

(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2004-534850

(P2004-534850A)

(43) 公表日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/56</b>	C O 7 K 7/56	4 C O 8 4
<b>A61K 38/00</b>	A 6 1 P 3/04	4 H O 4 5
<b>A61P 3/04</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1
<b>A61P 43/00</b>	C O 7 K 7/64	
<b>C07K 7/64</b>	A 6 1 K 37/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)		

(21) 出願番号	特願2003-512363 (P2003-512363)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成14年7月8日 (2002.7.8)		メルク エンド カムパニー インコーポ レーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月9日 (2004.1.9)		MERCK & COMPANY INC OPERATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/021443		アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ ュー 126
(87) 国際公開番号	W02003/006604	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成15年1月23日 (2003.1.23)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/304, 958	(74) 代理人	100113332
(32) 優先日	平成13年7月12日 (2001.7.12)		弁理士 一入 章夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), CA, JP, U S		弁理士 小野 誠
(特許庁注：以下のものは登録商標)		最終頁に続く	
テフロン			

(54) 【発明の名称】 強力な選択的メラノコルチン-4 受容体アゴニストとしての環状ペプチド

## (57) 【要約】

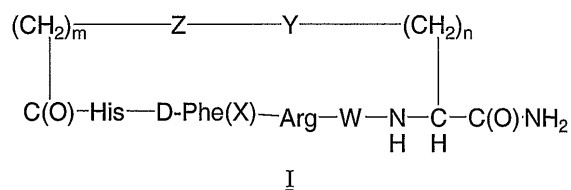
式(I)の環状ペプチドは、メラノコルチン-4 受容体の強力な選択的アゴニストであり、従って、MC-4 受容体の生理学的な役割を確認するための研究用ツールとして有用であり、また、MC-4 受容体が介在する障害又は疾患を診断、治療又は予防するのに有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 (I) :

## 【化 1】



10

[式中、

HisはL-ヒスチジルであり；

D-Phe(X)は、パラ位が場合によりF、Cl、Br、Me及びOMeから選択される基で置換されていてもよいD-フェニルアラニルであり；

ArgはL-アルギニルであり；

Wは、L-トリプトファン又は2-ナフチル-L-アラニルであり；

YとZの一方は-C(O)-であって、他方は-NH-であり；

mは1～4であり；

nは1～4であるが、但し、n+mは4～6である]

で表される化合物又はその塩。

20

## 【請求項 2】

Zが-C(O)-であって、Yが-NH-である、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 3】

mが2である、請求項2に記載の化合物。

## 【請求項 4】

nが2～3である、請求項2に記載の化合物。

## 【請求項 5】

mが2であり且つnが2である、請求項2に記載の化合物。

## 【請求項 6】

D-Phe(X)が、パラ位が場合により塩素で置換されていてもよいD-フェニルアラニルである、請求項2に記載の化合物。 30

## 【請求項 7】

Yが-C(O)-であって、Zが-NH-である、請求項1に記載の化合物。

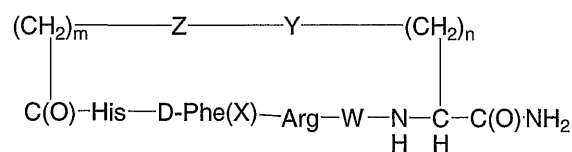
## 【請求項 8】

mが2であり且つnが2である、請求項7に記載の化合物。

## 【請求項 9】

下記から選択される請求項1に記載の化合物。

## 【表 1】



40

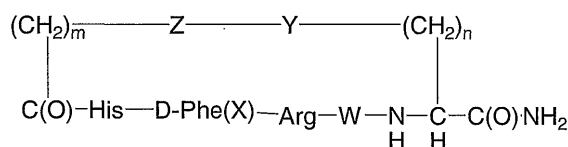
Z	Y	X	W	m	N
C(O)	NH	H	Trp	2	4
C(O)	NH	H	Trp	2	2
C(O)	NH	H	Trp	2	1
C(O)	NH	パラ-Cl	Trp	2	4
C(O)	NH	H	2-Nal	2	4

50

## 【請求項 10】

下記から選択される請求項 1 に記載の化合物。

## 【表 2】



Z	Y	X	W	m	N
NH	C(O)	H	Trp	4	2
NH	C(O)	H	Trp	3	2
NH	C(O)	H	Trp	2	2
NH	C(O)	H	Trp	1	2

10

## 【請求項 11】

ヒトにおける肥満を予防又は治療する方法であって、前記ヒトに薬理的に有効な量の請求項 1 に記載の化合物を投与することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 に記載の化合物及び製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒトのメラノコルチン-4 受容体の強力な選択的アゴニストである環状ペプチドを提供する。

## 【背景技術】

## 【0002】

メラノコルチンペプチド又はメラノトロピン、 $\alpha$ -MSH、 $\beta$ -MSH、 $\gamma$ -MSH 及び ACTH は、脊椎動物、哺乳動物及びヒトの体内で多くの生理学的機能に参与している。それらは、皮膚の色素沈着及びステロイド産生を調節し、免疫反応及び学習プロセスを調節し、エネルギーバランス、神経の成長と再生及び別の幾つかの機能に影響を及ぼす。

30

## 【0003】

ヒトでは、メラノトロピンと相互作用する 5 種類の受容体 (hMC-1R ~ hMC-5R) が知られている。これらの受容体は、7 ヘリックス膜貫通型受容体であり、G タンパク質共役型受容体のスーパーファミリーに属する。これらの受容体が活性化されると、cAMP が増加する。メラノコルチン受容体 1、3、4 及び 5 は、 $\alpha$ -MSH、 $\beta$ -MSH 及び  $\gamma$ -MSH を認識するが、メラノコルチン受容体 2 は ACTH のみを認識する。

## 【0004】

最近では、中枢神経系で広範に発現されるメラノコルチン受容体 3 及び 4 や、脳及び種々の末梢組織において見出されるメラノコルチン受容体 5 が多くの注目を集めている。hMC-3R 及び hMC-5R の生理学的な役割は充分には明らかにされていないが、最近、hMC-5R が外分泌腺において脂質及びフェロモンの産生を制御するのに参与していることが示された。急激に増加している薬理的及び遺伝的な証拠は、hMC-4R が齧歯類のエネルギーバランス及び体重の調節に参与していることを示唆している。摂食及び体重の調節における MC-4R の役割は、ラットへのアゴニスト/アンタゴニスト投与から得られた結果及びマウスの遺伝学から得られた結果によって支持される。アゴニスト MTII を脳室内投与することにより食物摂取量は減少し、逆に、アンタゴニスト SHU9119 により、食物摂取量及び体重は増加した。メラノコルチン受容体 4 が遺伝的に欠失しているマウスは肥満になる。従って、MC-4R に活性を示す化合物は、摂食障害の治療に有効であることが予測された。

