

(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2014-516049

(P2014-516049A)

(43) 公表日 平成26年7月7日 (2014. 7. 7)

|                                     |                     |             |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                        | F I                 | テーマコード (参考) |
| <b>C07K 14/47 (2006.01)</b>         | C O 7 K 14/47 Z N A | 4 C O 7 6   |
| <b>A61K 38/00 (2006.01)</b>         | A 6 1 K 37/02       | 4 C O 8 4   |
| <b>A61P 3/10 (2006.01)</b>          | A 6 1 P 3/10        | 4 H O 4 5   |
| <b>A61P 1/16 (2006.01)</b>          | A 6 1 P 1/16        |             |
| <b>A61P 3/06 (2006.01)</b>          | A 6 1 P 3/06        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く |                     |             |

(21) 出願番号 特願2014-512115 (P2014-512115)  
 (86) (22) 出願日 平成24年5月24日 (2012. 5. 24)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月17日 (2014. 1. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/039431  
 (87) 国際公開番号 W02012/162542  
 (87) 国際公開日 平成24年11月29日 (2012. 11. 29)  
 (31) 優先権主張番号 61/489, 781  
 (32) 優先日 平成23年5月25日 (2011. 5. 25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 598133654  
 アミリン・ファーマシューティカルズ、リ  
 ミテッド・ライアビリティ・カンパニー  
 AMYLIN PHARMACEUTIC  
 ALS, LLC  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 121, サンディエゴ, タウン センター  
 ドライブ 9360  
 9360 Towne Centre D  
 rive, San Diego, CA  
 92121 USA

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミリンペプチドおよび誘導体ならびにそれらの使用

## (57) 【要約】

生物活性の持続期間が増強されたポリペプチドコンジュゲートおよびその使用方法が提供される。ポリペプチドコンジュゲートは、定義された配列のポリペプチド成分と結合している水溶性ポリマーを含めた持続期間増強部分を含む。代謝障害の治療のための使用方法が提供される。摂食障害、インスリン抵抗性、肥満症、過体重、異常な食後高血糖、I型糖尿病、II型糖尿病、妊娠糖尿病、メタボリックシンドローム、ダンピング症候群、高血圧症、脂質異常症、心血管疾患、高脂血症、睡眠時無呼吸、癌、肺高血圧症、胆嚢炎、変形性関節症または短腸症候群の治療のための使用方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

持続期間増強部分に共有結合によって連結しているポリペプチド成分を含むポリペプチドコンジュゲートであって、

ポリペプチド成分が、式 (I) の残基 1 ~ 37 のアミノ酸配列：

X'-Xaa<sup>1</sup>-Cys<sup>2</sup>-Asn<sup>3</sup>-Thr<sup>4</sup>-Ala<sup>5</sup>-Thr<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>-Ala<sup>8</sup>-Thr<sup>9</sup>-Gln<sup>10</sup>-Arg<sup>11</sup>-Leu<sup>12</sup>-Ala<sup>13</sup>-Asn<sup>14</sup>-Phe<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup>-Val<sup>17</sup>-Xaa<sup>18</sup>-Ser<sup>19</sup>-Ser<sup>20</sup>-Xaa<sup>21</sup>-Asn<sup>22</sup>-Phe<sup>23</sup>-Xaa<sup>24</sup>-Xaa<sup>25</sup>-Xaa<sup>26</sup>-Xaa<sup>27</sup>-Xaa<sup>28</sup>-Xaa<sup>29</sup>-Thr<sup>30</sup>-Xaa<sup>31</sup>-Val<sup>32</sup>-Gly<sup>33</sup>-Xaa<sup>34</sup>-Xaa<sup>35</sup>-Thr<sup>36</sup>-Tyr<sup>37</sup>-X(配列番号4) (I)

を含み、

ここで、式 (I) に示されるアミノ酸の最大 25% が欠失し、または異なるアミノ酸で置換されていてもよく、

X' は、水素、N末端キャップ基、持続期間増強部分との結合または持続期間増強部分とのリンカーであり、

Xaa<sup>1</sup> は、Lys または結合であり、

Xaa<sup>18</sup> は、Lys、Cys または His であり、

Xaa<sup>21</sup> は、Lys、Cys または Asn であり、

Xaa<sup>24</sup> は、Lys、Cys または Gly であり、

Xaa<sup>25</sup> は、Lys、Cys または Pro であり、

Xaa<sup>26</sup> は、Lys、Cys または Ile であり、

Xaa<sup>27</sup> は、Lys、Cys または Leu であり、

Xaa<sup>28</sup> は、Lys、Cys または Pro であり、

Xaa<sup>29</sup> は、Lys、Cys または Pro であり、

Xaa<sup>31</sup> は、Lys、Cys または Asn であり、

Xaa<sup>34</sup> は、Lys、Cys または Ser であり、

Xaa<sup>35</sup> は、Lys、Cys または Asn であり、

X は、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、ヒドロキシル、持続期間増強部分との結合または持続期間増強部分とのリンカーであり、

持続期間増強部分が、連結アミノ酸残基、X' または X の側鎖と、適宜、リンカーを介して、共有結合によって連結される、ポリペプチドコンジュゲート。

## 【請求項 2】

持続期間増強部分が、ポリエチレングリコールまたはその誘導体である、請求項 1 に記載のポリペプチドコンジュゲート。

## 【請求項 3】

連結アミノ酸残基が、システインまたはリシンである、請求項 1 から 2 のいずれかに記載のポリペプチドコンジュゲート。

## 【請求項 4】

ポリエチレングリコールが、直鎖、分岐またはコム(comb)型である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリペプチドコンジュゲート。

## 【請求項 5】

1 つの持続期間増強部分を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドコンジュゲート。

## 【請求項 6】

持続期間増強部分が、ポリペプチドの N 末端アミノ酸残基と結合している、請求項 1 から 5 のいずれかに記載のポリペプチドコンジュゲート。

## 【請求項 7】

持続期間増強部分が、ポリペプチドの C 末端アミノ酸残基と結合している、請求項 1 から 5 のいずれかに記載のポリペプチドコンジュゲート。

10

20

30

40

50

**【請求項 8】**

持続期間増強部分が、11、18、24～29、31、34または35位でアミノ酸の側鎖と結合している、請求項1から5のいずれかに記載のポリペプチドコンジュゲート。

**【請求項 9】**

請求項1から8のいずれか一項に記載のポリペプチドコンジュゲートと、医薬上許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

**【請求項 10】**

対象において疾患または障害を治療するための方法であって、請求項9に記載の組成物を、疾患または障害を治療するのに有効な量で治療を必要とする対象に投与することを含む、方法。

10

**【請求項 11】**

疾患または障害が、摂食障害、インスリン抵抗性、肥満症、過体重、異常な食後高血糖、I型糖尿病、II型糖尿病、妊娠糖尿病、メタボリックシンドローム、ダンピング症候群、高血圧症、脂質異常症、心血管疾患、高脂血症、睡眠時無呼吸、癌、肺高血圧症、胆嚢炎、変形性関節症または短腸症候群である、請求項10に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

配列表

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含有する。2012年5月18日に作成された前記ASCIIコピーは、123USPRO.txtと名づけられ、28,832バイトの大きさである。

20

**【0002】**

生物活性の持続期間が増強されたポリペプチドコンジュゲートおよびその使用方法が提供される。ポリペプチドコンジュゲートは、適宜、リンカーを介して、1つまたは複数の持続期間増強部分と結合しているポリペプチド成分を含む。ポリペプチドコンジュゲート内に含まれるポリペプチド成分は、アミリン、カルシトニンおよびそれらのキメラと関連している。ポリペプチドコンジュゲートは、それだけには限らないが、適宜、リンカーを介して、ペプチドコンジュゲートのポリペプチド成分と結合している水溶性ポリマーを含めた持続期間増強部分をさらに含む。本方法は、肥満症、糖尿病およびその他の代謝障害の治療を含む。

30

**【背景技術】****【0003】**

真性糖尿病は、慢性的に上昇したレベルの血糖（高血糖）の存在によって定義される重篤な代謝疾患である。この高血糖の状態は、ペプチドホルモン、インスリンの活性の相対的または絶対的欠如の結果である。インスリンは、膵臓の細胞によって産生および分泌される。インスリンは、グルコース利用、タンパク質合成ならびに中性脂質の形成および貯蔵を促進すると報告されている。グルコース、炭水化物エネルギーの主な供給源は、グリコーゲン、重合したグルコースの形態として身体中に貯蔵され、これは代謝必要条件に合うよう変換されてグルコースに戻され得る。正常条件では、インスリンは、基礎速度およびグルコース刺激後の増強速度の両方で分泌され、すべて、グルコースをグリコーゲンに変換することによって代謝ホメオスタシスを維持する。

40

**【0004】**

用語真性糖尿病は、いくつかの異なる高血糖状態を包含する。これらの状態は、1型（インスリン依存性真性糖尿病またはIDDM）および2型（非インスリン依存性真性糖尿病またはNIDDM）糖尿病を含む。I型糖尿病を有する個体に存在する高血糖は、生理学的範囲内に血糖レベルを維持するのに不十分である、欠損した、減少した、または存在しないレベルのインスリンと関連している。1型糖尿病の治療は、一般に、非経口経路によるインスリンの置換用量の投与を含む。II型糖尿病を有する個体に存在する高血糖は

50

、初期には、正常および上昇したレベルのインスリンと関連しているが、これらの個体は、末梢組織および肝臓におけるインスリン抵抗性の状態のために、また、疾患が進行すると、インスリンの分泌を担う膵臓細胞の進行性の悪化のために代謝ホメオスタシスを維持できない。したがって、2型糖尿病の初期療法は、食餌およびライフスタイルの変化に基づくものであり得、スルホニル尿素などの経口血糖降下薬を用いる療法によって増強される。しかし、特に、疾患の後期には、高血糖のいくらかの制御をもたらし、疾患の合併症を最小にしようとして、インスリン療法が必要とされることが多い。したがって、多くの2型糖尿病患者は、最終的に、生存するためにインスリンを必要とする。

#### 【0005】

肥満症およびその関連障害は、米国および世界中で、よく見られ、極めて深刻な公衆衛生問題である。上半身肥満症は、2型真性糖尿病について公知である最強のリスク因子であり、心血管疾患の強いリスク因子である。肥満症は、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、卒中、胆嚢疾患、変形性関節症、睡眠時無呼吸、多嚢胞性卵巣症候群などの生殖障害、乳房、前立腺および結腸の癌ならびに全身麻酔の合併症の発症率上昇の認識されているリスク因子である（例えば、Kopelman, Nature 404: 635-43 (2000) 参照のこと）。

10

#### 【0006】

肥満症は、寿命を減少させ、上記で列挙された併存症、同様に、感染症、静脈瘤、黒色表皮腫、湿疹、運動不耐性、インスリン抵抗性、高血圧高コレステロール血症、胆石症、整形外科的傷害および血栓塞栓性疾患などの障害の重篤なリスクを伴う [Rissanen et al., Br. Med. J. 301: 835-7 (1990)]。肥満症はまた、インスリン抵抗性症候群または「シンドローム X」およびメタボリックシンドロームと呼ばれる状態の群のリスク因子である。肥満症および関連障害の世界的な医療費は、莫大である。

20

#### 【0007】

当技術分野で公知のように、アミリンは、栄養素の摂取に応じてインスリンと同時に分泌される、膵臓細胞によって合成されるペプチドホルモンである。したがって、アミリンは、代謝機能を有する。アミリンの配列は、哺乳類種中で高度に保存されており、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、カルシトニン、インターメジンおよびアドレノメデュリンに対して構造的類似性を有する。Young A., 2005, Amylin: Physiology and Pharmacology. In: August JT, Murad F, Granner, D (eds), AMYLIN: PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, pp 1-18 参照のこと。アミリンの血糖調節作用は、栄養素によって刺激されるグルカゴン分泌の抑制によって循環におけるグルコース出現速度を調節することおよび胃内容排出を減速することによって、インスリンのそれを補完する。Young, 1997, Curr Opin Endocrinol Diabetes 4:282-290 参照のこと。例えば、インスリンによって治療されている糖尿病の患者では、プラムリンチド、ヒトアミリンの合成類似体が、不適当に上昇した食後グルカゴン分泌を抑制することおよび胃内容排出を減速することによって食後グルコース変動幅を低減する。例えば、Janes et al., 1996, Diabetes, 45(suppl 2):865 (abstract); Young et al., 1996, Drug Dev Res 37:231-248; Weyer et al., 2001, Curr Pharm Des 7:1353-1373; Hoogwerf et al., 2008, Vasc Health Risk Manag 4:355-362; Edelman et al., 2008, Biodrugs 22:375-386 参照のこと。

30

40

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

本明細書において、増強された作用の持続期間を提供する水溶性ポリマーとコンジュゲートしているポリペプチドが提供される。

#### 【0009】

本明細書に引用されるすべての参考文献は、その全体が、すべての目的のために、参照により組み込まれる。

#### 【課題を解決するための手段】

50

## 【 0 0 1 0 】

要約すれば、生物活性の持続期間が増強されたポリペプチドコンジュゲートおよびその使用方法が提供される。ポリペプチドコンジュゲート内に含まれるポリペプチド成分は、アミリン、カルシトニンおよびそれらのキメラと関連している。ポリペプチドコンジュゲートは、それだけには限らないが、適宜、リンカーを介して、ペプチドコンジュゲートのポリペプチド成分と結合している水溶性ポリマーを含めた持続期間増強部分をさらに含む。本方法は、肥満症、糖尿病およびその他の代謝障害の治療を含む。

## 【 0 0 1 1 】

第 1 の態様において、ポリペプチド成分と、それに共有結合によって連結された持続期間増強部分とを含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。ポリペプチド成分は、以下の式 (I) の残基 1 ~ 37 のアミノ酸配列を含み、ここで、式 (I) に示されるアミノ酸の最大 25 % が欠失し、または異なるアミノ酸で置換されていてもよい：

$X'-Xaa^1-Cys^2-Asn^3-Thr^4-Ala^5-Thr^6-Cys^7-Ala^8-Thr^9-Gln^{10}-Arg^{11}-Leu^{12}-Ala^{13}-Asn^{14}-Phe^{15}-Leu^{16}-Val^{17}-Xaa^{18}-Ser^{19}-Ser^{20}-Xaa^{21}-Asn^{22}-Phe^{23}-Xaa^{24}-Xaa^{25}-Xaa^{26}-Xaa^{27}-Xaa^{28}-Xaa^{29}-Thr^{30}-Xaa^{31}-Val^{32}-Gly^{33}-Xaa^{34}-Xaa^{35}-Thr^{36}-Tyr^{37}-X$  (配列番号 4)。 (I)

## 【 0 0 1 2 】

式 (I) に関して、 $X'$  は、水素、N 末端キャップ基、持続期間増強部分との結合または持続期間増強部分とのリンカーであり、 $Xaa^1$  は、 $lys$  または結合であり、 $Xaa^{18}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $His$  であり、 $Xaa^{21}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Asn$  であり、 $Xaa^{24}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Gly$  であり、 $Xaa^{25}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Pro$  であり、 $Xaa^{26}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Ile$  であり、 $Xaa^{27}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Leu$  であり、 $Xaa^{28}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Pro$  であり、 $Xaa^{29}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Pro$  であり、 $Xaa^{31}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Asn$  であり、 $Xaa^{34}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Ser$  であり、 $Xaa^{35}$  は、 $lys$ 、 $Cys$  または  $Asn$  であり、 $X$  は、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラキルオキシ、ヒドロキシル、持続期間増強部分との結合または持続期間増強部分とのリンカーである。持続期間増強部分は、連結アミノ酸残基、 $X'$  または  $X$  の側鎖と、適宜、リンカーを介して、共有結合によって連結され得る。持続期間増強部分は、ポリペプチド成分の主鎖原子と、適宜、リンカーを介して、共有結合によって連結され得る。

## 【 0 0 1 3 】

別の態様では、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて、本明細書に記載される化合物を含む医薬組成物が提供される。

## 【 0 0 1 4 】

別の態様では、対象において肥満症、糖尿病またはその他の代謝障害を治療するための方法が提供される。本方法は、本明細書に記載された化合物または医薬組成物を、肥満症、糖尿病またはその他の代謝障害を治療するのに有効な量で治療を必要とする対象に投与することを含む。

## 【 0 0 1 5 】

さらに別の態様では、摂食障害、インスリン抵抗性、肥満症、過体重、異常な食後高血糖、I 型、II 型および妊娠糖尿病を含めた任意の種類の糖尿病、メタボリックシンドローム、ダンピング症候群、高血圧症、脂質異常症、心血管疾患、高脂血症、睡眠時無呼吸、癌、肺高血圧症、胆嚢炎 (cholecystitis)、変形性関節症または短腸症候群について、治療を必要とする対象において治療するための方法が提供される。本方法は、本明細書に記載された化合物または医薬組成物を、疾患または障害を治療するのに有効な量で治療を必要とする対象に投与することを含む。

## 【 図面の簡単な説明 】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 6 】

【図 1】図 1 A は、化合物 2 1、2 5、2 4、2 2、2 6 および媒体についての、本明細書に記載された毎日の累積的体重増加結果を表す。図 1 B は、化合物 2 1、2 5、2 4、2 2、2 6 および媒体についての、毎日の食物摂取結果を表す。説明文：化合物 2 1（四角）；化合物 2 5（先端が上の三角形）；化合物 2 4（先端が下の三角形）；化合物 2 2（菱形）；化合物 2 6（白丸）；媒体（黒丸）。

【図 2】図 2 A は、D I O ラットにおける 2 週間の、化合物 2 6 の週に 2 回の S C 投薬および化合物 1 の連続投薬の比較の結果を表す。説明文：媒体（黒丸）；化合物 2 6（三角形）；化合物 1（四角）。図 2 B は、D I O ラットにおける 4 週間の、化合物 2 3 の週に 1 回の S C 投薬および化合物 1 の連続注入の比較の結果を表す。説明文：媒体（黒丸）；化合物 2 3（三角形）；化合物 1（四角）。

【図 3】図 3 A は、化合物 2 3 の用量応答研究から得られた毎日の累積的体重増加結果を表す。図 3 B は、化合物 2 3 の用量応答研究から得られた毎日の食物摂取結果を表す。説明文：媒体（四角）；1 2 n m o l / k g（先端が上の三角形）；2 5 n m o l / k g（先端が下の三角形）；5 0 n m o l / k g（菱形）；1 2 5 n m o l / k g（黒丸）；2 5 0 n m o l / k g（白四角）。

【図 4】図 4 A は、化合物 1 9 の用量応答研究から得られた累積的体重増加結果を表す。説明文：媒体（四角）；5 0 n m o l / k g（先端が上の三角形）；5 0 n m o l / k g（先端が下の三角形）；5 0 n m o l / k g（菱形）。図 4 B は、化合物 2 3、2 7 および媒体についての、本明細書に記載された毎日の累積的体重増加結果を表す。説明文：媒体（暗い黒四角）；化合物 2 3（明るい黒四角）；化合物 2 7（三角）。

【図 5】図 5 A は、化合物 2 6、2 8、2 9、3 0 および媒体についての、本明細書に記載された毎日の累積的体重増加結果を表す。図 5 B は、化合物 2 6、2 8、2 9、3 0 および媒体についての、毎日の食物摂取結果を表す。説明文：化合物 2 6（先端が下の三角形）；化合物 2 8（菱形）；化合物 2 9（大きな黒丸）；化合物 3 0（白四角）；媒体（小さい黒丸）。

