub>I<sub>669</sub>I<sub>670</sub>I<sub>671</sub>I<sub>672</sub>I<sub>673</sub>I<sub>674</sub>I<sub>675</sub>I<sub>676</sub>I<sub>677</sub>I<sub>678</sub>I<sub>679</sub>I<sub>680</sub>I<sub>681</sub>I<sub>682</sub>I<sub>683</sub>I<sub>684</sub>I<sub>685</sub>I<sub>686</sub>I<sub>687</sub>I<sub>688</sub>I<sub>689</sub>I<sub>690</sub>I<sub>691</sub>I<sub>692</sub>I<sub>693</sub>I<sub>694</sub>I<sub>695</sub>I<sub>696</sub>I<sub>697</sub>I<sub>698</sub>I<sub>699</sub>I<sub>700</sub>I<sub>701</sub>I<sub>702</sub>I<sub>703</sub>I<sub>704</sub>I<sub>705</sub>I<sub>706</sub>I<sub>707</sub>I<sub>708</sub>I<sub>709</sub>I<sub>710</sub>I<sub>711</sub>I<sub>712</sub>I<sub>713</sub>I<sub>714</sub>I<sub>715</sub>I<sub>716</sub>I<sub>717</sub>I<sub>718</sub>I<sub>719</sub>I<sub>720</sub>I<sub>721</sub>I<sub>722</sub>I<sub>723</sub>I<sub>724</sub>I<sub>725</sub>I<sub>726</sub>I<sub>727</sub>I<sub>728</sub>I<sub>729</sub>I<sub>730</sub>I<sub>731</sub>I<sub>732</sub>I<sub>733</sub>I<sub>734</sub>I<sub>735</sub>I<sub>736</sub>I<sub>737</sub>I<sub>738</sub>I<sub>739</sub>I<sub>740</sub>I<sub>741</sub>I<sub>742</sub>I<sub>743</sub>I<sub>744</sub>I<sub>745</sub>I<sub>746</sub>I<sub>747</sub>I<sub>748</sub>I<sub>749</sub>I<sub>750</sub>I<sub>751</sub>I<sub>752</sub>I<sub>753</sub>I<sub>754</sub>I<sub>755</sub>I<sub>756</sub>I<sub>757</sub>I<sub>758</sub>I<sub>759</sub>I<sub>760</sub>I<sub>761</sub>I<sub>762</sub>I<sub>763</sub>I<sub>764</sub>I<sub>765</sub>I<sub>766</sub>I<sub>767</sub>I<sub>768</sub>I<sub>769</sub>I<sub>770</sub>I<sub>771</sub>I<sub>772</sub>I<sub>773</sub>I<sub>774</sub>I<sub>775</sub>I<sub>776</sub>I<sub>777</sub>I<sub>778</sub>I<sub>779</sub>I<sub>780</sub>I<sub>781</sub>I<sub>782</sub>I<sub>783</sub>I<sub>784</sub>I<sub>785</sub>I<sub>786</sub>I<sub>787</sub>I<sub>788</sub>I<sub>789</sub>I<sub>790</sub>I<sub>791</sub>I<sub>792</sub>I<sub>793</sub>I<sub>794</sub>I<sub>795</sub>I<sub>796</sub>I<sub>797</sub>I<sub>798</sub>I<sub>799</sub>I<sub>800</sub>I<sub>801</sub>I<sub>802</sub>I<sub>803</sub>I<sub>804</sub>I<sub>805</sub>I<sub>806</sub>I<sub>807</sub>I<sub>808</sub>I<sub>809</sub>I<sub>8010</sub>I<sub>8011</sub>I<sub>8012</sub>I<sub>8013</sub>I<sub>8014</sub>I<sub>8015</sub>I<sub>8016</sub>I<sub>8017</sub>I<sub>8018</sub>I<sub>8019</sub>I<sub>8020</sub>I<sub>8021</sub>I<sub>8022</sub>I<sub>8023</sub>I<sub>8024</sub>I<sub>8025</sub>I<sub>8026</sub>I<sub>8027</sub>I<sub>8028</sub>I<sub>8029</sub>I<sub>8030</sub>I<sub>8031</sub>I<sub>8032</sub>I<sub>8033</sub>I<sub>8034</sub>I<sub>8035</sub>I<sub>8036</sub>I<sub>8037</sub>I<sub>8038</sub>I<sub>8039</sub>I<sub>8040</sub>I<sub>8041</sub>I<sub>8042</sub>I<sub>8043</sub>I<sub>8044</sub>I<sub>8045</sub>I<sub>8046</sub>I<sub>8047</sub>I<sub>8048</sub>I<sub>8049</sub>I<sub>8050</sub>I<sub>8051</sub>I<sub>8052</sub>I<sub>8053</sub>I<sub>8054</sub>I<sub>8055</sub>I<sub>8056</sub>I<sub>8057</sub>I<sub>8058</sub>I<sub>8059</sub>I<sub>8060</sub>I<sub>8061</sub>I<sub>8062</sub>I<sub>8063</sub>I<sub>8064</sub>I<sub>8065</sub>I<sub>8066</sub>I<sub>8067</sub>I<sub>8068</sub>I<sub>8069</sub>I<sub>8070</sub>I<sub>8071</sub>I<sub>8072</sub>I<sub>8073</sub>I<sub>8074</sub>I<sub>8075</sub>I<sub>8076</sub>I<sub>8077