40

## 【0005】

50

メラノコルチン受容体 4 は、さらに、別の生理学的機能、即ち、グルーミング行動、勃起及び血圧の制御においても役割を果たしているように見える。しかしながら、天然ホルモンであるメラノトロピンは、h M C - 3 R ~ h M C - 5 R に対する親和性が比較的小さく、特に選択性を有するわけではない。メラノコルチン受容体 4 の生理学的機能を、脳内の別のメラノコルチン受容体、特に M C - 3 R の生理学的機能から識別するためには、強力な選択的アンタゴニストが必要である。現在利用可能な合成リガンドは、複数のメラノコルチン受容体を区別しない。頻繁に使用される研究用ツールは S H U 9 1 1 9 ペプチドであり、これは、メラノコルチン受容体 3 及び 4 の強力なアンタゴニストであり、且つ、メラノコルチン受容体 5 のアゴニストである。S H U 9 1 1 9 は、インピトロ及びインピボで広範囲にわたり研究されている。このペプチドの注入は、ラットの摂食を刺激する。同様のラクタム誘導体であるペプチド M T I I は、h M C - 3 R ~ h M C - 5 R の強力な非選択的アゴニストである。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、ヒトのメラノコルチン-4 受容体の強力な選択的アゴニストである環状ペプチドを提供する。これらの化合物は、M C - 4 受容体の生理学的な役割を確認するための研究用ツールとして有用であり、また、M C - 4 受容体が介在する障害又は疾患を診断、治療又は予防するのに有用である。

【課題を解決するための手段】

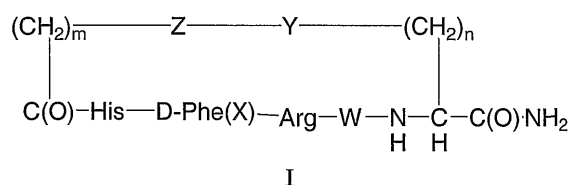
20

【0007】

本発明は、式(1)：

【0008】

【化1】



30

[式中、

HisはL-ヒスチジルであり；

D-Phe(X)は、パラ位が場合によりF、Cl、Br、Me及びOMeから選択される基で置換されていてもよいD-フェニルアラニルであり；

ArgはL-アルギニルであり；

Wは、L-トリプトファニル又は2-ナフチル-L-アラニルであり；

YとZの一方は-C(O)-であって、他方は-NH-であり；

mは1～4であり；

nは1～4であるが、但し、n+mは4～6である]

で表される化合物又はその塩を提供する。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

式(1)の一実施態様において、Zは-C(O)-であって、Yは-NH-である。前記実施態様の一サブセットにおいて、mは2である。前記実施態様の別のサブセットにおいて、nは2～4である。前記実施態様の別のサブセットにおいて、D-Phe(X)は、パラ位が場合により塩素で置換されていてもよいD-フェニルアラニルである。

【0010】

別の実施態様において、Yは-C(O)-であって、Zは-NH-である。前記実施態様の一サブセットにおいて、nは2である。前記実施態様の別のサブセットにおいて、mは2～4である。前記実施態様の別のサブセットにより、WがL-トリプトファニルであり、且つ

50

、D-Phe(X)がD-フェニルアラニルである化合物が提供される。

【0011】

本発明の化合物は、メラノコルチン-4受容体の強力な選択的アゴニストであり、従って、メラノコルチン-4受容体の生理学的な役割を研究するための分析的研究用のツールとして有用である。さらに、本発明の化合物は、MC-4受容体の活性化によって緩和され得る疾患及び障害、特に摂食障害に関連する疾患及び障害を、診断、治療及び予防するのに有用である。

【0012】

分析目的及び診断目的のために、本発明化合物は、放射性標識などの放射性形態で使うことができる。特に、本発明の化合物は、放射性ヨウ素若しくはトリチウム又は別の適切ないずれかの放射性核種を組み込むように製造し得る。このような放射性標識化合物は、特異的メラノコルチン受容体を定量するため、メラノコルチン受容体の特定のサブタイプと競合する薬物の解離定数( $K_i$ 又は $K_d$ )を分析するため、及び、例えば受容体オートラジオグラフィー技術の使用により、組織及び組織切片中のMC-受容体の存在部位を測定するための放射性リガンド結合に使用することができる。放射性リガンド結合及び受容体オートラジオグラフィーの原理は、当技術分野ではよく知られている。代替的な方法として、本発明化合物は、物質を検出し得る任意の別のタイプの標識、例えば、蛍光標識又はビオチンなどを用いて標識し、得られた化合物を、放射性標識化合物と同様の目的に使用してもよい。

【0013】

本発明化合物は、さらに、光、特に紫外線によって活性化され得る基を組み込むように製造することもできる。そのような活性化の目的は、光親和性標識技術を用いることによるMC-受容体の共有結合標識に有用な化合物を得ることである。光親和性標識は、当技術分野でよく知られている技術であり、本発明においては、MC-受容体の構造及び位相的な構成を解明するのに有用である。本発明化合物のこのような光活性誘導体も本発明の一部を構成する。さらに、本発明化合物の光活性誘導体は、好ましくは、容易に検出可能な基又は標識、例えば、放射性原子、蛍光性基及び/又はビオチンなどを組み込むように製造してもよい。

【0014】

本発明化合物は、ガンマ線及び/又は陽電子を放出する1種又は複数種の同位体で標識することができる。そのように標識された化合物は、本発明の極めて特定の実施態様であり、動物、好ましくはヒトに対して、全身的又は局所的に投与し得る。これらの標識された化合物は、公知技術を用いて、MC-受容体のインビボにおけるレベル及び/又は存在部位を画像化するのに有用である。前記公知技術としては、シンチグラフィー、陽電子放射断層撮影法(PET)及びシングルフォトン断層撮影法(SPECT)などがある。このような方法を用いて、検査対象である動物又はヒトの組織中における特定のMC-受容体の分布及び/又は量に関する情報が得られる。そのような情報は、疾患、特に、MC-受容体に関連する脳内の機能障害を診断するのに有用である。

【0015】

分析及び診断における有用性に加えて、本発明のペプチドは、MC-4受容体において天然のメラノトロピン(例えば、 $\alpha$ -MSH)に対する細胞の正常な生理学的反応を活性化するのにも使用し得る。従って、式(I)の化合物は、MC-4受容体の活性化に対して反応性の疾患、障害又は状態を治療、制御又は予防するのに有用であり、例えば、肥満や、さらに、雄及び雌の性的機能不全などを予防及び治療するのに有用である。

