

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6359972号  
(P6359972)

(45) 発行日 平成30年7月18日 (2018. 7. 18)

(24) 登録日 平成30年6月29日 (2018. 6. 29)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C O 7 K</b>	<b>14/595</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>14/595</b>	<b>Z N A</b>
<b>C O 7 K</b>	<b>14/605</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>14/605</b>	
<b>C O 7 K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C O 7 K</b>	<b>19/00</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>3/10</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>3/10</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>9/12</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>9/12</b>	

請求項の数 15 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-539352 (P2014-539352)
(86) (22) 出願日	平成24年11月2日 (2012. 11. 2)
(65) 公表番号	特表2015-502918 (P2015-502918A)
(43) 公表日	平成27年1月29日 (2015. 1. 29)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/071766
(87) 国際公開番号	W02013/064669
(87) 国際公開日	平成25年5月10日 (2013. 5. 10)
審査請求日	平成27年10月30日 (2015. 10. 30)
(31) 優先権主張番号	61/555, 435
(32) 優先日	平成23年11月3日 (2011. 11. 3)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	502453045
	ジーランド ファーマ アクティーゼルス
	カブ
	デンマーク国, デーコー 2600 グロ
	ストルップ, スメデランド 36
(74) 代理人	100099759
	弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100077517
	弁理士 石田 敬
(74) 代理人	100087871
	弁理士 福本 積
(74) 代理人	100087413
	弁理士 古賀 哲次
(74) 代理人	100117019
	弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G L P - 1 受容体アゴニストペプチドガストリンコンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式：

$$\underline{H} - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N - 8 A d o - 8 A d o - Y G W L D F - N H _ 2 \text{、又は} \underline{H} - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E W L K D Y G W L D F - N H _ 2$$

を有するペプチドコンジュゲート、又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物と、医薬的に許容される担体、賦形剤又はビヒクルとを含む、医薬組成物。

【請求項 3】

(i) 1 型糖尿病、2 型糖尿病、糖尿病前症、インスリン抵抗性症候群、耐糖能障害 (I G T)、高血中グルコースレベルに関連する疾患状態、高血糖、高血圧、アテローム発生性脂質異常症、動脈硬化症、冠状動脈性心臓疾患、末梢動脈疾患、脳卒中、微小血管疾患、胃疾患、メタボリック症候群、癌、炎症性腸疾患 (I B D)、過敏性腸症候群 (I B S)、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、及び腎不全から選択される疾患又は障害の治療；

(ii) - 細胞及び / 又はその壊死の誘導；

(iii) 臍島 - 細胞の生存の誘導；

(iv) 臍島での - 細胞アポトーシス及び / 又はその壊死の抑制；

- (v) 臍島での - 細胞増殖の誘導；
- (vi) 体重増加の抑制又は体重減少の促進；
- (vii) 循環グルコースレベル、耐糖能、及び/又は循環コレステロールレベルの改善、循環LDLレベルの低下、及び/又はHDL/LDL比の上昇；又は
- (viii) 過剰な体重により引き起こされるか又はこれを特徴とする症状の治療又は予防のための、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

ヒト対象に使用するための、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

過剰な体重により引き起こされるか又はこれを特徴とする症状が、肥満、病的肥満、肥満関連炎症、肥満関連胆嚢疾患、及び肥満誘発性睡眠時無呼吸、メタボリック症候群、及び糖尿病前症から選択される、請求項3に記載の医薬組成物。

10

【請求項6】

該ペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物が、プロトンポンプ阻害剤との、又は糖尿病、肥満、脂質異常症、もしくは高血圧を治療するための物質との、併用療法の一部として投与される、請求項3～5のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項7】

(i) 糖尿病を治療又は予防するための該物質が、メトホルミン、スルホニル尿素、グリニド、DPP-IV阻害剤、グリタゾン、インスリン、又はインスリン類似体であり；

20

(ii) 肥満を治療又は予防するための該物質が、グルカゴン様ペプチド-1アゴニスト、ペプチドYYもしくはその類似体、ニューロペプチドY(NPY)もしくはその類似体、カンナビノイド受容体1アンタゴニスト、リパーゼ阻害剤、メラノコルチン受容体4アゴニスト、又はメラニン濃縮ホルモン受容体1アンタゴニストであり；

(iii) 高血圧を治療又は予防するための該物質が、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、アンギオテンシンII受容体遮断薬、利尿剤、ベータ遮断薬、又はカルシウムチャネル遮断薬であり；

(iv) 脂質異常症を治療又は予防するための該物質が、スタチン、フィブラート、ナイアシン、及び/又はコレステロール吸収阻害であり；

(v) プロトンポンプ阻害剤が、ベンズイミダゾリル誘導体型又はイミダゾピリジン誘導体型の物質である、請求項6に記載の医薬組成物。

30

【請求項8】

請求項1に記載のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物を合成法で製造する方法。

【請求項9】

対象者に、請求項1に記載のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物、又は請求項2に記載の医薬組成物を送達するための、少なくとも1つの該ペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物、又は該医薬組成物を含む、装置。

【請求項10】

40

請求項1に記載の少なくとも1つのペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物、又は請求項2に記載の医薬組成物と、包装材料又は使用説明書とを含む、キット。

【請求項11】

(i) 1型糖尿病、2型糖尿病、糖尿病前症、インスリン抵抗性症候群、耐糖能障害(IGT)、高血中グルコースレベルに関連する疾患状態、高血糖、高血圧、アテローム発生性脂質異常症、動脈硬化症、冠状動脈性心臓疾患、末梢動脈疾患、脳卒中、微小血管疾患、胃疾患、メタボリック症候群、癌、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、及び腎不全、から選択される疾患又は障害の治療；

50

- (ii) - 細胞及び / 又はその壊死の誘導 ;
- (iii) 臍島 - 細胞の生存の誘導 ;
- (iv) 臍島での - 細胞アポトーシス及び / 又はその壊死の抑制 ;
- (v) 臍島での - 細胞増殖の誘導 ;
- (vi) 体重増加の抑制又は体重減少の促進 ;
- (vii) 循環グルコースレベル、耐糖能、及び / 又は循環コレステロールレベルの改善、循環 LDL レベルの低下、及び / 又は HDL / LDL 比の上昇 ; 又は
- (viii) 過剰な体重により引き起こされるか又はこれを特徴とする症状の治療又は予防

、  
のための医薬の製造のための、請求項 1 に記載の少なくとも 1 つのペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の使用。

10

#### 【請求項 1 2】

ヒト対象で使用するための、請求項 1 1 に記載の使用。

#### 【請求項 1 3】

過剰な体重により引き起こされるか又はこれを特徴とする症状が、肥満、病的肥満、肥満関連炎症、肥満関連胆嚢疾患、及び肥満誘発性睡眠時無呼吸、メタボリック症候群、及び糖尿病前症から選択される、請求項 1 1 に記載の使用。

#### 【請求項 1 4】

該ペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物が、プロトンポンプ阻害剤との、又は糖尿病、肥満、脂質異常症、もしくは高血圧を治療するための物質との、併用療法の一部として投与される、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

#### 【請求項 1 5】

(i) 糖尿病を治療又は予防するための該物質が、メトホルミン、スルホニル尿素、グリニド、DPP - IV 阻害剤、グリタゾン、インスリン、又はインスリン類似体であり ;

(ii) 肥満を治療又は予防するための該物質が、グルカゴン様ペプチド - 1、ペプチド YY もしくはその類似体、ニューロペプチド Y (NPY) もしくはその類似体、カンナビノイド受容体 1 アンタゴニスト、リパーゼ阻害剤、メラノコルチン受容体 4 アゴニスト、又はメラニン濃縮ホルモン受容体 1 アンタゴニストであり ;

(iii) 高血圧を治療又は予防するための該物質が、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、アンギオテンシン II 受容体遮断薬、利尿剤、ベータ遮断薬、又はカルシウムチャネル遮断薬であり ;

30

(iv) 脂質異常症を治療又は予防するための該物質が、スタチン、フィブラート、ナイアシン、及び / 又はコレステロール吸収阻害であり ;

(v) プロトンポンプ阻害剤が、ベンズイミダゾリル誘導体型又はイミダゾピリジン誘導体型の物質である、請求項 1 4 に記載の使用。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

#### 発明の分野

40

本発明は特に、いくつかのペプチドコンジュゲートと、糖尿病 (1 型及び / 又は 2 型) と糖尿病関連疾患又は障害を含む種々の疾患又は障害の治療及び / 又は予防におけるこのコンジュゲートの使用と、に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

#### 発明の背景

糖尿病 (特に 1 型及び 2 型糖尿病) は、2 型糖尿病の発症の主要な原因であると考えられている肥満とともに、世界的に大きなかつ増大し続けている健康問題となっている。糖尿病に帰結する疾患又は障害は、心血管疾患と末梢血管疾患、微小血管と巨大血管合併症、卒中、及びおそらくある種の癌を含む。

50

## 【 0 0 0 3 】

糖尿病は、血中グルコースレベルの生理学的調節の欠陥により特徴づけられる。糖尿病につながる可能性がある基礎的症状には、内因性インスリン産生及び／又はインスリン抵抗性の付随的低下又は喪失（インスリンに対する感受性の低下）を伴う膵臓の細胞量と機能の低下又は喪失、すなわち血中グルコースレベルの十分な制御をもたらす内因性インスリンの能力の低下又は喪失である。

## 【 0 0 0 4 】

血中グルコースレベルを低下させる多くのホルモンは、消化管中の栄養物質の存在と吸収に応答して消化管粘膜により分泌される。これらには、グルカゴン様ペプチド - 1（G L P - 1）、グルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチド（G I P）、ガストリン、及びセクレチンがある。

10

## 【 0 0 0 5 】

G L P - 1 [例えば、Orskov, Diabetologia 35: 701-711 (1992)を参照]は、180アミノ酸のペプチドであるプログルカゴンの組織プロセッシングにより産生される[例えば、Drucker, Diabetes 47: 159-169 (1998)を参照]。プログルカゴンの全体の配列は、グルカゴンの29アミノ酸配列と、G L P - 1の36又は37アミノ酸配列と、及びグルカゴン様ペプチド - 2（G L P - 2；インスリン分泌刺激ペプチド）の34アミノ酸配列とを含有する。

## 【 0 0 0 6 】

血中グルコースレベルを低下させる別のペプチド群を構成するいわゆるエキセンジン（exendin）は、G L P - 1（7～36）とある程度の配列類似性（53％）を有する[例えば、Goke et al., J. Biol. Chem. 268: 19650-19655 (1993)]。エキセンジンは、ドクトカゲ科種（Helodermatidae）（ドクトカゲ）の唾液中で発見されている。エキセンジン - 3は、ヘロデルマ・ホリヅム（*Heloderma horridum*）（メキシコドクトカゲ）の唾液中に存在しており、エキセンジン - 4は、ヘロデルマ・サスペクツム（*Heloderma suspectum*）（アメリカドクトカゲ）の唾液中に存在している。エキセンジン - 3のアミノ酸配列とは2位と3位で異なるエキセンジン - 4のアミノ酸配列は、H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S - N H<sub>2</sub>である。

20

## 【 0 0 0 7 】

エキセンジン - 4は、単離されたラットインスリノーマ細胞上の強力なG L P - 1受容体アゴニストであることが報告されている[Goke et al., 前出]。W O 9 9 / 0 7 4 0 4は、糖尿病d b / d bマウスで全身投与されたエキセンジン - 4が血中グルコースレベルを40％低下させることを開示し、糖尿病o b / o bマウスにおけるエキセンジン - 4の1日1回の腹腔内注射の長期間の血中グルコースレベル低下作用も報告されている[Grig et al., Diabetologia 42: 45-50 (1999)]。

30

## 【 0 0 0 8 】

米国特許第5,424,286号及びW O 9 8 / 0 5 3 5 1は、エキセンジン - 3、エキセンジン - 4、及びエキセンジンアゴニストが、糖尿病の治療のために、胃の運動性を低下させ胃排出を遅延させるために、及び高血糖の予防のために、使用することができることを開示し、W O 9 8 / 3 0 2 3 1はさらに、これらが食物摂取を低下させるために使用できることを開示する。

40

## 【 0 0 0 9 】

ペプチドホルモンであるガストリンは、胃粘膜の細胞や十二指腸のG細胞から分泌され、ヒトでのこのホルモンの主要な生理的役割には、胃酸（すなわちH C l）の分泌の刺激と胃運動性の補助がある。ガストリンが、膵島新生における役割、すなわち膵島におけるインスリン分泌性細胞増殖の刺激[例えば、Korc, M., J. Clin. Invest, 92: 1113-1114 (1993); Rومان et al. Diabetes 51: 686-690 (2002)]の役割を果たし、従って血中グルコースの制御に寄与している兆候がある。

## 【 0 0 1 0 】

50

ガストリンは、別の消化管ペプチドホルモンであるコレシストキニン（ＣＣＫ）と受容体を共有する。受容体ＣＣＫ－ＡＲとＣＣＫ－ＢＲは、ガストリンとＣＣＫ変種に対して異なる親和性を有する。ＣＣＫ－ＡＲ（又はＣＣＫＲ１）は硫酸化ＣＣＫの受容体として主に作用し、一方、ＣＣＫ－ＢＲ（又はＣＣＫＲ２）は、ＣＣＫとガストリンの両方に等しく結合する。ＣＣＫ－ＢＲは、血漿中のＣＣＫと比較して、ガストリンのより高いレベルのために「ガストリン受容体」と見なされている[Foucaud et al. Reg. Peptides 145: 17-23 (2008)]。

#### 【００１１】

ＣＣＫ－ＢＲは、リガンドが結合するといくつかの細胞内経路を開始させ、これが、ＣＣＫの多様な生物学的役割の理由であると見なされている。ＣＣＫ－ＢＲの下流の主要な経路は、ＭＡＰＫ（分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ）又はＥＲＫ（細胞外調節キナーゼ）経路であり、これはまた、いくつかの増殖ホルモンにより活性化される。ＣＣＫ－ＢＲは膵臓で発現されるため、ガストリンは、この組織中で細胞増殖と膵島再生に寄与することができる。

#### 【００１２】

ヒトでは、ガストリンは主に、３つの形態で存在する。すなわちガストリン３４、ガストリン１７、及びガストリン１４（問題の配列中のアミノ酸の総数を基準にして）。ガストリン６も同定されている。より短い形態は、Ｃ末端アミド化ガストリン３４の切断によって生成される。従ってガストリン１７は、ガストリン３４の最後の１７個のＣ末端残基（プロガストリン（５５～７１）に対応）からなり、ガストリン１４は、ガストリン３４の最後の１４個のＣ末端残基（プロガストリン（５８～７１）に対応）からなり、ガストリン６は、ガストリン３４の最後の６個のＣ末端残基（プロガストリン（６６～７１）に対応）からなる。ヒトのガストリン１７では、Ｎ－末端アミノ酸残基は、ピログルタミン酸（PyroGlu）残基である。アミド化Ｃ末端の６アミノ酸は、ガストリンの主要な受容体結合残基である。

#### 【発明の概要】

#### 【００１３】

#### 発明の概要

２つの共有的に結合又は連結したペプチド成分を含むいくつかのコンジュゲートが、例えば糖尿病（１型及び／又は２型糖尿病）と種々の他の糖尿病関連疾患又は障害の治療において、問題の２つの個々のペプチドの組合せの治療活性と比較して、予想外に高い治療活性を示すことがあることが、わかっている。

#### 【００１４】

広い形態において、本発明は、ＧＬＰ－１受容体アゴニストとガストリン、特にLeu、Nle、Phe、及びThrから選択されるガストリン１７中の１５位（ガストリン６中の４位に相当）での置換を有するガストリン、とのペプチドコンジュゲートを提供する。さらに詳しくは本発明は、エキセンジン－４とガストリンとのペプチドコンジュゲートを提供する。

#### 【００１５】

従ってある態様において、本発明は、式Ⅰ



[式中、

$R^1$ は、 $H$ 、 $C_{1-4}$ アルキル、アセチル、ホルミル、ベンゾイル、又はトリフルオロアセチルであり、

$R^2$ は、 $OH$ 又は $NH_2$ であり；そして

$Z_a$ は、式Ⅰa

His - Gly - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Z<sub>9</sub> - Leu - Ser - Z<sub>12</sub> - Z<sub>13</sub> - Z<sub>14</sub> - Glu - Z<sub>16</sub> - Glu - Ala - Val - Z<sub>20</sub> - Leu - Phe - Ile - Z<sub>24</sub> - Z<sub>25</sub> - Leu - Z<sub>27</sub> - Z<sub>28</sub> (Ⅰa)