</sub>I<sub>8078</sub>I<sub>8079</sub>I<sub>8080</sub>I<sub>8081</sub>I<sub>8082</sub>I<sub>8083</sub>I<sub>8084</sub>I<sub>8085</sub>I<sub>8086</sub>I<sub>8087</sub>I<sub>8088</sub>I<sub>8089</sub>I<sub>8090</sub>I<sub>8091</sub>I<sub>8092</sub>I<sub>8093</sub>I<sub>8094</sub>I<sub>8095</sub>I<sub>8096</sub>I<sub>8097</sub>I<sub>8098</sub>I<sub>8099</sub>I<sub>80100</sub>I<sub>80101</sub>I<sub>80102</sub>I<sub>80103</sub>I<sub>80104</sub>I<sub>80105</sub>I<sub>80106</sub>I<sub>80107</sub>I<sub>80108</sub>I<sub>80109</sub>I<sub>80110</sub>I<sub>80111</sub>I<sub>80112</sub>I<sub>80113</sub>I<sub>80114</sub>I<sub>80115</sub>I<sub>80116</sub>I<sub>80117</sub>I<sub>80118</sub>I<sub>80119</sub>I<sub>80120</sub>I<sub>80121</sub>I<sub>80122</sub>I<sub>80123</sub>I<sub>80124</sub>I<sub>80125</sub>I<sub>80126</sub>I<sub>80127</sub>I<sub>80128</sub>I<sub>80129</sub>I<sub>80130</sub>I<sub>80131</sub>I<sub>80132</sub>I<sub>80133</sub>I<sub>80134</sub>I<sub>80135</sub>I<sub>80136</sub>I<sub>80137</sub>I<sub>80138</sub>I<sub>80139</sub>I<sub>80140</sub>I<sub>80141</sub>I<sub>80142</sub>I<sub>80143</sub>I<sub>80144</sub>I<sub>80145</sub>I<sub>80146</sub>I<sub>80147</sub>I<sub>80148</sub>I<sub>80149</sub>I<sub>80150</sub>I<sub>80151</sub>I<sub>80152</sub>I<sub>80153</sub>I<sub>80154</sub>I<sub>80155</sub>I<sub>80156</sub>I<sub>80157</sub>I<sub>80158</sub>I<sub>80159</sub>I<sub>80160</sub>I<sub>80161</sub>I<sub>80162</sub>I<sub>80163</sub>I<sub>80164</sub>I<sub>80165</sub>I<sub>80166</sub>I<sub>80167</sub>I<sub>80168</sub>I<sub>80169</sub>I<sub>80170</sub>I<sub>80171</sub>I<sub>80172</sub>I<sub>80173</sub>I<sub>80174</sub>I<sub>80175</sub>I<sub>80176</sub>I<sub>80177</sub>I<sub>80178</sub>I<sub>80179</sub>I<sub>80180</sub>I<sub>80181</sub>I<sub>80182</sub>I<sub>80183</sub>I<sub>80184</sub>I<sub>80185</sub>I<sub>80186</sub>I<sub>80187</sub>I<sub>80188</sub>I<sub>80189</sub>I<sub>80190</sub>I<sub>80191</sub>I<sub>80192</sub>I<sub>80193</sub>I<sub>80194</sub>I<sub>80195</sub>I<sub>80196</sub>I<sub>80197</sub>I<sub>80198</sub>I<sub>80199</sub>I<sub>80200</sub>I<sub>80201</sub>I<sub>80202</sub>I<sub>80203</sub>I<sub>80204</sub>I<sub>80205</sub>I<sub>80206</sub>I<sub>80207</sub>I<sub>80208</sub>I<sub>80209</sub>I<sub>80210</sub>I<sub>80211</sub>I<sub>80212</sub>I<sub>80213</sub>I<sub>80214</sub>I<sub>80215</sub>I<sub>80216</sub>I<sub>80217</sub>I<sub>80218</sub>I<sub>80219</sub>I<sub>80220</sub>I<sub>80221</sub>I<sub>80222</sub>I<sub>80223</sub>I<sub>80224</sub>I<sub>80225</sub>I<sub>80226</sub>I<sub>80227</sub>I<sub>80228</sub>I<sub>80229</sub>I<sub>80230</sub>I<sub>80231</sub>I<sub>80232</sub>I<sub>80233</sub>I<sub>80234</sub>I<sub>80235</sub>I<sub>80236</sub>I<sub>80237</sub>I<sub>80238</sub>I<sub>80239</sub>I<sub>80240</sub>I<sub>80241</sub>I<sub>80242</sub>I<sub>80243</sub>I<sub>80244</sub>I<sub>80245</sub>I<sub>80246</sub>I<sub>80247</sub>I<sub>80248</sub>I<sub>80249</sub>I<sub>80250</sub>I<sub>80251</sub>I<sub>80252</sub>I<sub>80253</sub>I<sub>80254</sub>I<sub>80255</sub>I<sub>80256</sub>I<sub>80257</sub>I<sub>80258</sub>I<sub>80259</sub>I<sub>80260</sub>I<sub>80261</sub>I<sub>80262</sub>I<sub>80263</sub>I<sub>80264</sub>I<sub>80265</sub>I<sub>8</sub>