【0016】

本発明の別の態様により、式(I)の化合物及び製薬上許容される担体を含む医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、有効成分として式(I)の化合物又はその製薬上許容される塩を含有し、さらに、製薬上許容される担体及び場合により別の治療用成分を含有し得る。「製薬上許容される塩」という用語は、無機の塩基又は酸及び有機の塩基又は酸を包含する製薬上許容される非毒性の塩基又は酸から調製された塩を意味する。

## 【0017】

本発明の組成物には、経口投与、直腸内投与、局所投与、非経口投与(皮下投与、筋肉内投与及び静脈内投与など)、眼内投与、肺内投与(鼻腔内吸入又は口腔内吸入)又は鼻腔内投与に適した組成物が包含されるが、任意の所与のケースにおける最適の投与経路は、治療しようとする状態の種類及び重症度並びに有効成分の種類に依存する。本発明の組成物は、好都合には、単位投与形態で提供し得、調剤の技術分野でよく知られている任意の方法で調製し得る。

## 【0018】

実際の使用においては、有効成分としての式(1)の化合物を、慣習的な医薬配合技術に従って製薬用担体と一緒にして十分に混合することができる。前記担体は、例えば経口投与又は非経口投与(静脈内投与など)の投与に望ましい調製物の形態に応じて様々な形態を有し得る。本発明の組成物を経口投与形態に調製する場合、例えば、懸濁液剤、エリキシル剤又は溶液剤などの経口用液体調製物の場合には、例えば、水、グリコール、油、アルコール、香味剤、保存剤及び着色剤などの慣用の任意の製薬用媒体を使用でき；又は、例えば、散剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤及び錠剤などの経口用固体調製物の場合には、デンプン、糖及び微晶質セルロースなどの担体、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤及び崩壊剤などを使用することができる。液体調製物よりも経口用固体調製物の方が好ましい。

10

## 【0019】

投与が容易であるという理由で、錠剤及びカプセル剤は、最も有利な経口用単位投与形態であり、この場合、明らかに固体製薬用担体を使用する。望ましい場合には、錠剤は、水性又は非水性の標準的な技術によりコーティングし得る。上記のような組成物及び調製物は、少なくとも0.1%の活性化合物を含有している。もちろん、これらの組成物中の活性化合物のパーセンテージは変えることが可能であり、都合よくは、上記単位投与形態の約2重量%～約60重量%であり得る。このような治療に有用な組成物中の活性化合物の量は、有効な投与量が得られるような量である。上記活性化合物は、さらに、例えば、液滴又はスプレーなどの形態で、鼻腔内投与することもできる。

20

## 【0020】

錠剤、丸剤及びカプセル剤などは、さらに、トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチ又はゼラチンのような結合剤；リン酸二カルシウムのような賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤；及び、スクロース、ラクトース又はサッカリンのような甘味剤も含有し得る。単位投薬形態がカプセルである場合、該カプセルは、上記種類の物質に加えて、脂肪油のような液体担体を含有し得る。

30

## 【0021】

コーティングとして、又は、投与単位の物理的形態を改変するために、種々の別の物質が存在してもよい。例えば、錠剤を、シェラック、糖又はシェラックと糖の双方によってコーティングしてもよい。シロップ剤又はエリキシル剤は、有効成分に加えて、甘味剤としてのスクロース、保存剤としてのメチル及びプロピルパラベン、色素、及び、チェリー風味又はオレンジ風味のような香味剤を含有し得る。

## 【0022】

また、式(1)の化合物は、非経口的に投与してもよい。これらの活性化合物の溶液又は懸濁液は、ヒドロキシ-プロピルセルロースなどの界面活性剤と適宜混合した水の中で調製することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール及びそれらの油中混合物中で調製することができる。通常の保存条件下及び使用条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含有する。

40

## 【0023】

注射可能な用途に適する製薬形態としては、無菌の水溶液又は水性分散液、及び、無菌の注射可能な溶液又は分散液を用時調製するための無菌の粉末などがある。いずれの場合にも、当該形態は、無菌であること、及び、容易に注射することができる程度の流動性を有することが要求される。当該形態は、製造及び保存の条件下で安定でなければならず、細

50

菌類及び真菌類のような微生物の汚染作用に対して保護されていなければならない。前記担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物及び植物油などを含む溶媒又は分散媒体であることができる。

#### 【0024】

薬理的に有効な量は、体重1kg当たり、0.001mg/日～1,000mg/日の範囲で変わり得る。本発明化合物の有効な投与量を、哺乳動物、特にヒトに与えるために、任意の適切な投与経路を使用し得る。例えば、経口投与、直腸内投与、局所投与、非経口投与、眼内投与、肺内投与及び鼻腔内投与などを採用し得る。投与形態としては、錠剤、トローチ剤、分散液剤、懸濁液剤、溶液剤、カプセル剤、クリーム剤、軟膏剤及びエアゾールなどがある。使用される有効成分の有効な投与量は、使用される特定の化合物、投与方法、治療される状態及び治療される状態の重症度に応じて変化し得る。そのような投与量は、当業者が容易に確認し得る。

10

#### 【0025】

以下の実施例は、本発明を例証するために提供されており、決して本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

#### 【実施例】

#### 【0026】

#### 実施例1～実施例9

#### 環状ペプチドの合成

20

p-メトキシベンズヒドリルアミン樹脂上のペプチジル鎖の延長は、431A ABIペプチドシンセサイザーで行った。製造業者から提供されたプロトコルを応用して、N-メチルピロリドン(NMP)中でアミノ酸のヒドロキシベンゾトリアゾールエステルをカップリングさせた。半永久的な -アミノ保護基としてt-ブチルオキシカルボニル(Boc)基を使用し、側鎖保護基は、アルギニンにはトシル、ヒスチジンにはベンジルオキシメチル、リシンにはフルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、アスパラギン酸にはフルオレニルメチル(Fm)であった。シンセサイザーでの鎖の形成は、N-末端残基のアセチル化によって完了した。ペプチジル樹脂を容器に移し、NMP中の20%ピペリジンを用いて、手動操作でFmoc基及びFm基を除去した(室温で20分間)。