(ここで、

10

20

30

40

50

Z 9 は、A s p 及び G l u から選択され、  
 Z 1 2 は、L y s、A r g、及び O r n から選択され、  
 Z 1 3 は、G l n 及び T y r から選択され、  
 Z 1 4 は、M e t 及び L e u から選択され、  
 Z 1 6 は、G l u、C y s、A r g、O r n、及び L y s から選択され、  
 Z 2 0 は、A r g、L y s、及び O r n から選択され、  
 Z 2 4 は、L y s、A r g、O r n、及び G l u から選択され、  
 Z 2 5 は、T r p、L y s、C y s、及び P h e から選択され、  
 Z 2 7 は、L y s、A r g、及び O r n から選択され、  
 Z 2 8 は、A s n 及び A s p から選択されるか、又は存在しない)

10

を有するペプチド配列であり、

L<sub>a</sub> は、式 I b

L 1 - L 2 - L 3 - L 4 ( I b )

(ここで、

L 1 は、O r n、8 A d o、C y s、L y s、及び G l n から選択されるか、又は存在せず、

L 2 は、O r n、8 A d o、C y s、L y s、及び G l n から選択されるか、又は存在せず、

L 3 は、O r n、8 A d o、C y s、L y s、及び G l n から選択されるか、又は存在せず、及び

20

L 4 は、O r n、8 A d o、C y s、L y s、及び G l n から選択されるか、又は存在しない)

を有するペプチド配列であり、

Y<sub>a</sub> は、式 I c

Y 1 2 - Y 1 3 - Y 1 4 - Y 1 5 - A s p - Y 1 7 ( I c )

(ここで、

Y 1 2 は、T y r 及び A l a から選択されるか、又は存在せず、

Y 1 3 は、G l y 及び A l a から選択されるか、又は存在せず、

Y 1 4 は、T r p、1 N a l 及び P h e から選択され；

Y 1 5 は、M e t、L e u、N l e、T h r、及び P h e から選択され；及び

30

Y 1 7 は、P h e 及び 3 - ( 3 - ピリジル ) - アラニンから選択される)

を有するペプチド配列であり、

ここで、式 I a と I b 中の L y s、O r n、又は C y s の少なくとも 1 つはさらに、親油性及び / 又はビオチン性置換基に結合しているか、及び / 又はペグ化されている] を有するペプチドコンジュゲートであるか、

又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

#### 【 0 0 1 6 】

さらなる態様において本発明は、Z<sub>a</sub> が式 I I a

H i s - G l y - G l u - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - Z 9 - L e u -  
 S e r - L y s - Z 1 3 - Z 1 4 - G l u - Z 1 6 - G l u - A l a - V a l - A r g -  
 L e u - P h e - l l e - G l u - Z 2 5 - L e u - L y s - Z 2 8 ( I I a )

40

(ここで、

Z 9 は、G l u 及び A s p から選択され、

Z 1 3 は、G l n 及び T y r から選択され、

Z 1 4 は、M e t 及び L e u から選択され、

Z 1 6 は、G l u、C y s、及び L y s から選択され、

Z 2 5 は、L y s、P h e、C y s、及び T r p から選択され、

Z 2 8 は、A s n 及び A s p から選択されるか、又は存在しない) を有するペプチド配列であり、

L<sub>a</sub> が、上記した式 I b を有するペプチド配列であり、そして

50

$Y_a$ が、式I I c

Tyr - Gly - Trp - Y15 - Asp - Phe (I I c)

(ここで、Y15は、Leu及びThrから選択される)を有するペプチド配列であり、

ここで、式I I aのZ16位とZ25位のLys残基の少なくとも1つはさらに、親油性及び/又はビオチン性置換基に結合しているか、及び/又はpeg化されている、式Iのペプチドコンジュゲート、

又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物を提供する。

#### 【0017】

具体的な態様において本発明は、式：

H - HGE GTF TSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKN - 8Ado - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - 8Ado - YGWLD F - NH<sub>2</sub> (化合物1)、

H - HGE GTF TSDLSKQLEEEAVRLFIE - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - LKN - 8Ado - 8Ado - YGWLD F - NH<sub>2</sub> (化合物2)、

H - HGE GTF TSDLSKQLE - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - EAVRLFIEWLKN - 8Ado - 8Ado - YGWLD F - NH<sub>2</sub> (化合物3)、

H - HGE GTF TSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN - 8Ado - C (ビオチン - Mal) - 8Ado - YGWLD F - NH<sub>2</sub> (化合物4)、

H - HGE GTF TSDLSKQLEEEAVRLFIE - C (ビオチン - Mal) - LKN - 8Ado - 8Ado - YGWLD F - NH<sub>2</sub> (化合物5)、

H - HGE GTF TSDLSKQLE - C (ビオチン - Mal) - EAVRLFIEWLKN - 8Ado - 8Ado - YGWLD F - NH<sub>2</sub> (化合物6)、

H - HGE GTF TSELSKYLEEEAVRLFIE - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - LK - 8Ado - 8Ado - YGWLD F - NH<sub>2</sub> (化合物7)、

H - HGE GTF TSELSKYLEEEAVRLFIE - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - LK - 8Ado - QQYGWLD F - NH<sub>2</sub> (化合物8)、

を有するペプチドコンジュゲート、

又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物に関する。

#### 【0018】

他の態様において本発明は、式I I I

R<sup>1</sup> - Z<sub>b</sub> - L<sub>b</sub> - Y<sub>b</sub> - R<sup>2</sup> (I I I)

[式中、

R<sup>1</sup>は、H、C<sub>1-4</sub>アルキル、アセチル、ホルミル、ベンゾイル、又はトリフルオロアセチルであり、

R<sup>2</sup>は、OH又はNH<sub>2</sub>であり；そして

Z<sub>b</sub>は、式I I I a

His - Gly - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Glu - Leu - Ser - Lys - Tyr - Leu - Glu - Glu - Glu - Ala - Val - Arg - Leu - Phe - Ile - Glu - Z25 - Leu - Lys - Z28 (I I I a)

(ここで、

Z25は、Phe及びTrpから選択され、そして

Z28は、Asn及びAspから選択されるか、又は存在しない)

を有するペプチド配列であり、

L<sub>b</sub>は、式I I I b

L5 - L6 - L7 - L8 (I I I b)

(ここで、

L5は、8Ado、8Aoc、Ala、Gly、及びGlnから選択されるか、又は存在せず、

L6は、8Ado、8Aoc、Ala、Gly、及びGlnから選択されるか、又は存在せず、

10

20

30

40

50

L7は、8Ado、8Aoc、Ala、Gly、及びGlnから選択されるか、又は存在せず、

L8は、8Ado、8Aoc、Ala、Gly、及びGlnから選択されるか、又は存在しない)

を有するペプチド配列であり、

Y<sub>b</sub>は、式IIIIc

Y10 - Y11 - Tyr - Gly - Trp - Y15 - Asp - Phe (IIIIc)

(ここで、

Y10は、Gluであるか、又は存在せず、

Y11は、Alaであるか、又は存在せず、そして

Y15は、Leu及びThrから選択される)

を有するペプチド配列である]を有するペプチドコンジュゲート、

又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物を提供するが、

ただし、式IIIIは、

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLK - 8Ado - 8Ado - YGWLDF - NH<sub>2</sub> ;

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLKYGWLDF - NH<sub>2</sub>

;

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLK - 8Ado - YGWLDF - NH<sub>2</sub>ではない。

【0019】

さらなる態様において本発明は、

Z<sub>b</sub>が、式IVa

His - Gly - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Glu - Leu - Ser - Lys - Tyr - Leu - Glu - Glu - Glu - Ala - Val - Arg - Leu - Phe - Ile - Glu - Z25 - Leu - Lys - Asn (IVa)

(ここで、Z25は、Lys、Phe、及びTrpから選択される)を有するペプチド配列であり、

L<sub>b</sub>が、上記した式IIIIbを有するペプチド配列であり、

Y<sub>b</sub>が、式IVc

Tyr - Gly - Trp - Y15 - Asp - Phe (IVc)

(ここで、Y15は、Leu及びThrから選択される)を有するペプチド配列である、式IIIIのペプチドコンジュゲート、

又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物を提供する。

【0020】

具体的な態様において本発明は、式：

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLKQQYGWLDF - NH<sub>2</sub> (化合物9)、

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLKQQEAYGWLDF - NH<sub>2</sub> (化合物10)、

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLK - 8Ado - QQYGWLDF - NH<sub>2</sub> (化合物11)、

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLKDYGWLDF - NH<sub>2</sub> (化合物12)、

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLKAAAYGWLDF - NH<sub>2</sub> (化合物13)、

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLKGGGYGWLDF - NH<sub>2</sub> (化合物14)、

H - HGEGTFTSELSKYLEEEAVRLFIEFLK - 8Aoc - YGWLDF - NH<sub>2</sub> (化合物15)、



H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N Y G W L D F - N H  
 2 (化合物16)、  
 H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K A Y G W L D F - N H  
 2 (化合物17)、  
 H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N - 8 A d o - 8 A d  
 o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物18)、  
 H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K D - 8 A d o - 8 A d  
 o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物19)、  
 H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N Y G W T D F - N H  
 2 (化合物20)、  
 H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K D Y G W T D F - N H  
 2 (化合物21)、  
 H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E W L K N Y G W L D F - N H  
 2 (化合物22)、  
 H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E W L K D Y G W L D F - N H  
 2 (化合物23)、

を有するペプチドコンジュゲート、

又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物に関する。

#### 【0021】

具体的な態様において、本発明のペプチドコンジュゲートは、標準的合成方法により、  
 組換え発現系の使用により、又は他の任意の適切な方法により、製造することができる。  
 すなわちこのコンジュゲートは、例えば

(a) 標準的固相法又は液相法で、段階的にもしくは断片の組み立てにより、ペプチド  
 コンジュゲートを合成し、最終的にペプチドコンジュゲート生成物を単離し精製する工程

、  
 (b) ペプチドコンジュゲートをコードする核酸構築体を宿主細胞中で発現させ、発現  
 生成物を宿主細胞培養物から回収する工程、又は

(c) ペプチドコンジュゲートをコードする核酸構築体の無細胞インビトロ発現を行い  
 、抽出生成物を回収する工程、を含む方法、

又は(a)、(b)、もしくは(c)の方法の任意の組合せにより、ペプチドコンジュ  
 ゲートの断片を得て、次にこれらの断片をペプチドコンジュゲートに結合させ、ペプチド  
 コンジュゲートを回収する方法、を含む多くの方法により合成することができる。

#### 【0022】

本発明のさらなる態様には、糖尿病(1型及び/又は2型)及び種々の糖尿病関連症状  
 、疾患又は障害を含む種々の症状、疾患又は障害の治療法がある。これらの態様は、本発  
 明のペプチドコンジュゲート(遊離形態、又は医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の  
 形態)、並びに本発明のペプチドコンジュゲート又は医薬的に許容される塩もしくは溶媒  
 和物を含む医薬組成物の投与を含む。

#### 【0023】

ある態様において、本発明のペプチドコンジュゲートは、インスリン抵抗性、耐糖能異  
 常、糖尿病前症、メタボリック症候群、空腹時グルコースレベルの上昇、高血中グルコー  
 スレベルに関連する疾患状態、高血糖症、1型及び/又は2型糖尿病、糖尿病性神経障害  
 、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、腎不全、高血圧症及び/又は脂質異常症(又はこれら  
 の代謝及び心血管危険因子の組み合わせ)、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、大血  
 管疾患、微小血管疾患、冠動脈性心疾患、末梢動脈病、及び脳卒中の治療用の薬剤として  
 有用であり得る、これらはまた、病的肥満を含む、体重増加の防止、体重減少の促進、過  
 剰な体重の減少及び/又は肥満症の治療(食欲、食物摂取頻度、食物摂取量、カロリー摂  
 取、及び/又はエネルギー消費の調節により)、並びに、特に限定されないが、肥満関連  
 炎症、肥満関連胆嚢疾患、及び肥満誘発性睡眠時無呼吸を含む関連する疾患、障害、及び  
 健康状態の治療に有用であり得る。これらの条件下での本発明のペプチドコンジュゲート

10

20

30

40

50

の効果は、体重に対する効果を通して全体的又は部分的に媒介され得るか、又はこれとは独立していてもよい。

【0024】

本発明のさらなる態様には、糖尿病（1型及び／又は2型）及び種々の糖尿病関連症状、疾患又は障害を含む種々の症状、疾患又は障害の治療法がある。これらの態様は、本発明のペプチドコンジュゲート（遊離形態、又は医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の形態）、並びに本発明のペプチドコンジュゲート又は医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物を含む医薬組成物の投与を含む。

【0025】

ある態様において、本発明のペプチドコンジュゲートは、インスリン抵抗性、耐糖能異常、糖尿病前症、メタボリック症候群、空腹時グルコースレベルの上昇、高血中グルコースレベルに関連する疾患状態、高血糖症、1型及び／又は2型糖尿病、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、腎不全、高血圧症及び／又は脂質異常症（又はこれらの代謝及び心血管危険因子の組み合わせ）、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、大血管疾患、微小血管疾患、冠動脈性心疾患、末梢動脈病、及び脳卒中の治療用の薬剤として有用であり得る、これらはまた、病的肥満を含む、体重増加の防止、体重減少の促進、過剰な体重の減少及び／又は肥満症の治療（食欲、食物摂取頻度、食物摂取量、カロリー摂取、及び／又はエネルギー消費の調節により）、並びに、特に限定されないが、肥満関連炎症、肥満関連胆嚢疾患、及び肥満誘発性睡眠時無呼吸を含む関連する疾患、障害、及び健康状態の予防に有用であり得る。これらの条件下での本発明のペプチドコンジュゲートの効果は、体重に対する効果を通して全体的又は部分的に媒介され得るか、又はこれとは独立していてもよい。

【0026】

本発明のさらなる形態は、以下の開示から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】3週間処置後の空腹時血中グルコースレベル。db/dbマウスにおいて、ビヒクル、リラグルチド（100nmol/kg/日）、及び化合物18（30及び100nmol/kg/日）の1日1回のSC投与で3週間処置後の空腹時血中グルコースレベルに対する作用。データは、平均値とSEMで示される。統計：データは、1元配置ANOVA後、ビヒクル又はリラグルチドに対してボンフェローニMC検定により比較した：\*\*p<0.001対ビヒクル、##p<0.01対リラグルチド。

【図2】4週間処置後に1週間の休薬後の空腹時血中グルコースレベル。db/dbマウスにおいて、ビヒクル、リラグルチド（100nmol/kg/日）、及び化合物18（30及び100nmol/kg/日）の1日1回のSC投与で、4週間処置後に1週間の休薬（ビヒクル処置）後の空腹時血中グルコースレベルに対する作用。データは、平均値とSEMで示される。統計：データは、1元配置ANOVA後、ビヒクル又はリラグルチドに対してボンフェローニMC検定により比較した：\*\*p<0.01対ビヒクル、#p<0.05対リラグルチド。

【図3】3週間処置後のOGTT、AUC。db/dbマウスにおいて、ビヒクル、リラグルチド（100nmol/kg/日）、及び化合物18（30及び100nmol/kg/日）の1日1回のSC投与で、3週間処置後の耐糖能に対する作用。データは、曲線下の面積（AUC）とSEMで示される。統計：データは、1元配置ANOVA後、ビヒクル又はリラグルチドに対してボンフェローニMC検定により比較した：\*\*\*p<0.001対ビヒクル、###p<0.001対リラグルチド。

【図4】4週間処置+1週間休薬後のOGTT、AUC。db/dbマウスにおいて、ビヒクル、リラグルチド（100nmol/kg/日）、及び化合物18（30及び100nmol/kg/日）の1日1回のSC投与で、4週間処置後に1週間の休薬（ビヒクル処置）後の耐糖能に対する作用。データは、曲線下の面積（AUC）とSEMで示される。統計：データは、1元配置ANOVA後、ビヒクル又はリラグルチドに対してボンフェ

ローニMC検定により比較した：\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 対ビヒクル、### $p < 0.001$ 対リラグルチド。

【図5】4週間処置後のデルタ体重。db/dbマウスにおいて、ビヒクル、リラグルチド(100nmol/kg/日)、及び化合物18(30及び100nmol/kg/日)の1日1回のSC投与で、4週間処置後のデルタ(終了-開始)体重に対する作用。データは、平均値とSEMで示される。統計：データは、1元配置ANOVA後、ビヒクル又はリラグルチドに対してボンフェローニMC検定により比較した：\*\*\* $p < 0.001$ 対ビヒクル、## $p < 0.01$ 対リラグルチド。

【図6】5週間処置後の空腹時血中グルコースレベル。ZDFラットにおいて、ビヒクル、リラグルチド(2×40nmol/kg/日)、及び化合物18(2×10及び2×40nmol/kg/日)の1日2回のSC投与で、5週間処置後の空腹時血中グルコースレベルに対する作用。データは、平均とSEMで示される。統計：データは、1元配置ANOVA後、ビヒクル又はリラグルチドに対してボンフェローニMC検定により比較した：\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 対ビヒクル、### $p < 0.001$ 対リラグルチド。