【図 6】図 6 A は、化合物 3 1 と比較した、化合物 2 9 の用量応答研究から得られた毎日の累積的体重増加結果を表す。図 6 B は、化合物 3 1 と比較した、化合物 2 9 についての、毎日の食物摂取結果を表す。説明文：化合物 3 1、2 5 0 n m o l / k g（四角）；化合物 2 9、2 5 0 n m o l / k g（先端が上の三角形）；化合物 2 9、1 2 5 n m o l / k g（先端が下の三角形）；化合物 2 9、6 2 . 5 n m o l / k g（菱形）；化合物 2 9、3 1 . 2 5 n m o l / k g（大きな黒丸）；媒体（小さい黒丸）。

【図 7】図 7 A は、化合物 2 9、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6 および媒体についての、本明細書に記載された毎日の累積的体重増加結果を表す。図 7 B は、化合物 2 9、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6 および媒体についての、毎日の食物摂取結果を表す。説明文：化合物 2 9（正方形）；化合物 3 2（菱形）；化合物 3 3（黒丸）；化合物 3 4（正方形）；化合物 3 5（先端が上の三角形）；化合物 3 6（先端が下の三角形）；媒体（小さい黒丸）。

【図 8】図 8 A は、化合物 2 9、4 1、4 2 および媒体についての、本明細書に記載された毎日の累積的体重増加結果を表す。図 8 B は、化合物 2 9、4 1、4 2 および媒体についての毎日の食物摂取結果を表す。説明文：化合物 2 9（正方形）；化合物 4 1（先端が上の三角形）；化合物 4 2（先端が下の三角形）；媒体（小さい黒丸）。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 1 7 】

## I . 定義

本明細書において使用される略語は、化学および生物学の技術分野内でのその従来の意味を有する。本明細書において示される化学構造および式は、化学の技術分野において公知である化学結合価の標準ルールに従って構築される。

## 【 0 0 1 8 】

置換基（substituent group）が、左から右に書かれる、その従来の化学式によって特

定される場合には、右から左に構造を書くことに起因する化学的に同一の置換基を等しく包含する、例えば、 $-\text{CH}_2\text{O}-$  は、 $-\text{OCH}_2-$  と等価である。

#### 【0019】

用語「アルキル」とは、それ自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、直鎖（すなわち、非分岐）もしくは分枝鎖またはそれらの組合せを意味し、これらは完全飽和であっても、モノ不飽和またはポリ不飽和であってもよく、指定される炭素原子数を有する（すなわち、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  は、1～10個の炭素を意味する）二価および多価ラジカルを含み得る。飽和炭化水素ラジカル为例として、それだけには限らないが、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチル、 $t$ -ブチル、イソブチル、 $\text{sec}$ -ブチル、（シクロヘキシル）メチル、例えば、 $n$ -ペンチル、 $n$ -ヘキシル、 $n$ -ヘプチル、 $n$ -オクチルの相同体および異性体などといった基が挙げられる。不飽和アルキル基は、1つまたは複数の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例として、それだけには限らないが、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-（ブタジエニル）、2,4-ペンタジエニル、3-（1,4-ペンタジエニル）、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニルならびに高級相同体および異性体が挙げられる。アルコキシは、酸素リンカー（ $-\text{O}-$ ）を介して分子の残部と結合しているアルキルである。

10

#### 【0020】

用語「アルキレン」とは、それ自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  によって例示されるが、これに限定されないアルキルから誘導される二価ラジカルを意味する。通常、アルキル（またはアルキレン）基は、1～24個の炭素原子を有し、本発明では、10個以下の炭素原子を有する基が好ましい。「低級アルキル」または「低級アルキレン」とは、短鎖アルキルまたはアルキレン基であり、一般に、8個以下の炭素原子を有する。用語「アルケニレン」とは、それ自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、アルケンから誘導される二価ラジカルを意味する。

20

#### 【0021】

用語「ヘテロアルキル」とは、それ自体で、または別の用語と組み合わせて、別に示されない限り、少なくとも1個の炭素原子と、O、N、P、SiおよびSからなる群から選択される少なくとも1個のヘテロ原子とからなる安定な直鎖もしくは分枝鎖またはそれらの組合せを意味し、ここで、窒素および硫黄原子は、適宜、酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、適宜、四級化されていてもよい。ヘテロ原子（単数または複数）O、N、P、SおよびSiは、ヘテロアルキル基の内部の位置のいずれに置かれてもよく、またはアルキル基が分子の残部と結合している位置に置かれてもよい。例として、それだけには限らないが、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、および $-\text{CN}$ が挙げられる。最大2個のヘテロ原子が連続している場合もある、例えば、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  など。

30

40

#### 【0022】

同様に、用語「ヘテロアルキレン」とは、それ自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  および  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$  によって例示されるが、これに限定されないヘテロアルキルから誘導される二価ラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基について、ヘテロ原子はまた、鎖の末端のいずれかまたは両方を占め得る（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基について、連結基の配向は、連結基の式が書かれている方向によって暗示されない。例えば、式 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  は、 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  および  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$  の両方を表す。上記のように、ヘテロアルキル基は、本明細書において使

50

用される場合、 $-C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-OR'$ 、 $-SR'$  および / または  $-SO_2R'$  などのヘテロ原子を介して分子の残部と結合している基を含む。「ヘテロアルキル」が列挙され、 $-NR'R''$  などといった特定のヘテロアルキル基の列挙が続く場合には、用語ヘテロアルキルおよび  $-NR'R''$  は重複しておらず、相互に排他的ではないことは理解されよう。むしろ、明確性を付加するために、特定のヘテロアルキル基が列挙される。したがって、用語「ヘテロアルキル」は、本明細書において、 $-NR'R''$  などといった特定のヘテロアルキル基を排除すると解釈されてはならない。

#### 【0023】

用語「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」とは、それら自体で、またはその他の用語と組み合わせて、別に示されない限り、それぞれ、「アルキル」および「ヘテロアルキル」の環状版を意味する。さらに、ヘテロシクロアルキルについては、ヘテロ原子は、複素環が分子の残部と結合している位置を占め得る。シクロアルキルの例として、それだけには限らないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘブチルなどが挙げられる。ヘテロシクロアルキルの例として、それだけには限らないが、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどが挙げられる。「シクロアルキレン」および「ヘテロシクロアルキレン」とは、単独または別の置換基の一部として、それぞれ、シクロアルキルおよびヘテロシクロアルキルから誘導される二価ラジカルを意味する。

#### 【0024】

用語「ハロ」または「ハロゲン」とは、それら自体で、または別の置換基の一部として、別に示されない限り、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素原子を意味する。さらに、「ハロアルキル」などの用語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含むものとする。例えば、用語「ハロ( $C_1-C_4$ )アルキル」は、それだけには限らないが、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2,2,2-トリフルオロエチル、4-クロロブチル、3-ブロモプロピルなどを含む。

#### 【0025】

用語「アシル」とは、別に示されない限り、 $-C(O)R$  (式中、 $R$  は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールである)を意味する。

#### 【0026】

用語「アリール」とは、別に示されない限り、単一環または一緒に縮合している(すなわち、縮合環アリール)か、または共有結合によって連結している複数の環であり得る(好ましくは、1~3個の環)、ポリ不飽和、芳香族、炭化水素置換基を意味する。縮合環アリールとは、縮合環の少なくとも1個がアリール環である、一緒に縮合している複数の環を指す。用語「ヘテロアリール」とは、N、OおよびSから選択される1~4個のヘテロ原子を含有するアリール基(または環)を指し、ここで、窒素および硫黄原子は、酸化されていてもよく、窒素原子(単数または複数)は、四級化されていてもよい。したがって、用語「ヘテロアリール」とは、縮合環ヘテロアリール基(すなわち、縮合環の少なくとも1個が、複素芳香環である、一緒に縮合している複数の環)を含む。5,6-縮合環ヘテロアリーレンとは、一方の環が5員を有し、もう一方の環が6員を有し、少なくとも1個の環がヘテロアリール環である、一緒に縮合している2個の環を指す。同様に、6,6-縮合環ヘテロアリーレンとは、一方の環が6員を有し、もう一方の環が6員を有し、少なくとも1個の環が、ヘテロアリール環である、一緒に縮合している2個の環を指す。また、6,5-縮合環ヘテロアリーレンとは、一方の環が6員を有し、もう一方の環が5員を有し、少なくとも1個の環が、ヘテロアリール環である、一緒に縮合している2個の

10

20

30

40

50



環を指す。ヘテロアリール基は、炭素またはヘテロ原子を介して分子の残部と結合され得る。アリールおよびヘテロアリール基の限定されない例として、フェニル、1 - ナフチル、2 - ナフチル、4 - ビフェニル、1 - ピロリル、2 - ピロリル、3 - ピロリル、3 - ピラゾリル、2 - イミダゾリル、4 - イミダゾリル、ピラジニル、2 - オキサゾリル、4 - オキサゾリル、2 - フェニル - 4 - オキサゾリル、5 - オキサゾリル、3 - イソオキサゾリル、4 - イソオキサゾリル、5 - イソオキサゾリル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、5 - チアゾリル、2 - フリル、3 - フリル、2 - チエニル、3 - チエニル、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、2 - ピリミジル、4 - ピリミジル、5 - ベンゾチアゾリル、プリニル、2 - ベンゾイミダゾリル、5 - インドリル、1 - イソキノリル、5 - イソキノリル、2 - キノキサリニル、5 - キノキサリニル、3 - キノリル、および6 - キノリルが挙げられる。上記のアリールおよびヘテロアリール環系各々の置換基は、以下に記載される許容される置換基の群から選択される。「アリーレン」および「ヘテロアリーレン」とは、単独または別の置換基の一部として、それぞれ、アリールおよびヘテロアリールから誘導される二価ラジカルを意味する。

10

#### 【0027】

簡潔さのために、用語「アリール」とは、その他の用語（例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）と組み合わせて使用される場合には、上記で定義されるアリールおよびヘテロアリール環の両方を含む。したがって、用語「アリールアルキル」とは、炭素原子（例えば、メチレン基）が、例えば、酸素原子（例えば、フェノキシメチル、2 - ピリジルオキシメチル、3 - (1 - ナフチルオキシ)プロピルなど）によって置き換えられているアルキル基を含めた、アリール基がアルキル基（例えば、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど）と結合しているラジカルを含むものとする。

20

#### 【0028】

用語「オキシ」とは、本明細書において使用される場合、炭素原子と二重結合している酸素を意味する。

#### 【0029】

用語「アルキルスルホニル」とは、本明細書において使用される場合、式 - S (O<sub>2</sub>) - R' (式中、R' は、上記で定義されるアルキル基である) を有する部分を意味する。R' は、特定された数の炭素（例えば、「C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキルスルホニル」）を有し得る。

30

#### 【0030】

上記の用語の各々（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」）は、示されたラジカル of 置換および非置換形態の両方を含む。各種類のラジカル of 好ましい置換基は、以下に提供されている。

#### 【0031】

アルキルおよびヘテロアルキルラジカル of 置換基（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニルおよびヘテロシクロアルケニルと呼ばれることが多い基を含む）は、0 ~ (2m' + 1) 個（式中、m' は、このようなラジカル中の炭素原子の総数である）の範囲の数の、それだけには限らないが、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R'、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R'R'、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R'、-OC(O)NR'R'、-NR'C(O)R'、-NR'-C(O)NR'R'、-NR'C(O)<sub>2</sub>R'、-NR-C(NR'R'R')=NR'、-NR-C(NR'R')=NR'、-S(O)R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R'、-NRSO<sub>2</sub>R'、-CN、および-NO<sub>2</sub> から選択されるさまざまな基のうち1種または複数であり得る。R'、R'、R' およびR' は各々、独立に、水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール（例えば、1 ~ 3 個のハロゲンで置換されたアリール）、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基または

40

50

アリーールアルキル基を指すことが好ましい。本発明の化合物が、2個以上のR基を含む場合には、例えば、R基は各々、2個以上のこれらの基が存在する場合に、各R'、R''、R'''およびR''''基がそうであるように独立に選択される。R'およびR''が、同一窒素原子と結合している場合には、それらは、窒素原子と組み合わせさせて、4、5、6または7員環を形成してもよい。例えば、-NR'R''として、それだけには限らないが、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルが挙げられる。置換基の上記の考察から、当業者ならば、用語「アルキル」は、ハロアルキル（例えば、-CF<sub>3</sub>および-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>）およびアシル（例えば、-C(O)CH<sub>3</sub>、-C(O)CF<sub>3</sub>、-C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>など）などの水素基以外の基と結合している炭素原子を含めた基を含むものとするということは理解されよう。

10

#### 【0032】

アルキルラジカルについて記載された置換基と同様に、アリーールおよびヘテロアリーール基の置換基は、多様であり、0～芳香環系上の空の原子価の総数の範囲の数で、例えば：-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR'C(O)R'、-NR'-C(O)NR'R''R'''、-NR'C(O)<sub>2</sub>R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR''''、-S(O)R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R'、-NRSO<sub>2</sub>R'、-CN、-NO<sub>2</sub>、-R'、-N<sub>3</sub>、-CH(Ph)<sub>2</sub>、フルオロ(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルコキシ、およびフルオロ(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルから選択され、ここで、R'、R''、R'''およびR''''は、独立に、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリーールおよび置換もしくは非置換ヘテロアリーールから選択されることが好ましい。本発明の化合物が、2個以上のR基を含む場合には、例えば、R基は各々、2個以上のこれらの基が存在する場合に、R'、R''、R'''およびR''''基の各々がそうであるように独立に選択される。

20

#### 【0033】

2個以上の置換基は、連結して、アリーール、ヘテロアリーール、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル基を形成してもよい。このようないわゆる環形成置換基は、通常、必ずしもそうではないが、環基本構造と結合して見られる。一実施形態では、環形成置換基は、基本構造の隣接するメンバーと結合している。例えば、環基本構造の隣接するメンバーと結合している2個の環形成置換基は、縮合環構造を作り出す。別の実施形態では、環形成置換基は、基本構造の単一のメンバーと結合している。例えば、環基本構造の単一のメンバーと結合している2個の環形成置換基は、スピロ環構造を作り出す。さらに別の実施形態では、環形成置換基は、基本構造の隣接していないメンバーと結合している。

30

#### 【0034】

アリーールまたはヘテロアリーール環の隣接する原子上の置換基のうち2個が、式-T-C(O)-(CRR')<sub>q</sub>-U-(式中、TおよびUは、独立に、-NR-、-O-、-CRR'-または一重結合であり、qは、0～3の整数である)の環を形成してもよい。あるいは、アリーールまたはヘテロアリーール環の隣接する原子上の置換基のうち2個が、式-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-B-(式中、AおよびBは、独立に、-CRR'-、-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NR'-または一重結合であり、rは、1～4の整数である)の置換基で置き換えられてもよい。そのように形成された新規環の一重結合のうち1つは、二重結合で置き換えられてもよい。あるいは、アリーールまたはヘテロアリーール環の隣接する原子上の置換基のうち2個が、式-(CRR')<sub>s</sub>-X'-(C''R''')<sub>d</sub>-(式中、sおよびdは、独立に、0～3の整数であり、X'は、-O-、-NR'-、-S-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-または-S(O)<sub>2</sub>NR'-である)の置換基で置き換えられてもよい。置換基R、R'、R''およびR'''は、独立に、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリーールおよび置

40

50

換もしくは非置換ヘテロアリールから選択されることが好ましい。

【0035】

本明細書において使用される場合、用語「ヘテロ原子」または「環ヘテロ原子」は、酸素(O)、窒素(N)、硫黄(S)、リン(P)およびケイ素(Si)を含むものとする。

【0036】

「置換基(substituent group)」とは、本明細書において使用される場合、以下の部分：

(A) -OH、-NH<sub>2</sub>、-SH、-CN、-CF<sub>3</sub>、-NO<sub>2</sub>、オキソ、ハロゲン、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリールならびに

(B) (i) オキソ、-OH、-NH<sub>2</sub>、-SH、-CN、-CF<sub>3</sub>、-NO<sub>2</sub>、ハロゲン、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリールおよび

(ii) (a) オキソ、-OH、-NH<sub>2</sub>、-SH、-CN、-CF<sub>3</sub>、-NO<sub>2</sub>、ハロゲン、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリールおよび

(b) オキソ、-OH、-NH<sub>2</sub>、-SH、-CN、-CF<sub>3</sub>、-NO<sub>2</sub>、ハロゲン、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリールおよび非置換ヘテロアリールから選択される少なくとも1個の置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール

から選択される少なくとも1個の置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールおよびヘテロアリール

から選択される少なくとも1個の置換基で置換された、アルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールおよびヘテロアリールから選択される基を意味する。

【0037】

「大きさが制限された置換基」または「大きさが制限された置換基(substituent group)」とは、本明細書において使用される場合、「置換基(substituent group)」について上記で記載された置換基のすべてから選択される基を意味し、ここで、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2~20員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換C<sub>4</sub>~C<sub>8</sub>シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の4~8員のヘテロシクロアルキルである。

【0038】

「低級置換基」または「低級置換基(substituent group)」とは、本明細書において使用される場合、「置換基(substituent group)」について上記で記載された置換基のすべてから選択される基を意味し、ここで、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2~8員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換C<sub>5</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の5~7員のヘテロシクロアルキルである。

【0039】

用語「医薬上許容される塩」とは、本明細書に記載された化合物上に見られる特定の置換基に応じて、相対的に非毒性の酸または塩基を用いて調製される活性化合物の塩を含むものとする。本発明の化合物が、相対的に酸性の官能基を含有する場合には、ニートでか、または適した不活性の溶媒中で、このような化合物の中性形態を十分な量の所望の塩基と接触させることによって塩基付加塩を得ることができる。医薬上許容される塩基付加塩

の例として、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノまたはマグネシウム塩または同様の塩が挙げられる。本発明の化合物が、相対的に塩基性の官能基を含有する場合には、ニートでか、または適した不活性の溶媒中で、このような化合物の中性形態を十分な量の所望の酸と接触させることによって酸付加塩を得ることができる。医薬上許容される酸付加塩の例として、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、炭酸一水素 (mono hydrogencarbonic)、リン酸、リン酸一水素、リン酸二水素、硫酸、硫酸一水素、ヨウ化水素酸または亜リン酸などのような無機酸から誘導されるもの、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p - トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、シュウ酸、メタンスルホン酸などのような相対的に非毒性の有機酸から誘導される塩が挙げられる。また、アルギン酸などといったアミノ酸の塩およびグルクロン酸またはガラクトン酸 (galactunoric acids) などのような有機酸の塩も含まれる (例えば、Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19参照のこと)。本発明のある特定の化合物は、化合物が塩基または酸付加塩のいずれかに変換されることを可能にする、塩基性および酸性官能基の両方を含有する。

10

#### 【0040】

したがって、本発明の化合物は、医薬上許容される酸を有するものなどの塩として存在し得る。本発明は、このような塩を含む。このような塩の例として、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、メタンスルホン酸塩、硝酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩 (例えば、(+) - 酒石酸塩、(-) - 酒石酸塩またはラセミ混合物を含めたそれらの混合物)、コハク酸塩、安息香酸塩およびグルタミン酸などのアミノ酸を有する塩が挙げられる。これらの塩は、当業者に公知の方法によって調製され得る。

20

#### 【0041】

化合物の中性形態は、塩を、塩基または酸と接触させることおよび従来法で親化合物を単離することによって再生されることが好ましい。化合物の親形態は、極性溶媒における溶解度などの、ある物理的特性において種々の塩形態とは異なる。

#### 【0042】

本発明は、塩形態に加えて、プロドラッグ形態の化合物を提供する。本明細書に記載された化合物のプロドラッグとは、生理学的条件下で化学変化を容易に受けて、本発明の化合物を提供する化合物である。さらに、プロドラッグは、エキソビボ (ex vivo) 環境において化学的または生化学的方法によって本発明の化合物に変換され得る。例えば、プロドラッグは、適した酵素または化学試薬とともに経皮パッチリザーバー中に入れられた場合に、本発明の化合物にゆっくりと変換され得る。