#### 【0027】

30

環化するために、ペプチジル樹脂を十分に洗浄し、次いで、NMP中の5倍過剰量のベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBoc)及び6倍過剰量のジイソプロピルエチルアミンと一緒に一晩撹拌した。Kaiser試験で陰性が観察されるまで前記手順を繰り返した。ペプチジル樹脂をNMP及びメタノールで洗浄し、乾燥させ、スカベンジャーとしてのアニソール(又はp-クレゾール)の存在下における液体フッ化水素(9:1, v/v)で処理した。0 で1時間維持した後、減圧下にフッ化水素を除去し、樹脂をエーテルで洗浄し、氷酢酸で抽出し、抽出物を凍結乾燥させた。得られた未精製ペプチドを、全自動Wisp 712インジェクター及び991フォトダイオードアレイ検出装置の付いたWaters 600Eシステムに接続したC18 Vydacカラム上の分析用逆相高圧液体クロマトグラフィー(RP HPLC)によって分析した。分析には、30分間での0～100%緩衝液Bの標準勾配系(G1)、及び、30分間での20～80%緩衝液Bの勾配(G2)を使用した。緩衝液Aは、水中の0.1%トリフルオロ酢酸であり、緩衝液Bは、アセトニトリル中の0.1%トリフルオロ酢酸であった。HPLCプロファイルを210nm及び280nmで記録した。半分取C18 RP Watersカラムの付いたWaters Delata Prep 40000システムで分取的分離を行った。水及びアセトニトリルの上記溶媒系を60分間での20～80%緩衝液Bの勾配(G3)で分離に使用した。

40

#### 【0028】

数種類の化合物について、ペプチジル樹脂を容器に移し、N-メチルピロリドン中の6倍過剰量の無水コハク酸及び6倍過剰量のジイソプロピルエチルアミンと一緒に、Kaiser

50

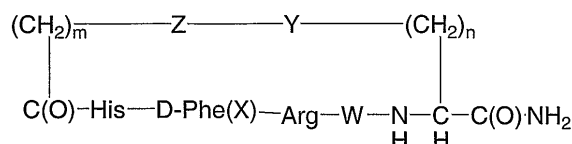
試験で陰性が観察されるまで攪拌し、次いで、N-メチルピロリドン及びメタノールで十分に洗浄した。続いて、Fmoc基の除去、環化、脱保護、樹脂からのペプチドの切断及び粗生成物の精製を上記と同様に行った。

#### 【0029】

クロマトグラフィー的に均質な化合物を、アミノ酸分析及びエレクトロスプレー質量分析法によって分析した。正確な質量をエレクトロスプレー質量分析法(Hewlett Packardシリーズ 1100 MSD質量分析計)によって確認した。上記の一般的な手順に従って調製した化合物の例を下記表に示す。

#### 【0030】

【表1】



実施例	Z	Y	X	W	m	N
1	C(O)	NH	H	Trp	2	4
2	C(O)	NH	H	Trp	2	2
3	C(O)	NH	H	Trp	2	1
4	C(O)	NH	パラ-Cl	Trp	2	4
5	C(O)	NH	H	2-Nal	2	4
6	NH	C(O)	H	Trp	4	2
7	NH	C(O)	H	Trp	3	2
8	NH	C(O)	H	Trp	2	2
9	NH	C(O)	H	Trp	1	2

#### 【0031】

##### 実施例10

##### 競合的結合アッセイ

本発明ペプチドのアゴニスト活性を受容体結合アッセイで評価した。未精製の膜調製物は、ヒトのMC3受容体、MC4受容体及びMC5受容体を発現しているチャイニーズハムスター卵巣細胞から得た。細胞を、CaCl<sub>2</sub>又はMgCl<sub>2</sub>を欠いているリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)で洗浄し、次いで、酵素非含有解離媒体(Specialty Media, Lavellette, NJ, USA)で分離させた。細胞を、2800×gで10分間ペレット化し、5μg/mLのロイペプチン、5μg/mLのアプロチニン、40μg/mLのパシトラシン及び25μg/mLのペファブロック(Boehringer Mannheim)を加えた膜緩衝液(20mMのトリス、pH7.2、5mMのエチレンジアミン四酢酸)に再懸濁させた。低速ガラスホモジェナイザー中のモーター駆動テフロン被覆乳棒を使用して10ストロークで細胞を上記膜緩衝液中に懸濁させた。得られた細胞懸濁液を4で20分間4100×gで遠心した。得られたペレットを、タンパク質分解酵素阻害剤を加えた新しい膜緩衝液に再懸濁させ、アリコートに分け、液体窒素中で急速凍結し、-80で保存した。得られた未精製の膜を滴定して、結合試験を行うのに必要な最適レベルを決定した。

#### 【0032】

結合反応物(総容積=250μL)は、MBB(50mMのトリス、pH7.2、2mMのCaCl<sub>2</sub>、1mMのMgCl<sub>2</sub>)、0.1%のウシ血清アルブミン、ヒトのMC3受容体、MC4受容体又はMC5受容体を発現している細胞から調製した未精製膜、200pMの[125I]-NDP--MSSH(Amersham, Arlington Heights, IL, USA)、及び、ジメチルスルホキシドに溶解させた増加する濃度の未標識被験化合物(最終濃度=2%)を含んでいた。反応物を、振盪することなく1時間インキュベーションし、次いで、96-ウェルフィ

10

20

30

40

50



ルタープレート (Packard) で濾過し、1 % のポリエチレンジアミンに予浸した。フィルターを T N E 緩衝液 (50 mM のトリス, pH 7.4, 5 mM のエチレンジアミン四酢酸、150 mM の NaCl) で 3 回洗浄し、乾燥させ、Topcountシンチレーションカウンター (Packard) 中で Microscint-20 を使用してカウントした。2  $\mu$ m の未標識 NDP - - M S H (Peninsula Laboratories) の存在下で非特異的結合を測定した。結合データを GraphPad カーブフィッティングソフトウェア (PRISM, San Diego, California) で分析した。前記データは以下の表に示してある。独立した 3 つの実験によって活性ペプチドを評価した。

#### 【0033】

##### 実施例 11

##### cAMP アッセイ

ヒトのメラノコルチン受容体を発現しているチャイニーズハムスター卵巣細胞を、カルシウム及びマグネシウムを含まない P B S (Life Technologies) で洗浄し、酵素非含有解離緩衝液 (S-014-B, Specialty Media) と一緒に 5 分間インキュベーションすることにより組織培養フラスコから分離した。細胞を遠心によって収集し、10 mM の 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸 (Hepes) 緩衝液、pH 7.5、5 mM の MgCl<sub>2</sub>、1 mM のグルタミン及び 1 mg/mL のウシ血清アルブミンを加えたアールの平衡塩類溶液 (Life Technologies) に、1 ~ 5 × 10<sup>6</sup> 細胞/mL の濃度に再懸濁させた。その後、細胞をカウントし、細胞懸濁液を、ホスホジエステラーゼ阻害剤である 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (0.6 mM 以下の濃度) で処理した。