【図7】5週間処置のOGTT、AUC。db/dbマウスにおいて、ビヒクル、リラグルチド(2×40nmol/kg/日)、及び化合物18(2×10及び2×40nmol/kg/日)の1日1回のSC投与で、5週間処置後の耐糖能に対する作用。データは、曲線下の面積(AUC)とSEMで示される。統計：データは、1元配置ANOVA後、ビヒクル又はリラグルチドに対してボンフェローニMC検定により比較した：\*\*\* $p < 0.001$ 対ビヒクル、### $p < 0.001$ 対リラグルチド。

【図8】6週間処置のHbA1cレベル。ZDFラットマウスにおいて、ビヒクル、リラグルチド(2×40nmol/kg/日)、及び化合物18(2×10及び2×40nmol/kg/日)の1日2回のSC投与で、6週間処置後のHbA1cレベルに対する作用。データは、平均値とSEMで示される。統計：データは、1元配置ANOVA後、ビヒクル又はリラグルチドに対してボンフェローニMC検定により比較した：\*\*\* $p < 0.001$ 対ビヒクル、# $p < 0.05$ 対リラグルチド。

【発明を実施するための形態】

【0028】

発明の詳細な説明

上記したように、本発明の1つの形態は以下の式を有するペプチドコンジュゲートに関する：

H-HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKN-8Ado-K(ヘキサデカノイル-イソGlu)-8Ado-YGWLDLF-NH<sub>2</sub>(化合物1)、

H-HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIE-K(ヘキサデカノイル-イソGlu)-LKN-8Ado-8Ado-YGWLDLF-NH<sub>2</sub>(化合物2)、

H-HGEGTFTSDLSKQLE-K(ヘキサデカノイル-イソGlu)-EAVRLFIEWLKN-8Ado-8Ado-YGWLDLF-NH<sub>2</sub>(化合物3)、

H-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-8Ado-C(ビオチン-Mal)-8Ado-YGWLDLF-NH<sub>2</sub>(化合物4)、

H-HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIE-C(ビオチン-Mal)-LKN-8Ado-8Ado-YGWLDLF-NH<sub>2</sub>(化合物5)、

H-HGEGTFTSDLSKQLE-C(ビオチン-Mal)-EAVRLFIEWLKN-8Ado-8Ado-YGWLDLF-NH<sub>2</sub>(化合物6)、

H-HGEGTFTSEL SKYLEEEAVRLFIE-K(ヘキサデカノイル-イソGlu)-LK-8Ado-8Ado-YGWLDLF-NH<sub>2</sub>(化合物7)、

H-HGEGTFTSEL SKYLEEEAVRLFIE-K(ヘキサデカノイル-イソGlu)-LK-8Ado-QQYGWLDLF-NH<sub>2</sub>(化合物8)。

【0029】

さらに本発明の別の形態において、本発明は以下の式を有するペプチドコンジュゲートに関する：

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K Q Q Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物9)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K Q Q E A Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物10)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K - 8 A d o - Q Q Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物11)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K D Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物12)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K A A A Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物13)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K G G G Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物14)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K - 8 A o c - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物15)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物16)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K A Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物17)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N - 8 A d o - 8 A d o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物18)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K D - 8 A d o - 8 A d o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物19)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N Y G W T D F - N H<sub>2</sub> (化合物20)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K D Y G W T D F - N H<sub>2</sub> (化合物21)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E W L K N Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物22)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E W L K D Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物23)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K E A Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物24)。

# 【0030】

さらに本発明の別の形態において、本発明は以下の式を有するペプチドコンジュゲートに関する：

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物25)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物26)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E - (ヘキサデカノイル - イソGlu) - E A V R L F I E F L N Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物27)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - E A V R L F I E F L K N W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物28)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物29)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物30)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - E A V R L F I E F L K Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物31)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - E A V

10

20

30

40

50

R L F I E F L K W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 32)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - L K - 8 A d o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 33)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - L K Q Q Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 34)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - L K - O r n - O r n - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 35)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - L K N Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 36)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E - K (ヘキサデカノイル - イソGlu) - L K D Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 37)。

10

#### 【0031】

さらに本発明の別の形態において、本発明は以下の式を有するペプチドコンジュゲート：

H - H G E G T F T S D L S K Q L E E E A V R L F I E C ( P E G 5 K ) L K N - 8 A d o - 8 A d o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 38)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E C ( P E G 10 K ) L K - 8 A d o - 8 A d o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 39)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E C ( P E G 20 K ) L K - 8 A d o - 8 A d o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 40)、

20

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E C ( P E G 40 K ) L K - 8 A d o - 8 A d o - Y G W L D F - N H<sub>2</sub> (化合物 41)、

H - H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N Y G W T D F - O H (化合物 42)、

H - H G E G T F T S E L S K Y L E E E A V R L F I E F L K N - 8 A d o - 8 A d o - Y G W T D F - N H<sub>2</sub> (化合物 43)、

又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物に関する。

#### 【0032】

略語 8 A d o、8 A o c、ヘキサデカノイル、イソGlu、Orn、及びビオチン - M a l は、それぞれ以下の天然には存在しないアミノ酸成分を示す：

30

8 A d o (又はPeg3)：- N H - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C ( O ) - ( 8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸から誘導される)；

8 A o c：- N H - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - C ( O ) - ( 8 - アミノオクタン酸から誘導される)；

ヘキサデカノイル：C H<sub>3</sub> - ( C H<sub>2</sub> )<sub>14</sub> - C ( O ) - ；

イソGlu：- N H - C H ( C O O H ) - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - C ( O ) - ；

O r n：オルニチン；及び

ビオチン - M a l：ビオチン - マレイミド。

#### 【0033】

本発明のペプチドコンジュゲート中のリンカー成分の配向について、例えばリンカー成分 - 8 A d o - 8 A d o - は、化学成分

40

- N H - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C ( O ) - N H - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - C ( O ) -

を示し、問題のリンカー成分の末端の - N H - ... 成分は、問題のペプチドコンジュゲートのG L P - 1 アゴニスト (例えばエキセンジン - 4 由来) 成分に共有結合しており、問題のリンカー成分の右にある ... - C ( O ) - 成分は、問題のペプチドコンジュゲートのガストリン由来成分に結合している。

#### 【0034】

上記した本発明のペプチドコンジュゲートにおいて、エキセンジン - 4 ( 1 ~ 28 ) ペプチド配列成分は、ヘロデルマ・サスペクツム (Heloderma suspectum) エキセンジン -

50

4 配列の配列から誘導されるか、又はその類似体である。

【 0 0 3 5 】

本発明の文脈において用語「エキセンジン - 4 類似体」は、本来のエキセンジン - 4 配列の置換、末端切断、欠失、付加、又は結合から誘導されるペプチド配列として定義される。これは、特に限定されないが、本発明の置換物を含む。

【 0 0 3 6 】

同様に、コンジュゲート中の [ L e u 4 ] ガストリン 6 成分は、ヒトガストリンから合成的に得られる。

また同様に、コンジュゲート中の [ L e u 1 5 ] ガストリン 1 7 成分は、ヒトガストリンから合成的に得られる。

【 0 0 3 7 】

上記ペプチドコンジュゲート 1 ~ 4 1 の各 1 つ、すなわち化合物 1 又は化合物 2 又は化合物 3 ・ ・ ・ ( など、化合物 4 1 まで ) 又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物は、本発明のさらなる各形態を構成する。

【 0 0 3 8 】

本発明の文脈において、アミノ酸がその完全な名前 ( 例えば、アラニン、アルギニンなど ) で言及されない場合は、これらは、その常用の 3 文字及び / 又は 1 文字略語 ( 例えば、アラニンについては A l a 又は A、アルギニンについては A r g 又は R など ) で示される。

【 0 0 3 9 】

本発明の文脈において、用語「ペプチドコンジュゲート」は、第 1 のペプチド成分が、直接、又は結合性 ( すなわち、ブリッジ式又はスペース式 ) 化学成分を介して、又は共有化学結合により、第 2 のペプチド成分への結合されている分子を指す。

【 0 0 4 0 】

本発明のペプチドコンジュゲートにおいて、エキセンジン - 4 又は Z ( Z<sub>a</sub> 又は Z<sub>b</sub> ) は、本来のエキ・サスペクツム ( H. suspectum ) エキセンジン - 4 と少なくとも 7 5 % の同一性、例えば、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の同一性を有してもよい。

【 0 0 4 1 】

本発明のペプチドコンジュゲートにおいて、ガストリン又は Y ( Y<sub>a</sub> 又は Y<sub>b</sub> ) は、本来のヒトガストリン 1 7 及び / 又はガストリン 6 と少なくとも 7 0 % の同一性、例えば、可能な場合は、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 3 %、8 5 %、9 0 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の同一性を有してもよい。

【 0 0 4 2 】

ある態様において本発明のポリペプチドは、可能な場合は、上記した配列の 1 つ又はそれ以上と少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 9 9 . 5 % 同一である、化合物番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、及び 4 1 のいずれか 1 つに示したアミノ酸配列又はその機能性断片もしくは変種を含んでよい。アミノ酸置換は、例えば保存的置換でもよい。

【 0 0 4 3 】

本明細書において用語「保存的置換」は、1 つ又はそれ以上のアミノ酸が別の生物学的に類似した残基により置換されることを示す。例には、例えば小アミノ酸、酸性アミノ酸、極性アミノ酸、塩基性アミノ酸、疎水性アミノ酸、及び芳香族アミノ酸などの、同様の特性を有するアミノ酸残基の置換がある。例えば、本発明の好適な態様において、M e t 残基は、M e t のバイオイソスター ( bioisostere ) であるが、M e t とは反対に容易に酸化はされないノルロイシン ( N l e ) で置換される。内因性の哺乳動物ペプチドやタンパク質中には通常見出されない残基による保存的置換の別の例は、例えばオルニチン、カナバニン、アミノエチルシステイン、又は他の塩基性アミノ酸による A r g 又は l y s の

10

20

30

40

50

保存的置換であろう。ペプチドやタンパク質中の表現型的にサイレントな置換に関するさらなる情報については、Bowie et.al. Science 247, 1306-1310, 1990. Conservative substitutions of amino acids grouped by physicochemical properties. I: neutral, hydrophilic, II: acids and amides, III: basic, IV: hydrophobic, V: aromatic, bulky amino acidsを参照されたい。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

I	II	III	IV	V
A	N	H	M	F
S	D	R	L	Y
T	E	K	I	W
P	Q		V	
G			C	

10

【 0 0 4 5 】

ある態様において本発明のポリペプチドは、記載の配列の 1 つ又はそれ以上と比較して、多くても 20、15、10、9、8、7、6、4、3、2、又は 1 つのアミノ酸置換を有する機能性断片又はその変種を含んでよい。本発明のポリペプチドはさらに、シグナル配列有りでも無しでもよい。

20

ある態様において本発明のポリペプチドの 1 つ又はそれ以上のシステインは、他の残基（例えばセリン）で置換されてもよい。

【 0 0 4 6 】

ある態様において本発明のポリペプチドは、化合物番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、及び 41 のいずれか 1 つに示したアミノ酸配列と、少なくとも 99 % のアミノ酸配列同一性を共有する。

【 0 0 4 7 】

本発明の文脈において用語「医薬的に許容される塩」（本発明のペプチドコンジュゲートの医薬的に許容される塩）は、問題の塩が投与される患者又は対象者に対して有害ではない塩を示すことを意図する。これは適切には、酸付加塩及び塩基性塩から選択される塩でもよい。酸付加塩の例は、塩化物塩、クエン酸塩、及び酢酸塩を含む。塩基性塩の例は、カチオンがアルカリ金属カチオン（例えば、ナトリウム又はカリウムイオン）、アルカリ土類金属カチオン（例えば、カルシウム又はマグネシウムイオン）、並びに置換アンモニウムイオン [ 例えば  $N(R^1)(R^2)(R^3)(R^4)^+$  (ここで、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、及び  $R^4$  は独立に、典型的には水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、又は任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルであろう) ] から選択される。関連する  $C_{1-6}$ -アルキル基の例は、メチル、エチル、1-プロピル、及び 2-プロピル基を含む。関連する可能性のある  $C_{2-6}$ -アルケニル基の例は、エテニル、1-プロペニル、及び 2-プロペニルを含む。医薬的に許容される塩の他の例は、"Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (及び、より最近の版)、"Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology", 3rd edition, James Swarbrick (Ed.) Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007、及び J. Pharm. Sci. 66: 2 (1977) に記載されている。

30

40

【 0 0 4 8 】

本発明の文脈において用語「溶媒和物」は、溶質（念のため、本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩）と溶媒との間で形成された一定の化学量論の複合体を指す。この点で溶媒は、例えば、水、エタノール、又は別の医薬的に許容される塩

50

、典型的には小分子有機分子種、例えば、特に限定されないが、酢酸又は乳酸でもよい。問題の溶媒が水である時、このような溶媒和物は通常水和物と言われる。

【 0 0 4 9 】

本発明のいくつかの態様は、医薬として使用するための、又はその製造もしくは調製のための、本発明のペプチドコンジュゲートもしくはその医薬的に許容される塩、又は種々の疾患もしくは症状、例えば

1型糖尿病、2型糖尿病、糖尿病前症、インスリン抵抗性症候群、耐糖能障害（IGT）、高血中グルコースレベルに関連する疾患状態、高血糖、高血圧、アテローム発生性脂質異常症、動脈硬化症（例えば、アテローム性動脈硬化症）、大血管疾患、冠状動脈性心臓疾患、末梢動脈疾患、脳卒中、微小血管疾患、胃疾患、メタボリック症候群、癌（例えば結腸癌）、炎症性腸疾患（IBD）、過敏性腸症候群（IBS）、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、及び腎不全、

を治療又は予防するための方法における、その使用に関する。

【 0 0 5 0 】

この点に関連する可能性のあるさらなる疾患又は障害は、肥満、病的肥満、肥満関連炎症、肥満関連胆嚢疾患、及び肥満誘発性睡眠時無呼吸を含む。

いくつかの態様において、本発明の医薬は、その必要がある対象者の治療に使用するための医薬である。

【 0 0 5 1 】

さらなる形態において、本発明の医薬は、その必要がある対象者において、膵島新生（膵臓の膵島における新たな - 細胞の形成を促進するための）を誘導するための医薬である。

さらなる形態において、本発明の医薬は、その必要がある対象者において、膵島中の - 細胞の生存（例えば、膵島における - 細胞の損失を防止するための）を誘導するための医薬である。

【 0 0 5 2 】

さらなる態様において、本発明の医薬は、その必要がある対象者において、膵島における - 細胞の増殖（例えば、膵島中の既存の - 細胞の増殖を促進する）を誘導するための医薬である。

さらなる態様において、本発明の医薬は、その必要がある対象者において、上記のプロセス（すなわち膵島新生、膵島における - 細胞の生存、及び / 又は膵島中の - 細胞の増殖）の任意の組合せを誘導するための医薬である。

【 0 0 5 3 】

医薬が、その必要がある対象者の膵島 - 細胞の生存率を改善するために使用される、態様請求項 39 のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の使用。

【 0 0 5 4 】

さらに別の態様において、本発明の医薬は、その必要がある対象者において、膵島中の - 細胞のアポトーシス及び / 又は壊死を防ぐ（例えば、膵島中の - 細胞の喪失を防ぐ）のに使用するための医薬である。

【 0 0 5 5 】

さらなる態様において、本発明の医薬は、その必要がある対象者において、血中のヘモグロビン b 1 A c（グリコシル化ヘモグロビン；Hb A 1 c）レベルを低下させるのに使用するための医薬である。

【 0 0 5 6 】

本発明のさらなる形態は、その必要がある対象者において、本明細書に開示された症状の 1 つ又はそれ以上の治療用の医薬の製造又は調製における、本発明のペプチドコンジュゲートの使用に関する。

【 0 0 5 7 】

本発明のペプチドコンジュゲートはさらに、

10

20

30

40

50



その必要がある対象者において膵島の新生を誘導するための医薬の製造、  
その必要がある対象者において膵島中の - 細胞のアポトーシスを防止するための医薬の製造、  
その必要がある対象者において膵島中の - 細胞の生存を誘導するのに使用するための医薬の製造、  
その必要がある対象者において膵臓の - 細胞増殖を誘導するための医薬の製造、  
その必要がある対象者の血中のヘモグロビン b 1 A c ( グリコシル化ヘモグロビン ; H b A 1 c ) レベルを低下させるための医薬の製造、  
及び / 又はこれらの任意の組合せ、において、さらに使用し得る。

【 0 0 5 8 】

10

本発明の関連する追加の形態の 1 つは、本明細書に開示された症状、疾患又は障害の対応する治療法である。すなわち、本発明の 1 つのこのような追加の形態は、その必要がある対象者において、本明細書に開示された症状、疾患又は障害の 1 つ又はそれ以上の治療法であって、

本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の治療的有効量をその対象者に投与することを含む方法に関する。

【 0 0 5 9 】

本発明のさらなる態様は、その必要がある対象者において膵島の新生を誘導するための方法であって、本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の治療的有効量をその対象者に投与することを含む方法に関する。

20

【 0 0 6 0 】

本発明の追加の態様は、その必要がある対象者において膵島中の - 細胞生存を促進する方法であって、本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の治療的有効量をその対象者に投与することを含む方法に関する。