30

#### 【0043】

本発明のある化合物は、溶媒和していない形態ならびに水和形態を含めた溶媒和形態で存在し得る。一般に、溶媒和形態は、溶媒和していない形態と等価であり、本発明の範囲内に包含される。本発明のある化合物は、複数の結晶または非晶質形態で存在し得る。一般に、すべての物理的形態は、本発明によって企図される使用にとって等価であり、本発明の範囲内にあるものとする。

#### 【0044】

本発明のある化合物は、不斉炭素原子 (光学中心) または二重結合を有し; ラセミ化合物、ジアステレオマー、互変異性体、幾何異性体および個々の異性体は、本発明の範囲内に包含される。本発明の化合物は、合成および/または単離するには不安定すぎると当技術分野で公知であるものを含まない。

40

#### 【0045】

本発明の化合物はまた、このような化合物を構成する原子のうち1個または複数で、天然にない割合の原子の同位体を含有し得る。例えば、化合物は、例えば、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、ヨウ素 - 125 ( $^{125}\text{I}$ ) または炭素 - 14 ( $^{14}\text{C}$ ) などの放射性同位体で放射標識され得る。本発明の化合物のすべての同位体の変動は、放射性であろうとなかろうと、本発明の範囲内に包含される。

50

【 0 0 4 6 】

記号

【 化 1 】



は、化学部分の、分子または化学式の残部との結合点を表す。

【 0 0 4 7 】

「オルソログ」および同様の用語は、ペプチドとの関連において、当技術分野で公知のように、オルソログをコードする遺伝子が、共通の祖先から進化した 2 種以上のペプチド遺伝子産物を指す。

10

【 0 0 4 8 】

「類似体」とは、本明細書において、ポリペプチドとの関連において使用される場合、親化合物に対してアミノ酸の挿入、欠失および / または置換を有する化合物を指す。類似体は、優れた安定性、溶解度、有効性、半減期などを有し得る。いくつかの実施形態では、類似体は、親化合物に対して、少なくとも 50 %、例えば、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 % またはさらに高い配列同一性を有する化合物である。

【 0 0 4 9 】

用語「同一性」、「配列同一性」などは、2 種以上の核酸またはポリペプチド配列の比較との関連において、同一であるか、または当技術分野で公知の、配列比較アルゴリズム、例えば、BLAST または BLAST 2.0 を使用して測定されるような、特定されたパーセンテージの同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチド（すなわち、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって、最大一致を求めて比較およびアラインされた場合の、特定された領域にわたる、約 50 % 同一性、好ましくは、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % またはより高い同一性）を有する 2 種以上の配列または部分配列を指す。この定義は、欠失および / または付加を有する配列、ならびに置換を有するもの、ならびに天然に存在するもの、例えば、多型または対立遺伝子変異体および人為的変異体を含む。好ましいアルゴリズムでは、当技術分野で公知のように、ギャップなどについて考慮される。配列比較のためには、通常、1 種の配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて、部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用できるか、または代替パラメータを指定できることが好ましい。次いで、配列比較アルゴリズムによって、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する、試験配列の配列同一性パーセントが算出される。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482 の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443 の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, 1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 の類似性の検索法によって、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. 中の GAP, BESTFIT, FASTA および TFASTA) のコンピュータによる実施によって、または手作業によるアラインメントおよび目視検査によって実施できる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 補遺) 参照のこと。

20

30

40

【 0 0 5 0 】

配列同一性および配列類似性パーセントを決定するのに適しているアルゴリズムの好ましい例として、BLAST および BLAST 2.0 アルゴリズムが挙げられ、これらは、Altschul et al., 1977, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 および Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410 に記載されている。BLAST および BLAST 2.0 は、

50

当技術分野で公知のように、本発明の核酸およびタンパク質の配列同一性パーセントを決定するために使用される。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationのウェブサイトを通じて公的に利用可能である。このアルゴリズムは、まず、クエリー配列において、データベース配列中の同一の長さのワードとアラインされた場合に幾分か正の値の閾値スコアTにマッチするか、またはそれを満たす長さWの短いワードを同定することによって高スコアリング配列対(HSP)を同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschul et al., 同著)。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見出すための検索を開始するためのシードとして作用する。ワードヒットは、累積的アラインメントスコアが増大され得る限り、各配列に沿って両方向に伸長される。例えば、ヌクレオチド配列についての累積的スコアは、パラメータM(1対のマッチング残基についてのリワードスコア; 常に>0)およびN(ミスマッチ残基についてのペナルティスコア; 常に<0)を使用して算出される。アミノ酸配列については、累積的スコアを算出するためにスコアリングマトリックスが使用される。各方向におけるワードヒットの伸長は、累積的アラインメントスコアがその最大達成値から分量Xだけ減少する; 1つもしくは複数の負のスコアを示す残基のアラインメントの蓄積のために累積的スコアが0以下になる; またはいずれかの配列の末端に到達する時点で停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列のための)は、デフォルトとして、11のワード長(W)、10の期待値(E)、M=5、N=-4および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列のためには、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長および10の期待値(E)および50のBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff& Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915参照のこと)アラインメント(B)、10の期待値(E)、M=5、N=-4および両鎖の比較を使用する。

10

20

30

40

50

#### 【0051】

2種のアミノ酸配列の、または2種の核酸の同一性または類似性パーセントを決定するには、最適比較目的で配列をアラインする(例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適アラインメントのために、第1のアミノ酸または核酸配列の配列にギャップを導入してもよい)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同一または類似のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合には、分子は、その位置で同一または類似である。2種の配列間の同一性または類似性パーセントは、配列によって共有される同一または類似の位置の数の関数である(すなわち、同一性%=同一位置の数/位置の総数(例えば、重複位置) $\times 100$ )。2種のアミノ酸の類似性は、当技術分野で公知のさまざまな方法によって評価され得る。例えば、非極性中性残基(例えば、Ala、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val)は、類似と考えることができ、同じく、酸性の電荷を有する極性(例えば、Glu、Asp)、塩基性の電荷を有する極性(例えば、Arg、His、Lys)および中性極性(例えば、Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr)残基も同様である。

#### 【0052】

同一性および類似性は両方とも、容易に算出され得る。例えば、同一性パーセントの算出では、正確なマッチのみが数えられ得、ローカルアラインメントとは対照的にグローバルアラインメントが実施され得る。配列間の同一性または類似性を決定するためによく使用される方法として、例えば、Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073に開示されるものが挙げられる。同一性を決定するための例示的方法は、試験される配列間の最大マッチを与えるよう設計される。同一性および類似性を決定するための例示的方法はまた、市販のコンピュータプログラムにおいて提供される。2種の配列の比較のために利用される数学アルゴリズムの特定の例として、Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムおよび例えば、Karlin et al., 1993, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877と同様に改変されたアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。比較目的のためにギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるようにギャップ付きBLASTを利用してもよい。あるいは、PSI-Blastを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施してもよい。BLAST、ギャップ付きBLASTおよびPSI-Blastプログラムを利用する場合には、当技術分野で公知のように、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用してもよい。さらに、FASTA法（Atschul et al., 1990, 同著）を使用してもよい。配列の比較にとって有用な数学アルゴリズムの別の特定の例として、Myers et al., 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージ（Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Res. 12(1):387）の一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。同一性パーセントは、ベクターNTI（登録商標）（Invitrogen; Carlsbad CA）中のAlignX（登録商標）モジュールを用いる解析によって決定され得る。

10

#### 【0053】

「肥満症」および「過体重」とは、普通に予測されるものよりも多い重量を有する哺乳類を指し、例えば、外見、当技術分野で公知の肥満度指数（BMI）、ウエストとヒップ周りの比率、皮下脂肪厚、ウエスト周りなどによって決定され得る。疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention）（CDC）は、過体重を、25～29.9のBMIを有する成人ヒトとして定義しており；肥満を、30以上のBMIを有する成人ヒトとして定義している。肥満症の決定のためにはさらなる測定基準が存在する。例えば、CDCは、1.0より大きいウエストとヒップの比率を有する人は過体重であると述べている。

20

#### 【0054】

「除脂肪体重」とは、脂肪を含まない体重を指し、すなわち、総体重 - 体脂肪重量が、除脂肪体重である。除脂肪体重は、当技術分野で公知の、流体静力学的計量、コンピュータ化チャンパー、二重エネルギーX線吸収測定法、皮膚キャリパー、磁気共鳴画像法（MRI）および生体電気インピーダンス解析（BIA）などの方法によって測定できる。

30

#### 【0055】

「哺乳類」とは、一般に、毛皮または毛を有し、生児出生をその後代に与え、その後代に乳を与える温血動物を指す。哺乳類は、ヒト、コンパニオンアニマル（例えば、イヌ、ネコ）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ）、野生動物などを含む。一実施形態では、哺乳類は、雌である。一実施形態では、哺乳類は、女性のヒトである。一実施形態では、哺乳類は、ネコまたはイヌである。一実施形態では、哺乳類は、糖尿病哺乳類、例えば、2型糖尿病を有するヒトである。一実施形態では、哺乳類は、肥満糖尿病哺乳類、例えば、2型糖尿病を有する肥満哺乳類である。

#### 【0056】

「アミリンアゴニスト化合物」は、天然アミリンペプチド、アミリン類似体ペプチドおよびアミリンアゴニスト活性を有するその他の化合物（例えば、小分子）を含む。「アミリンアゴニスト化合物」は、天然供給源から誘導され得、合成であり得、または組換えDNA技術から誘導され得る。アミリンアゴニスト化合物は、アミリンアゴニスト受容体結合活性を有し、アミノ酸（例えば、天然、非天然またはそれらの組合せ）、ペプチドミメティック、化学部分などを含み得る。当業者ならば、アミリン受容体結合アッセイを使用して、またはヒラメ筋アッセイにおけるアミリンアゴニスト活性を測定することによってアミリンアゴニスト化合物を認識されよう。アミリンアゴニスト化合物は、本明細書に記載されるもの、その開示内容全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,686,411号および米国公開第2008/0176804号に記載されるものなどのアミリン受容体結合アッセイにおいて、約200nM以下、約100

40

50

n M以下または約 5 0 n M以下の I C<sub>50</sub>を有し得る。用語「I C<sub>50</sub>」とは、通例の意味で、生物学的または生化学的機能を阻害する化合物の半数阻害濃度を指す。したがって、受容体結合研究との関連において、I C<sub>50</sub>とは、特定された受容体から既知リガンドの半量と競合する試験化合物の濃度を指す。アミリンアゴニスト化合物は、本明細書に、また米国特許第 5, 6 8 6, 4 1 1 号に記載されるものなどのヒラメ筋アッセイにおいて、約 2 0 n M以下、約 1 5 n M以下、約 1 0 n M以下または約 5 n M以下の E C<sub>50</sub>を有し得る。用語「E C<sub>50</sub>」とは、通例の意味で、当技術分野で公知の、ベースライン応答と最大応答の間の中間の応答を誘導する化合物の有効濃度を指す。アミリンアゴニスト化合物は、[<sup>25</sup>, <sup>28</sup>, <sup>29</sup> P r o] ヒト - アミリン ( プラムリンチド ) に対して少なくとも 9 0 % または 1 0 0 % の配列同一性を有し得る。アミリンアゴニスト化合物は、アミリン (例えば、ヒトアミリン、ラットアミリンなど) およびカルシトニン (例えば、ヒトカルシトニン、サケカルシトニンなど) のペプチドキメラであり得る。適した、例示的アミリンアゴニスト化合物はまた、その開示内容全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる米国公開第 2 0 0 8 / 0 2 7 4 9 5 2 号に記載されている。別に示されない限り、用語「約」とは、数値との関連において、数値の + / - 1 0 % を指す。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 5 7 】

「断片」とは、ポリペプチドとの関連において、本明細書において、通例の化学的意味で、ポリペプチドの一部を指す。例えば、断片は、親ポリペプチドの 1 個または複数の残基の N 末端欠失または C 末端欠失に起因し得、および / または断片は、親ポリペプチドの 1 個または複数の残基の内部欠失に起因し得る。用語「親」とは、ポリペプチドとの関連において、通例の意味で、修飾、例えば、挿入、欠失および / または置換の前の参照構造として働くポリペプチドを指す。用語「コンジュゲート」、「ペプチドコンジュゲート」、「ポリペプチドコンジュゲート」などは、本明細書に記載された方法において有用な化合物との関連において、適宜、リンカーを介して、1 つまたは複数の持続期間増強部分と結合している成分ポリペプチドを指す。

#### 【 0 0 5 8 】

用語「ペプチド」および「ポリペプチド」とは、本明細書に記載されたポリペプチドコンジュゲートのポリペプチド成分との関連において、同義である。用語「ペプチド」とは、通例の意味で、アミド結合によって接続しているアミノ酸のポリマーを指す。用語「d e s - アミノ酸」、「d e s - A A」、「d e s L y s」などは、当技術分野で通例であるように、示されたアミノ酸の不在を指す。アミノ酸 (または官能基) が「不在」であることは、不在のアミノ酸 (または官能基) の N 末端および C 末端側に以前に結合していた残基 (または官能基) が、一緒に結合するようになったことを意味する。用語「ペプチド成分」および「ポリペプチド成分」とは、本明細書に記載されたポリペプチドコンジュゲート内に含まれるポリペプチドを指す。

#### 【 0 0 5 9 】

「誘導体」とは、ポリペプチドとの関連において、親またはその類似体のアミノ酸配列を有するが、そのアミノ酸側基、 - 炭素原子、主鎖窒素原子、末端アミノ基または末端カルボン酸基のうち 1 つまたは複数の化学的修飾をさらに有する分子を指す。化学的修飾として、それだけには限らないが、化学部分を付加すること、新規結合を作り出すことおよび化学部分を除去することが挙げられる。アミノ酸側基の修飾として、それだけには限らないが、リシン - アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジンまたはリシンの N - アルキル化、グルタミン酸またはアスパラギン酸のカルボン酸基のアルキル化およびグルタミンまたはアスパラギンの脱アミド化が挙げられる。末端アミノの修飾として、それだけには限らないが、デスアミノ、N - 低級アルキル、N - ジ - 低級アルキル、拘束されたアルキル (例えば、分岐、環状、縮合、アダマンチル) および N - アシル修飾が挙げられる。末端カルボキシ基の修飾として、それだけには限らないが、アミド、低級アルキルアミド、拘束されたアルキル (例えば、分岐、環状、縮合、アダマンチル) アルキル、ジアルキルアミドおよび低級アルキルエステル修飾が挙げられる。さらに、側基または末端基の 1 個または複数、通常の合成化学者に公知の保護基によって保護される場合もある。



アミノ酸の - 炭素は、モノ - またはジメチル化され得る。1つまたは複数の特定の部位で、個々のアミノ酸の立体化学が、(L)/S から (D)/R に反転され得る本明細書に記載されたポリペプチド成分の誘導体もまた、企図される。また、例えば、Asn、Ser および / または Thr 残基でグリコシル化によって修飾されたポリペプチド成分も企図される。提供される方法において有用な化合物はまた、本明細書に記載されたペプチド (天然の、アゴニスト、類似体および誘導体) の生物学的に活性な断片であり得る。

#### 【0060】

用語「ミメティック」、「ペプチドミメティック」などは、通例の意味で、天然親ペプチドの生物学的作用 (単数または複数) をアゴナイズまたはアンタゴナイズできる非ペプチド構造要素を含有する化合物を指す。

10

#### 【0061】

本願を通じて、選択肢は、マーカッシュ群、例えば、2種以上の可能性あるアミノ酸を含有する各アミノ酸位置で書かれているということは留意されるべきである。具体的には、マーカッシュ群の各メンバーは、別個に考えられなければならない、それによって別の実施形態を含み、マーカッシュ群は、単一の単位として読み取られてはならないということが企図される。

#### 【0062】

本明細書において使用される場合、単数形の「不定冠詞」および「定冠詞」(「a」、「an」および「the」) は、別に示されるか、文脈から明確でない限り、複数の言及を含む。例えば、文脈から明らかであるように、「1種の」類似体は、1種または複数の類似体を含み得る。

20

#### 【0063】

#### II. 化合物

第1の態様において、1つまたは複数の持続期間増強部分が、適宜、リンカーを介して、連結しているポリペプチド成分を含むポリペプチドコンジュゲートが提供される。したがって、ポリペプチド成分は、好ましくは、共有結合による結合によって、1つまたは複数の持続期間増強部分が結合される鑄型 (「ポリペプチド鑄型」) として働く。持続期間増強部分のポリペプチド成分との連結は、本明細書に記載されるようなリンカーを介したものであり得る。あるいは、持続期間増強部分のポリペプチド成分との連結は、直接共有結合によるものであり得る。持続期間増強部分は、本明細書に記載されるような水溶性ポリマーであり得る。いくつかの実施形態では、複数の持続期間増強部分が、ポリペプチド成分と結合しており、この場合には、各持続期間増強部分との各リンカーは、本明細書に記載されたリンカーから独立に選択される。

30

#### 【0064】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分は、以下の式 (I) の残基 1 ~ 37 のアミノ酸配列を含み、ここで、式 (I) に示されるアミノ酸の最大 25% が欠失し、または異なるアミノ酸で置換されていてもよい：

$X^1\text{-Xaa}^1\text{-Cys}^2\text{-Asn}^3\text{-Thr}^4\text{-Ala}^5\text{-Thr}^6\text{-Cys}^7\text{-Ala}^8\text{-Thr}^9\text{-Gln}^{10}\text{-Arg}^{11}\text{-Leu}^{12}\text{-Ala}^{13}\text{-Asn}^{14}\text{-Phe}^{15}\text{-Leu}^{16}\text{-Val}^{17}\text{-Xaa}^{18}\text{-Ser}^{19}\text{-Ser}^{20}\text{-Xaa}^{21}\text{-Asn}^{22}\text{-Phe}^{23}\text{-Xaa}^{24}\text{-Xaa}^{25}\text{-Xaa}^{26}\text{-Xaa}^{27}\text{-Xaa}^{28}\text{-Xaa}^{29}\text{-Thr}^{30}\text{-Xaa}^{31}\text{-Val}^{32}\text{-Gly}^{33}\text{-Xaa}^{34}\text{-Xaa}^{35}\text{-Thr}^{36}\text{-Tyr}^{37}\text{-X(配列番号4)}$  (I)。

40

#### 【0065】

式 (I) 中、 $X^1$  は、水素、N末端キャップ基、持続期間増強部分との結合または持続期間増強部分とのリンカーである。 $Xaa^1$  は、Lys または結合であり、 $Xaa^{18}$  は、Lys、Cys または His であり、 $Xaa^{21}$  は、Lys、Cys または Asn であり、 $Xaa^{24}$  は、Lys、Cys または Gly であり、 $Xaa^{25}$  は、Lys、Cys または Pro であり、 $Xaa^{26}$  は、Lys、Cys または Ile であり、 $Xaa^{27}$  は、Lys、Cys または Leu であり、 $Xaa^{28}$  は、Lys、Cys または Pro であり、 $Xaa^{29}$  は、Lys、Cys または Pro であり、 $Xaa^{31}$  は、Lys、Cys または Asn であり、 $Xaa^{34}$  は、Lys、Cys または Ser であり、 $Xaa^{35}$  は、Lys、Cys または Asn である。当業者ならば、式 (I) および本明細書に開示さ

50

れたその他の式のポリペプチド成分が、1つまたは複数の持続期間増強部分と結合するのに適当な結合価を有することは直ちに認識するであろう。例えば、単一の持続期間増強部分が存在する場合には、式(I)のポリペプチド成分は、一価ペプチドであり、その結合価は、適宜、リンカーを介して、持続期間増強部分と結合する。したがって、2つの持続期間増強部分が存在する場合には、式(I)のポリペプチド成分は、二価ペプチドなどである。