#### 【0034】

被験化合物をジメチルスルホキシド (DMSO, 10<sup>-3</sup> ~ 10<sup>-8</sup> M) に溶解し、緩衝液で希釈し、得られた溶液の 0.1 容積を 0.9 容積の上記細胞懸濁液 (1 ~ 5 × 10<sup>5</sup> 細胞) に添加した。DMSO の最終濃度は 1 % であった。室温で 45 分間維持した後、100 で 5 分間インキュベーションすることによって細胞を溶解させ、蓄積された cAMP を遊離させた。Amersham (Arlington Heights, IL) cAMP 検出アッセイキット (RPA556) を用いて、細胞溶解液のアリコート中の cAMP の蓄積を測定した。被験化合物にตอบสนองして産生された cAMP の量を、100 % アゴニストであると定義されている - M S H にตอบสนองして産生された cAMP の量と比較した。全ての活性ペプチドについて、独立した 3 つの実験で特性決定した。

#### 【0035】

本発明の代表的な化合物についての結合アッセイ及び cAMP アッセイ (それぞれ、実施例 10 及び実施例 11) の結果を以下に示す。

#### 【0036】

##### 【表 2】

実施例	結合アッセイ IC <sub>50</sub> (nM)			CAMP アッセイ EC <sub>50</sub> (nM)		
	hMC-3R	hMC-4R	hMC-5R	hMC-3R	hMC-4R	hMC-5R
1	418	25	3103	110	3.3	1180
2	1800	35	7200	240	2.9	2200
3	1600	71	3600	590	33	12% @ 5
4	17	1.7	92	40	0.74	170
5	440	13	>20000	360	3.7	>5000
6	580	12	9000	190	2.7	1900
7	1830	41	>5000	310	5.7	>5000
8	450	4	5050	59	0.53	1900
9	>1000	290	>1000	2200	35	15% @ 5

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 03/006604 A2**

- (51) International Patent Classification: C12N A, [US/US]: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/21443
- (22) International Filing Date: 8 July 2002 (08.07.2002) (74) Common Representative: MERCK & CO., INC.; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): CA, JP, US.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (30) Priority Data: 60/304,958 12 July 2001 (12.07.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK & CO., INC. [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): BEDNAREK, Maria,
- Published:**  
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/006604 A2

(54) Title: CYCLIC PEPTIDES AS POTENT AND SELECTIVE MELANOCORTIN-4 RECEPTOR AGONISTS

(57) Abstract: Cyclic peptides of formula I are potent and selective agonists of melanocortin-4 receptors, and as such are useful research tool for the determination of the physiological roles of the MC-4 receptor, as well as for the diagnoses, treatment or prevention of disorders or diseases mediated through the MC-4 receptor.

WO 03/006604

PCT/US02/21443

TITLE OF THE INVENTIONCYCLIC PEPTIDES AS POTENT AND SELECTIVE MELANOCORTIN-4  
RECEPTOR AGONISTS5 BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Melanocortin peptides or melanotropins,  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH and ACTH, are involved in many physiological functions in vertebrates, mammals and in man. They regulate skin pigmentation and steroid production, modulate immune responses and learning processes, influence energy balance, growth and regeneration of nerves, and several other functions as well.

15 Five human receptors are known which interact with melanotropins, hMC-1R to hMC-5R. The receptors are seven-helix transmembrane-spanning receptors and belong to the superfamily of G protein-coupled receptors; their activation leads to elevation of cAMP. The melanocortin receptors 1, 3, 4 and 5 recognize  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH and  $\gamma$ -MSH, while melanocortin receptor 2 recognizes only ACTH.

20 Considerable attention has recently focused on melanocortin receptors 3 and 4 that are widely expressed in the central nervous system, and also on melanocortin receptor 5, found in the brain and in various peripheral tissues. The physiological role of hMC-3R and hMC-5R is not well defined, although hMC-5R has recently been implicated in control of lipid and pheromone production in exocrine glands. Rapidly growing pharmacological and genetic evidence suggests that  
25 hMC-4R is involved in regulation of the energy balance and body weight in rodents. The role of MC-4R in regulation of food intake and body weight is supported by results obtained from agonist/antagonist administration in rats and from murine genetics. Intraventricular administration of the agonist MTII reduced food intake and  
30 conversely, the antagonist SHU9119 increased food intake and body weight. Mice genetically deficient in the melanocortin receptor 4 develop obesity. It could be anticipated therefore that compounds active at MC-4R might be useful in the treatment of eating disorders.

WO 03/006604

PCT/US02/21443

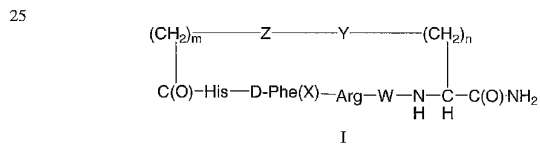
Melanocortin receptor 4 appears to play a role in other physiological functions as well, namely in controlling grooming behavior, erection and blood pressure. The natural hormones, melanotropins, however, have relatively low affinity for hMC3-5R and are not particularly selective. In order to differentiate the physiological role of melanocortin receptor 4 from that of other melanocortin receptors in the brain, in particular from MC-3R, potent and selective antagonists are necessary. The synthetic ligands available at present do not distinguish between the melanocortin receptors. A frequently used research tool is the SHU9119 peptide, a potent antagonist at melanocortin receptors 3 and 4, and an agonist at melanocortin receptor 5. SHU9119 has been extensively studied *in vitro* and *in vivo*; injection of this peptide stimulates food intake in rats. A similar lactam derivative, the peptide MTII is a potent but non-selective agonist at hMC3-5R.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides cyclic peptides that are potent and selective agonists of the human melanocortin-4 receptor. These compounds are useful as research tool for the determination of the physiological roles of the MC-4 receptor, as well as for the diagnosis, treatment or prevention of disorders or diseases mediated through the MC-4 receptor.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides compounds of the formula I



wherein,

His is L-histidyl;  
 D-Phe(X) is D-phenylalanyl optionally para-substituted with a group selected from F, Cl, Br, Me, OMe;

WO 03/006604

PCT/US02/21443

Arg is L-arginyl;  
 W is L-tryptophanyl or 2-naphthyl-L-alanyl;  
 one of Y and Z is -C(O)- and the other is -NH-;  
 m is 1 to 4;

- 5 n is 1 to 4, provided that n+m is 4 to 6; or  
 a salt thereof.