【表4】

| 修飾部分<br>番号 | 修飾部分   |
|------------|--|
| I          | {2-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(13-カルボキシトリデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ]-エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル   |
| II         | {2-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(15-カルボキシペンタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル  |
| III        | {2-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル  |
| IV         | {2-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(19-カルボキシノナデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチル   |
| V          | {3-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(13-カルボキシトリデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ]-エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]プロピルカルバモイル}メチル  |
| VI         | {3-[2-(2-[2-[2-[2-(2-[(S)-4-カルボキシ-4-(15-カルボキシペンタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]プロピルカルバモイル}メチル |
| VII        | {3-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]プロピルカルバモイル}メチル |
| VIII       | {3-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(19-カルボキシノナデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]プロピルカルバモイル}メチル  |
| IX         | {4-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(13-カルボキシトリデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ]-エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]ブチルカルバモイル}メチル   |
| X          | {4-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(15-カルボキシペンタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]ブチルカルバモイル}メチル  |
| XI         | {4-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]ブチルカルバモイル}メチル  |
| XII        | {4-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[(S)-4-カルボキシ-4-(19-カルボキシノナデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]-エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ]エトキシ)アセチルアミノ]ブチルカルバモイル}メチル   |

10

20

30

40

## 【実施例6】

## 【0091】

効力アッセイ-3T3-L1脂肪細胞におけるグルコースの取込み

次のアッセイにより、本発明のFGF21化合物の生物活性または効力を決定した。

## 【0092】

マウス3T3-L1線維芽細胞(例えばカタログ番号CL-173でATCCから入手可能)を基本培地(10%ウシ胎仔血清(FBS)およびペニシリン/ストレプトマイシン入りのDMEM(4500mg/lグルコース))で維持する。細胞は、集密に到達させずに、(目視で)約60%の集密度に達する前に(