#### 【0066】

さらに、式(I)に関して、変数Xは、C末端官能基(例えば、C末端キャップ)を表す。Xは、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換シクロアルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、置換もしくは非置換アラキルアミノ、置換もしくは非置換アルキルオキシ、置換もしくは非置換アリールオキシ、置換もしくは非置換アラキルオキシ、ヒドロキシル、持続期間増強部分との結合または持続期間増強部分とのリンカーである。いくつかの実施形態では、持続期間増強部分は、適宜、リンカーを介して、共有結合によって、連結アミノ酸残基、X'またはXの側鎖と連結している。いくつかの実施形態では、持続期間増強部分は、適宜、リンカーを介して、共有結合によって、ポリペプチド成分の主鎖原子と連結している。式(I)の残基1~37の配列を有するポリペプチド成分のC末端が、官能基Xでキャップされている場合には、Xは、それによってC末端アミドを形成するアミンであることが好ましい。式(I)によるポリペプチド成分を含めた本明細書に記載されたポリペプチド成分のN末端は、共有結合によって、それだけには限らないが、アセチル基を含めたさまざまな官能基と連結してもよい。用語「N末端キャップ基」とは、通例の意味で、当技術分野で公知のように、ポリペプチド、例えば、置換もしくは非置換アシル、置換もしくは非置換アシルオキシ、シッフ塩基などのN末端窒素と共有結合によって結合している部分を指す。いくつかの実施形態では、N末端官能基X'は、当技術分野で公知のアミン保護基、好ましくは、Fmocである。

10

20

#### 【0067】

いくつかの実施形態では、式(I)の残基1~37のアミノ酸の最大5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%またはさらに50%が、式(I)によるポリペプチド成分において欠失または置換されている。いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分は、式(I)に示されるアミノ酸配列に対して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはさらに16のアミノ酸置換を有する。

30

#### 【0068】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドコンジュゲートのポリペプチド成分は、式(I)によるアミノ酸配列の残基1~37に関して定義された配列同一性を有する配列を有する。

#### 【0069】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたポリペプチド成分と式(I)の残基1~37の間の配列同一性は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはさらに高い。いくつかの実施形態では、式(I)の残基1~37に示されるアミノ酸の最大50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%またはさらにそれ未満が、欠失していてもよく、または異なるアミノ酸で置換されていてもよい。いくつかの実施形態では、配列同一性は、範囲75%~100%内である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、範囲75%~90%内である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、範囲80%~90%内である。いくつかの実施形態では、配列同一性は、少なくとも75%である。いくつかの実施形態では、コンジュゲートのポリペプチド成分は、式(I)の残基1~37の配列を有する。

40

#### 【0070】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分は、化合物12の配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分は、化合物6の配列を有する。いくつかの実施形態では、

50

は、ポリペプチド成分は、式 (I) の配列に関して、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を有する。「保存的アミノ酸置換」とは、通例の意味で、側鎖で類似の生化学的特性 (例えば、親水性、疎水性 (hydrophobicity)、電荷の種類、ファン - デル - ワールス半径など) を有するアミノ酸の置換を指す。「非保存的アミノ酸置換」とは、通例の意味で、側鎖で非類似の生化学的特性を有するアミノ酸の置換を指す。

#### 【0071】

本明細書に示されたポリペプチド成分のいずれかに関する配列同一性の算出 (例えば、式 (I) の残基 1 ~ 37に見出される) では、比較されるべき配列は、いずれのN末端 (すなわち、X') またはC末端 (すなわち、X) 官能基が存在しようが、本明細書に開示されたアミノ酸にわたってとられるということは理解される。アミノ酸の側鎖と共有結合によって連結している持続期間増強部分の存在は、配列同一性の算出には重要ではないということはさらに理解される。例えば、式 (I) の任意の位置で置換され、適宜、リンカーを介して、持続期間増強部分とさらに結合しているリシンは、配列同一性算出の目的のためのリシンである。

#### 【0072】

式 (I) の残基 1 ~ 37 の配列を含めたポリペプチドは、アミリンおよびカルシトニンまたはその類似体のキメラ組合せであると考えられ得る。アミリンは、栄養素の摂取に応じてインスリンと同時に分泌される、膵臓細胞によって合成されるペプチドホルモンである。アミリンの配列は、哺乳類種中で高度に保存されており、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、カルシトニン、インターメジンおよびアドレノメデュリンに対して構造的類似性を有する。アミリンの血糖調節作用は、栄養素によって刺激されるグルカゴン分泌の抑制によって循環におけるグルコース出現速度を調節することおよび胃内容排出を減速することによって、インスリンのそれを補完する。インスリンによって治療されている糖尿病の患者では、ブラムリンチド、ヒトアミリンの合成、等効力類似体が、不適当に上昇した食後グルカゴン分泌を抑制することおよび胃内容排出を減速することによって食後グルコース変動幅を低減する。ラットアミリン、ヒトアミリンおよびブラムリンチドの配列は、それぞれ以下のとおりである：

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY (配列番号1)；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY (配列番号2)；

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY (配列番号3)。

#### 【0073】

別の態様では、1位のアミノ酸残基が不在であり (すなわち、des-Lys<sup>1</sup>)、2 ~ 37位のアミノ酸残基が、リシン残基またはシステイン残基で置換されており、前記リシン残基またはシステイン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結しており、アミノ酸番号付けが配列番号3中のアミノ酸番号と一致する、配列番号3を有するブラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートが提供される。

#### 【0074】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり (すなわち、des-Lys<sup>1</sup>)、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、31、32、33、34、35、36または37位のうちいずれか1つのアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するブラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

#### 【0075】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり (すなわち、des-Lys<sup>1</sup>)、18、21、24 ~ 29、31、34または35位のうちいずれか1つのアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するブラムリンチドま

たはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0076】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、des-Lys<sup>1</sup>）、18位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0077】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、des-Lys<sup>1</sup>）、21位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

10

【0078】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、des-Lys<sup>1</sup>）、24位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0079】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、des-Lys<sup>1</sup>）、25位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

20

【0080】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、des-Lys<sup>1</sup>）、26位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

30

【0081】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、des-Lys<sup>1</sup>）、27位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0082】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、des-Lys<sup>1</sup>）、28位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

40

【0083】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、des-Lys<sup>1</sup>）、29位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0084】

50

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、31位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0085】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、34位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

10

【0086】

別の態様では、本発明は、1位のアミノ酸残基が不在であり（すなわち、d e s - L y s<sup>1</sup>）、35位のアミノ酸残基が、リシン残基で置換されており、前記リシン残基が、適宜、リンカーを介して、ポリエチレングリコールポリマーと連結している、配列番号3を有するプラムリンチドまたはその類似体の誘導体であるポリペプチドコンジュゲートに関する。

【0087】

リンカー。用語「リンカー」などは、持続期間増強部分の、本明細書に記載されたポリペプチドコンジュゲート中のポリペプチド成分との結合との関連において、順に、結合に利用可能な結合価を有するポリペプチド成分と、結合に利用可能な結合価を有する持続期間増強部分と共有結合によって結合している二価の種（- L - ）を意味する。ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、側鎖残基（例えば、リシン、システイン、アスパラギン酸およびその相同体）であることが好都合である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、リシンまたはシステイン残基の側鎖である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、N末端アミンである。いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、C末端カルボキシルである。いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分上の利用可能な結合部位は、その主鎖原子である。本明細書において使用される場合、用語「連結アミノ酸残基」とは、適宜、リンカーを介して、持続期間増強部分が結合している式（I）の残基1～37内のアミノ酸を意味する。

20

30

【0088】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分を持続期間増強部分と共有結合によって連結するリンカーを有する化合物が提供される。リンカーは適宜である、すなわち、任意のリンカーは、単に結合であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリペプチド成分の側鎖で結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリペプチド成分の主鎖原子と結合している。

【0089】

一実施形態では、リンカーは、多官能性アミノ酸、例えば、それだけには限らないが、リシンおよびその相同体、アスパラギン酸およびその相同体などである。用語「多官能性」とは、アミノ酸との関連において、アミノ酸の アミンおよびカルボキシル官能基に加えて、反応して結合を形成し得る側鎖官能基を指す。多官能性アミノ酸の例示的官能基として、それだけには限らないが、アミン、カルボキシルおよびスルフヒドリル官能基が挙げられる。

40

【0090】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ペプチド結合によって連結している1～30個のアミノ酸（「ペプチドリナー」）を含む。アミノ酸は、20種の天然に存在するアミノ酸から選択され得る。あるいは、非天然アミノ酸は、化学合成、翻訳後化学的修飾によって、または宿主細胞における組換え発現によるインビボ（in vivo）組込みのいずれかによって組み込まれ得る。これらのリンカーアミノ酸の一部は、グリコシル化され得る。

50

別の実施形態では、1～30個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミンおよびリシンから選択される。いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシン、アラニンおよび/またはセリンなどの立体障害のないアミノ酸の大部分で構成されている。ポリグリシン、例えば、 $(\text{Gly})_3$ 、 $(\text{Gly})_4$  (配列番号5)、 $(\text{Gly})_5$  (配列番号6)は、特に有用であり、ポリアラニン、ポリ $(\text{Gly}-\text{Ala})$ およびポリ $(\text{Gly}-\text{Ser})$ も同様である。リンカーのその他の特定の例として、 $(\text{Gly})_3\text{Lys}(\text{Gly})_4$  (配列番号7)、 $(\text{Gly})_3\text{AsnGlySer}(\text{Gly})_2$  (配列番号8)、 $(\text{Gly})_3\text{Cys}(\text{Gly})_4$  (配列番号9)および $\text{GlyProAsnGlyGly}$  (配列番号10)がある。 $\text{Gly}$ および $\text{Ala}$ の組合せは、特に有用であり、 $\text{Gly}$ および $\text{Ser}$ の組合せも同様である。したがって、さらなる実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシンリッチペプチド、例えば、 $\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}$ ; 配列 $[\text{Gly}-\text{Ser}]_n$  (配列番号11)、 $[\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ser}]_n$  (配列番号12)、 $[\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ser}]_n$  (配列番号13)および $[\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ser}]_n$  (配列番号14) (式中、 $n$ は、1、2、3、4、5または6である)、例えば、 $[\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ser}]_3$  (配列番号15)からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

#### 【0091】

いくつかの実施形態では、リンカーは、二価ヘテロ原子を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{OCONH}-$ および $-\text{NHCONH}-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンであるか、またはそれを含む。代表的なリンカーとして、持続期間増強部分およびポリペプチド成分と結合している、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{OCONH}-$ および $-\text{NHCONH}-$ 、アミドおよび/またはウレタンが挙げられる。

#### 【0092】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリペプチド成分の主鎖官能基(部分)のアミノ酸側鎖と持続期間増強部分上の官能基間の直接化学コンジュゲーションから得られる。この種の結合の例示として、当技術分野で周知のように、標準固相合成法によって達成されるアミド結合の形成がある。本明細書に記載されたリンカーは、例示であり、本発明の範囲内のリンカーは、はるかに長いものであり得、その他の残基を含み得る。

#### 【0093】

いくつかの実施形態では、リンカーは、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンのうち2種以上を含む。

#### 【0094】

いくつかの実施形態では、リンカーは、構造 $-\text{L}^1-\text{L}^2-$  (式中、 $\text{L}^1$ および $\text{L}^2$ は、各々独立に、二価ヘテロ原子、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{OCONH}-$ および $-\text{NHCONH}-$ 、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである)を有する。いくつかの実施形態では、 $\text{L}^1$ および $\text{L}^2$ は、各々独立に、 $-\text{OCO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{NHCO}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-$  (式中、「 $n$ 」は独立に、各出現で1～5である)である。

#### 【0095】

いくつかの実施形態では、リンカーは、構造 $-\text{OCO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{NHCO}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-($

$\text{CH}_2)_n -$ 、 $- \text{O} - (\text{CH}_2)_n -$ 、 $- \text{SO}_2 - (\text{CH}_2)_n -$ 、 $- \text{SO}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{S} -$  (式中、「 $n$ 」は独立に、各出現で1～5である)を有する。

【0096】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載された、リンカー内の置換された基または置換リンカー基は、少なくとも1個の置換基 (substituent group) で置換されている。より具体的には、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたリンカー内の置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンは各々、少なくとも1個の置換基 (substituent group) で置換されている。その他の実施形態では、これらの基のうち少なくとも1個またはすべてが、少なくとも1個の大きさが制限された置換基 (substituent group) で置換されている。あるいは、これらの基のうち少なくとも1個またはすべてが、少なくとも1個の低級置換基 (substituent group) で置換されている。

10

【0097】

本明細書に記載されたリンカーのその他の実施形態では、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$  アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2～20員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換  $\text{C}_4 \sim \text{C}_8$  シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の4～8員のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アルキレンは、置換もしくは非置換  $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$  アルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の2～20員のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換シクロアルキレンは、置換もしくは非置換  $\text{C}_4 \sim \text{C}_8$  シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の4～8員のヘテロシクロアルキレンである。

20

【0098】

あるいは、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換  $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$  アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2～8員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換  $\text{C}_5 \sim \text{C}_7$  シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の5～7員のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アルキレンは、置換もしくは非置換  $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$  アルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の2～8員のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換シクロアルキレンは、置換もしくは非置換  $\text{C}_5 \sim \text{C}_6$  シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の5～7員のヘテロシクロアルキレンである。

30

【0099】

ポリペプチド成分。本明細書に記載された化合物および方法において有用なポリペプチド成分として、それだけには限らないが、以下の表1に提供される式(I)の残基1～37に示されるポリペプチド成分が挙げられる。それとは反対に示されない限り、明確に提供された配列を有するペプチドを含めた本明細書に記載されたすべてのペプチドは、遊離カルボン酸塩およびアミド化形態の両方で企図される。

40

【0100】

表1. 本明細書に記載された化合物において有用な成分ポリペプチド

【表 1】

| 化合物 | 説明(配列)   | 配列番号 |
|-----|--|------|
| 1   | KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                  | 16   |
| 2   | CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>([desLys <sup>1</sup> ]-化合物 1) | 17   |
| 3   | KCNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                  | 18   |
| 4   | CNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>([desLys <sup>1</sup> ]-化合物 3) | 19   |
| 5   | KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                  | 20   |
| 6   | CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>([desLys <sup>1</sup> ]-化合物 5) | 21   |
| 7   | KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                  | 22   |
| 8   | CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>([desLys <sup>1</sup> ]-化合物 7) | 23   |
| 9   | KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                   | 24   |
| 10  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub><br>([desLys <sup>1</sup> ]-化合物 9)  | 25   |
| 11  | CNTATCATQRLANFLVHSSKNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                   | 26   |
| 12  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPKLPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 27   |
| 13  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTKVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 28   |
| 14  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 29   |
| 15  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGKILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 30   |
| 16  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPIKPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 31   |
| 17  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILKPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 32   |
| 18  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPKTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 33   |
| 37  | CNTATCATQRLANFLVKSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 34   |
| 38  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGKNTY-NH <sub>2</sub>                                    | 35   |
| 39  | CNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSKTY-NH <sub>2</sub>                                    | 36   |

## 【0101】

持続期間増強部分。いくつかの実施形態では、持続期間増強部分は、式 - L - R (式中、R は、本明細書に記載された持続期間増強部分であり、L は、リンカーまたは結合である) を有する「連結している持続期間増強部分」内に含まれる。L がリンカーである場合には、L は、当技術分野で公知のように、- C (O) -、- NH -、- O -、- S -、- S - S -、- O C O -、- O C O N H -、- N H C O N H -、置換もしくは非置換アルキレン、置換もしくは非置換アルケニレン、置換もしくは非置換ウレタン、置換もしくは非置換アルキルアミド、置換もしくは非置換アルキルスルホン、置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンなどであり得る。

## 【0102】

いくつかの実施形態では、L は、R<sup>1</sup> 置換もしくは非置換アルキレン、R<sup>1</sup> 置換もしくは



は非置換アルケニレン、 $R^1$ 置換もしくは非置換ウレタン、 $R^1$ 置換もしくは非置換アルキルアミド、 $R^1$ 置換もしくは非置換アルキルスルホン、 $R^1$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキレン、 $R^1$ 置換もしくは非置換シクロアルキレン、 $R^1$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンである。 $R^1$ は、 $R^2$ 置換もしくは非置換アルキル、 $R^2$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキル、 $R^2$ 置換もしくは非置換シクロアルキル、 $R^2$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、 $R^2$ 置換もしくは非置換アリールまたは $R^2$ 置換もしくは非置換ヘテロアリールである。 $R^2$ は、 $R^3$ 置換もしくは非置換アルキル、 $R^3$ 置換もしくは非置換ヘテロアルキル、 $R^3$ 置換もしくは非置換シクロアルキル、 $R^3$ 置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、 $R^3$ 置換もしくは非置換アリールまたは $R^3$ 置換もしくは非置換ヘテロアリールである。 $R^3$ は、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリールまたは非置換ヘテロアリールである。

10

#### 【0103】

いくつかの実施形態では、連結している持続期間増強部分 - L - R は、ポリペプチド成分のアミノ酸側鎖と、または主鎖原子もしくはその一部と共有結合によって結合している。例示的主鎖部分は、N末端に遊離アミンを、C末端に遊離カルボキシルまたはカルボン酸塩を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸側鎖または主鎖原子または一部は、ポリエチレングリコールまたはその誘導体と共有結合によって結合している。

#### 【0104】

水溶性ポリマー。いくつかの実施形態では、持続期間増強部分 R は、水溶性ポリマーである。「水溶性ポリマー」とは、本明細書に記載された方法にとって有用であるために、当技術分野で公知の、例えば、温度、イオン濃度などの生理学的条件下で十分に水に溶解性であるポリマーを意味する。水溶性ポリマーは、このような水溶性ポリマーが結合しているペプチドまたはその他の生体分子の溶解度を増大し得る。実際、このような結合は、インビボで、投与されるタンパク質の、循環寿命、水溶解度および/または抗原性を改善するための手段として提案されている。例えば、米国特許第4,179,337号、米国公開出願第2008/0032408号参照のこと。この目的に向けて、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）などといった多数の異なる水溶性ポリマーおよび結合化学が使用されている。

20

30

#### 【0105】

ポリエチレングリコール。いくつかの実施形態では、連結している持続期間増強部分 - L - R は、ポリエチレングリコールを含む。ポリエチレングリコール（「PEG」）は、治療上使用可能なポリペプチドを得る試みにおいて使用されている。例えば、Zalipsky, S., 1995, Bioconjugate Chemistry, 6:150-165; Mehvar, R., 2000, J. Pharm. Pharmacol. Sci., 3:125-136参照のこと。当業者によって理解されるように、PEG主鎖  $[(CH_2CH_2-O)_n]$ 、 $n$ ：繰り返しモノマーの数]は、可動性であり両親媒性である。いずれかの理論または作用機序に拘泥するものではないが、長い鎖のようなPEG分子または部分は、極度に水和しており、水性媒質中にある場合には、迅速に動くと考えられている。この迅速な動きは、PEGに大容量を一掃させると考えられており、その他の分子のアプローチおよび干渉を妨げる。結果として、PEGポリマー鎖は、別の化学実体（ペプチドなど）と結合している場合には、免疫応答およびその他のクリアランス機序からこのような化学実体を保護し得る。結果として、ペグ化は、薬物動態を最適にすること、バイオアベイラビリティを増大することならびに免疫原性および投薬頻度を低減することによって、薬物有効性および安全性の改善につながり得る。「ペグ化」とは、通例の意味で、PEG部分の、別の化合物とのコンジュゲーションを指す。例えば、PEGの結合は、タンパク質をタンパク質分解から保護するとわかっている。例えば、Blomhoff, H. K. et al., 1983, Biochim Biophys Acta, 757:202-208参照のこと。それとは反対に明確に示