- In one embodiment of formula I, Z is -C(O)- and Y is -NH-. In one subset thereof m is 2. In another subset thereof n is 2 to 4. In another subset thereof,  
 10 D-Phe(X) is D-phenylalanyl optionally para-substituted with chlorine.

- In another embodiment Y is -C(O)- and Z is -NH-. In one subset thereof n is 2. In another subset thereof m is 2 to 4. Another subset thereof provides compounds where W is L-tryptophanyl and D-Phe(X) is D-phenylalanyl.  
 15

- Compounds of the present invention are potent and selective agonists of the melanocortin-4 receptor, and as such are useful as analytical research tool for the study of the physiological roles of the melanocortin-4 receptor. In addition, compounds of the present invention are useful for the diagnosis, treatment and  
 20 prevention of diseases and disorders that may benefit from the activation of the MC-4 receptor, in particular diseases and disorders related to eating disorders.

- For analytical and diagnostic purposes the compounds of the present invention can be used in radioactive form, including radioactive labels. In particular  
 25 the compounds of the invention may be manufactured so as to incorporate radioactive iodine or tritium, or any other suitable radio nuclide. Such a radioactively labeled compound can be used in radioligand binding for the the quantification of specific melanocortin receptors, for the analysis of dissociation constant ( $K_d$ s or  $K_{ds}$ ) of drugs competing with specific subtypes of melanocortin receptors, and for the localization  
 30 of MC-receptors in tissues and tissue sections e.g. by use of receptor autoradiographic techniques. Principles of radioligand binding and receptor autoradiography are well known in the art. As an alternative the compound may be labeled with any other type of label that allows detection of the substance, e.g. a fluorescent label or biotin, and the resulting compound be used for the similar purpose as the radioactively labeled  
 35 compound.

WO 03/006604

PCT/US02/21443

The compounds of the invention can also be manufactured so as to incorporate a group that can be activated by light, in particular UV-light, the purpose with such activation being to obtain a compound useful for covalent labeling of MC-receptor by use of the photoaffinity labeling technique. Photoaffinity labeling is a technique well known in the art which in the present context is useful for elucidating the structure and topological organisation of the MC-receptors. Thus photoactive derivatives of the compounds of the invention are also part of the present invention. Moreover, preferably photoactive derivatives of the compounds of the invention may also be made to incorporate an easily detectable group or label, such as e.g. a radioactive atom, a fluorescent group and/or biotin.

The compounds of the invention can be labeled with gamma and/or positron emitting isotope(s). Such labeled compounds constitute very specific embodiments of the invention and may be administered systematically, or locally, to an animal, preferably a human. These labeled compounds are useful for imaging the in vivo levels and/or localization of MC-receptors by the use of well known techniques among which may be mentioned Scintigraphy, Positron Emission Tomography (PET) and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT). Using such methods information on the distribution and/or quantities of the specific MC-receptors in tissues of the animal or human subject to the investigation is obtained, and such information is of value for diagnosis of disease, in particular functional disturbances in the brain related to MC-receptors.

In addition to analytical and diagnostic utilities, peptides of the present invention may also be used to activate the normal physiological response of cells to natural melanotropin (e.g.,  $\alpha$ -MSH) at the MC-4 receptor. Accordingly, compounds of formula I are useful in the treatment, control or prevention of diseases, disorders or conditions responsive to the activation MC-4 receptor such as the prevention and treatment of obesity, as well as male and female sexual dysfunction.

Another aspect of the present invention provides pharmaceutical compositions which comprises a compound of Formula I and a pharmaceutically acceptable carrier. The pharmaceutical compositions of the present invention comprise a compound of Formula I as an active ingredient or a pharmaceutically

WO 03/006604

PCT/US02/21443

acceptable salt thereof, and may also contain a pharmaceutically acceptable carrier and optionally other therapeutic ingredients. The term "pharmaceutically acceptable salts" refers to salts prepared from pharmaceutically acceptable non-toxic bases or acids including inorganic bases or acids and organic bases or acids.

5

The compositions include compositions suitable for oral, rectal, topical, parenteral (including subcutaneous, intramuscular, and intravenous), ocular (ophthalmic), pulmonary (nasal or buccal inhalation), or nasal administration, although the most suitable route in any given case will depend on the nature and severity of the conditions being treated and on the nature of the active ingredient. They may be conveniently presented in unit dosage form and prepared by any of the methods well-known in the art of pharmacy.

10

In practical use, the compounds of Formula I can be combined as the active ingredient in intimate admixture with a pharmaceutical carrier according to conventional pharmaceutical compounding techniques. The carrier may take a wide variety of forms depending on the form of preparation desired for administration, e.g., oral or parenteral (including intravenous). In preparing the compositions for oral dosage form, any of the usual pharmaceutical media may be employed, such as, for example, water, glycols, oils, alcohols, flavoring agents, preservatives, coloring agents and the like in the case of oral liquid preparations, such as, for example, suspensions, elixirs and solutions; or carriers such as starches, sugars, microcrystalline cellulose, diluents, granulating agents, lubricants, binders, disintegrating agents and the like in the case of oral solid preparations such as, for example, powders, hard and soft capsules and tablets, with the solid oral preparations being preferred over the liquid preparations.

15

20

25

Because of their ease of administration, tablets and capsules represent the most advantageous oral dosage unit form in which case solid pharmaceutical carriers are obviously employed. If desired, tablets may be coated by standard aqueous or nonaqueous techniques. Such compositions and preparations should contain at least 0.1 percent of active compound. The percentage of active compound in these compositions may, of course, be varied and may conveniently be between about 2 percent to about 60 percent of the weight of the unit. The amount of active compound in such therapeutically useful compositions is such that an effective dosage

30

35

WO 03/006604

PCT/US02/21443

will be obtained. The active compounds can also be administered intranasally as, for example, liquid drops or spray.

5 The tablets, pills, capsules, and the like may also contain a binder such as gum tragacanth, acacia, corn starch or gelatin; excipients such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, alginic acid; a lubricant such as magnesium stearate; and a sweetening agent such as sucrose, lactose or saccharin. When a dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier such as a fatty oil.

10

Various other materials may be present as coatings or to modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets may be coated with shellac, sugar or both. A syrup or elixir may contain, in addition to the active ingredient, sucrose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and a flavoring such as cherry or orange flavor.

15

Compounds of formula I may also be administered parenterally. Solutions or suspensions of these active compounds can be prepared in water suitably mixed with a surfactant such as hydroxy-propylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols and mixtures thereof in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

20

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g. glycerol, propylene glycol and liquid polyethylene glycol), suitable mixtures thereof, and vegetable oils.