【 0 0 6 1 】

本発明の追加の態様は、その必要がある対象者において膵島中の - 細胞のアポトーシス及び / 又は壊死を低下させるか又は防止するための方法であって、本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の治療的有効量をその対象者に投与することを含む方法に関する。

【 0 0 6 2 】

30

本発明の追加の態様は、その必要がある対象者において膵島中の - 細胞の増殖を誘導するための方法であって、本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の治療的有効量をその対象者に投与することを含む方法に関する。

【 0 0 6 3 】

本発明の追加の態様は、上記プロセス ( すなわち膵島新生、膵島中の - 細胞の生存、及び / 又は膵島中の - 細胞の増殖 ) の任意の組合せを誘導するための方法であって、本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の治療的有効量をその対象者に投与することを含む方法に関する。

【 0 0 6 4 】

本発明の他の態様は、その必要がある対象者の血中のヘモグロビン b 1 A c ( グリコシル化ヘモグロビン ; H b A 1 c ) レベルを低下させるための方法であって、本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の治療的有効量をその対象者に投与することを含む方法に関する。

40

【 0 0 6 5 】

本発明のさらに追加の態様は、以下に関する：  
その必要がある対象者において、高血中グルコースレベルに関連する疾患状態の治療法、  
その必要がある対象者において、血中グルコースレベルを低下させる方法、  
その必要がある対象者において、インスリン放出を刺激する方法、  
その必要がある対象者において、胃内容排出を調節する方法、及び

50

その必要がある対象者において、血漿脂質レベルを低下させる方法、  
その必要がある対象者において、血圧を低下させる方法、  
その必要がある対象者において、体重を低下させる方法。

【0066】

本発明の後者の方法の各々において、方法は、本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の治療的有効量をその対象者に投与することを含む。

【0067】

本発明の治療又は他の治療的介入の上記方法の文脈で使用される用語「治療的有効量」は、例えば確立された臨床的終点又は他のバイオマーカー（確立された又は実験的）により測定されるような、問題の治療又は他の治療的介入の対象である、具体的な疾患、障害、又は状態の臨床症状を治療、改善、緩和、又は部分的に阻止するのに十分な量を指す。治療に関連する量は、治療又は予防されている適応症とこの治療に関連する量が投与されている対象者に基づいて、当業者により経験的に決定されてもよい。例えば、熟練作業者は、本明細書に記載の生物活性の臨床に関連する指標の1つ又はそれ以上（例えば、血中グルコースレベル、インスリン放出、及び血漿脂質レベル）を測定することができる。熟練作業者は、インビトロ又はインビボ測定により、臨床に関連する量を決定することができる。他の測定例は、体重増加、体重減少、及び血圧変化を含む。

【0068】

これらの作用のいずれか又はすべてを実現するのに十分な量は、治療的有効量として定義される。投与された量及び投与方法は、最適な有効性を達成するように改変することができる。ある目的に有効な量は、特に、具体的な治療又は他の治療的介入の対象である疾患、障害、又は症状の重症度に、問題の対象者の体重及び全身状態に、食事に、可能性のある同時投与薬物に、及び医学分野の当業者に公知の他の要因に、依存するであろう。ヒトへの本発明のペプチドコンジュゲート又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の投与に最も適した適切な用量サイズ及び投与処方、本発明により得られる結果に支配され、正しく計画された臨床試験で確認することができる。有効な投与量と治療プロトコールは、実験動物での低用量から開始して、次に作用を追跡しながら投与量を増加させて、また投与処方を全身性に変化させる、通常方法により決定してもよい。ある対象者について、最適な投与量を決定する時は、臨床家により、多くの要因を考慮することができる。このような考慮事項は、当業者に公知である。

【0069】

本文脈において使用される用語「治療」及びその文法的変形（例えば、「治療される」、「治療する」）は、有効な又は所望の臨床的結果を得るためのアプローチを指す。本発明の目的において、有効な又は所望の臨床的結果は、特に限定されないが、検出可能でも検出不可能でも、症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患状態の安定化（すなわち、悪化はしていない）、疾患の進行の遅延又は減速、疾患状態の改善又は軽減、及び緩解（部分的又は全身的）を含む。「治療」はまた、たとえ治療を受けていなくても、予測される生存期間に対して、生存を延長させることを意味することでもある。すなわち治療の必要がある対象者は、問題の疾患又は障害にすでに罹患している対象者のこともある。用語「治療」は、治療の無い場合と比較して、病的状態又は症状の重症度の上昇（例えば、体重増加又は高血糖）の阻害又は低減を含み、必ずしも、関連する疾患、障害、又は症状の完全な停止を意味するものではない。

【0070】

本文脈において使用される用語「予防する」及びその文法的変形（例えば、「予防される」、「予防している」、「予防する」）は、症状、疾患又は障害の出現を防ぐための、又はその病態を変更するためのアプローチを指す。従って「予防」は、予防的又は防止的措置を指してもよい。本発明の目的において、有効な又は所望の臨床的結果は、特に限定されないが、検出可能でも検出不可能でも、疾患の症状、進行、又は発症の予防又は減速を含む。従って予防の必要な対象者（例えば、ヒト）は、まだ問題の疾患又は障害に罹患

していない対象者のこともある。従って用語「予防」は、治療の無い場合と比較して、疾患の発症を遅らせることを含み、必ずしも、関連する疾患、障害、又は症状の永続的な予防を意味するものではない。

【0071】

本発明の文脈で使用される用語「アゴニスト」は、問題の受容体タイプを活性化する物質（リガンド）を指す。

【0072】

本発明の文脈で使用される用語「GLP-1受容体アゴニスト」（時に「GLP-1アゴニスト」と呼ばれる）は、ヒトGLP-1受容体などのGLP-1受容体を活性化する物質（リガンド）を指す。ヒトGLP-1受容体を活性化する物質は、本来のGLP-1ペプチドホルモンであるGLP-1（7～37）、GLP-1（7～36）アミド、オキシントモジュリン、エキセナジン-3、エキセナジン-4、グルカゴン、胃阻害性ポリペプチド（GIP）、及びこれらの機能性ペプチド類似体と誘導体を含む。

【0073】

本発明の文脈で使用される用語「アンタゴニスト」は、問題の受容体タイプに対してアゴニストとして機能する別の物質（リガンド）の作用を阻止、中和、又は妨害する物質（リガンド）を指す。

【0074】

本発明のある態様において、上記した本発明の種々の形態に関連して言及される具体的な治療又は他の治療的介入の必要がある対象者は、哺乳動物である。さらなる態様において、哺乳動物はヒトである。

【0075】

本発明の追加の態様は、本発明のペプチドコンジュゲート、又はその医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物を、医薬的に許容し得る担体、賦形剤、又はビヒクルとともに含む医薬組成物に関する。

【0076】

ペプチドコンジュゲートの合成

本発明のペプチドコンジュゲートは、標準的合成法により、組換え発現系の使用により、又は他の任意の適切な方法により、製造することができる。すなわち、このコンジュゲートは、例えば

（a）標準的な固相法又は液相法により、段階的に又は断片の組み立てにより、ペプチドコンジュゲートを合成し、最終ペプチドコンジュゲート生成物を単離し精製する方法、

（b）ペプチドコンジュゲートをコードする核酸構築体を宿主細胞中で発現させ、宿主細胞培養物から発現生成物を回収する方法、又は

（c）ペプチドコンジュゲートをコードする核酸構築体の無細胞インビトロ発現を行い、発現生成物を回収する方法、

を含む方法、

又は、（a）、（b）、又は（c）の方法の任意の組合せによりペプチドコンジュゲートの断片を得て、次にこれらの断片を連結してペプチドコンジュゲートを得て、ペプチドコンジュゲートを回収する方法、を含む多くの方法により合成することができる。

【0077】

固相又は液相ペプチド合成により、本発明のコンジュゲートを合成することが好適となり得る。この文脈において、WO 98 / 11125、特に、Fields, G.B. et al., "Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis"のSynthetic Peptides中、Gregory A. Grant (Ed.), Oxford University Press（第2版、2002年）、及びその中の合成例を参照してもよい。

【0078】

本発明の化合物中のアミノ酸側鎖の1つ又はそれ以上は、親油性置換基にさらに結合されてもよい。親油性置換基は、アミノ酸側鎖中の原子に共有結合されてもよく、あるいはスペーサーによりアミノ酸側鎖に結合されてもよい。アミノ酸は、ペプチドZの一部でも

ペプチドLの一部でもよい。

【0079】

理論に拘束されるつもりはないが、親油性置換基は血流中でアルブミンに結合し、こうして、本発明の化合物を酵素分解から保護し、これは化合物の半減期を延長させると考えられる。存在する時はスペーサーは、化合物と親油性置換基との間にスペースを提供し得る。

【0080】

親油性置換基は、エステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド、又はスルホンアミドを介して、アミノ酸側鎖又はスペーサーに結合することができる。従って、ある態様において、親油性置換基は、エステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド、又はスルホンアミドの一部を形成するアシル基、スルホニル基、N原子、O原子、又はS原子を含むことは理解されるであろう。

10

【0081】

好ましくは親油性置換基中のアシル基は、アミノ酸側鎖又はスペーサーとともにアミド又はエステルの一部を構成する。

【0082】

親油性置換基は、4～30個のC原子、例えば少なくとも8又は12個のC原子、及び好ましくは24個のC原子もしくはそれ以下、又は20個のC原子もしくはそれ以下を有する炭化水素鎖を含んでよい。炭化水素鎖は直鎖又は分岐してもよく、飽和又は不飽和でもよい。炭化水素鎖は、好ましくはアミノ酸側鎖又はスペーサーへの結合の一部を形成する成分、例えばアシル基、スルホニル基、N原子、O原子、又はS原子で置換されることは理解されるであろう。最も好ましくは炭化水素鎖はアシル基で置換され、従って炭化水素鎖は、アルカノイル基、例えばパルミトイル、カプロイル、ラウロイル、ミリストイル、又はステロイルの一部でもよい。

20

【0083】

従って、親油性置換基は以下に示す式を有してもよい：

【0084】

【化1】



30

【0085】

Aは、例えばアシル基、スルホニル基、NH、N-アルキル、O原子、又はS原子、好ましくはアシルでもよい。nは3～29の整数である。ある態様において、nは少なくとも7であるか又は少なくとも11である。ある態様において、nは23又はそれ以下である。ある態様において、nは19又はそれ以下である。

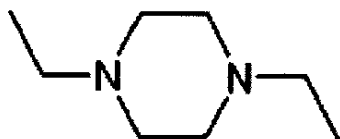
【0086】

炭化水素鎖は、さらに置換されてよい。例えばこれは、NH<sub>2</sub>、OH、及びCOOHから選択される最大3個の置換基でさらに置換されてよい。炭化水素鎖がさらに置換される場合、これは好ましくは、1つのみの置換基でさらに置換される。あるいは又はさらに、炭化水素鎖は、例えば以下に示すようにシクロアルカン又はヘテロシクロアルカンを含んでよい。

40

【0087】

## 【化 2】



## 【 0 0 8 8 】

ある態様において、シクロアルカン又はヘテロシクロアルカンは 6 員環である。ある好適な態様において、これはピペリジンである。

10

## 【 0 0 8 9 】

あるいは親油性置換基は、シクロペンタノフェナトレン骨格に基づき、これは部分的又は完全に不飽和又は飽和されてよい。この骨格中の炭素原子は、Me 又は OH で置換されてよい。例えば、親油性置換基は、コリル、デオキシコリル、又はリトコリルでもよい。

## 【 0 0 9 0 】

上記したように、親油性置換基は、スペーサーによりアミノ酸側鎖に結合してもよい。存在する場合、スペーサーは親油性置換基及びアミノ酸側鎖に結合される。スペーサーは、独立にエステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド、又はスルホンアミドにより、親油性置換基及びアミノ酸側鎖に結合されてよい。従って、これは、アシル、スルホニル、N 原子、O 原子、又は S 原子から独立に選択される 2 つの成分を含んでよい。スペーサーは以下の式を有してもよい：

20

## 【 0 0 9 1 】

## 【化 3】



30

## 【 0 0 9 2 】

(式中、B と D はそれぞれ、アシル、スルホニル、NH、N - アルキル、O 原子、又は S 原子から独立に選択され、好ましくはアシル及び NH から選択される。好ましくは、n は 1 ~ 10 の整数、例えば 1 ~ 5 の整数である。スペーサーは任意選択的に、C<sub>1-6</sub> アルキル、C<sub>1-6</sub> アルキルアミン、C<sub>1-6</sub> アルキルヒドロキシ、及び C<sub>1-6</sub> アルキルカルボキシから選択される 1 つ又はそれ以上の置換基でさらに置換されてよい。

## 【 0 0 9 3 】

あるいは、スペーサーは、上記式の 2 つ又はそれ以上の繰り返し単位を有してもよい。B、D、及び n は、それぞれ各繰り返し単位から独立に選択される。隣接する繰り返し単位は、各 B 及び D 成分を介して互いに共有結合され得る。例えば、隣接繰り返し単位の B 及び D 成分は一緒に、エステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド、又はスルホンアミドを形成することができる。スペーサーの各末端の遊離の B 及び D 単位は、上記したようにアミノ酸側鎖及び親油性置換基に結合される。

40

## 【 0 0 9 4 】

好ましくはスペーサーは、5 又はそれ以下、4 又はそれ以下、又は 3 又はそれ以下の繰り返し単位を有する。最も好ましくはスペーサーは、2 つの繰り返し単位を有するか、又は単一の単位である。

## 【 0 0 9 5 】

スペーサー (又は、繰り返し単位を有する場合は、スペーサーの 1 つ又はそれ以上の繰り返し単位) は、例えば天然の又は非天然のアミノ酸でもよい。官能化側鎖を有するアミ

50

ノ酸について、B及びノ又はDは、アミノ酸の側鎖内の成分でもよい。スペーサーは、任意の天然に存在する又は非天然のアミノ酸でもよい。例えば、スペーサー（又は、繰り返し単位を有する場合は、スペーサーの1つ又はそれ以上の繰り返し単位）は、Gly、Pro、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Cys、Phe、Tyr、Trp、His、Lys、Arg、Gln、Asn、 $\gamma$ -Glu、 $\epsilon$ -Glu、Asp、Ser、Thr、GABA、Aib、bAla、5-アミノペンタノイル、6-アミノヘキサノイル、7-アミノヘプタノイル、8-アミノオクタノイル、9-アミノノナノイル、又は10-アミノデカノイルでもよい。

【 0 0 9 6 】

例えば、スペーサーは、 $\alpha$ -Glu、Gaba、 $\gamma$ -Ala、及び Gly から選択される単一のアミノ酸でもよい。

【 0 0 9 7 】

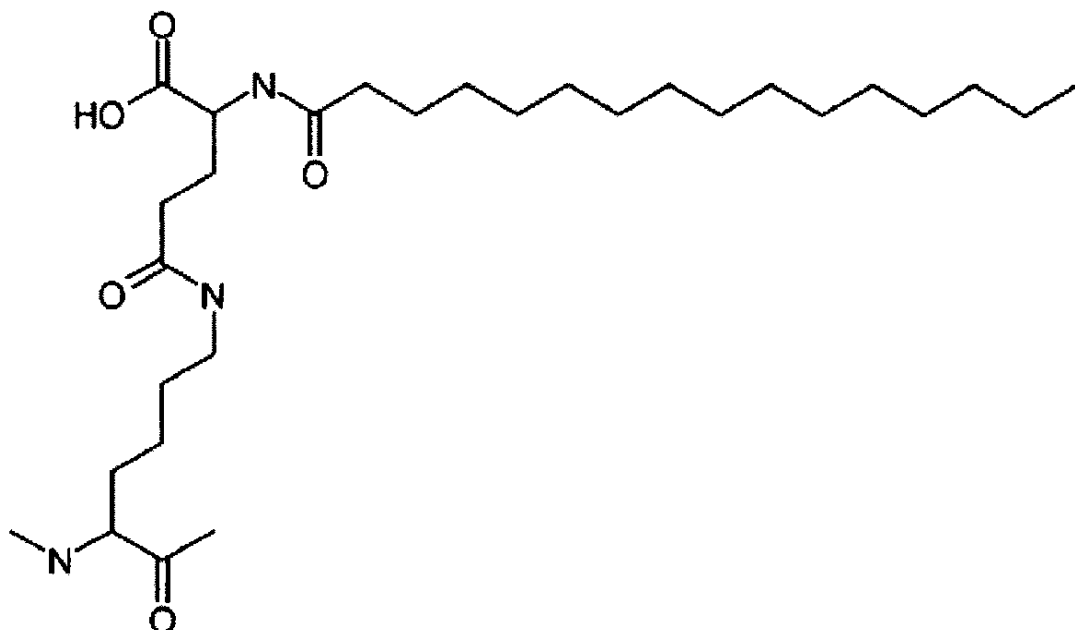
親油性置換基は、本発明の化合物中で任意のアミノ酸側鎖に結合することができる。好ましくはアミノ酸側鎖は、スペーサー又は親油性置換基とともに、エステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド、又はスルホンアミドを形成するために、カルボキシ、ヒドロキシ、チオール、アミド、又はアミン基を含む。例えば、親油性置換基は、Asn、Asp、Glu、Gln、His、Lys、Arg、Ser、Thr、Tyr、Trp、Cys又はDbu、Dpr又はOrnに結合されてよい。好ましくは親油性置換基は、Lys又はCysに結合されてよい。しかし、本明細書に提供された式中でLysとして示された任意のアミノ酸は、親油性置換基が加えられる場合、Dbu、Dpr、又はOrnにより置換されてよい。