40

50

されない限り、用語「PEG」、「ポリエチレングリコールポリマー」などは、ポリエチレングリコールポリマーおよびメトキシ-PEG (mPEG) を含めたその誘導体を指す。

#### 【0106】

PEGおよび関連ポリマーなどのポリマー部分を、タンパク質上に見られる反応性基と結合するために、さまざまな手段が使用されている。例えば、米国特許第4,179,337号、同4,002,531号、Abuchowski et al., 1981、in "Enzymes as Drugs", J. S. Holcberg and J. Roberts, (Eds.), pp. 367-383; Zalipsky, S., 1995, Bioconjugate Chemistry, 6:150-165参照のこと。タンパク質を修飾するためのPEGおよびその他のポリマーの使用は論じられている。例えば、Cheng, T.-L. et al., 1999m, Bioconjugate Chem., 10:520-528; Belcheva, N. et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10:932-937; Bettinger, T. et al., 1998, Bioconjugate Chem., 9:842-846; Huang, S.-Y. et al., 1998, Bioconjugate Chem., 9:612-617; Xu, B. et al. 1998, Langmuir, 13:2447-2456; Schwarz, J. B. et al., 1999, J. Amer. Chem. Soc., 121:2662-2673; Reuter, J. D. et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10:271-278; Chan, T.-H. et al., 1997, J. Org. Chem., 62:3500-3504参照のこと。タンパク質中の通常の結合部位として、リシン残基上またはN末端のものなどの一次アミノ基、システイン側鎖上のもなどのチオール基およびグルタミン酸またはアスパラギン酸残基上またはC末端のものなどのカルボキシル基が挙げられる。結合の一般的な部位として、糖タンパク質の糖残基に対するもの、システインまたは標的ポリペプチドのN末端およびリシンに対するものがある。用語「ペグ化」などは、本明細書に記載されたような、および/または当技術分野で公知のような、ポリエチレングリコールの、適宜リンカーを介したポリペプチドまたはその他の生体分子との共有結合による結合を指す。

10

20

30

#### 【0107】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたポリペプチドコンジュゲート中のPEG部分は、特定された範囲内の名目上の分子量を有する。当技術分野で通例であるように、PEG部分の大きさは、通常キロダルトン(kD)で提供される名目上の分子量への言及によって示される。分子量は、数、重量、粘度および「Z」平均分子量を含めた当技術分野で公知のさまざまな様式で算出される。PEGなどといったポリマーは、名目上の平均値についての分子量の分布として存在するということは理解される。

30

#### 【0108】

PEGの分子量についての技術用語の例示として、用語「mPEG 40KD」とは、40キロダルトンの名目上の分子量を有するメトキシポリエチレングリコールポリマーを指す。その他の分子量のPEGへの言及は、この慣例に従う。いくつかの実施形態では、PEG部分は、10~100KD、20~80KD、20~60KDまたは20~40KDの範囲の名目上の分子量を有する。いくつかの実施形態では、PEG部分は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95またはさらに100KDの名目上の分子量を有する。PEG部分は、20、25、30、40、60または80KDの分子量を有することが好ましい。

40

#### 【0109】

ポリペプチドの誘導体化に有用なPEG分子は、通常、当技術分野で公知のように、直鎖、分岐およびWarwick[すなわち、PolyPEG(登録商標)]クラスのPEGに分類される。それとは反対に明確に示されない限り、本明細書に記載されたPEG部分は、直鎖PEGである。さらに、用語「2アーム分岐」、「Y型」などは、当技術分野で公知のように、分岐PEG部分を指す。用語「Warwick」は、PEGとの関連において、「コーム」または「コーム型」PEGとしても知られ、当技術分野で公知のように、主鎖、通常、ポリ(メタクリレート)と結合しているさまざまなマルチアームPEGを指す。本明細書において提供された表中に使用された慣例を含めた命名法に関して、反対に表示がない場合には、PEG部分は、ペプチドの主鎖と結合している。例えば、化合物19は、mPEG 40KDの、化合物1のN末端窒素とのコンジュゲーションの結果で

50

ある。同様に、化合物 20 は、mPEG40KD の、化合物 2 の N 末端窒素とのコンジュゲーションの結果である。アミノ酸の標準的な一文字略語が使用され得、同様に標準的な三文字略語も使用され得る。例えば、化合物 24 は、化合物 9 の 26 位の残基が、リシンと置換されており、リシン 26 (すなわち、 $K^{26}$ ) のペンダントアミン官能基が、PEG40KD 部分とコンジュゲートされている化合物 10 の類似体である。例示的化合物が以下の表 2 中に提供されている。

【0110】

表2. ペグ化化合物

【表 2】

| 化合物 | 説明                                 | 配列番号 |
|-----|------------------------------------|------|
| 19  | mPEG40KD- 化合物 1                    | 37   |
| 20  | mPEG40KD- 化合物 2                    | 38   |
| 21  | [ $K^{21}$ (mPEG40KD)]- 化合物 3      | 39   |
| 22  | [ $K^{21}$ (mPEG40KD)]- 化合物 4      | 40   |
| 23  | [ $K^{26}$ (mPEG40KD)]- 化合物 5      | 41   |
| 24  | [ $K^{26}$ (mPEG40KD)]- 化合物 6      | 42   |
| 25  | [ $K^{31}$ (mPEG40KD)]- 化合物 7      | 43   |
| 26  | [ $K^{31}$ (mPEG40KD)]- 化合物 8      | 44   |
| 27  | [ $K^{26}$ (Y 型-mPEG40KD)]- 化合物 5  | 45   |
| 28  | [ $K^{21}$ (mPEG40KD)]- 化合物 11     | 46   |
| 29  | [ $K^{26}$ (mPEG40KD)]- 化合物 12     | 47   |
| 30  | [ $K^{31}$ (mPEG40KD)]- 化合物 13     | 48   |
| 31  | [ $K^{26}$ (Y 型-mPEG40KD)]- 化合物 12 | 49   |
| 32  | [ $K^{24}$ (mPEG40KD)]- 化合物 14     | 50   |
| 33  | [ $K^{25}$ (mPEG40KD)]- 化合物 15     | 51   |
| 34  | [ $K^{27}$ (mPEG40KD)]- 化合物 16     | 52   |
| 35  | [ $K^{28}$ (mPEG40KD)]- 化合物 17     | 53   |
| 36  | [ $K^{29}$ (mPEG40KD)]- 化合物 18     | 54   |
| 40  | [ $K^{18}$ (mPEG40KD)]- 化合物 37     | 55   |
| 41  | [ $K^{34}$ (mPEG40KD)]- 化合物 38     | 56   |
| 42  | [ $K^{35}$ (mPEG40KD)]- 化合物 39     | 57   |

【0111】

組換え PEG。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたポリペプチドとコンジュゲートされた持続期間増強部分 - L - R は、構造化されていない組換えポリペプチドを含む。例えば、参照によって、すべての目的のために、本明細書に組み込まれる Schellen

10

20

30

40

50

berger et al., 2009, Nature Biotechnology, 27:1186-1192参照のこと。用語「組換え PEG」、「rPEG」、「rPEG持続期間増強部分」などは、式(I)のアミノ酸配列に対して定義された配列同一性を有するポリペプチド成分とのコンジュゲーションにおいて持続期間増強部分としてのPEGの代替として作用する、実質的に構造化されていない組換えポリペプチド配列を指す。rPEGおよびそのポリペプチドコンジュゲートは、合成が、組換え法によって達成され得、例えば、それだけには限らないが、PEGのポリペプチドとのコンジュゲーションの固相または液相化学合成工程を必要としないという潜在的に重大な利点を有する。

#### 【0112】

安定な高度に発現される、構造化されていないポリペプチドは、生物学的に活性な分子とコンジュゲートされ得、これが、それだけには限らないが、血清半減期を含めたさまざまな生物学的パラメータの調節をもたらすことが見出された。例えば、Schellenberger et al (同著)は、もっぱらA、E、G、P、SおよびTを組み込むことによって、エクセナチド、緑色蛍光タンパク質(GFP)およびヒト成長ホルモン(hGH)とのコンジュゲートの見かけの半減期が、コンジュゲートされていないポリペプチドに対して有意に増大されることを開示している。

#### 【0113】

いくつかの実施形態では、rPEG持続期間増強部分は、疎水性残基(例えば、F、I、L、M、V、WまたはY)、側鎖アミド含有残基(例えば、NまたはQ)または正に帯電している側鎖残基(例えば、H、KまたはR)を含まない。いくつかの実施形態では、rPEG持続期間増強部分は、A、E、G、P、SまたはTを含む。いくつかの実施形態では、rPEGは、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、60~70%、70~80%、80~90%、90~99%でグリシンを、またはさらに100%でグリシンを含む。

#### 【0114】

rPEG持続期間増強部分が、式(I)の構造と少なくとも75%同一であるポリペプチドのN末端またはC末端でコンジュゲートされている実施形態では、コンジュゲートされているポリペプチドおよびrPEGは、当技術分野で公知の組換え法によって合成される。rPEG持続期間増強部分が、式(I)の構造と少なくとも75%同一であるポリペプチドの側鎖でコンジュゲートされている実施形態では、rPEG部分は、組換え法によって合成され、その後、当技術分野で公知の、本明細書において開示される方法によってポリペプチドとコンジュゲートされる。

#### 【0115】

化学置換。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたポリペプチドコンジュゲート中の各置換された基は、少なくとも1個の置換基(substituent group)で置換されている。より具体的には、いくつかの実施形態では、本明細書に記載された置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換シクロアルキレン、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換アリーレンまたは置換もしくは非置換ヘテロアリーレンは各々、少なくとも1個の置換基(substituent group)で置換されている。いくつかの実施形態では、これらの基のうち少なくとも1個またはすべてが、少なくとも1個の大きさが制限された置換基(substituent group)で置換されている。いくつかの実施形態では、これらの基のうち少なくとも1個またはすべてが、少なくとも1個の低級置換基(substituent group)で置換されている。

#### 【0116】

いくつかの実施形態では、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2~20員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換C<sub>4</sub>~C<sub>8</sub>シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の4~8員のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは

非置換アルキレンは、置換もしくは非置換  $C_1 \sim C_{20}$  アルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の 2 ～ 20 員のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換シクロアルキレンは、置換もしくは非置換  $C_4 \sim C_8$  シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の 4 ～ 8 員のヘテロシクロアルキレンである。

#### 【0117】

いくつかの実施形態では、各置換もしくは非置換アルキルは、置換もしくは非置換  $C_1 \sim C_8$  アルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の 2 ～ 8 員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換シクロアルキルは、置換もしくは非置換  $C_5 \sim C_7$  シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の 5 ～ 7 員のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換アルキレンは、置換もしくは非置換  $C_1 \sim C_8$  アルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の 2 ～ 8 員のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換シクロアルキレンは、置換もしくは非置換  $C_5 \sim C_6$  シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の 5 ～ 7 員のヘテロシクロアルキレンである。

10

#### 【0118】

##### III. 例示的合成

ポリペプチド合成の一般法。本明細書に記載されたポリペプチドコンジュゲートのポリペプチド成分は、当技術分野で公知である生物学的、化学的および/または組換え DNA 技術を使用して調製され得る。例示的方法は、本明細書に、およびその開示内容全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 6,872,700 号; WO 2007/139941; WO 2007/140284; WO 2008/082274; WO 2009/011544; および米国公開第 2007/023866 号に記載されている。化合物を調製するためのその他の方法は、本明細書において示されており、および/または当技術分野で公知である。

20

#### 【0119】

例えば、本明細書に記載された化合物のポリペプチド成分は、自動化または半自動化ペプチドシンセサイザーなどの標準固相ペプチド合成技術を使用して調製され得る。通常、このような技術を使用して、 $\alpha$ -N-カルバモイル保護されたアミノ酸および樹脂上の成長するペプチド鎖と結合しているアミノ酸が、塩基（例えば、ジイソプロピルエチルアミンなど）の存在下、カップリング剤（例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾ-トリアゾールなど）の存在下で、不活性溶媒（例えば、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリジノン、塩化メチレンなど）中、室温でカップリングされる。

30

$\alpha$ -N-カルバモイル保護基は、試薬（例えば、トリフルオロ酢酸、ピペリジンなど）およびペプチド鎖に付加される次に望まれる N 保護アミノ酸を用いて繰り返されたカップリング反応を使用して、得られたペプチド-樹脂から除去される。t-ブチルオキシカルボニル (tBoc) フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) などといった適した N 保護基は、当技術分野で周知である。ペプチドシンセサイザーにおいて使用される、溶媒、アミノ酸誘導体および 4-メチルベンズヒドリル-アミン樹脂は、例えば、Applied Biosystems Inc. (Foster City, Calif.) を含めたさまざまな市販の供給源から購入され得る。

40

#### 【0120】

化学合成については、ポリペプチドコンジュゲートには固相ペプチド合成が使用されるが、その理由は、一般に、固相合成が、直接的なアプローチであり、市販規模への優れた拡張性を有し、一般に、相対的に長いポリペプチドコンジュゲートと適合するからである。固相ペプチド合成は、NMP/HOBt (オプション 1) システムおよびカップリングを用いる tBoc または Fmoc 化学を使用する自動ペプチドシンセサイザー (モデル 430A、Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) を用いて実施され得る (Applied Biosystems User's Manual for the A

50

BI 430A Peptide Synthesizer, Version 1.3B Jul. 1, 1988, section 6, pp. 49-70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif. 参照のこと)。B o c - ペプチド - 樹脂は、H F を用いて切断され得る（- 5 ～ 0 、 1 時間）。ペプチドは、水および酢酸を交互に用いて樹脂から抽出され得、濾液は凍結乾燥される。F m o c - ペプチド樹脂は、標準法（例えば、Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, pp. 6-12）に従って切断され得る。ペプチドはまた、A d v a n c e d C h e m T e c h シンセサイザー（モデル M P S 350、Louisville、Ky.）を使用して組み立てることもできる。

#### 【 0 1 2 1 】

アミンペグ化。P E G の共有結合による結合は、合成化学の技術分野の当業者に利用可能なさまざまな方法によって達成され得ることが好都合である。主鎖または側鎖アミンでのペグ化には、通常、P E G 試薬を、穏やかな条件下で反応させて、ペグ化化合物を得る。それだけには限らないが、還元を含めたさらなる工程が使用されてもよい。通常のペプチド - m P E G コンジュゲーションスキームでは、N - ヒドロキシルスクシンイミド（N H S）官能化された m P E G が、D I P E A（例えば、T F A 対イオンあたり 3 当量）の存在下、窒素下、適した溶媒（例えば、無水 D M F）中で、適した時間（例えば、24 時間）の間、遊離アミンを有するペプチドと混合され得る。コンジュゲートは、沈殿試薬（例えば、冷ジエチルエーテル）の付加によって沈殿され得る。沈殿物は、遠心分離によって単離され、水に溶解され、続いて、凍結乾燥され得る。精製は、さまざまなクロマトグラフィー手順（例えば、勾配 0 . 5 M N a C l を使用する M a c r o C a p S P 陽イオン交換カラム）によって得られ得る。純度は、S D S - P A G E によって調べられ得る。質量分析（例えば、M A L D I）は、水に対する透析後にコンジュゲートを特性決定するために使用され得る。

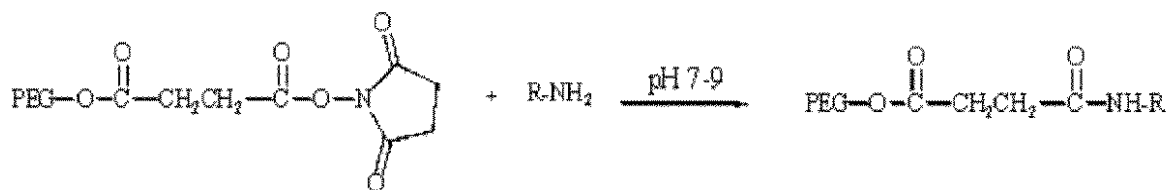
#### 【 0 1 2 2 】

P E G - S S（スクシンイミジルスクシネート）。スキーム 1 に示されるように、P E G - S S は、穏やかな条件下でアミン基と反応して、アミドを形成する。N H S 官能化は、p H 7 ~ 9 で第一級アミン基と反応して、安定なアミド結合を形成し得るアミノ反応性 P E G 誘導体を提供する。反応は、1 時間またはさらにそれ未満の時間で終了し得る。例示的反応は、スキーム 1 および 2 をたどる。

#### 【 0 1 2 3 】

#### 【 化 2 】

スキーム 1.



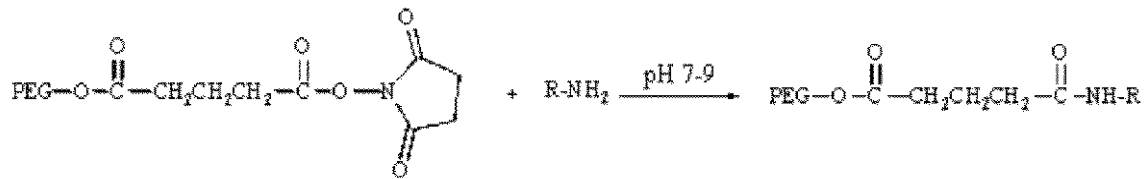
#### 【 0 1 2 4 】

P E G - S G（グルタル酸スクシンイミジル）。同様に、P E G - S G は、スキーム 2 に示されるように、アミン基と反応して、対応するアミドを形成する。

#### 【 0 1 2 5 】

## 【化 3】

スキーム 2.



## 【0126】

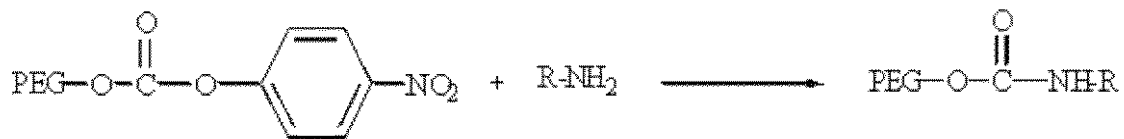
10

PEG-NPC (p-ニトロフェニルカーボネート)。PEG-NPCは、スキーム 3 に示されるように、アミン官能基と反応して、相対的に安定なウレタン官能基を形成する。

## 【0127】

## 【化 4】

スキーム 3.



20

## 【0128】

PEG-イソシアネート。スキーム 4 に示されるように、PEG-イソシアネートは、アミンと反応して、得られた相対的に安定なウレタン連結を形成し得る。

## 【0129】

## 【化 5】

スキーム 4.



30

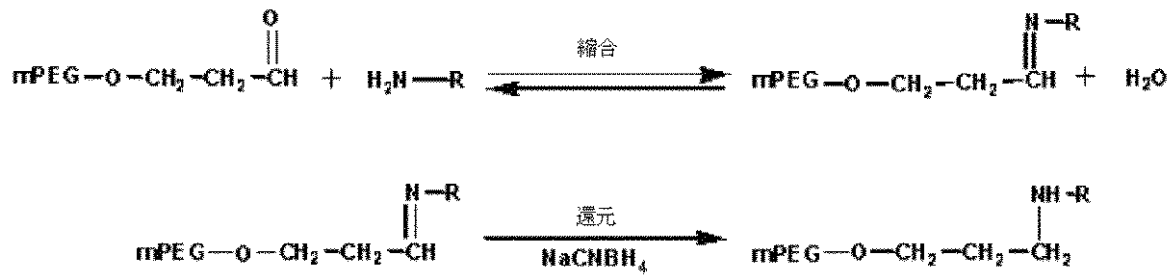
## 【0130】

PEG-アルデヒド。アミンとのさまざまなPEG-アルデヒド反応によって、イミンを得ることができ、これをさらに還元して、ペグ化アミンを得ることができる。反応 pH は、標的選択性にとって重要であり得る。N末端アミンペグ化は、およそ pH 5 であり得る。例えば、mPEG-プロピオンアルデヒドのペプチドアミンとの反応と、それに続く還元によって、以下のスキーム 5 に表される化合物が得られる。

## 【0131】

## 【化 6】

スキーム 5.