25

30

Pharmacologically effective amounts may vary from 0.001 mg/day/kg body weight to 1,000 mg/day/kg body weight. Any suitable route of administration

35



WO 03/006604

PCT/US02/21443

may be employed for providing a mammal, especially a human with an effective dosage of a compound of the present invention. For example, oral, rectal, topical, parenteral, ocular, pulmonary, nasal, and the like may be employed. Dosage forms include tablets, troches, dispersions, suspensions, solutions, capsules, creams,

ointments, aerosols, and the like. The effective dosage of active ingredient employed may vary depending on the particular compound employed, the mode of administration, the condition being treated and the severity of the condition being treated. Such dosage may be ascertained readily by a person skilled in the art.

The following examples are provided to illustrate the present invention is not to be construed as limiting the invention in any manner.

#### EXAMPLES 1-9

##### 15 Synthesis of Cyclic Peptides

Elongation of peptidyl chains on p-methoxybenzhydrylamine resin was performed on a 431A ABI peptide synthesizer. Manufacturer-supplied protocols were applied for coupling of the hydroxybenzotriazole esters of amino acids in N-methylpyrrolidone (NMP). The tert-butyloxycarbonyl (Boc) group was used as a semi-permanent alpha-amino protecting group, whereas the side chain protecting groups were: tosyl for arginine, benzyloxymethyl for histidine, fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) for lysine, and fluorenylmethyl (Fm) for aspartic acid. Chain building on the synthesizer was concluded by acetylation of the N-terminal residue. The peptidyl resin was transferred into a vessel and Fmoc and Fm groups were manually removed with 20 % piperidine in NMP (20 minutes at room temperature).

For cyclization, the peptidyl resin was thoroughly washed, and then agitated overnight with 5-fold excess of benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBoc) and 6-fold excess of diisopropylethylamine in NMP. The procedure was repeated until a negative Kaiser test was observed. The peptidyl resin was washed with NMP and methanol, dried, and treated with liquid hydrogen fluoride in the presence of anisole (or p-cresol) as scavenger (9:1, v/v). After 1 hour at 0°C, hydrogen fluoride was removed *in vacuo*, the resin was washed with ether and extracted with glacial acetic acid, and the extract was

WO 03/006604

PCT/US02/21443

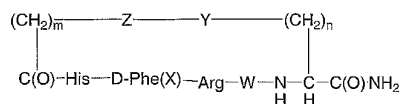
lyophilized. The crude peptide was analyzed by analytical reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP HPLC) on a C18 Vydac column attached to a Waters 600E system with automatic Wisp 712 injector and 991 Photodiode Array detector. A standard gradient system of 0-100% buffer B in 30 minutes (G1), and, a  
5 gradient of 20-80% buffer B in 30 minutes (G2) was used for analysis: buffer A was 0.1% trifluoroacetic acid in water and buffer B was 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile. HPLC profiles were recorded at 210 nm and 280 nm. Preparative separations were performed on a Waters Delata Prep 40000 system with a semipreparative C18 RP Waters column. The above-described solvent system of  
10 water and acetonitrile, in a gradient of 20-80 % buffer B in 60 minutes (G3) was used for separation.

For several compounds, the peptidyl resin was transferred into a vessel, agitated with 6-fold excess of succinic anhydride and 6-fold excess of  
15 diisopropylethylamine in N-methylpyrrolidone until a negative Kaiser test was observed, and then thoroughly washed with N-methylpyrrolidone and methanol. Subsequent removal of Fmoc group, cyclization, deprotection and cleavage of peptides from a resin, and purification of the crude products were performed as described above.

20 The chromatographically homogenous compounds were analyzed by amino acid analysis and electrospray mass spectrometry. Correct mass was identified by electrospray mass spectrometry (Hewlett Packard series 1100 MSD spectrometer). Examples of compounds prepared in accordance with the above general procedure are  
25 shown in the following Table.

WO 03/006604

PCT/US02/21443



Example	Z	Y	X	W	m	N
1	C(O)	NH	H	Trp	2	4
2	C(O)	NH	H	Trp	2	2
3	C(O)	NH	H	Trp	2	1
4	C(O)	NH	Para-Cl	Trp	2	4
5	C(O)	NH	H	2-Nal	2	4
6	NH	C(O)	H	Trp	4	2
7	NH	C(O)	H	Trp	3	2
8	NH	C(O)	H	Trp	2	2
9	NH	C(O)	H	Trp	1	2

## EXAMPLE 10

5

Competitive Binding Assay

The peptides of the present invention were evaluated for agonist activity in receptor binding assay. Crude membrane preparations were obtained from Chinese hamster ovary cells expressing human MC3, MC4, and MC5 receptors. Cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) lacking CaCl<sub>2</sub> or MgCl<sub>2</sub> (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), and then detached with enzyme-free dissociation media (Specialty Media, Lavellette, NJ, USA). Cells were pelleted at 2800 × g for 10 minutes and resuspended in membrane buffer (20 mM Tris, pH 7.2, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid) with 5 μg/ml leupeptin, 5 μg/ml aprotinin, 40 μg/ml bacitracin, and 25 μg/ml pefabloc (Boehringer Mannheim). The cells were doused with 10 strokes by using a motor-driven Teflon-coated pestle in a glass homogenizer at low speed. The resulting cell suspension was centrifuged at 4100 × g, 4°C, for 20 minutes. The pellet was resuspended in fresh membrane buffer with protease inhibitors, aliquoted, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

WO 03/006604

PCT/US02/21443

The resulting crude membranes were titrated to determine the optimal level necessary for performing binding studies.

- Binding reactions (total volume = 250  $\mu$ l) contained MBB (50 mM Tris, pH 7.2, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 0.1% bovine serum albumin, crude membranes prepared from cells expressing human MC3, MC4, or MC5 receptor, 200 pM of [ $^{125}\text{I}$ ]-NDP- $\alpha$ -MSH (Amersham, Arlington Heights, IL, USA), and increasing concentrations of unlabeled test compounds dissolved in dimethylsulfoxide (final concentration = 2%). Reactions were incubated for 1 hour without shaking and then filtered through 96-well filter plates (Packard), presoaked in 1% polyethyleneimine. Filters were washed 3 times with TNE buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 150 mM NaCl), dried and counted by using Microscint-20 in a Topcount scintillation counter (Packard). Nonspecific binding was determined in the presence of 2  $\mu$ M of unlabeled NDP- $\alpha$ -MSH (Peninsula Laboratories). Binding data were analyzed with GraphPad curve-fitting software (PRISM, San Diego, California) and are presented in the Table below. Active peptides were evaluated in three independent experiments.