【 0 0 9 8 】

親油性置換基とスペーサーの例は、以下の式で示される。

【 0 0 9 9 】

【化 4】



【 0 1 0 0 】

ここで、本発明の化合物からの（例えばXからの）Lysは、アミド成分を介して - Glu（スペーサー）に共有結合される。パルミトイルは、アミド成分を介して - Gluに共有結合される。

【 0 1 0 1 】

あるいは又はさらに、本発明の化合物中の１つ又はそれ以上のアミノ酸側鎖は、ビオチン性置換基にさらに結合されてよい。ビオチン性置換基は、アミノ酸側鎖中の原子に結合されるか、又はスペーサーによりアミノ酸側鎖に共有結合されてよい。アミノ酸は、ペプチドZの一部又はペプチドLの一部でもよい。

【0102】

理論に拘束されるつもりはないが、ビオチン性置換基は血流中でアルブミンに結合し、こうして本発明の化合物を酵素分解から保護し、これが本化合物の半減期を延長することができると考えられる。スペーサー（存在する時）は、本化合物とビオチン性置換基との間にスペースを提供するために使用される。

【0103】

ビオチン性置換基は、マレイミドエステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド、又はスルホンアミドを介して、アミノ酸側鎖又はスペーサーに結合され得る。従って、好ましくはビオチン性置換基は、エステル、スルホニルエステル、チオエステル、アミド、又はスルホンアミドを形成する、マレイミド基、アシル基、スルホニル基、N原子、O原子、又はS原子を含む、ことが理解されるであろう。

【0104】

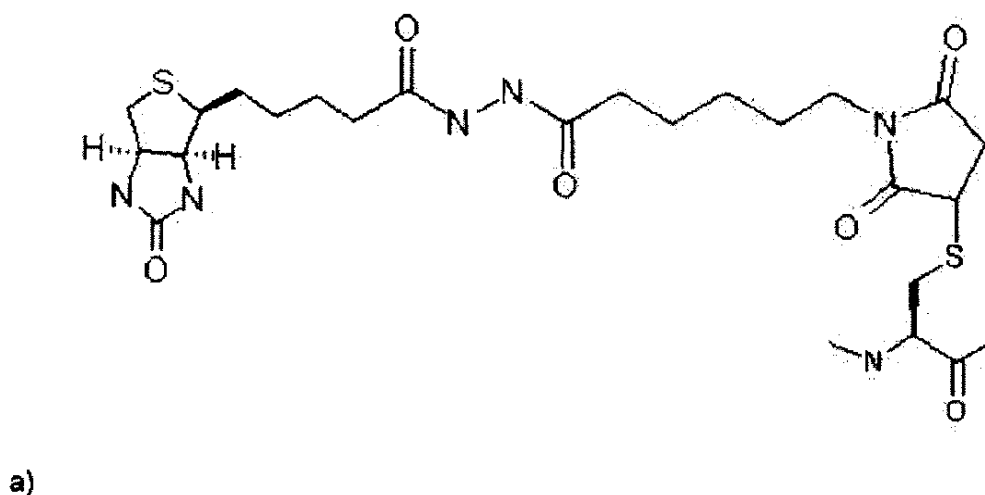
好適な態様において、スペーサーがペプチドに結合される前に、まずビオチン成分がスペーサーに結合される。リジン又はシステインの側鎖への結合を可能にするであろうスペーサー官能基を有する多くのビオチン-スペーサーコンジュゲートが市販されている。より好適な態様において、ビオチン-スペーサーコンジュゲートは、システイン側鎖上のスルフヒドリル基に選択的に結合できるマレイミド官能基を含有する。

【0105】

本発明に従って使用し得るビオチン性置換基の例は、以下を含む。

【0106】

【化5】



【0107】

ビオチンは、ビタミンH又は補酵素Rとして知られており、水溶性B複合体ビタミン（ビタミンB7）である。これは、ある薬物の経口摂取を上昇させることが証明されている。

【0108】

あるいは又はさらに、本発明の化合物中の１つ又はそれ以上のアミノ酸側鎖は、溶解度及び/又はインビボの半減期（例えば、血漿中）及び/又はバイオアベイラビリティを上昇させるために、ポリマー成分に結合してもよい。このような修飾はまた、治療的タンパ

ク質及びペプチドのクリアランス（例えば、腎クリアランス）を低下させることも知られている。

【0109】

ポリマー成分は、好ましくは水溶性（両新媒性又は親水性）、非毒性、及び薬理学的に不活性である。適切なポリマー成分は、ポリエチレングリコール（PEG）、PEGのホモポリマー又はコポリマー、PEGのモノメチル置換ポリマー（mPEG）、又はポリオキシエチレングリセロール（POG）を含む。例えば、Int. J. Hematology 68: 1 (1998); Bioconjugate Chem. 6: 150 (1995); 及び Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys. 9:249 (1992)を参照されたい。

【0110】

他の適切なポリマー成分は、ポリリジン、ポリアスパラギン酸、及びポリグルタミン酸などのポリアミノ酸を含む（例えば、Gombotz, et al. (1995), Bioconjugate Chem., vol. 6: 332-351; Hudecz, et al. (1992), Bioconjugate Chem., vol. 3: 49-57; Tsukada, et al. (1984), J. Natl. Cancer Inst., vol 73: 721-729; 及び Pratesi, et al. (1985), Br. J. Cancer, vol. 52: 841-848 を参照されたい。

【0111】

ポリマー成分は、直鎖であるか又は分岐していてもよい。これは、500～40,000 Da、例えば500～10,000 Da、1000～5000 Da、10,000～20,000 Da、又は20,000～40,000 Daの分子量を有してもよい。

【0112】

本発明の化合物は、2つ又はそれ以上のこのような成分を含んでよく、この場合、このような成分のすべての総分子量は一般に上記範囲内に入るであろう。

【0113】

ポリマー成分は、アミノ酸側鎖のアミノ基、カルボキシル基、又はチオール基に結合され得る（共有結合により）。好適な例は、Cys残基のチオール基及びLys残基のイブシロニアミノ基であり、Asp及びGlu残基のカルボキシル基も使用できる。

【0114】

当業者は、これらの結合反応を実施するのに使用できる適切な技術を知っているであろう。例えば、メトキシ基を有するPEG成分は、Nektar Therapeutics ALから市販されている試薬を使用して、マレイミド結合によりCysチオール基に結合することができる。適切な化学の詳細については、WO2008/101017及び上記で引用した文献も参照されたい。

【0115】

本発明のある態様において、マレイミド官能化PEGは、システインの側鎖スルフヒドリル基に結合される。

【0116】

有効性

本発明のペプチドコンジュゲートは、エキセンジン - 4の1つ又はそれ以上の生物活性とガストリンの1つ又はそれ以上の生物活性とを有する。

【0117】

ガストリン様成分Y ( $Y_a$ ,  $Y_b$ ) 及びリンカー成分L ( $L_a$ ,  $L_b$ ) の非存在下でのペプチドZ ( $Z_a$ ,  $Z_b$ ) は、エキセンジン - 4の1つ又はそれ以上の生物活性を有する。すなわち、化合物  $R^1 - Z - R^2$  は、エキセンジン - 4の上記の1つ又はそれ以上の生物活性を有するであろう。

【0118】

エキセンジン - 4様成分Z ( $Z_a$ ,  $Z_b$ ) 及びリンカー成分L ( $L_a$ ,  $L_b$ ) の非存在下でのペプチドY ( $Y_a$ ,  $Y_b$ ) は、ガストリンの1つ又はそれ以上の生物活性を有する。すなわち、化合物  $R^1 - Y - R^2$  は、ガストリンの上記の1つ又はそれ以上の生物活性を有するであろう。

【0119】



エキセンジン - 4 の生物活性は、G L P - 1 受容体でのアゴニスト活性でもよい。ガストリンの生物活性は、C C K - B 受容体でのアゴニスト活性でもよい。

【 0 1 2 0 】

好ましくはアゴニスト活性は、ヒト G L P - 1 受容体及び / 又はヒト C C K - B 受容体での活性である。「アゴニスト活性」は、細胞内サイクリック A M P ( c A M P ) 合成、又は関連受容体への結合時の p E R K リン酸化を誘導する能力を含んでよい。

【 0 1 2 1 】

すなわち、G L P - 1 又は C C K - B 受容体への関連化合物の結合は、アゴニスト活性の指標として使用できるが、一般に、関連受容体へのその化合物の結合により引き起こされる細胞内シグナル伝達を測定する生物学的アッセイを使用することが好ましい。例えば、適切なアゴニストによる G L P - 1 受容体の活性化は、細胞の c A M P 生成を刺激するであろう。同様に、適切なアゴニストによる C C K - B 受容体の活性化は、細胞の p E R K リン酸化を刺激するであろう。すなわち、これらの 2 つの受容体の 1 つを発現している適切な細胞中での c A M P の産生又は E R K ( p E R K ) のリン酸化は、関連する受容体活性を追跡するのに使用することができる。従ってそれぞれが片方の受容体を発現し他方の受容体を発現しない細胞タイプの適切な対の使用は、両方のタイプの受容体に対するアゴニスト活性を測定するために使用することができる。

【 0 1 2 2 】

当業者は、適切なアッセイフォーマットを知っており、例は以下に示される。アッセイは、ヒト G L P - 1 受容体 ( N P \_ 0 0 2 0 5 3 . 3 G I : 1 6 6 7 9 5 2 8 3 ) 、及び / 又はヒト C C K - B 受容体 ( N M \_ 1 7 6 8 7 5 . 3 G I : 3 5 6 9 9 5 8 5 1 ) を使用してもよい。前駆体タンパク質の配列が好ましい場合、アッセイは、シグナル配列が欠如した成熟タンパク質を使用してもよいことは、もちろん理解すべきである。

【 0 1 2 3 】

好適な態様において、本発明のポリペプチドは、G L P 1 - R について 0 . 1 n M 未満の E C <sub>50</sub> 値を有してもよい。

好適な態様において、本発明のポリペプチドは、C C K B - R について 1 0 0 n M 未満の E C <sub>50</sub> 値を有してもよい。

好適な態様において、本発明のポリペプチドは、C C K B - R について 5 0 n M 未満の E C <sub>50</sub> 値を有してもよい。

E C <sub>50</sub> 値は、実施例 4 に記載するように測定すべきである。

【 0 1 2 4 】

治療的使用

本発明のペプチドコンジュゲートの使用はまた、その医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物の使用を包含する。

【 0 1 2 5 】

本発明のペプチドコンジュゲートは、糖尿病、特に 1 型及び / 又は 2 型糖尿病、及び肥満を含む代謝疾患又は障害の魅力的な治療選択肢を提供し得る。

【 0 1 2 6 】

糖尿病は、インスリン分泌、インスリン作用、又はこれらの両方の欠陥により生じる高血糖を特徴とする代謝疾患の群を含む。糖尿病の急性症状は、過剰な尿産生、その結果としての代償性のどの渇きと水分摂取の増加、かすみ目、原因不明の体重減少、倦怠感、及びエネルギー代謝の変化を含む。糖尿病の慢性高血糖は、様々な臓器、特に目（特に糖尿病性網膜症の形で）、腎臓（糖尿病性腎症の形態で）、神経（糖尿病性神経障害の形態で）、心臓、及び血管の長期的な損傷、機能不全、及び、ある場合には最終的な不全を引き起こし得る巨大血管及び微小血管合併症に関連している。糖尿病は、病原特性に基づいて、3 つのクラス、すなわち、1 型糖尿病、2 型糖尿病、及び妊娠糖尿病に小分類される。

【 0 1 2 7 】

1 型糖尿病は、すべての糖尿病症例の 5 ~ 1 0 % を占め、インスリン分泌性膵臓 - 細胞の自己免疫的破壊により引き起こされる。

2 型糖尿病は、糖尿病症例の 90 ~ 95 % を占め、代謝性疾患の複雑な組合せの結果である。2 型糖尿病は、内因性インスリン産生及び / 又は全身のインスリン感受性の結果であり、血漿グルコースレベルを診断閾値以下に維持するには不十分となる。

妊娠糖尿病は、妊娠中に特定される耐糖能異常のすべての程度を指す。

#### 【 0 1 2 8 】

糖尿病前症として知られている状態も認識されている。それは、例えば空腹時グルコースレベルの上昇及び耐糖能異常を含み、一般に、血中グルコースレベルが上昇する場合に発生する状態を指すが、糖尿病の臨床診断で確立されているレベルには達しないものである。

#### 【 0 1 2 9 】

2 型糖尿病及び糖尿病前症を有する患者の大部分は、腹部肥満（腹部の内臓の周りに過剰な脂肪組織）、アテローム生成脂質異常症（動脈壁におけるプラーク蓄積を促進する、高トリグリセリドレベル、低 HDL コレステロールレベル、及び / 又は高 LDL コレステロールレベルを含む血液脂肪障害）、血圧上昇（高血圧症）、血栓形成促進状態（例えば、血中の高フィブリノーゲン又はプラスミノーゲンアクチベーター阻害剤 - 1 レベル）、及び炎症誘発性の状態（例えば、血中の上昇した C 反応性タンパク質レベル）を含む、追加の代謝危険因子の高い罹患率のために、罹患率と死亡率のリスクが高い。

#### 【 0 1 3 0 】

逆に、肥満は、例えば、糖尿病前症、2 型糖尿病、ある種の癌、閉塞性睡眠時無呼吸及び胆嚢疾患を発症するリスクを増加させる。

#### 【 0 1 3 1 】

脂質異常症は、心血管疾患のリスク上昇と関連している。血漿高密度リポタンパク質（HDL）濃度とアテローム動脈硬化性疾患のリスクとの間に逆相関が存在するため、HDL が臨床的に重要である。アテローム性動脈硬化プラークに保存されたコレステロールの大部分は、低密度リポタンパク質（LDL）に由来し、従って、LDL 濃度の上昇は、アテローム性動脈硬化症と密接に関連している。HDL / LDL 比は、特にアテローム性動脈硬化症及び冠動脈アテローム性動脈硬化症の臨床的リスクを評価するために用いられるパラメータである。

#### 【 0 1 3 2 】

理論に拘束されるつもりはないが、観察された活性が、個々のペプチド成分の対応する付加的（コンジュゲート化されていない）組合せを使用する時に観察されるものより顕著に高くなるように、本発明のペプチドコンジュゲートは、GLP - 1 受容体アゴニストの生理学的作用とガストリンペプチドの生理学的作用（上記参照）とを予想外に組合せているように、思われる。従って本発明のペプチドコンジュゲートは、糖尿病前症、糖尿病（特に 1 型及び / 又は 2 型糖尿病）及び糖尿病関連状態、例えば上記のような疾患又は障害の治療 [ 膵島 - 細胞生成（膵島新生）、従ってインスリン産生を促進する処置を含む ] において特に有益であり、これは、血中グルコース濃度の制御に有益であろうと考えられる。従って本発明のペプチドコンジュゲートは、1 型及び / 又は 2 型糖尿病の疾患の進行を制限又は阻止するのに、特に有用となり得る。

#### 【 0 1 3 3 】

本発明のペプチドは、膵島中の - 細胞の生存を促進しアポトーシスを阻害するために、さらに有用となり得る。GLP - 1 及びガストリンの作用は、- 細胞増殖と成熟に対する作用を含むが、- 細胞アポトーシス及び / 又は壊死及び新生の増強も含み、従って本発明のペプチドの作用は、このような作用、及び改善されたインスリン及びグルコース制御に対するその作用を含んでよい。

#### 【 0 1 3 4 】

従って本発明のペプチドコンジュゲートは、本明細書に記載の疾患、障害、又は症状の治療のための薬剤として有用であり得る。疾患、障害、又は症状の例は、インスリン抵抗性、グルコース不耐性、糖尿病前症、血中グルコースレベルの上昇に関連する疾患状態（例えば、空腹時血糖レベルの上昇）、1 型及び / 又は 2 型糖尿病、高血糖症、胃の疾患、

10

20

30

40

50

メタボリック症候群、高血圧症及び／又は脂質異常症（又はこれらの代謝危険因子の組合せ）、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、微小血管疾患、巨大血管疾患、末梢動脈疾患、脳卒中、癌（例えば結腸癌）、炎症性腸疾患（IBD）、過敏性腸症候群（IBS）、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、及び腎不全を含む。