50

新しいバイアルに移して)継代しなければならない。

【0093】

グルコースの取り込みアッセイのために、24ウェルプレートに80,000細胞/ウェルまたは96ウェルプレートに20,000細胞/ウェルで細胞を播種し、細胞が集密に達した時に(高密度、分化した脂肪細胞を得る目的で)、培地を基本培地からトログリタゾン、IBMX、デキサメタゾン(例えばSigmaから市販品として入手可能)およびヒトインスリン(例えばNovo Nordisk A/Sから市販品として入手可能)を含む基本培地に変更する。

【0094】

細胞は、分化を開始して7~14、好ましくは7~10日後に使用する。細胞を、基本培地で FGF21ポリペプチドまたは本発明の誘導体の濃度を増大させて(0~300nM)20時間刺激する。3H-デオキシグルコース(以下トレーサー)を加える前に温かい(約37℃)アッセイバッファー(1mM MgCl<sub>2</sub>および2mM CaCl<sub>2</sub>入りのPBS)、HEPESおよび0.1%ヒト血清アルブミン)で細胞を洗浄して、トレーサーと共に細胞を1時間インキュベートする。このインキュベーションを、氷冷のアッセイバッファー中で2回洗浄することにより終了させる。細胞をTriton X-100で溶解し、溶解物を96ウェルプレートに移し、microscint-40(例えばPerkin Elmerから市販品として入手可能)を加え、TOP-counter(例えばPerkin ElmerのPackard top-counter)中でトレーサー量をカウントする。問題とするポリペプチドのEC<sub>50</sub>を計算する。下記のTable 1(表5)に示す結果は、Met-FGF21のEC<sub>50</sub>(効力)に対する本発明のFGF21化合物のEC<sub>50</sub>(効力)を示す。

【0095】

【表5】

10

20

30

40

Table 1: FGF21 化合物の効力

| 類似体または誘導体 ID | 3T3-L1 のグルコースの取り込み<br>Met-FGF21 と比較した効力(%) |
|--------------|--|
| Met-FGF21    | 100  |
| 類似体 9        | 1594                                       |
| 類似体 8        | 1099                                       |
| 誘導体 24       | 796  |
| 類似体 7        | 734  |
| 誘導体 23       | 445  |
| 誘導体 31       | 995  |
| 類似体 10       | 121  |
| 誘導体 101      | 13   |
| 類似体 6        | 1017                                       |
| 類似体 5        | 571  |
| 誘導体 21       | 270  |
| 類似体 11       | 529  |
| 誘導体 102      | 484  |
| 類似体 4        | 102  |
| 類似体 3        | 383  |
| 誘導体 19       | 57   |
| 類似体 2        | 1325                                       |
| 誘導体 18       | 381  |
| 類似体 1        | 1190                                       |
| 誘導体 17       | 438  |

【0096】

50

概して本発明のFGF21化合物はMet-FGF21の効力と比較して効力が改善されていることがTable 1(表5)の結果から明らかである。

【実施例 7】

【0097】

HEK293/-クロト-ERKリン酸化アッセイ

ERKリン酸化アッセイを、ヒト/-クロト-が安定的にトランスフェクションされたHEK293細胞において実施した。HEK293T/b-クロト-安定細胞を96-ウェルプレート上に30000細胞/ウェルで播種した。2日後、新鮮な培地を加え、さらに2時間以上後にFGF21タンパク質を加えた。このプレートを12分間インキュベートした。そして、製造業者の指示に従って、AlphaScreen SureFire Phospho-ERK1/2アッセイキット(Perkin Elmer、Waltham、MA)を使用して総ERKリン酸化を評価し、EnVision Multilabel Microplate Readerモデル2103(Perkin Elmer)をAlphaScreen HTS Turboオプションと共に使用して、シグナルを検出した。データは平均+/-S.E.Mとして表わされる。EC50値を、GraphPad Prismバージョン5.02を使用して、4-パラメータロジスティック非線形回帰分析により決定した。参考文献:Yie, Jら:FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation、FEBS Letters583(2009)19~24、およびMicanovic Rら:Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21. J. Cell. Physiol. 2009 May;219(2):227~34。