10

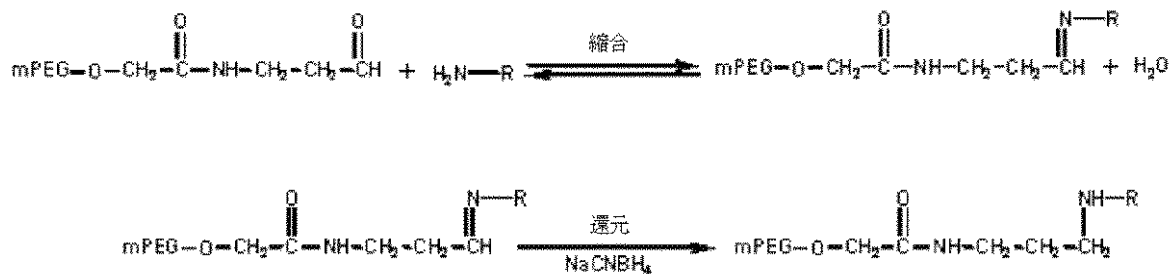
## 【0132】

同様に、mPEG-アミド-プロピオンアルデヒドのアミンとの縮合およびその後の還元によって、以下のスキーム6に表される化合物を得ることができる。

## 【0133】

## 【化 7】

スキーム 6.



20

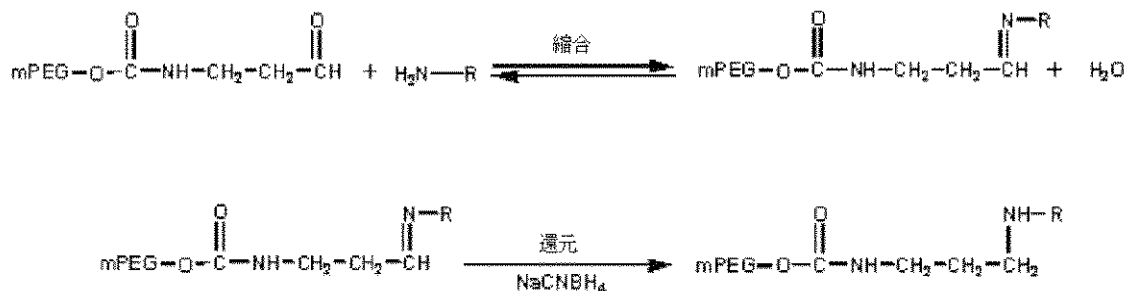
## 【0134】

mPEG-ウレタン-プロピオンアルデヒドのアミンとの反応およびその後の還元によって、以下のスキーム7に表される化合物を得ることができる。

## 【0135】

## 【化 8】

スキーム 7.



40

## 【0136】

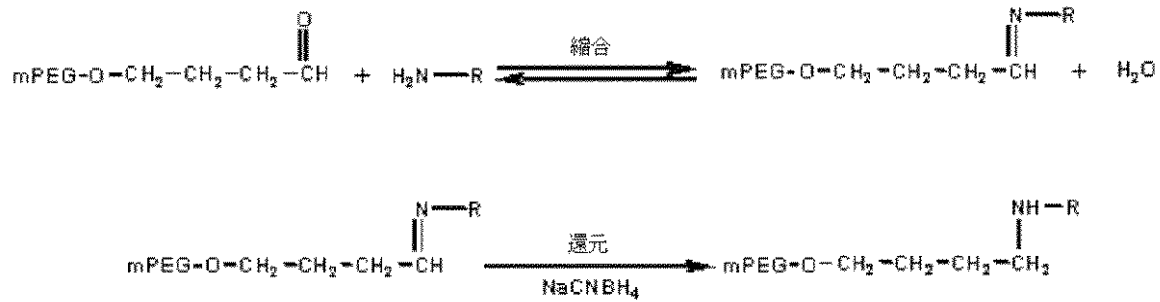
さらに、mPEG-ブチルアルデヒドのアミンとの反応およびその後の還元によって、以下のスキーム8に表される化合物を得ることができる。

## 【0137】



## 【化 9】

スキーム 8.



10

## 【0138】

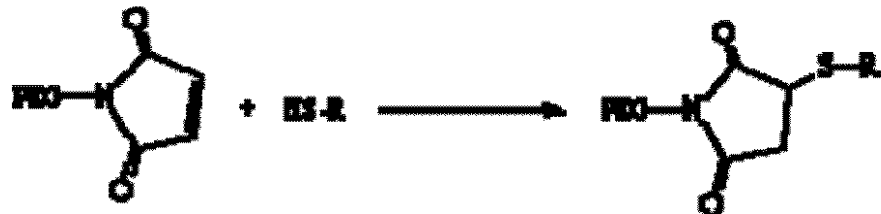
チオールペグ化：PEG-マレイミド。ペグ化は、当技術分野で公知のさまざまな方法によって、遊離チオール基で達成されることが好都合である。例えば、以下のスキーム 9 に示されるように、PEG-マレイミドは、標的化合物のチオールをペグ化し、これでは、マレイミン (maleimic) 環の二重結合が切断されてチオールと接続する。反応速度は、pH 依存的であり、最良条件は、およそ pH 8 に見られる。

## 【0139】

## 【化 10】

20

スキーム 9.



## 【0140】

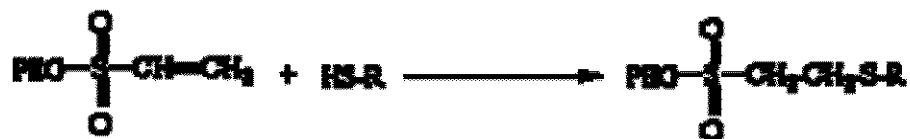
30

PEG-ビニルスルホン。さらに、以下のスキーム 10 に表されるように、PEG-ビニルスルホン、遊離チオールのペグ化にとって有用である。

## 【0141】

## 【化 11】

スキーム 10.



40

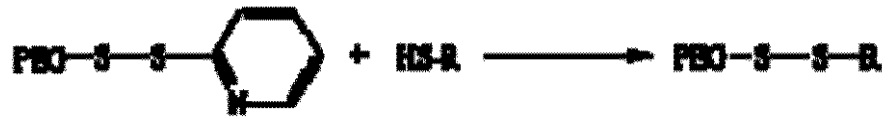
## 【0142】

PEG-オルトピリジル-ジスルフィド (OPSS)。ポリペプチドへのジスルフィド連結 PEG の形成は、以下のスキーム 11 に表される反応を含めた当技術分野で公知のさまざまな方法によって達成される。この種の連結では、得られた PEG コンjugate は、例えば、それだけには限らないが、水素化ホウ素、小分子ジチオール (例えば、ジチオエリスリトール) などを用いる還元によってポリペプチドからデカップリングされ得る。

## 【0143】

## 【化 1 2】

スキーム 11.



## 【0144】

PEG-ヨードアセトアミド。PEG-ヨードアセトアミドは、軽度に塩基性の媒質において、チオールをペグ化して、安定なチオエーテル結合を形成する。この種のコンジュゲーションは、強酸解析によって、タンパク質のペグ化システイン残基が、カルボキシメチルシステインを生じさせることができる興味深い態様を示し、これは、標準アミノ酸解析（例えば、アミノ酸配列決定）によって評価され得、したがって、反応の出現を確認する方法を提供できる。通常の反応スキームは、以下のスキーム 12 に表されている。

10

## 【0145】

## 【化 1 3】

スキーム 12.



20

## 【0146】

化合物の精製。本明細書に記載された化合物の精製は、一般に、当業者に利用可能な方法をたどる。通常、精製手順では、粗ペプチド-PEGコンジュゲートをまず、イオン交換クロマトグラフィー、例えば、Macro Cap SP陽イオン交換体カラムによって精製する。通常、精製手順は、バッファーA（20 mM 酢酸ナトリウムバッファー、pH 5.0）およびバッファーB（20 mM 酢酸ナトリウムバッファー、pH 5.0、0.5 M 塩化ナトリウム）を、勾配溶出プログラム、例えば、0 ~ 0 % バッファーB（20分）とそれに続く0 ~ 50 % バッファーB（50分）、次いで、100 % バッファーB（20分）で使用する。流速は、通常、3 mL / 分である。収集された画分のSDSポリアクリルアミドゲル可視化、続いて、適した画分プールの水に対する透析および得られたものの凍結乾燥を実施する。解析特性決定は、通常、MALDI質量分析を使用する。

30

## 【0147】

## IV. 使用方法

一態様では、それだけには限らないが、肥満症、糖尿病（例えば、2型または非インスリン依存性糖尿病、1型糖尿病および妊娠糖尿病）、脂質異常症、摂食障害、インスリン抵抗性症候群および/または心血管疾患などの代謝障害について、治療を必要とする対象において治療するための方法が提供される。別の態様では、異常な食後高血糖、ダンピング症候群、高血圧症、高脂血症、睡眠時無呼吸、癌、肺高血圧症、胆嚢炎、変形性関節症および短腸症候群について、治療を必要とする対象において治療するための方法が提供される。本方法は、有効量の明細書に記載された化合物または医薬組成物を、治療を必要とする対象に投与することを含む。

40

## 【0148】

本明細書において使用される場合、「対象」は、それだけには限らないが、ラット、マウスおよびヒトを含めた任意の哺乳類を含み得る。「対象」はまた、家畜（例えば、イヌ、ネコ、ウマ）ならびにその他の動物も含む。対象は、本明細書に記載された代謝障害のうち少なくとも1種を有し得る。対象は、任意の年齢のものであり得る。したがって、これらの障害は、若年成人および成人（65歳以下のものとして本明細書において定義される）ならびに幼児、小児、青年および高齢者（65歳を超えて本明細書において定

50

義される)において見られ得る。実際、集団のあるセグメントは、青年および若年成人における摂食障害などの特定の状態を特に有しやすい場合がある。高齢者は、鬱病などの状態の影響を特に受けやすい場合がある。

#### 【0149】

本明細書において使用される場合、また当技術分野で十分に理解されるように、「治療」は、臨床結果を含めた、有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。疾患、障害または状態を「治療すること」、「緩和すること」または「寛解させること」とは、障害を治療していないのと比較して、障害または疾患状態の程度、状態の望ましくない臨床兆候または両方が減少することおよび/または進行の経時的推移が減速されること(すなわち、時間が延ばされること)を意味する。本明細書に開示された方法の目的のため、有益なまたは所望の臨床結果として、それだけには限らないが、検出可能であろうと、検出不可能であろうと、1種または複数の症状の軽減または寛解、障害の程度の縮小、障害の安定化された(すなわち、悪化していない)状態、障害進行の遅延または減速、障害の寛解または緩和および緩解(部分であろうと完全であろうと)が挙げられる。「治療」はまた、治療を受けない場合に予測される生存と比較した、生存の延長を意味する場合もある。さらに、治療は、1用量の投与によって必ずしも起こらず、一連の用量の投与の際に起こることが多い。したがって、「治療上有効な量」、緩和するのに十分な量または疾患、障害もしくは状態を治療するのに十分な量が、1回または複数回の投与で投与され得る。

10

#### 【0150】

肥満症および過体重を含めたその関連障害は、米国および世界中で、よく見られ、深刻な公衆衛生問題である。上半身肥満症は、2型真性糖尿病について公知である最強のリスク因子であり、心血管疾患の強いリスク因子である。肥満症は、高血圧症、アテローム性動脈硬化症、鬱血性心不全、卒中、胆嚢疾患、変形性関節症、睡眠時無呼吸、多嚢胞性卵巣症候群などの生殖障害、乳房、前立腺および結腸の癌ならびに全身麻酔の合併症の発症率上昇の認識されているリスク因子である。例えば、Kopelman, 2000, Nature 404:635-43参照のこと。

20

#### 【0151】

肥満症は、寿命を減少させ、上記で列挙された併存症、同様に、感染症、静脈瘤、黒色表皮腫、湿疹、運動不耐性、インスリン抵抗性、高血圧高コレステロール血症、胆石症、整形外科的傷害および血栓塞栓性疾患などの障害の重篤なリスクを伴う。例えば、Rissanen et al, 1990, Br. Med. J., 301:835-7参照のこと。肥満症はまた、インスリン抵抗性症候群または「シンドロームX」およびメタボリックシンドロームと呼ばれる状態の群のリスク因子である。肥満症および関連障害の世界的な医療費は、莫大である。

30

#### 【0152】

肥満症の原因は、多因子性であると考えられている。問題は、肥満対象では、栄養素利用性およびエネルギー消費が、過剰な脂肪組織があるまでバランスのとれた状態にならないことである。中枢神経系(CNS)は、エネルギーバランスを制御し、動物の代謝状態に適当な、さまざまな行動、自律神経性および内分泌活性を調和させる。これらの活性を制御する機序または系は、前脳(例えば、視床下部)、後脳(例えば、脳幹)および脊髄中に広く分布している。最終的に、これらの系からの代謝(すなわち、食料利用性)および認知(すなわち、学習された好み)情報が統合され、欲求(食物を探すこと)および完了(経口摂取)行動に関与する決定は、スイッチが入れられる(食事調達および開始)か、またはスイッチが切られる(食事終了)のいずれかである。視床下部が、これらのシグナルを統合すること、次いで、脳幹に命令を出すことを主に担うと考えられている。完了運動制御系の要素(例えば、咀嚼および嚥下を担う筋肉)を制御する脳幹核。したがって、これらのCNS核は、経口摂取行動の「最終共通路」を構成するものと本当に呼ばれている。

40

#### 【0153】

神経解剖学および薬理学的証拠は、エネルギーおよび栄養的ホメオスタシスのシグナ

50

ルが前脳核において統合することおよび完了運動制御系が脳幹核に、おそらくは、三叉神経運動核の周囲の領域中にあることを支持する。視床下部および脳幹間には大規模な相互接続がある。さまざまなCNSに向けられた抗肥満症治療薬（例えば、小分子およびペプチド）は、主に、視床下部にある前脳基質に、および/または脳幹にある後脳基質に焦点を合わせている。

#### 【0154】

インスリン抵抗性は、肥満および非肥満2型糖尿病患者両方における主要な病態生理学的特徴であり、主に、インスリン作用における結合後欠陥によるものであるとこれまででは考えられていた。例えば、Berhanu et al., 1982, J. Clin. Endoc. Metab. 55:1226-1230参照のこと。このような欠陥は、末梢細胞の固有の特性によるものであり得るか、または血漿中の体液性因子の濃度の変化によって引き起こされ得るか、またはその両方であり得る。インスリン抵抗性に関与している体液性因子の実証でのこれまでの試みは、矛盾する結果をもたらした。また、2型真性糖尿病におけるインスリン抵抗性において、固有の結合後欠陥を実証することも可能ではなかった(Howard, B. V. Diabetes 30: 562-567 (1981); Kolterman, O. G. et al., J. Clin. Invest.: 68: 957-969 (1981)参照のこと)。

10

#### 【0155】

2型糖尿病におけるインスリン抵抗性の機序は、複雑である。主に脂肪組織に関する研究から集められた証拠は、最も穏やかな場合には、インスリン抵抗性は、末梢標的細胞上のインスリン受容体の数の不足によって大部分は説明され得ることを示唆するが、空腹時高血糖の度合いが高まるにつれ、インスリン作用の受容体後欠陥が現れ、重要性が徐々に増大するといわれていた(Kolterman et al., 前掲参照のこと)。2型糖尿病におけるインスリン抵抗性に付随する耐糖能異常は、大部分は、末梢(peripheral)組織におけるグルコース取り込みの減少によって引き起こされると考えられているが、不完全なグルコースによって誘導された肝臓グルコース産生の抑制もまた、関与しているといわれている。例えば、Wajngot et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:4432-4436参照のこと。肥満および非肥満2型糖尿病患者の両方において、インスリン用量応答曲線は、右に移動しており、非糖尿病対象と比較して、2型糖尿病患者における、グルコース廃棄の、および全身グルコース代謝の最大速度に著しい低下がある(Kolterman et al., 同著; De Fronzo, R. A. et al., 1985, J. Clin. Invest. 76:149-155)。

20

30

#### 【0156】

別の一般的な態様では、本発明の化合物は、食物摂取を低減するために、食欲を低減するために、満腹を誘導するために、脂肪として貯蔵するために身体にとって利用可能な栄養素を低減して、減量を引き起こすために、身体組成に影響を及ぼすために、身体エネルギー含量またはエネルギー消費を変更するために、脂質プロファイルを改善するために(LDLコレステロールおよびトリグリセリドレベルを低減することおよび/またはHDLコレステロールレベルを変化させることを含む)、胃腸運動を減速するために、胃内容排出を遅延するために、食後血糖変動幅を抑えるために、グルカゴン分泌を防止するか、または阻害するために、および血圧を低下させるために有用であり得る。

#### 【0157】

したがって、ある実施形態では、本発明の化合物は、脂肪として貯蔵するために身体にとって利用可能な栄養素を低減することによって軽減され得る状態または障害を治療または予防するために有用である。このような状態および障害として、それだけには限らないが、摂食障害、インスリン抵抗性、肥満症、異常な食後高血糖、I型、II型および妊娠糖尿病を含めた任意の種類の糖尿病、メタボリックシンドローム、ダンピング症候群、高血圧症、脂質異常症、心血管疾患、高脂血症、睡眠時無呼吸、癌、肺高血圧症、胆嚢炎ならびに変形性関節症が挙げられる。

40

#### 【0158】

心血管状態または疾患の限定されない例として、高血圧症、心筋虚血および心筋再灌流がある。本発明の化合物はまた、卒中、癌(例えば、子宮内膜、乳房、前立腺および結腸

50

癌)、胆嚢疾患、睡眠時無呼吸、受精能の減少および変形性関節症を含めた肥満症と関連しているその他の状態の治療または予防において有用であり得る。その他の実施形態では、本発明の化合物は、審美的理由のために身体組成を変更するために、その身体能力を増強するために、または低脂肪肉供給源を製造するために使用され得る。

【0159】

別の一般的な態様では、本発明の化合物は、グレリンの分泌を阻害するために使用され得る。したがって、本発明の化合物は、ブラダー・ウィリー症候群などのグレリン関連障害、あらゆる種類の糖尿病およびその合併症、肥満症、過食症、高脂血症または栄養過剰と関連しているその他の障害を治療または予防するために利用され得る。

【0160】

別の一般的な態様では、本発明の化合物は、バレット食道、胃食道逆流疾患(GERD)ならびにそれと関連する状態を治療または予防するために有用であり得る。このような状態として、それだけには限らないが、胸やけ、胃/腸の内容物の口または肺中への逆流を伴う胸やけ、嚥下困難、咳、間欠性喘鳴および声帯炎症(GERDと関連している状態)、食道びらん、食道潰瘍、食道狭窄、バレット異形成(正常食道上皮の異常な上皮との置換)、バレット腺癌腫ならびに肺の誤嚥を挙げることができる。アミリンおよびアミリンアゴニストは、胃酸の阻害、胆汁酸の阻害および膵臓酵素の阻害などの抗分泌特性を有する。さらに、アミリンは、胃保護効果を有することが見出された。したがって、アミリンおよびアミリンアゴニストのこれらの特性は、それらを、バレット食道および/またはGERDおよび本明細書に記載された関連または付随状態の治療または予防において特に有用にし得る。