#### 【0135】

治療効果の例は、体重増加の防止、体重減少の促進、過剰な体重の低減、及び／又は病的肥満を含む肥満症の治療（例えば、食欲、摂食、食物摂取、カロリー摂取、及び／又はエネルギー消費の制御により）、並びに関連する疾患、障害、及び健康状態（特に限定されないが、肥満関連炎症、肥満関連胆嚢疾患、及び肥満誘発性睡眠時無呼吸を含む）を含む。これらの条件下での本発明のペプチドコンジュゲートの効果は、体重に対する効果を介して全体的又は部分的に媒介され得るか、又はそれらから独立していてもよい。

10

#### 【0136】

##### 医薬組成物

以下において、本発明のペプチドコンジュゲートの1つ又はそれ以上を医薬組成物に含めることはまた、本発明のペプチドコンジュゲートの医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物を含めることを包含する。

#### 【0137】

本発明のペプチドコンジュゲートは、保存の有無にかかわらず投与に適した医薬組成物として製剤化してもよく、これは、典型的には本発明の少なくとも1つのペプチド結合体の治療的有効量を、医薬的に許容し得る担体担体、賦形剤、又はビヒクルとともに含む。

20

#### 【0138】

用語「医薬的に許容し得る担体」は、任意の標準的な医薬担体を含む。治療的使用のための医薬的に許容し得る担体は、製薬技術分野で周知であり、"Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 に記載されている。例えば、わずかに酸性又は生理的 pH の無菌生理食塩水及びリン酸緩衝化生理食塩水を使用することができる。適切な pH 緩衝剤は、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（TRIS）、N - トリス（ヒドロキシメチル）メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸（TAPS）、重炭酸アンモニウム、ジエタノールアミン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、又は酢酸塩（例えば酢酸ナトリウムとして）、又はこれらの混合物でもよい。この用語はさらに、ヒトを含む動物における使用のための、米国薬局方に記載されている任意の担体物質を包含する。

30

#### 【0139】

本発明の医薬組成物は、単位剤型であってもよい。このような形態において組成物は、1つ又は複数の活性成分の適切な量を含む単位用量に分割される。単位剤型は、包装された製剤として提供することができ、包装は、個別量の製剤を含有し、例えば包装された錠剤、カプセル剤、又は粉末剤をバイアル又はアンプル中に含む。単位剤型はまた、それ自体で、例えばカプセル剤、カシェ剤又は錠剤であってもよく、又はこれらの包装形態のいずれかの適切な数であってもよい。単位剤型はまた、液相（典型的には水性）組成物を含有するペン装置の形態で、例えば単回用量の注射可能な形態で、提供することができる。組成物は、任意の適切な経路及び投与手段のために製剤化することができる。薬学的に許容される担体又は希釈剤は、例えば、経口、硝子体内、直腸、膺、鼻、局所経腸又は非経口（皮下（SC）、筋肉内（IM）、静脈内（IV）、皮内及び経皮を含む）投与、又は吸入による投与に適した製剤で使用されるものを含む。製剤は、便利には、単位剤型で提供することができ、医薬製剤の分野で当業者に公知の方法のいずれかによって調製することができる。

40

皮下又は経皮型の投与は、本発明のペプチドコンジュゲートに特に適している。

#### 【0140】

本発明のさらなる形態は、本発明の医薬製剤を送達するために使用される装置、剤型、

50

及び包装に関する。すなわち、本明細書に記載の安定な又は保存された製剤又は液剤における、少なくとも1つのペプチドコンジュゲート又は特定の部分もしくは変種は、SC又はIM注射を含む種々の送達方法（経皮、肺、経粘膜、インプラント、浸透圧ポンプ、カトリッジ、マイクロポンプ、又は当該分野で公知のように当業者に公知の他の手段）を介して、本発明に従って患者に投与することができる。

#### 【0141】

本発明のさらに別の形態は、経口製剤及び経口投与に関する。経口投与のための製剤は、腸壁の浸透性を人為的に上昇させるためのアジュバント（例えば、レゾルシノール、及びポリオキシエチレンオレイルエーテル及びn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルなどの非イオン性界面活性剤）の同時投与、並びに、酵素的分解を阻害するための酵素阻害剤（例えば、膵臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロホスフェート（DFF）、及びトラジロール）の同時投与に依存してもよい。経口投与のための固体剤型の活性成分化合物は、ショ糖、乳糖、セルロース、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、マルチトール、デキストラン、デンプン、寒天、アルギネート、キチン、キトサン、ペクチン、トラガカントゴム、アラビアゴム、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、合成もしくは半合成ポリマー、及びグリセリドを含む少なくとも一つの添加剤と混合することができる。これらの剤型はまた、他のタイプの添加剤、例えば、不活性希釈剤、潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、パラベン）、保存剤（例えば、ソルビン酸、アスコルビン酸、-トコフェロール）、抗酸化剤（例えばシステイン）、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝剤、pH調整剤、甘味剤、香味剤、芳香剤などを含有することができる。

#### 【0142】

##### 投与量

本発明の文脈において使用される本発明のペプチドコンジュゲートの典型的な用量は、約0.0001～約100mg/kg体重/日、例えば約0.0005～約50mg/kg体重/日、約0.001～約10mg/kg/日、約0.005～約5mg/kg/日、約0.01～約1mg/kg/日、約0.015～約0.1mg/kg/日の範囲が、1回又は複数回、例えば1～3回投与されてよい。既にある程度上記したように、用いられる正確な用量は、特に、治療すべき疾患又は障害の性質及び重症度；治療すべき対象者の性別、年齢、体重、全身状態；治療を受けているか又は受ける予定の他の可能性のある付随する疾患又は障害；並びに、当該分野の医師に知られているであろう他の要因などに依存するであろう。

#### 【0143】

本発明のペプチドコンジュゲートは、又は特定の対象者について所望の用量及び熟練した医師により選択される医薬組成物に依存して、連続的に（例えば、静脈内投与又は他の連続的な薬物投与法で）投与され得るか、間隔を置いて、典型的には一定の時間間隔で、対象者に投与することができる。

#### 【0144】

一定の投与間隔は、ペプチドコンジュゲートの特定の投与製剤、バイオアベイラビリティ、及び薬物動態プロフィールに依存して、1日1回、1日2回、2日、3日、4日、5日、もしくは6日に1回、1週に1回もしくは2回、1月に1回もしくは2回、又は一定のさらに低頻度の投与間隔を含む。

#### 【0145】

慢性の長期投与中のような特定の状況において、薬物療法を受けている対象者が、薬物のレベルを低下させるか又は服用を中止する（しばしば「休薬日」を取ると呼ばれる）ために、本発明のこのような規則的なペプチドコンジュゲートの投与処方を中断することが有利なことがある。休薬日は、長期の慢性治療中に薬剤に対する感受性を維持又は回復するのに、又は薬剤による対象者の長期慢性治療の望ましくない副作用を軽減するために、有用である。

#### 【0146】

休薬日のタイミングは、定期的な投与処方のタイミングと休薬日を取るための目的に依

10

20

30

40

50

存する（例えば、薬剤感受性を回復するために、及び／又は連続的な長期投与中の望ましくない副作用を軽減するため）。いくつかの態様において、休薬日は、薬剤の減少（例えば一定の時間間隔について治療上有効な量以下に）でもよい。他の態様において薬剤の投与は、投与が再開される前、これと同時に、又は異なる投与処方で、一定の期間で停止される（例えば、より低い又はより高い、用量及び／又は投与頻度で）。

すなわちペプチドコンジュゲートは、各休薬期で区切られた２回以上の投与期を含む投与処方を介して送達してもよい。

#### 【 0 1 4 7 】

各投与期中ペプチドコンジュゲートは、あらかじめ決められた投与パターンに従って治療の有効量で受容対象者に投与される。この投与パターンは、投与期中にわたって、受容対象者への薬剤の連続投与を含んでよい。あるいはこの投与パターンは、受容対象者へのペプチドコンジュゲートの複数回の投与を含んでよく、この投与は投与間隔により離れている。

10

#### 【 0 1 4 8 】

投与パターンは、１回の投与期に少なくとも２回の投与、１回の投与期に少なくとも５回の投与、１回の投与期に少なくとも１０回の投与、１回の投与期に少なくとも２０回の投与、１回の投与期に少なくとも３０回の投与、又はそれ以上を含んでよい。

#### 【 0 1 4 9 】

この投与間隔は、一定の投与間隔でもよく、これは、上記されたように、ペプチドコンジュゲートの特定の投与製剤、バイオアベイラビリティ、及び薬物動態プロファイルに依存して、１日１回、１日２回、２日、３日、４日、５日、もしくは６日に１回、１週に１回もしくは２回、１月に１回もしくは２回、又は一定のさらに低頻度の投与間隔でもよい。

20

#### 【 0 1 5 0 】

投与期の持続は、少なくとも２日間、少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも４週間、少なくとも１ヶ月、少なくとも２ヶ月、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、又はそれ以上の期間を有してもよい。

#### 【 0 1 5 1 】

ある投与パターンが複数回の投与を含む場合、以後の休薬期の持続は、その投与パターンで使用される投与間隔より長い。投与間隔が不規則な場合、休薬期の持続は、投与期全体の投与間の平均間隔より長くてもよい。あるいは休薬日の持続は、投与期中の連続投与間の最も長い間隔より長くてもよい。

30

#### 【 0 1 5 2 】

休薬期の持続は、関連する投与間隔（又はその平均）の少なくとも２倍、関連する投与間隔又はその平均の少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍でもよい。

#### 【 0 1 5 3 】

これらの制約の中で、休薬期は、以前の投与期中の投与パターンに依存して、少なくとも２日、少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも４週間、少なくとも１ヶ月、少なくとも２ヶ月、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、又はそれ以上の持続期間を有してもよい。

40

#### 【 0 1 5 4 】

投与処方は、少なくとも２回の投与期を含む。連続的な投与期は、各休薬期により分離される。すなわち投与処方は、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、又は少なくとも３０の投与期、又はそれ以上を含んでよく、各々、休薬期により分離される。

#### 【 0 1 5 5 】

連続的投与期は、同じ投与パターンを使用してもよいが、これは、必ずしも所望でも必要でもない。しかし、本発明のペプチドコンジュゲートと組合せて他の薬物又は活性物質が投与される場合、典型的には同じ組合せの薬物又は活性物質が、連続投与期に投与され

50

る。ある態様において、受容対象者はヒトである。

【 0 1 5 6 】

併用療法

上記したように、本発明のペプチドコンジュゲートへの以下の言及はまた、その医薬的に許容される塩もしくは溶媒和物、並びに2つ以上の異なる本発明のペプチドコンジュゲートを含む組成物も包含することは、理解されるであろう。

【 0 1 5 7 】

本発明のペプチドコンジュゲートは、併用療法の一部として、問題の疾患又は障害、例えば、糖尿病、肥満、メタボリック症候群、脂質異常症、又は高血圧の治療のための別の活性物質と共に投与してもよく、そのような場合、2つの活性剤は、一緒に投与されるか、又は別々に、例えば、同じ医薬組成物もしくは製剤中の成分として、又は別々の製剤として投与してもよい。

【 0 1 5 8 】

従って本発明のペプチドコンジュゲートは、既知のタイプの抗糖尿病剤（特に限定されないが、メトホルミン、スルホニル尿素、グリニド、DPP-IV阻害剤、グリタゾン、又はインスリンもしくはインスリン類似体）と組み合わせて使用することができる。好適な態様において、本発明のペプチドコンジュゲートは、十分な血糖コントロールを達成するために、インスリン又はその類似体、DPP-IV阻害剤、スルホニル尿素、又はメトホルミン、特にスルホニル尿素又はメトホルミンと組合せて投与される。より好適な態様において、ペプチドコンジュゲートは、十分な血糖コントロールを達成するために、インスリン又はその類似体と組合せて投与される。適切なインスリン類似体の例は、特に限定されないが、Lantus（登録商標）、Novorapid（登録商標）、Humalog（登録商標）、Novomix（登録商標）、Actraphane（登録商標）HM、Levemir（登録商標）、Degludec（登録商標）、及びApidra（登録商標）を含む。この点で他の関連する抗糖尿病剤は、GLP-1受容体アゴニスト、例えば、エキセナチド（Byetta（登録商標）；エキセンジン-4）、及びByetta LAR（登録商標）、リキセンアチド（Lyxumia（登録商標））、及びリラグルチド（Victoza（登録商標））を含む。

【 0 1 5 9 】

本発明のペプチドコンジュゲートはまた、既知のタイプの抗糖尿病剤〔特に限定されないが、ペプチドYYもしくはその類似体、ニューロペプチドY（NPY）もしくはその類似体、カンナビノイド受容体1アンタゴニスト、リパーゼ阻害剤、ヒューマンprolsletペプチド（HIP）、メラノコルチン受容体4アゴニスト、リラグルチド、Orlistat（登録商標）、及びSibutramine（登録商標）、又はメラニン濃縮ホルモン受容体1アンタゴニスト、CCK、アミリン又はレプチン、及びこれらの類似体を含む〕とともに使用することができる。

【 0 1 6 0 】

本発明のペプチドコンジュゲートはさらに、既知のタイプの高血圧剤（特に限定されないが、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、アンギオテンシンII受容体遮断薬、利尿剤、ベータ遮断薬、又はカルシウムチャネル遮断薬を含む）とともに使用することができる。

【 0 1 6 1 】

本発明のペプチドコンジュゲートはさらに、既知のタイプの抗脂質異常症薬（特に限定されないが、スタチン、フィブラート、ナイアシン、及び/又はコレステロール吸収阻害剤を含む）とともに使用することができる。

【 0 1 6 2 】

本発明のペプチドコンジュゲートはまた、既知のタイプのプロトンポンプ阻害剤〔特に限定されないが、ベンズイミダゾリル誘導体型又はイミダゾピリジン誘導体型の物質、例えばOmeprazole（登録商標）、Lansoprazole（登録商標）、Dexlansoprazole（登録商標）、Esomeprazole（登録商標）、Pantoprazole（登録商標）、Rabeprazole（登録商標）、Zolpidem（登録商標）、Alpidem（登録商標）、Saripidem（登録商標）、又はNecopidem（登録商標）を含む〕とともに使用することができる。

## 【 0 1 6 3 】

本発明のペプチドコンジュゲートはさらに、既知のタイプの抗炎症剤〔特に限定されないが、

ステロイド及びコルチコステロイド、例えばベクロメタゾン、メチルプレドニゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、デキサメタゾン、及びヒドロコルチゾン；

非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、例えばプロピオン酸誘導体（例えばアルミノプロフェン、ペノキサプロフェン、ブクロキシ酸、カルプロフェン、フェンブフェン、フェノプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドプロフェン、ケトプロフェン、ミプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、スプロフェン、チアプロフェン酸、及びチオキサプロフェン）；酢酸誘導体（例えばインドメタシン、アセメタシン、アルクロフェナック、クリダナク、ジクロフェナク、フェンクロフェナク、フェンクロジン酸、フェンチアザク、フロフェナク、イブフェナク、イソキセパク、オキスピナク、スリンダク、チオピナク、トルメチン、ジドメタシン、及びゾメピラック）；フェナム酸誘導体（例えばフルフェナム酸、メクロフェナム酸、メフェナム酸、ニフルム酸、及びトルフェナム酸）；ビフェニルカルボン酸誘導体（例えばジフルニサル及びフルフェニサル）；オキシカム（例えばイソキシカム、ピロキシカム、スドキシカム、及びテノキシカム）；サリチル酸塩（例えばアセチルサリチル酸及びスルファサラジン）；及びピラゾロン（例えばアパゾン、ベズピペリロン、フェブラゾン、モフェブタゾン、オキシフェンブタゾン、及びフェニルブタゾン）；

COXII阻害剤、例えばロフェコキシブ及びセレコキシブ；インターフェロンベータの調製物（例えば、インターフェロンベータ - 1 a 又はインターフェロンベータ - 1 b）；

及び、いくつかの他の化合物、例えば5 - アミノサリチル酸、及び、これらのプロドラッグと薬学的に許容される塩〕とともに使用することができる。

## 【 0 1 6 4 】

メトホルミンは、抗炎症性を有する〔Haffner et al. Diabetes 54: 1566-1572 (2005)を参照〕ことも証明されており、従って、本発明の文脈において有用となり得る。

## 【 0 1 6 5 】

以下の実施例は、本発明の特定の具体的な態様を示す。以下の実施例を詳細に説明したこと以外は、当業者に周知であり日常的である標準的な技術を用いて、行われた。これらの例は例示のみを目的とするものであり、本発明の条件又は範囲に関して完全に決定的であることを趣旨とするものではないことを理解すべきである。従ってこれらは、決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