10

【0098】

## 【表6】

Table 2: ERK

| 類似体または誘導体ID | HSA[EC50(nM)]なしのpERK-HEK293-β-クロト一 中央値 |
|-------------|--|
| Met-FGF21   | 1.6                                    |
| 類似体9        | 0.70                                   |
| 類似体8        | 0.76                                   |
| 誘導体24       | 1.01                                   |
| 類似体7        | 0.63                                   |
| 誘導体23       | 0.64                                   |
| 誘導体31       | 1.46                                   |
| 類似体10       | 12.51                                  |
| 誘導体101      | 23.8                                   |
| 類似体6        | 0.71                                   |
| 類似体5        | 0.78                                   |
| 誘導体21       | 1.07                                   |
| 類似体11       | 0.98                                   |
| 誘導体102      | 1.40                                   |
| 類似体4        | 0.47                                   |
| 類似体3        | 0.77                                   |
| 誘導体19       | 0.48                                   |
| 類似体2        | 0.64                                   |
| 誘導体18       | 0.47                                   |
| 類似体1        | 0.71                                   |
| 誘導体17       | 0.98                                   |

## 【0099】

[-1A, 71C, 121Q, 166F, 168L, 174V, 179F, 180E, des181]FGF21については、Erk値は0.97であった。例えば、この類似体は、上記の修飾部分番号111である{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-カルボキシ-4-(17-カルボキシヘプタデカノイルアミノ)ブチリルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エトキシ}エトキシ)アセチルアミノ]エチルカルバモイル}メチルを71Cysのメルカプト基由来の硫黄原子に共有結合させることにより、誘導体化することができる。

## 【実施例8】

## 【0100】

FGF21化合物のin vivo試験-薬力学

db/dbマウスは、2型糖尿病のマウスモデルである。このマウスはレプチン受容体を欠き、高血糖、インスリン抵抗性、過食および肥満を特徴とする。

10

20

30

40

50

## 【0101】

雄のdb/dbマウス(9~10週齢)を使用して、次のFGF21類似体および誘導体の血中グルコースおよび体重に対する効果を測定した。

## 【0102】

化合物を、50mMリン酸、145mM NaCl、0.05%Tween-80、pH=7.4(2mL/kg)に入れて0.1mg/kgで、一日一回7日間皮下注射投与した(n=7~9)。各ビヒクル処理群(コントロール)は、50mMリン酸、145mM NaCl、0.05%Tween-80、pH=7.4、(2mL/kg)の皮下注射で一日一回7日間処理した(n=8~9)。体重を投薬前とさらに7日間の治療後に測定した。非空腹時血中グルコースを、投薬前とさらに7日目の投薬から2時間後に測定した。血中グルコースを、グルコースアナライザー(Biosen5040)を使用してグルコースオキシダーゼ法に基づいて測定した。結果を下記のTable 3(表7)に示す。

10

## 【0103】

## 【表7】

Table 3:  $\Delta$ 血中グルコースおよび $\Delta$ 体重(1~7日)のビヒクルとの差

|         | $\Delta$ 血中グルコース  | $\Delta$ 体重      |
|---------|-------------------|------------------|
| 類似体 7#  | -9.72 ± 0.66 ***  | -0.38 ± 0.26     |
| 誘導体 23  | -11.38 ± 0.79 *** | -2.03 ± 0.19 *** |
| 誘導体 101 | -10.31 ± 0.60 *** | -1.07 ± 0.12 **  |
| 誘導体 24  | -12.21 ± 0.95 *** | -1.60 ± 0.20 *** |
| 誘導体 17  | -10.61 ± 0.58 *** | -1.74 ± 0.35 *** |
| 誘導体 19  | -12.47 ± 0.92 *** | -1.90 ± 0.59 **  |
| 誘導体 31  | -12.80 ± 0.92 *** | -1.37 ± 0.28 **  |
| 誘導体 18  | -10.87 ± 1.03 *** | -0.63 ± 0.25     |
| 誘導体 102 | -12.63 ± 0.62 *** | -1.11 ± 0.23 *   |

#投薬 BID

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 化合物対各ビヒクルの $\Delta$ 値を比較するスチューデントのt検定, n=7-9

20

## 【0104】

Table 3(表7)の結果は、本発明のFGF21誘導体はin vivoで生物学的に活性であり、体重および非空腹時/空腹時血中グルコースを効果的に低下させることを示す。

30

## 【実施例9】

## 【0105】

FGF21化合物のin vivo試験-薬物動態

## ミニブタ

Met-FGF21の薬物動態プロファイルは、正常な雄のゲッチンゲンミニブタ、n=4(12~15月齢、25kg)で試験することができる。試験化合物の血漿濃度を14日間モニターする。Met-FGF21を0.1mg/kg(約5nmol/kg)の単回静脈内投与として投与する。