【0161】

別の一般的な態様では、本発明の化合物は、膵炎、膵臓癌腫および胃炎の治療または予防のためにさらに有用であり得る。さらに、本発明の化合物は、内視鏡的逆行性胆道膵管造影法(ERCP)を受けた患者において膵炎の治療および予防において有用であり得る。アミリンおよびアミリンアゴニストは、ソマトスタチンと組み合わせられた場合に、驚くべき優れた治療効果を有し得ることをさらに発見した。したがって、ある実施形態では、膵炎を治療または予防する方法は、本発明の化合物を投与することならびにソマトスタチンおよびソマトスタチンアゴニストを投与することを含む。

【0162】

別の一般的な態様では、本発明の化合物はまた、骨吸収を低減するために、血漿カルシウムを低減するために、および鎮痛効果を誘導するために有用であり得る。したがって、本発明の化合物は、骨減少症および骨粗しょう症などの骨障害を治療するために有用であり得る。さらにその他の実施形態では、本発明の化合物は、疼痛および有痛性神経障害を治療するために有用であり得る。

【0163】

別の一般的な態様では、本発明の化合物はまた、短腸症候群を治療するために有用であり得る。短腸症候群または短消化管症候群(short gut syndrome)とは、妊娠の間の未発達腸の腸によるか、または相当な長さの小腸の外科的切除後の腹痛、下痢、体液貯留、意図しない減量および極度の疲労などの栄養素の吸収不良に起因する症状を特徴とする胃腸症候群を意味する。したがって、本明細書において使用される場合、用語「短腸症候群」はまた、短消化管症候群および広範囲の小腸切除を含む。腸のホルモン反射およびフィードバックループが破壊され、近位胃および小腸部分の容量の増大および運動性パターンの変更につながり得る。水、ナトリウムおよびマグネシウム喪失は、電解質攪乱につながり得る。回腸による、ビタミンB12、胆汁酸塩およびその他の脂溶性ビタミンの吸収などの、腸のある部分に独特である、ある特定の吸収機能もまた損なわれ得る。本発明の化合物は、排便習慣、栄養状態および短腸症候群患者における生活の質の実質的な改善を提供し得、さらに、非経口栄養法および小腸移植の必要性を低減し得る。

【0164】

V. アッセイ

本明細書に記載された化合物を製造する方法およびそのアッセイは、一般に、当業者にとって利用可能である。本明細書に記載された化合物および方法の代表的なアッセイは以下である。

【0165】

食物摂取。いずれかの理論に拘泥するものではないが、食物摂取は、本明細書に記載された化合物の有用性の評価において有用であると考えられている。例えば、いくつかの代謝病態は、食物摂取と関連している（例えば、糖尿病、肥満症）ということが公知である。したがって、食物摂取が、本明細書に記載された化合物の投与によって調節される程度を決定するために初期スクリーニングを実施してもよく、また正の初期スクリーニングは、化合物のその後の開発において有用であり得る。

10

【0166】

さまざまな食物摂取アッセイが、当業者には利用可能である。例えば、食物摂取のいわゆる「ホームケージモデル」では、対象（例えば、ラット）は、そのホームケージ中で維持し、試験化合物の注射後に対象の総重量とともに食物摂取を測定する。食物摂取アッセイのいわゆる「給餌パターンモデル」では、対象（例えば、ラット）を、給餌チャンバーに対して、また試験の前の注射に対して慣らす。試験化合物を投与した後、対象を給餌チャンバー中に直ちに投入し、食物摂取を、時間の関数（例えば、1分間隔）として自動的に決定する。両試験のために、食物は、標準固形飼料または当技術分野で公知のさまざまな固形飼料のうちいずれか（例えば、「高脂肪」）である。いわゆる「マウス食物摂取」アッセイでは、試験化合物は、食欲抑制について、または食餌誘導性肥満症（DIO）マウスにおける体重増加に対する効果について試験され得る。通常のマウス食物摂取アッセイでは、雌のNIH/Swissマウス（8～24週齢）が、12:12時間明:暗周期で0600に明かりをつけて群で収容される。水および標準ペレットマウス固形飼料食は、記載がなければ自由に利用可能とする。動物を、実験の1日前におよそ1500時間で開始して絶食させる。実験の朝、動物を実験群に分割する。通常の研究では、 $n = 3$ 匹のマウス/ケージを有する4ケージ。時間 = 0分で、すべての動物に、通常、約10nmol/kg～75nmol/kgの範囲の量で媒体または化合物の腹腔内注射を行い、予め秤量した量（10～15g）の標準固形飼料を直ちに与える。種々の時点、通常、30、60および120分で食物を取り出し、秤量して、消費された食物量を決定する。例えば、Morley et al., 1994, Am. J. Physiol. 267:R178-R184参照のこと。食物摂取は、時間 = 0で最初に提供された食物の重量から、例えば、30、60、120、180および/または240分の時点で残っている食物の重量を差し引くことによって算出する。有意な治療効果は、ANOVAによって同定される（ $p < 0.05$ ）。有意差が存在する場合には、ダネット試験（Prism v. 2.01、GraphPad Software Inc., San Diego, Calif.）を使用して試験平均値を対照平均値と比較する。本明細書に記載された任意の試験について、試験化合物の投与は、注射（例えば、皮下、腹腔内など）、経口または当技術分野で公知のその他の投与方法を含めた任意の手段によってであり得る。

20

30

【0167】

インビトロ（in vitro）アッセイ。いずれかの理論または作用機序に拘泥するものではないが、インビトロ（例えば、受容体）アッセイの結果と、代謝疾患および障害の治療のための薬剤の有用性の間に、相関関係が存在すると考えられる。したがって、インビトロアッセイ（例えば、細胞ベースのアッセイ）は、本明細書に記載されたものなどの可能性ある代謝剤のスクリーニング戦略として有用である。以下のように記載されるものを含めたさまざまなインビトロアッセイが、当技術分野で公知である。

40

【0168】

カルシトニンアデニレートシクラーゼアッセイ（機能アッセイ）。カルシトニン受容体媒介性アデニレートシクラーゼ活性化は、CisBio製のHTRF（ホモジニアス時間分解蛍光）細胞ベースのcAMPアッセイキットを使用して測定され得る。このキットは、d2アクセプターフルオロフォアを用いて標識されたcAMPおよびドナーユウロピウ

50

ムクリプテートを用いて標識された抗cAMPモノクローナル抗体を使用する競合イムノアッセイである。cAMPレベルの増大は、ドナーおよびアクセプター間の時間分解蛍光エネルギー移動の減少として記録される。ペプチドは、バッファーを用いて段階希釈され、例えば、384ウェルの化合物プレートに移され得る。ラットC1aカルシトニン受容体を安定に発現するC1a-HEK細胞は、細胞培養フラスコから剥離され、500  $\mu$ M IBMXおよびd2フルオロフォアを1:40で含有する刺激バッファーに $2 \times 10^6$ 個の細胞/mlで再懸濁され得る。細胞は、ウェルあたり12,500個の密度で化合物プレートに加えられ、受容体活性化のために、室温、暗所で30分間インキュベートされ得る。続いて、細胞は、キットコンジュゲート/溶解バッファー(1:40)で希釈された抗cAMPクリプテート溶液の付加によって溶解され得る。暗所で1~24時間インキュベートされた後、プレートは、時間分解蛍光エネルギー移動を測定できるTecan Ultraでカウントされ得る。

10

20

30

40

50

#### 【0169】

アミリン受容体結合アッセイ。RNA膜は、およそ20 pM(終濃度)の $^{125}$ I-ラットアミリン(Bolton-Hunter標識された、PerkinElmer、Waltham、MA)および漸増濃度の試験化合物とともに、例えば、96ウェルポリスチレンプレートにおいて周囲温度で1時間インキュベートされ得る。ウェル内容物の結合している画分は、PerkinElmerプレートハーベスター(plate harvester)を使用して、96ウェルガラスファイバープレート(0.5% PEI(ポリエチレンジイミン)中で少なくとも30分間プレブロックされた)上に収集され、1xPBSを用いて洗浄され得る。乾燥ガラスファイバープレートをシンチラントと組み合わせ、マルチウェルPerkinElmerシンチレーションカウンターでカウントされ得る。

#### 【0170】

CGRP受容体結合アッセイ。SK-N-MC細胞膜は、およそ50 pM(終濃度)の $^{125}$ I-ヒトCGRP(PerkinElmer、Waltham、MA)および漸増濃度の試験化合物とともに、96ウェルポリスチレンプレートにおいて周囲温度で1時間インキュベートされ得る。ウェル内容物の結合している画分は、PerkinElmerプレートハーベスターを使用して、96ウェルガラスファイバープレート(0.5% PEI中で少なくとも30分間プレブロックされた)上に収集され、1xPBSを用いて洗浄され得る。乾燥ガラスファイバープレートをシンチラントと組み合わせ、マルチウェルPerkinElmerシンチレーションカウンターでカウントされ得る。

#### 【0171】

カルシトニン受容体結合アッセイ。C1a-HEK細胞膜は、およそ50 pM(終濃度)の $^{125}$ I-ヒトカルシトニン(PerkinElmer、Waltham、MA)および漸増濃度の試験化合物とともに、例えば、96ウェルポリスチレンプレートにおいて周囲温度で1時間インキュベートされ得る。ウェル内容物の結合している画分は、PerkinElmerプレートハーベスターを使用して、96ウェルガラスファイバープレート(0.5% PEI中で少なくとも30分間プレブロックされた)上に収集され、1xPBSを用いて洗浄され得る。乾燥ガラスファイバープレートをシンチラントと組み合わせ、マルチウェルPerkinElmerシンチレーションカウンターでカウントされ得る。

#### 【0172】

### VI. 医薬組成物

一態様では、本明細書に記載されるような本発明の化合物を、医薬上許容される賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。

#### 【0173】

### A. 製剤

本明細書に記載された化合物は、さまざまな経口、非経口および局所剤形で調製され、投与され得る。したがって、本発明の化合物は、注射(例えば、静脈内に、筋肉内に、皮内に、皮下に、十二指腸内にまたは腹腔内に)によって投与され得る。また、本明細書に

記載された化合物は、吸入によって、例えば、鼻腔内に投与され得る。さらに、本発明の化合物は、経皮的に投与され得る。複数の投与経路（例えば、筋肉内、経口、経皮）を使用して、本発明の化合物を投与してもよいということも想定される。したがって、本発明はまた、医薬上許容される担体または賦形剤と、1種または複数の本発明の化合物とを含む医薬組成物を提供する。

【0174】

本発明の化合物から医薬組成物を調製するために、医薬上許容される担体は、固体または液体のいずれであってもよい。固体形態調製物として、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、カシェ剤、坐剤および分散性顆粒剤が挙げられる。固体担体は、希釈剤、香味剤、結合剤、保存料、錠剤崩壊剤またはカプセル化材料としても作用し得る1種または複数の物質であり得る。

10

【0175】

散剤では、担体は、微粉化活性成分との混合物中の微粉化固体である。錠剤では、活性成分は、必要な結合特性を有する担体と、適した割合で混合され、所望の形状および大きさに圧縮される。

【0176】

散剤および錠剤は、5%～70%の活性化合物を含有することが好ましい。適した担体として、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、低融点ワックス、ココアバターなどがある。用語「調製物」は、カプセル剤を提供する担体としてカプセル化材料を有する活性化合物の製剤を含むものとし、これでは、その他の担体を含むか、または含まない活性成分が、担体によって囲まれて、したがって、それを伴っている。同様に、カシェ剤およびロゼンジ剤が含まれる。錠剤、散剤、カプセル剤、丸剤、カシェ剤およびロゼンジ剤は、経口投与に適した固体剤形として使用され得る。

20

【0177】

坐剤を調製するには、脂肪酸グリセリドまたはココアバターの混合物などの低融点ワックスを、まず、融解し、攪拌によってのように、それに活性成分を均一に分散させる。融解された均一な混合物を、次いで、好都合な大きさの型に注ぎ入れ、放冷し、それによって、凝固させる。

30

【0178】

液体形態調製物として、溶液、懸濁液およびエマルジョン、例えば、水または水/プロピレングリコール溶液が挙げられる。非経口注射用には、ポリエチレングリコール水溶液中の溶液で液体調製物が製剤され得る。

【0179】

非経口適用が必要であるか、または望ましい場合には、本発明の化合物に特に適した混合物として、注射用滅菌溶液、好ましくは、油性または水性溶液ならびに懸濁液、エマルジョンまたは坐剤を含めたインプラントがある。特に、非経口投与のための担体として、デキストロースの水溶液、生理食塩水、純水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ピーナッツオイル、ゴマ油、ポリオキシエチレンブロックポリマーなどが挙げられる。アンプルは、好都合な単位投与物である。本発明の化合物はまた、リボソームに組み込まれ得るか、または経皮ポンプもしくはパッチを介して投与され得る。本発明において使用するための適した医薬混合物として、例えば、PHARMACEUTICAL SCIENCES (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA)およびWO 96/05309に記載されるものが挙げられ、それら両方の教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0180】

経口使用に適した水溶液は、活性成分を水に溶解することおよび必要に応じて、適した着色剤、香味料、安定化剤および増粘剤を添加することによって調製され得る。経口使用に適した水性懸濁液は、微粉化活性成分を、天然または合成ゴム、樹脂、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよびその他の周知の懸濁剤などの粘性材料

50



とともに水に分散させることによって製造され得る。

【0181】

使用直前に、経口投与用液体形態調製物に変換されるよう意図される固体形態調製物も含まれる。このような液体形態として、溶液、懸濁液およびエマルジョンが挙げられる。これらの調製物は、活性成分に加えて、着色料、香味料、安定化剤、バッファー、人工および天然甘味料、分散剤、増粘物、可溶化剤などを含有し得る。

【0182】

医薬調製物は、単位剤形であることが好ましい。このような形態では、調製物は、適当な分量の活性成分を含有する単位用量に細分割される。単位剤形は、バイアルまたはアンブルにパッケージされた錠剤、カプセル剤および散剤などの、パッケージ調製物、個別の分量の調製物を含有するパッケージであり得る。また、単位剤形は、カプセル剤、錠剤、カシエ剤もしくはロゼンジ剤自体であり得るか、またはパッケージングされた形態の、適当な数のこれらのうち任意のものであり得る。

【0183】

単位用量調製物中の活性成分の分量は、多様であり、または特定の適用および活性成分の効力に従って、0.1 mg ~ 1000 mg、より通常は、1.0 mg ~ 1000 mg、最も通常は、10 mg ~ 500 mg に調整され得る。組成物は、必要に応じて、その他の適合する治療剤も含有し得る。

【0184】

一部の化合物は、制限された水への溶解度を有し得、したがって、組成物において界面活性剤またはその他の適当な共溶媒が必要であり得る。このような共溶媒として、ポリソルベート20、60および80；Pluronic F-68、F-84およびP-103；シクロデキストリン；およびポリオキシシル35ヒマシ油が挙げられる。このような共溶媒は、通常、約0.01重量%から約2重量%の間のレベルで使用される。

【0185】

製剤の分注における可変性を低減するために、製剤の懸濁液もしくはエマルジョンの成分の物理的分離を低減するために、および/またはそうではなく製剤を改善するために、単純水溶液の粘度を超える粘度が望ましい場合がある。このような粘度上昇剤 (viscosity building agent) として、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、コンドロイチン硫酸およびその塩、ヒアルロン酸およびその塩ならびに前記のものの組合せが挙げられる。このような薬剤は、通常、約0.01重量%から約2重量%の間のレベルで使用される。

【0186】

本発明の組成物は、徐放および/または快適さを提供するための成分をさらに含み得る。このような成分として、高分子量、陰イオン性ムコミメティック (mucomimetic) ポリマー、ゲル形成多糖および微粉化薬物担体基質が挙げられる。これらの成分は、米国特許第4,911,920号；同5,403,841号；同5,212,162号および同4,861,760号において、より詳細に論じられている。これらの特許の全内容は、その全体がすべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0187】

B. 有効投与量

本発明によって提供される医薬組成物は、活性成分が、治療上有効な量で、すなわち、その意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物を含む。特定の適用によって有効な実際の量は、とりわけ、治療されている状態に応じて変わる。例えば、代謝疾患または障害を治療するための方法において投与される場合には、このような組成物は、所望の結果（例えば、代謝疾患または障害の症状を軽減すること）を達成するのに有効な活性成分の量を含有する。

【0188】

投与される化合物の投与量および頻度（単回用量または複数回用量）は、投与経路；レ

10

20

30

40

50

シビエントの大きさ、年齢、性別、健康、体重、肥満度指数および食餌；治療されている疾患の症状の性質および程度；その他の疾患の存在またはその他の健康と関連する問題；併用する治療の種類；および任意の疾患または治療レジメンからの合併症を含めたさまざまな因子に応じて多様であり得る。その他の療法レジメンまたは治療剤を、本発明の方法および化合物とともに使用してもよい。

【0189】

本明細書に記載された任意の化合物について、治療上有効な量は、それだけには限らないが、細胞培養アッセイおよび食物摂取アッセイを含めたさまざまなアッセイからまず決定され得る。標的濃度は、細胞培養アッセイにおいて生物学的応答を誘発できるか、または食物摂取応答を誘発できる活性化合物（単数または複数）の濃度となる。

10

【0190】

ヒトにおいて使用するための治療上有効な量は、動物モデルから決定され得る。例えば、ヒトのための用量は、動物において有効であると見出されている濃度を達成するよう製剤され得る。ヒトにおける投与量は、当技術分野で公知のように、および／または本明細書に記載されるように、根底にある代謝疾患または障害をモニタリングすることおよび投与量を上方または下方調整することによって調整され得る。

【0191】

投与量は、患者の必要条件および使用されている化合物に応じて多様であり得る。本発明との関連において患者に投与される用量は、患者において経時的に有益な治療応答を達成するのに十分でなくてはならない。用量の大きさはまた、任意の有害な副作用の存在、性質および程度によって決定される。一般に、治療は、化合物の最適用量未満である少ない投与量で開始される。したがって、投与量は、環境下で最適効果が到達されるまで、小さい増分で増加される。本発明の一実施形態では、投与量範囲は、0.001%～10% w/vである。別の実施形態では、投与量範囲は、0.1%～5% w/vである。

20

【0192】

投与量および間隔は、治療されている特定の臨床適応症にとって有効な、投与される化合物のレベルを提供するよう、個々に調整され得る。これは、個体の病状の重篤度と釣り合った療法レジメンを提供する。

【0193】

本明細書に提供された教示を利用して、実質的な毒性を引き起こさないが、特定の患者によって示された臨床症状を治療するのに完全に有効である、有効な予防的または治療的治療レジメンが計画され得る。この計画は、化合物の効力、相対的バイオアベイラビリティ、患者体重、有害な副作用の存在および重篤度、好ましい投与方式ならびに選択された薬剤の毒性プロファイルなどの因子を考慮することによって活性化合物を注意深く選択することを含まなくてはならない。

30

【0194】

C. 毒性

特定の化合物の毒性および治療効果間の比は、その治療指数であり、LD<sub>50</sub>（集団の50%において致死性である化合物の量）とED<sub>50</sub>（集団の50%において有効な化合物の量）の間の比として表され得る。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイおよび／または動物研究から得られた治療指数データは、ヒトにおいて使用するための投与量の範囲の製剤に使用され得る。このような化合物の投与量は、ED<sub>50</sub>を含み、毒性がほとんどないか、または全くない血漿濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で多様であり得る。例えば、Fingl et al., In: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ch.1, p.1, 1975参照のこと。正確な製剤、投与経路および投与量は、患者の状態および化合物が使用される特定の方法を考慮して個々の医師によって選択され得る。