## 【 0 1 6 6 】

実施例で使用する略語は次のとおりである：

NMP：N - メチルピロリドン

DCM：ジクロロメタン

DMF：N、N - ジメチルホルムアミド

HATU：2 - (7 - アザ - 1H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート

DIPA：ジイソプロピルエチルアミン

EtOH：エタノール

Et<sub>2</sub>O：ジエチルエーテル

8Ado：8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタノイル

8Aoc：8 - アミノオクタノイル

TFA：トリフルオロ酢酸

MeCN：アセトニトリル

HPLC：高速液体クロマトグラフィー

MS：質量分析法

IBMX：3 - イソブチル - 1 - メチルキサンチン

B S A : ウシ血清アルブミン

c A M P : 環状アデノシンーリン酸

D M E M : ダルベッコ改変イーグル培地

F C S : ウシ胎児血清

H E P E S : N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N ' - 2 - エタンスルホン酸

P - E R K : リン酸化細胞外制御キナーゼ

P B S : リン酸緩衝化生理食塩水

B O C : t - ブトキシカルボニル

N E P : N - エチルピロリドン

リラグルチド : [ A r g 3 4 , L y s 2 6 ( ヘキサデカノイル - イソ G l u ) ] G L P - 1 ( 7 ~ 3 7 ) 10

#### 【実施例】

#### 【0167】

#### 化合物の合成

#### 材料と方法

特に明記しない場合は、以下で使用される試薬と溶媒は、標準的な実験用試薬又は分析グレードで市販されており、さらに精製することなく使用された。

#### 【0168】

#### 本発明のペプチドコンジュゲートの合成のための一般的操作

標準的 F m o c 化学を使用して、固相ペプチド合成を CEM Liberty Peptide Synthesizer 上で行った。使用の前に、TentaGel (登録商標) S Ram 樹脂 ( 1 g ; 0 . 2 5 m m o l / g ) を N E P ( 1 0 m l ) 中で膨潤させ、DCM 及び N E P を使用してチューブと反応槽との間を移動させた。ペプチド合成中の凝集を最小にするために使用されるジペプチドであるシュードプロリン、例えば F m o c - P h e - T h r ( - M e , M e - P r o ) - O H 及び F m o c - A s p - S e r ( - M e , M e - P r o ) - O H を適宜使用し、非天然のアミノ酸 (すなわち、F m o c - 8 A d o - O H ) を、一般的操作に変更を加えることなく使用した。 20

#### 【0169】

#### カップリング :

N E P / D M F / D C M ( 1 : 1 : 1 ; 0 . 2 M ; 5 m l ) 中の F m o c - アミノ酸を CEM Discover マイクロ波装置中の樹脂に、H A T U / D M F ( 0 . 5 M ; 2 m l ) 及び D I P E A / N E P ( 2 . 0 M ; 1 m l ) と共に添加した。混合物を通して窒素を泡立てせながら、カップリング混合物を 7 5 ° C まで 5 分間加熱した。続いて樹脂を N E P で洗浄した ( 4 x 1 0 m l ) 。 30

#### 【0170】

#### 脱保護 :

最初の脱保護のためにピペリジン / N E P ( 1 / 4 ( 4 部の N E P に対する 1 部のピペリジンを示す ) ; 1 0 m l ) を樹脂に添加し、混合物をマイクロ波加熱した ( 4 0 ° C ; 3 0 秒 ) 。反応容器を排出し、ピペリジン / N E P ( 1 / 4 ; 1 0 m l ) の 2 回目の量を添加し、再度加熱した ( 7 5 ° C ; 3 分 ) 。続いて樹脂を N E P で洗浄した ( 6 x 1 0 m l ) 。 40

#### 【0171】

#### 切断 :

樹脂をエタノール ( 3 x 1 0 m l ) 及び E ジエチルエーテル ( 3 x 1 0 m l ) で洗浄し、一定の重量まで室温で ( r . t . ) 乾燥した。T F A / T I S / 水 ( 9 5 / 5 / 5 ; 4 0 m l , 2 h ; r . t . ) を用いる処置によって、未精製のペプチドを樹脂から切断した。T F A の大半を減圧で除去し、未精製のペプチドを沈殿させ、ジエチルエーテルで 3 回洗浄し、室温で一定の重量まで乾燥した。

#### 【0172】

#### 精製と性状解析 :



適切なカラムとフラクションコレクターを備えたPerSeptive Biosystems VISION Workstationを使用して、未精製のペプチドを分取用逆相HPLCによって90%超の純度まで精製し、緩衝液A(0.1% TFA、aq.)及び緩衝液B(0.1% TFA、90% MeCN、aq.)との勾配で実行した。分析用HPLC及びMSによって画分を分析し、関連画分をプールし凍結乾燥した。最終生成物をHPLC及びMSによって性状解析した。

#### 【0173】

##### 実施例1

#### 化合物2 [Leu14, Lys25(ヘキサデカノイル-イソGlu)]エキセンジン-4(1~28)-8Ado-8Ado-[Leu4]ガストリン6の合成

CEM Liberty Peptide Synthesizer上で上記したTentaGel S Ram 樹脂(1.13g; 0.24mmol/g)とFmoc化学を使用して、[Leu14]エキセンジン-4(1~28)-8Ado-8Ado-[Leu4]ガストリン6を合成した。Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(Fmoc-8Ado-OH)並びにFmoc-Lys(Dde)-OHを、アシル化のために結合点で使用した。

#### 【0174】

樹脂に結合し保護された線状ペプチドをNMP(3×2分)で洗浄した。固相に結合したペプチドのN末端を、DCM(4ml)中のBoc<sub>2</sub>O(265mg)及びDIEA(47μl)を使用してBoc保護し、次にNMP(5×2分)で洗浄した。次にDde保護基をヒドラジン水和物/NEPで(4/96; 2×15分)を使用して切断し、樹脂をNMP(5×2分)、DIEA/NMP(1/9; 3×5分)、及びNMP(8×2分)で洗浄した。合成は、Fmoc-Glu-OtBu及びヘキサデカン酸を使用して、上記のCEM Liberty Peptide Synthesizerで完了した。

#### 【0175】

ペプチドを上記の樹脂から切断し、そしてGemini-NXカラム(5×25cm; 10μm; C18)上で、緩衝液A(0.1% TFA; aq.)及び緩衝液B(0.1% TFA、90% MeCN; aq.)の混合物の35ml/分流量で精製を行った。生成物を30%~65%の緩衝液Bで47分間直線勾配で溶出し、フラクションコレクターによって画分(9ml)を採取した。関連画分を分析用HPLCとMSによって分析し、プールし、白色粉末(39mg)となるまで凍結乾燥し、これを、分析用HPLCによって81%純度として分析した。質量はMSにより測定すると、4655.53Daであった(計算値4655.44Da)。

#### 【0176】

##### 実施例2

#### 化合物6 [Cys16(ピオチン-Mal), Leu14]エキセンジン-4(1~28)-8Ado-8Ado-[Leu4]ガストリン6の合成

CEM Liberty Peptide Synthesizer上で上記した2部のTentaGel S Ram 樹脂(1.12g; 0.25mmol/g)とFmoc化学を使用して、Fmoc-Phe-Thr(-Me, Me-Pro)-OH及びFmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(Fmoc-8Ado-OH)を使用して、[Cys16, Leu14]エキセンジン-4(1~28)-8Ado-8Ado-[Leu4]ガストリン6を合成した。このペプチドを上記したように樹脂から切断した(部分1)。

#### 【0177】

精製番号1: 樹脂番号1からの未精製ペプチドを、Gemini-NXカラム(5×25cm; 10μm; C18)上で、緩衝液A(0.1% TFA; aq.)及び緩衝液B(0.1% TFA、90% MeCN; aq.)の混合物の35ml/分流量で精製した。生成物を30%~65%の緩衝液Bで47分間直線勾配で溶出し、フラクションコレクターによって画分(9ml)を採取した。関連画分を分析用HPLCとMSによって分析し、プールし、白色粉末(90mg)となるまで凍結乾燥し、これを、分析用HPLCによって68%純度として分析した。

10

20

30

40

50

## 【0178】

精製番号2：精製番号1からの生成物を、Gemini-NXカラム（10 mm × 25 cm；5 μm；C18）上で、緩衝液A（0.1% TFA；aq.）及び緩衝液B（0.1% TFA、90% MeCN；aq.）の混合物の4 ml / 分流量で精製した。生成物を30%～60%の緩衝液Bで47分間直線勾配で溶出し、フラクションコレクターによって画分（2 ml）を採取した。関連画分を分析用HPLCとMSによって分析し、プールし、白色粉末（25 mg）となるまで凍結乾燥し、これを、分析用HPLCによって91%純度として分析した。

## 【0179】

精製番号3：樹脂番号2からの未精製ペプチドを、Geminiカラム（5 × 25 cm；10 μm；C18）上で、緩衝液A（0.1% TFA；aq.）及び緩衝液B（0.1% TFA、90% MeCN；aq.）の混合物の35 ml / 分流量で精製した。生成物を30%～65%の緩衝液Bで47分間直線勾配で溶出し、フラクションコレクターによって画分（9 ml）を採取した。関連画分を分析用HPLCとMSによって分析し、プールし、白色粉末（129 mg）となるまで凍結乾燥し、これを、分析用HPLCによって74%純度として分析した。

## 【0180】

精製番号4：精製番号2と3からの一緒にした生成物を、Gemini-NXカラム（10 mm × 25 cm；5 μm；C18）上で、緩衝液A（0.1% TFA；aq.）及び緩衝液B（0.1% TFA、90% MeCN；aq.）の混合物の4 ml / 分流量で精製した。生成物を30%～55%の緩衝液Bで47分間直線勾配で溶出し、フラクションコレクターによって画分（2 ml）を採取した。関連画分を分析用HPLCとMSによって分析し、プールし、白色粉末（32 mg）となるまで凍結乾燥し、これを、分析用HPLCによって73%純度として分析し、別の白色粉末（100 mg）は分析用HPLCにより62%純度として分析した。

## 【0181】

精製番号5：精製番号4からの一緒にした生成物を、Gemini-NXカラム（10 mm × 25 cm；5 μm；C18）上で、緩衝液A（0.1% TFA；aq.）及び緩衝液B（0.1% TFA、90% MeCN；aq.）の混合物の4 ml / 分流量で精製した。生成物を30%～55%の緩衝液Bで47分間直線勾配で溶出し、フラクションコレクターによって画分（2 ml）を採取した。関連画分を分析用HPLCとMSによって分析し、プールし、白色粉末（30 mg）となるまで凍結乾燥し、これを、分析用HPLCによって90%純度として分析した。質量はMSにより測定すると、4320.24 Daであった（計算値4320.12 Da）。

## 【0182】

結合：精製番号5からの生成物を、PBS緩衝液（6 ml；pH 7.4）に溶解して、濁った溶液を得た（pH 6.2）。ピオチン・マレイミド（10.7 mg）をDMSO（1.1 ml）に溶解し、ペプチド溶液に加えた。反応を分析用HPLCにより追跡し、3時間後Gemini-NXカラム（10 × 25 cm；5 μm；C18）を使用して、緩衝液A（0.1% TFA；aq.）及び緩衝液Bの混合物の4 ml / 分流量で精製した。生成物を60%～55%の緩衝液Bで47分間直線勾配で溶出し、フラクションコレクターによって画分（2 ml）を採取した。関連画分を分析用HPLCとMSによって分析し、プールし、白色粉末（18 mg）となるまで凍結乾燥し、これを、分析用HPLCによって84%純度として分析した。質量はMSにより測定すると、4771.35 Daであった（計算値4771.31 Da）。

## 【0183】

## 実施例3

化合物9 [ Glu 9 , Leu 14 , Phe 25 , Tyr 13 ] エキセンジン - 4 ( 1 ~ 27 ) - QQ - [ Leu 4 ] ガストリン6の合成

このペプチドは、上記したようにCEM Liberty Peptide Synthesizer上でTentaGel S Ra

10

20

30

40

50

m 樹脂 ( 1 . 1 0 g ; 0 . 2 5 m m o l / g ) と F m o c 化学を使用して、F m o c - P h e - T h r ( - M e , M e - P r o ) - O H を使用して合成した。未精製ペプチドを Gemini-NX カラム ( 5 × 2 5 c m ; 1 0 μ m ; C 1 8 ) 上で、緩衝液 A ( 0 . 1 % T F A ; a q . ) 及び緩衝液 B ( 0 . 1 % T F A 、 9 0 % M e C N ; a q . ) の混合物の 3 5 m l / 分流量で精製した。生成物を 2 0 % ~ 5 0 % の緩衝液 B で 4 7 分間直線勾配で溶出し、フラクションコレクターによって画分 ( 9 m l ) を採取した。関連画分を分析用 H P L C と M S によって分析し、プールし、白色粉末 ( 1 3 7 m g ) となるまで凍結乾燥し、これを、分析用 H P L C によって 7 8 % 純度として分析した。質量は M S により測定すると、4 2 0 8 . 1 1 D a であった ( 計算値 4 2 0 8 . 0 9 D a ) 。

【 0 1 8 4 】

#### 実施例 4

本発明のペプチドコンジュゲートによる G L P - 1 受容体とガストリン C C K - B 受容体のインビトロ活性化 ( E C <sub>50</sub> )

#### 材料と方法

ヒト G L P - 1 受容体 ( G L P - 1 R ) 有効性アッセイ :

本発明のペプチドコンジュゲートのインビトロ作用を、Perkin-ElmerからのFlashPlate ( 登録商標 ) cAMP キットを使用して、G L P - 1 ( 7 ~ 3 6 ) 、エキセンジン - 4 ( 1 ~ 3 9 ) 、又は本発明のコンジュゲートによる受容体の刺激後、c A M P の誘導を測定することにより、評価した。簡単に説明すると、ヒト G L P - 1 R ( G L P - 1 R の c D N A のトランスフェクションと安定なクローンの選択により作成された安定な細胞株 ) を発現する H E K 2 9 3 細胞を、0 . 0 1 % ポリリジンで被覆した 9 6 ウェルマイクロタイタープレートに 4 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルで接種し、1 0 0 μ l の増殖培地 [ D M E M 、 1 0 % F C S 、 ペニシリン ( 1 0 0 I U / m l ) 、 ストレプトマイシン ( 1 0 0 μ g / m l ) ] 中で一晩培養して増殖させた。分析の日に、増殖培地を取り出し、細胞を 2 0 0 μ l のタイロード緩衝液 [ タイロード塩 ( 0 . 6 g / l ) 、 1 0 m M ヘプス、p H 7 . 4 ] で 1 回洗浄した。細胞を、上昇する濃度の試験化合物、1 0 0 μ M の I B M X 、及び 0 . 1 % の B S A を含有する 1 0 0 μ l のタイロード緩衝液中で、3 7 ° で 1 5 分インキュベートした。2 5 μ l の 0 . 5 M H C l の添加により反応を停止させ、氷上で 6 0 分インキュベートした。方法のさらなる詳細については、W O 2 0 0 8 / 1 5 2 4 0 3 を参照されたい。

【 0 1 8 5 】

C C K - B 受容体 ( C C K - B R ) 有効性アッセイ :

本発明のペプチドコンジュゲートと対照のガストリン 1 7 類似体 [ L e u 1 5 ] ガストリン 1 7 のインビトロ作用を、ヒト C C K - B R ( 高親和性ガストリン受容体 ; C C K - B R の c D N A のトランスフェクションと安定なクローンの選択により作成された安定な細胞株 ) を安定に発現する H E K 2 9 3 細胞中で p - E R K を測定して ( AlphaScreen ( 登録商標 ) SureFire p-ERK アッセイを使用して ) 推定した。ガストリン受容体有効性アッセイ ( AlphaScreen ( 登録商標 ) SureFire p-ERK アッセイ ) は、以下のように行った : 1 日目に、C C K - B R を発現する細胞を、ポリ - D - リジンで被覆した 9 6 ウェルプレートウェル中の 1 0 0 μ l の増殖培地 [ D M E M 、 1 0 % F C S 、 ペニシリン ( 1 0 0 I U / m l ) 、 ストレプトマイシン ( 1 0 0 μ g / m l ) ] 中で 2 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルで接種した。細胞をインキュベーター ( 3 7 ° 、 5 % C O <sub>2</sub> ) 中で 2 日間インキュベートした。次に増殖培地を、ウェル当たり 8 0 μ l の無血清培地 [ D M E M 、 ペニシリン ( 1 0 0 I U / m l ) 、 ストレプトマイシン ( 1 0 0 μ g / m l ) ] に添加し、細胞のインキュベーションをインキュベーター中で一晩続けた。分析の日に、上昇する濃度で化合物を 2 0 μ l の無血清培地に加え、細胞を室温で 5 分インキュベートした。プレートを素早く上下にひっくり返して刺激培地を捨て、6 0 μ l の 1 × 溶解緩衝液 ( SureFire アッセイキットから ) をウェルに加えた。さらなる詳細については、W O 2 0 1 1 / 1 3 4 4 7 1 を参照されたい。

【 0 1 8 6 】

本発明のペプチドコンジュゲートを上記アッセイ（すなわち、ヒトGLP-1 R活性化有効性、ヒトCCK-B R活性化有効性）で試験した。

ヒトGLP-1受容体（hGLP-1 R）活性化アッセイ中の陽性対照としてエキセジン-4（1～39）を使用し、ヒトCCK-B受容体（hCCK-B R）活性化アッセイの陽性対照としてh[Leu15]ガストリン17を使用した。