## 【0106】

比較化合物Met-FGF21の平均半減期( $T_{1/2}$ )は、標準偏差が2.7時間である10.8時間と決定されている。

40

## 【0107】

本発明のFGF21化合物の薬物動態プロファイルを、正常な雄ゲッチンゲンミニブタ、n=4(12~15月齢、25kg)で試験する。血漿濃度を19日間モニターする。化合物を0.05mg/kg(約2.5nmol/kg)の単回静脈内投与として投与する。

## 【0108】

試験化合物の平均半減期( $T_{1/2}$ )を決定した。

## 【0109】

FGF21化合物の血漿濃度は、Fibroblast Growth Factor-21 Human ELISA(カタログ番号R D191108200RでBioVendorから入手可能)を使用して決定することができる。PCベースのソ

50

ソフトウェアであるPharsight Corporation, Cary N.C.のWinNonLinバージョン5.2を使用して、薬物動態を計算することができる。

【0110】

この試験によって、本発明のFGF21誘導体の長期的効果が確認されることになる。

【0111】

刊行物、特許出願および特許を含めた、本明細書中で引用するすべての参考文献は、参照によりその全体が、各文献が個々におよび具体的に示されることにより、参照によって組み込まれかつそのすべてが本明細書で述べられる場合と同じ程度に、本明細書に組み込まれる(法によって認められる最大限の範囲において)。

【0112】

本明細書における特許文献の引用および組み込みは、便宜のためのみに行うものであり、そのような特許文献の有効性、特許性および/または執行力のいかなる見解も反映するものではない。本明細書における参考文献の言及は、それらが従来技術を構成することを認めるものではない。

【0113】

全ての表題および副題は、便宜のためのみに本明細書において使用され、決して本発明を制限するものとして解釈されるべきではない。

【0114】

本明細書で提供される任意の例および全ての例または例示的な言葉(例えば「などの」)の使用は、単に本発明をより明確にすることを意図するに過ぎず、特に要求がない限り、本発明の範囲の制限をもたらすものではない。本明細書のいかなる言葉も、非特許請求していない任意の要素を本発明の実施に不可欠であると示すものと解釈されるべきでない。

【0115】

本明細書において、単語「含む(comprise)」は、「含む(include)」、「含有する(contains)」または「包括する(comprehend)」を広く意味すると解釈すべきである(EPOガイドラインC、III、4.13を参照されたい)。

【0116】

本発明は、適用可能な法律によって許される限り、本明細書に添付の請求項および項目に記載されている主題のあらゆる変更形態および均等物を含む。

【配列表】

2013533227000001.app

10

20

30

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/059273

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K38/18 A61K47/48 C07K14/50  
ADD.

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)  
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, WPI Data, BEILSTEIN Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | WO 2009/020802 A2 (LILLY CO ELI [US]; COSKUN TAMER [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]) 12 February 2009 (2009-02-12)<br>abstract; claims<br>-----                                    | 1-9                   |
| X         | WO 2009/030771 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; SPETZLER JANE [DK]; SCHAEFFER LAUGE [DK]; LAU JE) 12 March 2009 (2009-03-12)<br>cited in the application<br>abstract; claims<br>----- | 1-9                   |
| X         | WO 2010/042747 A2 (AMGEN INC [US]; WALKER KENNETH W [US]; GEGG COLIN V JR [US]; HECHT RAN) 15 April 2010 (2010-04-15)<br>claims; tables<br>-----<br>-/-                        | 1-9                   |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* 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 document 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 November 2011