#### EXAMPLE 11

20

##### cAMP Assays

- Chinese hamster ovary cells expressing a human melanocortin receptor were rinsed with calcium- and magnesium-free PBS (Life Technologies), and detached from the tissue culture flasks by 5-minutes incubation with enzyme-free dissociation buffer (S-014-B, Specialty Media). Cells were collected by centrifugation and resuspended in Earle's balanced salt solution (Life Technologies) with addition of 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes) buffer, pH 7.5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM glutamine, and 1 mg/ml bovine serum albumin to concentration of  $1-5 \times 10^6$  cells/ml. Subsequently, cells were counted and the cell suspension was treated with the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (to concentration of 0.6 mM).

WO 03/006604

PCT/US02/21443

A test compound was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO,  $10^{-3}$  to  $10^{-8}$  M), diluted with buffer, and 0.1 volume of the solution was added to 0.9 volumes of the cell suspension ( $1$  to  $5 \times 10^5$  cells); final concentration of DMSO was 1%. After 45 minutes at room temperature, cells were lysed by incubation at  $100^\circ\text{C}$  for 5 minutes to release accumulated cAMP. Accumulation of cAMP was measured in an aliquot of the cell lysate with the Amersham (Arlington Heights, IL) cAMP detection assay kit (RPA556). The amount of cAMP produced in response to a tested compound was compared to the amount of cAMP produced in response to  $\alpha$ -MSH, defined as a 100% agonist. All active peptides were characterized in three independent experiments.

Results of binding assay and cAMP assay (Examples 10 and 11, respectively) for representative compounds of the present invention are provided below:

15

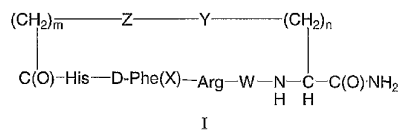
Ex	Binding Assay IC <sub>50</sub> (nM)			CAMP Assay EC <sub>50</sub> (nM)		
	hMC-3R	hMC-4R	hMC-5R	hMC-3R	hMC-4R	hMC-5R
1	418	25	3103	110	3.3	1180
2	1800	35	7200	240	2.9	2200
3	1600	71	3600	590	33	12% @ 5
4	17	1.7	92	40	0.74	170
5	440	13	>20000	360	3.7	>5000
6	580	12	9000	190	2.7	1900
7	1830	41	>5000	310	5.7	>5000
8	450	4	5050	59	0.53	1900
9	>1000	290	>1000	2200	35	15% @ 5

WO 03/006604

PCT/US02/21443

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound having the formula I:



wherein,

His is L-histidyl;

10 D-Phe(X) is D-phenylalanyl optionally para-substituted with a group selected from F, Cl, Br, Me, OMe;

Arg is L-arginyl;

W is L-tryptophanyl or 2-naphthyl-L-alanyl;

one of Y and Z is -C(O)- and the other is -NH-;

15 m is 1 to 4;

n is 1 to 4, provided that n+m is 4 to 6; or

a salt thereof.

2. A compound of Claim 1 wherein Z is -C(O)- and Y is -NH-.

3. A compound of Claim 2 wherein m is 2.

4. A compound of Claim 2 wherein n is 2 to 3.

5. A compound of Claim 2 wherein m is 2 and n is 2.

6. A compound of Claim 2 wherein D-Phe(X) is D-phenylalanyl optionally parasubstituted with chlorine.

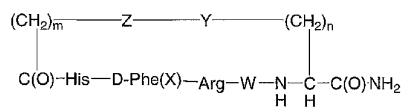
7. A compound of Claim 1 wherein Y is -C(O)- and Z is -NH-.

8. A compound of Claim 7 wherein m is 2 and n is 2.

WO 03/006604

PCT/US02/21443

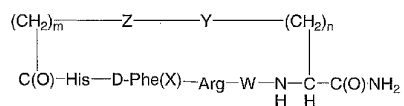
9. A compound of Claim 1 selected from:



5

Z	Y	X	W	m	N
C(O)	NH	H	Trp	2	4
C(O)	NH	H	Trp	2	2
C(O)	NH	H	Trp	2	1
C(O)	NH	Para-Cl	Trp	2	4
C(O)	NH	H	2-Nal	2	4

10. A compound of Claim 1 selected from:



10

Z	Y	X	W	m	N
NH	C(O)	H	Trp	4	2
NH	C(O)	H	Trp	3	2
NH	C(O)	H	Trp	2	2
NH	C(O)	H	Trp	1	2

11. A method for the prevention or treatment of obesity in a human which comprises administering to said human a pharmacologically effective amount of a compound of claim 1.

15

12. A pharmaceutical composition comprising a compound of Claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 03/006604 A3**

- (51) International Patent Classification: C07K 7/50 A, [US/US]: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/21443 (74) Common Representative: MERCK & CO., INC.; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).
- (22) International Filing Date: 8 July 2002 (08.07.2002) (81) Designated States (national): CA, JP, US.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/304,958 12 July 2001 (12.07.2001) US Published: — with international search report
- (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK & CO., INC. [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US). (88) Date of publication of the international search report: 2 October 2003
- (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): BEDNAREK, Maria, For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/006604 A3

(54) Title: CYCLIC PEPTIDES AS POTENT AND SELECTIVE MELANOCORTIN-4 RECEPTOR AGONISTS

(57) Abstract: Cyclic peptides of formula I are potent and selective agonists of melanocortin-4 receptors, and as such are useful research tool for the determination of the physiological roles of the MC-4 receptor, as well as for the diagnoses, treatment or prevention of disorders or diseases mediated through the MC-4 receptor.



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/21443
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07K 7/50 US CL : 530/317 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/317		
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 practicable, search terms used) WBST, CAS Online		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,054,556 A (HUBY et al) 25 April 2000 (25.04.2000), see entire document.	1-12
A	US 6,117,975 A (YAMADA et al) 12 September 2000 (12.09.2000), see entire document.	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 application or patent 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 earlier 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 but 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 considered 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 03 March 2003 (03.03.2003)		Date of mailing of the international search report 27 MAY 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer DAVID L. LINDSEY Telephone No. 703-308-0196

Form: PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

---

フロントページの続き

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ベドナレク, マリア・エイ

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウェイ、イースト・リンカー  
ン・アベニュー・126

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 BA16 BA24 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28

MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA58 MA59 MA60 MA63

MA66 NA14 ZA70 ZC41

4H045 AA10 BA13 BA14 BA31 BA35 DA83 EA20 FA34 GA25