【0187】

結果（EC<sub>50</sub>値、nM）は、以下の表1に要約される。

【0188】

【表2】

10

hGLP-1 RとhCCK-B Rの活性化における本発明の化合物  
（ペプチドコンジュゲート）のインビトロ活性（EC<sub>50</sub>値、nM）

化合物番号	hGLP-1 R EC <sub>50</sub> (nM)	hCCK-B R EC <sub>50</sub> (nM)
	0.017	
		2.89
1	0.048	30
2	0.094	7.4
3	0.058	38
4	0.14	10
5	0.024	5.0
6	0.038	5.8
7	0.88	29
8	0.80	21
9	0.093	18
10	0.069	13
11	0.098	59
12	0.13	23
13	0.29	75
14	0.11	28
15	0.17	30
16	0.11	45
17	0.19	85
18	0.062	18
19	0.045	13
21	0.052	94
22	0.085	31
23	0.094	18
38	0.037	61
40	0.37	133

20

30

40

【0189】

結果

上記表1に要約した結果は、本発明のペプチドコンジュゲートが、問題の2つの受容体の強力なアゴニストであること、及びこれらが非常によく似たレベルの活性を示すことを示す。

【0190】

実施例5

マウス中の選択された化合物の薬物動態（PK）

50

方法

C 5 7 B 1 L / 6 J マウスに、試験すべき各ペプチドの  $100 \text{ nmol} / \text{kg}$  を単回皮下投与した。5 分後及び 30 分後、そして 1、2、4、6、16、及び 24 時間後に、血液試料を採取した。各時点で、2 匹のマウスから試料を取った。採血後直ちに、マウスを頸椎脱臼により安楽死させた。固相抽出 (S P E) 後、血漿試料を液体クロマトグラフィー質量スペクトル法 (M C - M S / M S) により分析した。

【 0 1 9 1 】

【表 3】

マウスに  $100 \text{ nmol} / \text{kg}$  を皮下投与後の  $T_{1/2}$ 

化合物	$T_{1/2}$ (h)
7	6.2
12	5.0
18	4.1
19	2.4
22	8.2
23	6.7

10

【 0 1 9 2 】

20

実施例 63 週間のインビボ d b / d b マウス試験

d b / d b マウスは、可能性のある治療候補の  $\beta$ -細胞保存作用を評価するために、すでに使用されている [Rolin, B. et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283: E745-E752 (2002)]。いくつかの試験が、膵臓インスリン含量と  $\beta$ -細胞質量との相関を証明している [Rolin, B. et al. (前出); Suarez-Pinzon, W.L. et al., Diabetes 54: 2596-2601 (2005); Suarez-Pinzon W.L. et al., Diabetes 57: 3281-3288 (2008)]。

【 0 1 9 3 】

処置

d b / d b マウスを、H b A 1 c レベルに従って種々の処置群に群分けした。マウスは、全部で 21 日間の皮下 (S C) 注射で毎日 1 回処理した。注射容量は  $5 \text{ ml} / \text{kg}$  であった。試験中、体重 (B W) を毎日記録し、ペプチドの体重補正用量を投与するために使用した。

30

【 0 1 9 4 】

O G T T

16 日目に、経口耐糖能試験を動物に行った。グルコース投与の前 ( $t = 0$  で、ベースライン) と投与後 2 時間まで、血中グルコースを測定した。

【 0 1 9 5 】

終了

終了時に、血中グルコースを測定し、血液試料を H b A 1 c レベルについて分析した。

40

【 0 1 9 6 】

測定

全血グルコース濃度 (m M) を、固定化グルコースオキシダーゼ法により測定した (Elite Autoanalyser, Bayer, Denmark)。血液試料は、Cobas c111 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を使用して H b A 1 c について分析した。

【 0 1 9 7 】

結果

エキセンジン - ガストリン 2 重アゴニスト化合物 18 と化合物 23 は両方とも、16 日間の処置後、空腹時血中グルコースレベルを低下させた。化合物 18 は、空腹時血中グルコースレベルを化合物 23 より大きく低下させた。両方の化合物とも、3 週間の処置後 H

50

b A 1 c の血漿レベルを低下させたが、化合物間に有意差はなかった（対応の無い両側 t - 検定）。

【 0 1 9 8 】

化合物 1 8 と化合物 2 3 は両方とも、16 日目に経口グルコースチャレンジ（表 3）後に曲線下のグルコース濃度曲線面積（AUC）を低下させ、化合物 1 8 はグルコース濃度を化合物 2 3 より大きく低下させた。

【 0 1 9 9 】

最後に、化合物 1 8 と化合物 2 3 の両方とも、試験（表 3）の 3 週間のコース中、体重を低下させ、化合物 1 8 は体重増加を化合物 2 3 よりも大きく低下させた。

【 0 2 0 0 】

【表 4】

10

### 3 週間のインビボ d b / d b 試験結果

	デルタ H b A 1 c (%)	O G T T, A U C (n M * 分)	デルタ B W (g)	空腹時 B G レベル (mM)
ビヒクル	—	—	—	—
化合物 18	+++	+++	+++	+++
化合物 23	+++	++	++	++

20

【 0 2 0 1 】

表 3 の凡例：

デルタ H b A 1 c : d b / d b マウスの 21 日間の処置後の、ビヒクル、化合物 1 8 ( 1 0 0 n m o l / k g ) 及び化合物 2 3 ( 1 0 0 n m o l / k g ) の S C 投与のデルタ H b A 1 c ( % ) レベルに対する作用（試験の開始時の H b A 1 c のレベルから試験の終了時の H b A 1 c のレベルを引く）。データは、平均と S E M で示される（n = 11 / 群）。( - ) は、デルタ H b A 1 c レベルが 0 . 5 % を超えることを示し、( + ) はデルタ H b A 1 c レベルが 0 . 2 5 % ~ 0 . 5 % であることを示し、( + + ) は、デルタ H b A 1 c レベルが 0 % ~ 0 . 2 5 % であることを示し、( + + + ) は、デルタ H b A 1 c レベルが 0 % 未満であることを示す。

30

【 0 2 0 2 】

O G T T 曲線下の面積（AUC）：d b / d b マウスの 16 日間の処置後のグルコース負荷後の、ビヒクル、化合物 1 8 ( 1 0 0 n m o l / k g ) 及び化合物 2 3 ( 1 0 0 n m o l / k g ) の S C 投与の、曲線下の面積（AUC）で測定した耐糖能に対する作用。データは、平均と S E M で示される（n = 11 / 群）。( - ) は、O G T T A U C が 3 0 0 0 m M \* 分を超えることを示し、( + ) は O G T T A U C が 2 0 0 0 ~ 3 0 0 0 m M \* 分であることを示し、( + + ) は、O G T T A U C が 1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 m M \* 分であることを示し、( + + + ) は、O G T T A U C が 1 0 0 0 m M \* 分未満であることを示す。

40

【 0 2 0 3 】

デルタ B W : d b / d b マウスの 21 日間の処置後の、ビヒクル、化合物 1 8 ( 1 0 0 n m o l / k g ) 及び化合物 2 3 ( 1 0 0 n m o l / k g ) の S C 投与のデルタ B W ( g ) レベル（試験の開始時の B W から試験の終了時の B W を引く）に対する作用。データは、平均と S E M で示される（n = 9 ~ 11 / 群）。( - ) は、デルタ B W が 8 g より大きいことを示し、( + ) はデルタ B W が 6 ~ 8 g であることを示し、( + + ) は、デルタ B W が 4 ~ 6 g であることを示し、( + + + ) は、デルタ B W が 4 g 未満であることを示す。

【 0 2 0 4 】

空腹時 B G : d b / d b マウスの 16 日間の処置後の、ビヒクル、化合物 1 8 ( 1 0 0 n m o l / k g ) 及び化合物 2 3 ( 1 0 0 n m o l / k g ) の空腹時血中グルコース ( n M

50

) レベルに対する作用。データは、平均と S E M で示される (  $n = 11$  / 群 )。 ( - ) は、空腹時 B G が 12 m M より大きいことを示し、 ( + ) は空腹時 B G が 8 ~ 12 m M であることを示し、 ( + + ) は、空腹時 B G が 6 ~ 8 m M であることを示し、 ( + + + ) は、空腹時 B G が 6 m M 未満であることを示す。

【 0 2 0 5 】

#### 実施例 7

##### インビボ d b / d b マウス試験：4 週間の処置後に 2 週間の休薬

##### 処置

d b / d b マウスを、H b A 1 c レベルに従って種々の処置群に群分けした。マウスは、全部で 4 週間の皮下 ( S C ) 注射で毎日 1 回処理し、次にビヒクルを 2 週間投与した。注射容量は 5 m l / k g であった。試験中、体重 ( B W ) を毎日記録し、ペプチドの体重補正用量を投与するために使用した。

【 0 2 0 6 】

##### O G T T

3 週間と 5 週間後に、経口耐糖能試験を動物に行った。グルコース投与の前 (  $t = 0$  で、ベースライン ) と投与後 2 時間まで、血中グルコースを測定した。

【 0 2 0 7 】

##### 測定

全血グルコース濃度 ( m M ) は、固定化グルコースオキシダーゼ法により測定した ( E l i t e A u t o a n a l y s e r , B a y e r , D e n m a r k ) 。

【 0 2 0 8 】

##### 結果

エキセンジン - ガストリン 2 重アゴニスト化合物 18 は、3 週間の処置後、ビヒクルと比較して空腹時血中グルコースレベルを低下させた。化合物 18 は、空腹時血中グルコースレベルを等モル用量のリラグルチドより大きく低下させた ( 図 1 を参照 )。4 週間の処置後に 1 週間の休薬 ( ビヒクル投与 ) をすると、化合物 18 は、ビヒクルと比較して空腹時血中グルコースレベルを有意に低下させた。化合物 18 は、等モル用量のリラグルチドより、空腹時血中グルコースレベルを大きく低下させた ( 図 2 を参照 )。

【 0 2 0 9 】

化合物 18 は、3 週間の処置後の経口グルコースチャレンジ後に曲線下のグルコース濃度曲線面積 ( A U C ) を低下させ、化合物 18 はグルコース濃度曲線面積 ( A U C ) をリラグルチドより大きく低下させた ( 図 3 を参照 )。

【 0 2 1 0 】

4 週間の処置後に 1 週間の休薬 ( ビヒクル投与 ) をすると、化合物 18 は、経口グルコースチャレンジ後に曲線下のグルコース濃度曲線面積 ( A U C ) を、ビヒクルと比較して有意に低下させた ( 図 4 を参照 )。化合物 18 はグルコース濃度曲線面積 ( A U C ) を等モル用量のリラグルチドより大きく低下させた。

【 0 2 1 1 】

最後に、化合物 18 は、本試験の 4 週間のコース中、体重増加を低下させ、化合物 18 は体重増加を等モル用量のリラグルチドよりも大きく低下させた ( 図 5 を参照 )。

【 0 2 1 2 】

#### 実施例 8

##### インビボ Z D F ラット試験：6 週間の処置

##### 処置

Z D F ラットを、H b A 1 c レベルに従って種々の処置群に群分けした。ラットは、全部で 6 週間の皮下 ( S C ) 注射で毎日 2 回処理し、注射容量は 5 m l / k g であった。試験中、体重 ( B W ) を毎日記録し、ペプチドの体重補正用量を投与するために使用した。

【 0 2 1 3 】

##### O G T T

5 週間後に、経口耐糖能試験を動物に行った。グルコース投与の前 (  $t = 0$  で、ベース

10

20

30

40

50

ライン)と投与後2時間まで、血中グルコースを測定した。

【0214】

終了

終了時に、血液試料をHbA1cレベルについて分析した。

【0215】

測定

全血グルコース濃度(mM)は、固定化グルコースオキシダーゼ法により測定した(Elite Autoanalyser, Bayer, Denmark)。

血液試料は、Cobas c111 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を使用してHbA1cについて分析した。

【0216】

結果

エキセンジン - ガストリン2重アゴニスト化合物18は、5週間の処置後、ビヒクルと比較して空腹時血中グルコースレベルを低下させた。化合物18は、空腹時血中グルコースレベルを等モル用量のリラグルチドより大きく低下させた(図6を参照)。

【0217】

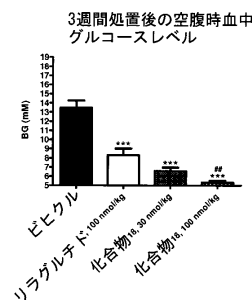
化合物18は、5週間の処置後の経口グルコースチャレンジ後に曲線下のグルコース濃度曲線面積(AUC)を低下させ、化合物18はグルコース濃度曲線面積(AUC)をリラグルチドより大きく低下させた(図7を参照)。

【0218】

6週間後、化合物18は、ビヒクルと比較してHbA1cレベルを有意に低下させた。化合物18は、等モル用量のリラグルチドよりも、HbA1cレベルを大きく低下させた(図8を参照)。

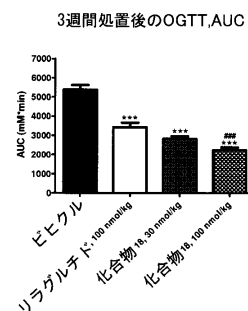
【図1】

Figure 1



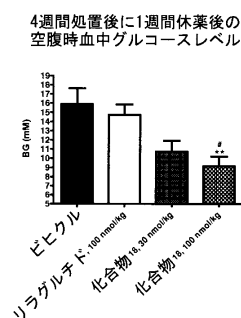
【図3】

Figure 3



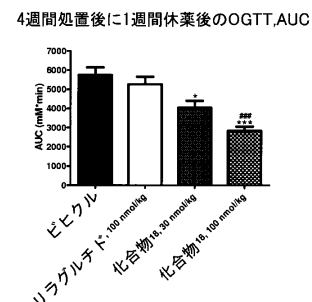
【図2】

Figure 2



【図4】

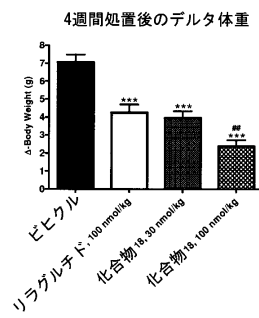
Figure 4





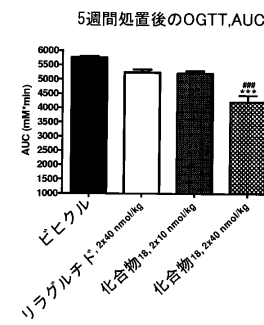
## 【図 5】

Figure 5



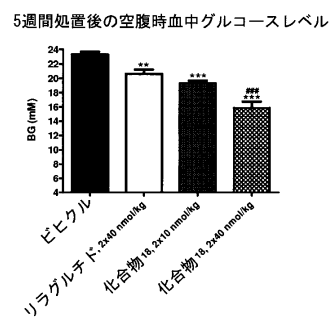
## 【図 7】

Figure 7



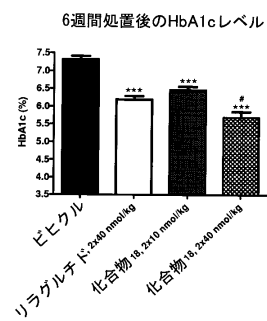
## 【図 6】

Figure 6



## 【図 8】

Figure 8



## 【配列表】

0006359972000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P 3/06
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/18
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 P 3/04
C 0 7 K	1/00	(2006.01)	A 6 1 K 38/16
			C 0 7 K 1/00

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ヤコブ リンド トルボルウ

デンマーク国, ヘアレウ, デーコー - 2 7 3 0, ブデルブバイ 5

(72)発明者 トリネ スコウルンド リゲ ネールブ

デンマーク国, フレデリクススンド, デーコー 3 6 0 0, ベーゲレ 2 7

(72)発明者 ケルド フォスゲラウ

デンマーク国, レズオブレ, デーコー - 2 7 2 0, リングホルムバイ 4 5

(72)発明者 トルベン エステルルンド

スウェーデン国, ルンド, エス - 2 2 4 7 2, オルケステルベージェン 2 8

(72)発明者 ドルテ レネルト クリステンセン アルムホルト

デンマーク国, グレーベ, デーコー - 2 6 7 0, ゴッドスケバルケン 1 1 1

(72)発明者 ロネ フロスト ラーセン

デンマーク国, シャーロテンルン, デーコー - 2 9 2 0, ソメルバイ 1 4

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 特表2007-525495(JP, A)

国際公開第2007/095737(WO, A1)

特開2010-265294(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 K 3 8 / 1 6

A 6 1 P 1 / 0 4

A 6 1 P 1 / 1 8

A 6 1 P 3 / 0 0

A 6 1 P 3 / 0 4

A 6 1 P 3 / 0 6

A 6 1 P 3 / 1 0

A 6 1 P 9 / 0 0

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 9 / 1 2

A 6 1 P 1 3 / 1 2

A 6 1 P 2 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

W P I D S / W P I X ( S T N )

P u b M e d