29/12/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vogt, Titus

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/059273

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X, P   | WO 2010/065439 A1 (LILLY CO ELI [US]; BALDWIN DAVID BRUCE [US]; DICKINSON CRAIG DUANE [US] 10 June 2010 (2010-06-10) claims; table 5   | 1                     |
| A, P   | -----  | 2-9                   |
| Y, P   | WO 2010/084169 A2 (NOVO NORDISK AS [DK]; TAGMOSE TINA MOELLER [DK]; GARIBAY PATRICK WILLI) 29 July 2010 (2010-07-29) page 132; claims; examples  | 1-9                   |
| X, P   | -----  |                       |
| Y, P   | WO 2010/142665 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; ANDERSEN BIRGITTE [DK]; HANSEN ANN MARIA KRUSE [ ]) 16 December 2010 (2010-12-16) embodiment 72 on p. 16;claims   | 1,2,5,6               |
| A  | -----  | 1-9                   |
| A  | YIE J ET AL: "FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 583, no. 1, 5 January 2009 (2009-01-05), pages 19-24, XP026194363, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/J.FEBSLET.2008.11.023 [retrieved on 2008-12-04] abstract           | 1-9                   |
| A  | -----  |                       |
| A  | MICANOVIC RADMILA ET AL: "Different Roles of N- and C-Termini in the Functional Activity of FGF21", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, WILEY LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 219, no. 2, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 227-234, XP008118374, ISSN: 0021-9541, DOI: 10.1002/JCP.21675 [retrieved on 2008-12-30] abstract | 1-9                   |
|  | -----  |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2011/059273

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)  | Publication date   |
|--|------------------|--|--|
| WO 2009020802 A2                       | 12-02-2009       | CA 2693504 A1<br>EP 2185178 A2<br>JP 2010535781 A<br>US 2011034373 A1<br>WO 2009020802 A2  | 12-02-2009<br>19-05-2010<br>25-11-2010<br>10-02-2011<br>12-02-2009   |
| WO 2009030771 A1                       | 12-03-2009       | CN 101842109 A<br>EP 2190460 A1<br>JP 2010538048 A<br>US 2010261637 A1<br>WO 2009030771 A1   | 22-09-2010<br>02-06-2010<br>09-12-2010<br>14-10-2010<br>12-03-2009   |
| WO 2010042747 A2                       | 15-04-2010       | AU 2009302318 A1<br>CA 2739615 A1<br>CR 20110245 A<br>EA 201100516 A1<br>EP 2358749 A2<br>KR 20110093790 A<br>US 2011195895 A1<br>WO 2010042747 A2 | 15-04-2010<br>15-04-2010<br>29-08-2011<br>31-10-2011<br>24-08-2011<br>18-08-2011<br>11-08-2011<br>15-04-2010 |
| WO 2010065439 A1                       | 10-06-2010       | NONE   |  |
| WO 2010084169 A2                       | 29-07-2010       | CA 2748593 A1<br>EP 2389190 A2<br>TW 201032827 A<br>US 2010216715 A1<br>WO 2010084169 A2   | 29-07-2010<br>30-11-2011<br>16-09-2010<br>26-08-2010<br>29-07-2010   |
| WO 2010142665 A1                       | 16-12-2010       | NONE   |  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2011/059273

**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 and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - 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 purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|  |  |
|--|--|
|  | International application No.<br>PCT/EP2011/059273 |
|--|--|

## 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.: 10-15 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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.

International Application No. PCT/ EP2011/ 059273

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 10-15

The scope of protection sought with claims 10-15 is open ended and unclear.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.            | F I           | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 9/00 (2006.01)  | A 6 1 P 9/00  |            |
| A 6 1 P 1/16 (2006.01)  | A 6 1 P 1/16  |            |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | A          |

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

- (72) 発明者 パトリック・ウィリアム・ガリバ  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク  
・アー/エス
- (72) 発明者 ヘレ・ヴェルディケ  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク  
・アー/エス
- (72) 発明者 シュジア・チャン  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク  
・アー/エス
- (72) 発明者 ヘニング・トゥーヤスン  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク  
・アー/エス
- (72) 発明者 ピーター・クレステン・ニールセン  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク  
・アー/エス
- (72) 発明者 ピアギッテ・アンデルセン  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク  
・アー/エス
- (72) 発明者 ジシュ・ワン  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク  
・アー/エス
- (72) 発明者 クリスチャン・サス・バク・イエンセン  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク  
・アー/エス
- (72) 発明者 ティナ・メラー・タグモーセ  
デンマーク・DK-2880・バウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA21 DA06 EA04 HA01  
4C084 AA02 BA22 CA18 DB54 NA14 ZA702 ZA752 ZC332 ZC352  
4H045 AA10 AA30 BA10 BA50 CA40 DA01 EA20 FA52 FA74 GA22  
GA23