40

【実施例1】

【0195】

化合物の調製

50

本発明の化合物を、いくつかの方法によって合成した。

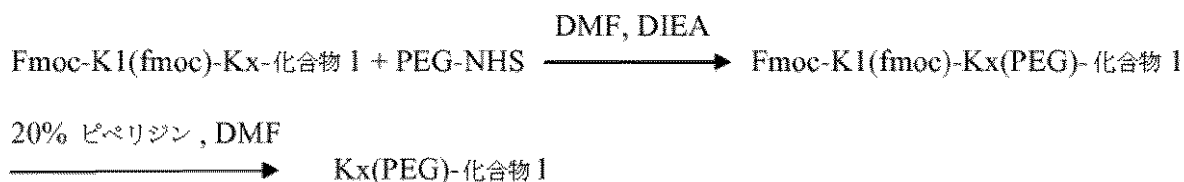
a) 例えば、化合物 19 は、還元的アルキル化反応において、mPEG40K - アルデヒドを、化合物 1 の N 末端とともに処理して、特異的に N 末端がペグ化された化合物 1 を作製することによって調製した。

b) 別の例では、化合物 20 を、化合物 2 の N 末端アミノ基を、mPEG40K - NHS (n - ヒドロキシスクシンイミドエステル) と反応させることによって調製した。

c) 別の例では、化合物 21、23、25 および 27 を以下のとおりに調製した：

【0196】

【化14】



x = 21, 26, 31

PEG = mPEG40K または yPEG40K

10

【0197】

DIEA を有する DMF 中で、Fmoc 保護されたリシン 1 と、21、26 および 31 位に突然変異リシンを有する化合物 1 の類似体を、mPEG40K - NHS とともに処理した。得られたペグ化ペプチドを、ピペリジンによって脱保護すると、ペグ化遊離ペプチドが得られた。

20

【0198】

d) 別の例では、リシン側鎖上での選択的ペグ化によって化合物 26、22 および 24 を調製した。DIEA を有する DMF 中で、21、24 ~ 29 および 31 位に突然変異リシンを有する化合物 2 の類似体を、mPEG40K - NHS とともに処理した。粗生成物を精製し、領域特異性について解析した。

【実施例 2】

30

【0199】

受容体結合活性

方法。脳 (ラット) の側坐核部分から調製した膜において、アミリン結合アッセイを実施し、段階希釈した本明細書に記載されたペプチド化合物を試験した。

【0200】

第 1 に、ペプチドを、200 μM の濃度で滅菌蒸留水に溶媒和させた (ペプチド重量は、およそ 80 % である)。次いで、ペプチドを、1x バッファー (20 mM HEPES、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、0.5 % BSA) を用いて 10<sup>-6</sup> M の 2x の出発濃度に希釈し、Perkin Elmer Multi-Probe II ロボットを使用し、バッファーを用いて段階希釈した。調製された膜を (16 倍) に、または 32.5 μg / ウェルに希釈し、1x バッファーと組み合わせるか、またはそれぞれ、対照またはペプチド化合物および <sup>125</sup>I - アミリンを用いて (Perkin Elmer Life Science、ID 番号 I - 3248) 段階希釈した。シェーカー上、室温で 1 時間、プレートをインキュベートした。プレートを 50 ° で 1.5 時間、次いで、室温で一晩、乾燥させた。シンチラントを加え (Microscint 20、Perkin Elmer カタログ番号 6013621)、放射標識されたヨウ素を読み取ることができる Perkin Elmer / Wallac TriLux マルチウェルシンチレーションカウンターで読み取ることによって CPM を決定した。

40

【0201】

受容体結合活性は、例えば、表 3 において、当技術分野で公知のように、4 - パラメー

50

タロジスティック方程式 ( P R I S M ( 登録商標 ) 、 G r a p h P A D S o f t w a r e 、 L a J o l l a 、 C A ) を使用し、反復曲線フィッティングプログラムを使用して生データから算出された  $IC_{50}$  値として表され得る。

#### 【 0 2 0 2 】

結果。以下の表 3 に示されるように、本発明のペグ化化合物は、アミリン受容体でのナノモル結合活性を実証する。

#### 【 0 2 0 3 】

表3. 受容体結合アッセイ

#### 【 表 3 】

| 化合物 | アミリン結合<br>IC50 (nM) |
|-----|---------------------|
| 1   | 0.10                |
| 2   | 0.42                |
| 19  | 40                  |
| 20  | 78                  |
| 21  | 104                 |
| 23  | 66                  |
| 25  | 86                  |
| 27  | 470                 |
| 26  | 75                  |
| 22  | 112                 |
| 24  | 54                  |
| 28  | 131                 |
| 29  | 39                  |
| 30  | 61                  |
| 31  | 132                 |
| 32  | 79                  |
| 33  | 31                  |
| 34  | 51                  |
| 35  | 53                  |
| 36  | 27                  |

10

20

30

40

50

#### 【 0 2 0 4 】

第 2 のアミリン受容体結合アッセイを実施して、細胞株、例えば、C o d e x A C T O n e ( 商標 ) 細胞株において異所的に発現されたヒトアミリン受容体 3 ( A M Y 3 ) からの、 $^{125}I$ -アミリン ( ラット ) の置換において、試験化合物、例えば、本明細書に開示されるポリペプチドの効力を測定した。この細胞株は、ヒト R A M P 3 ( N C B I タンパク質データベース C A A 0 4 4 7 4 ) を安定に発現する A C T O n e ( 商標 ) H E K 2 9 3 - C N G - h C a l c R 細胞株 ( C B - 8 0 2 0 0 - 2 5 8 ) を使用して作製し、ヒト A M Y 3 受容体を製造した。

#### 【 0 2 0 5 】

プロテアーゼ阻害剤 ( R o c h e カタログ番号 1 1 8 7 3 5 8 0 0 0 1 ) を含有する氷冷 2 0 m M H E P E S 中でホモジナイズすることによって、A M Y 3 細胞培養物から粗膜を調製した。粗膜を、2 0 p M の  $^{125}I$ -アミリン ( P e r k i n E l m e r カタログ番号 N E X 4 4 8 0 ) ( 2 0 0 0 C i / m m o l ) および漸増濃度の試験ペプチドとともにインキュベートした。インキュベーションは、9 6 ウェルポリスチレンプレート ( C o s t a r カタログ番号 3 7 9 7 ) において、5 m M M g C l <sub>2</sub> および 1 m M C a C l <sub>2</sub> を有する 2 0 m M H E P E S 中、周囲温度で 6 0 分間実施した。0 . 5 % ポリエ

チレンイミン中に少なくとも30分間予め浸漬した、UniFilter（登録商標）96プレートGF/B（Perkin Elmer、カタログ番号6005199）による迅速濾過によってインキュベーションを終了した。MicroMate 96細胞ハーベスター（Perkin Elmer）を使用し、氷冷PBSを使用して、UniFilter（登録商標）プレートを数回洗浄した。UniFilterプレートを乾燥させ、シンチラントを添加し（Microscint 20、Perkin Elmerカタログ番号6013621）、放射標識されたヨウ素を読み取ることができるPerkin Elmer/Wallac TriLuxマルチウェルシンチレーションカウンターで読み取ることによってCPMを決定した。

【0206】

4 - パラメータ曲線にフィッティングされた非線形回帰解析を使用する濃度応答曲線の解析によって試験ペプチドの効力（ $IC_{50}$ ）を決定した。GraphPad Prism（登録商標）ソフトウェア（GraphPad Software, Inc.、San Diego、CA）を使用して結合親和性を算出した。結果が以下の表4に示されている。

【0207】

結果。以下の表4に示されるように、本発明のペグ化化合物は、AMY3受容体でのナノモル結合活性を実証する。

【0208】

表4. 受容体結合アッセイ

【表4】

| 化合物 | アミリン結合<br>$IC_{50}$ (nM) |
|-----|--------------------------|
| 1   | 0.247                    |
| 28  | 388                      |
| 29  | 60                       |
| 30  | 80                       |
| 31  | 1132                     |
| 32  | 111                      |
| 33  | 48                       |
| 34  | 87                       |
| 35  | 46                       |
| 36  | 47                       |
| 40  | 238                      |
| 41  | 77                       |
| 42  | 143                      |

【実施例3】

【0209】

アミリン機能アッセイ

方法。このアッセイは、過剰発現されたヒトアミリン3受容体（hAMY3、Gsカップリングされた）のペプチド誘導性活性化によるCodex ACTOne（商標）細胞株におけるサイクリックAMP（cAMP）の増大を測定するために使用される。cAMPの蓄積は、HTRF（CisBio）細胞ベースのcAMPアッセイキットを、384ウェル形式で使用する30分のペプチド処理後に測定した。ペプチドの有効性は、100μMのフォルスコリン（アデニレートシクラーゼの構成的アクチベーター）を用いる細胞処理に対して決定し、ペプチドの効力（ $EC_{50}$ ）は、4 - パラメータモデルにフィッティングされた非線形回帰解析を使用する濃度応答曲線の解析によって決定した。

## 【 0 2 1 0 】

結果。以下の表 5 に示されるように、本発明のペグ化化合物は、A M Y 3 受容体での、ナノモル以下～ナノモルの機能活性を実証する。

## 【 0 2 1 1 】

表5. アミリン機能アッセイ

## 【表 5】

| 化合物 | EC50 (nM) |
|-----|-----------|
| 1   | 0.005     |
| 28  | 2.577     |
| 29  | 0.114     |
| 30  | 0.145     |
| 31  | 2.560     |
| 32  | 0.598     |
| 33  | 0.126     |
| 34  | 0.296     |
| 35  | 0.295     |
| 36  | 0.159     |
| 40  | 0.85      |
| 41  | 0.034     |
| 42  | 0.122     |

10

20

## 【実施例 4】

## 【 0 2 1 2 】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物 2 1、2 5、2 4、2 2、2 6

痩せたラットに、試験化合物または媒体の、週に 1 回の皮下（S C）注射を施した。図 1 A ~ 1 B は、複数日食物摂取アッセイの結果を提供する。対照として媒体を使用して、化合物 2 1、2 5、2 4、2 2 および 2 6 について、2 4 時間食物摂取に対する効果を調べた。図 1 A ~ B の結果は、試験された化合物の各々は、3 日間の体重および食物摂取の低減において効果的であったことを実証する。いくつかの化合物の場合には、減量は、1 週間後でさえも依然として明白であった。

30

## 【実施例 5】

## 【 0 2 1 3 】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物 2 6、2 3

化合物 2 6 の週に 2 回の用量または週に 1 回の用量の S C 注射を用いて判断されるような減量に対する効果を調べた。D I O（「食餌誘導性肥満」）ラットにおいて 1 2 5 n m o l / k g で週に 2 回投薬された場合には、化合物 2 6 は、1 2 . 5 n m o l / k g / d の化合物 1 の連続注入と類似の有効性を有する（図 2 A）。1 2 5 n m o l / k g で週に 1 回投薬された化合物 2 3 は、D I O ラットに 4 週間与えられた場合には、注入された化合物 1 と同程度には効果的ではなかったが、体重の一貫した低下を示した（図 2 B）。図 3 A ~ 3 B に示されるように、化合物 2 3 はまた、痩せたラットでは、体重および食物摂取を用量依存的に低減した。

40

## 【実施例 6】

## 【 0 2 1 4 】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物 1 9、2 3、2 7

y - 分岐 P E G（化合物 2 7）または N 末端 P E G（化合物 1 9）のいずれかを有する化合物の単回用量の、S C 注射を用いて判断されるような 2 4 時間食物摂取に対する効果を調べた。図 4 A に示されるように、N 末端ペグ化化合物、化合物 1 9 の 3 回用量は、D

50

I O ラットにおける体重の低減において媒体と同程度には効果的でなかった。y - 分岐ペグ化合物、化合物 27 は、図 4 B に示されるように、痩せたラットにおける体重の低減において、直鎖ペグ化版、化合物 23 と同程度には効果的 (efficiacious) でなかった。

【実施例 7】

【0215】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物 26、28、29、30、31

SC 注射を用いて判断されるような 24 時間食物摂取に対する効果を、化合物 26、28、29 および 30 について調べた。図 5 A ~ 5 B に示されるように、試験されたペグ化合物 28、29 および 30 の各々は、痩せたラットにおける体重および食物摂取低減において少なくとも化合物 26 と同程度に効果的であった。y - 分岐ペグ化合物、化合物 31 は、図 6 A ~ 6 B に示されるように、痩せたラットにおける体重および食物摂取低減において、直鎖ペグ化版、化合物 29 と同程度には効果的でなかった。化合物 29 はまた、図 6 A ~ 6 B に実証されるように、用量依存的有効性を示した。

10

【実施例 8】

【0216】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物 29、32、33、34、35 および 36

SC 注射を用いて判断されるような、累積的食物摂取および体重低減に対する効果を、化合物 29、32、33、34、35 および 36 について調べた。図 7 A ~ 7 B に示されるように、試験されたペグ化合物は各々、 $125 \text{ nmol/kg}$  で、痩せたラットにおける体重および食物摂取低減において効果的であった。化合物のほとんどの場合において、減量は、1 週間後でさえも依然として明白であった。

20

【実施例 9】

【0217】

食物摂取に対するペグ化の効果：化合物 41 および 42

SC 注射を用いて判断されるような、累積的食物摂取および体重低減に対する効果を、化合物 41 および 42 について調べた。図 8 A ~ 8 B に示されるように、試験されたペグ化合物は各々、 $125 \text{ nmol/kg}$  で、痩せたラットにおける体重および食物摂取低減において効果的であった。

【0218】

要約すれば、実施例 4 ~ 9 に示された食物摂取データは、試験された化合物のポリペプチド要素のペグ化の作用の持続期間に対する有効性および効果に関する価値ある観察結果を提供する。具体的には、ポリペプチド成分の 40KD PEG 誘導体は、非ペグ化ペプチドと比較して長期の、作用の経時的推移を示す。21、26 または 31 位の PEG の結合は、作用の持続期間および食物摂取応答の規模の両方を増大した。直鎖 PEG 化合物は、食物摂取アッセイにおいて、分岐 PEG 化合物と比較してより大きな有効性を実証する。

30

【 図 1 】

Fig. 1A

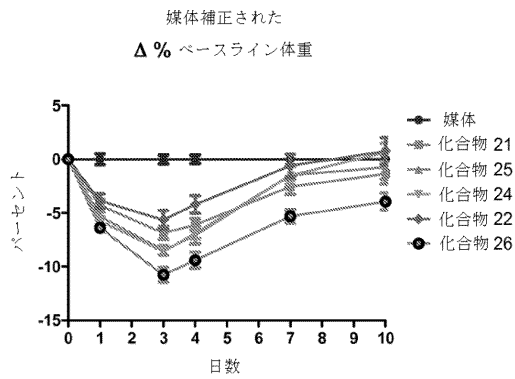
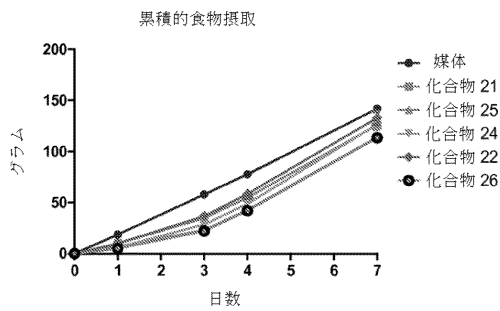


Fig. 1B



【 図 3 】

Fig. 3A

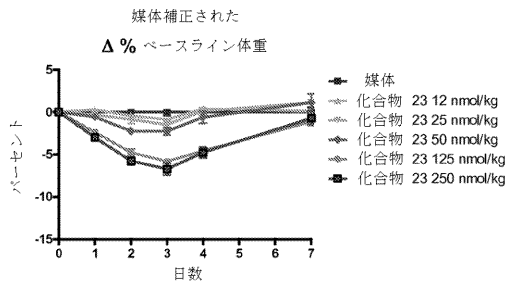
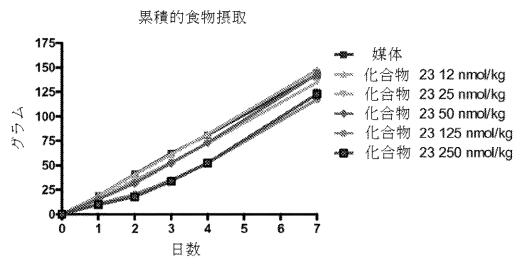


Fig. 3B



【 図 2 】

Fig. 2A

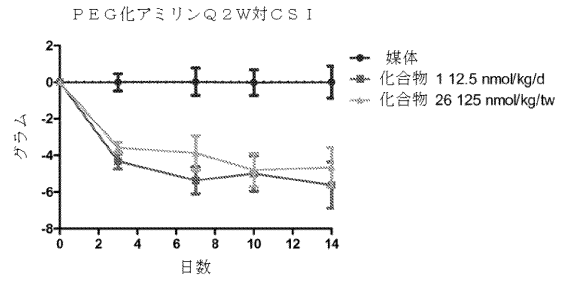
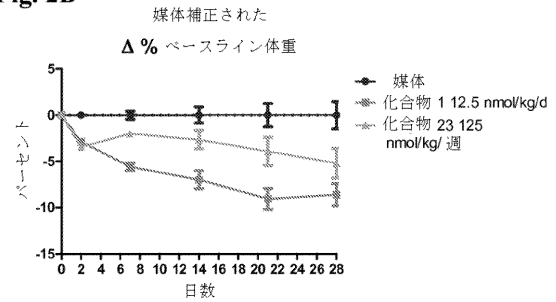


Fig. 2B



【 図 4 】

Fig. 4A

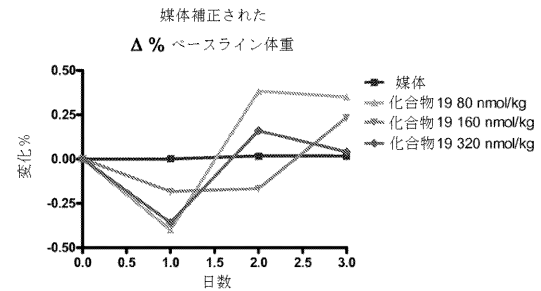
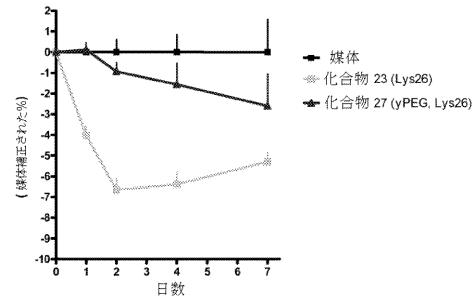


Fig. 4B





【 図 5 】

Fig. 5A

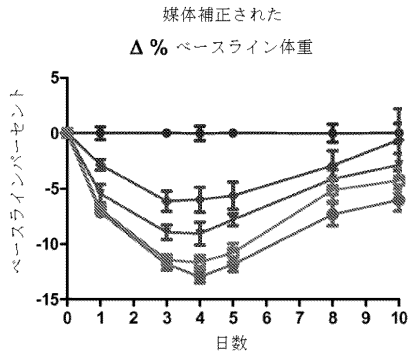
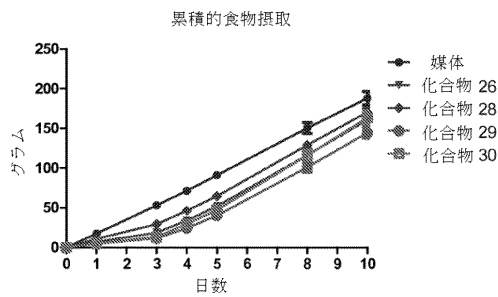


Fig. 5B



【 図 7 】

Fig. 7A

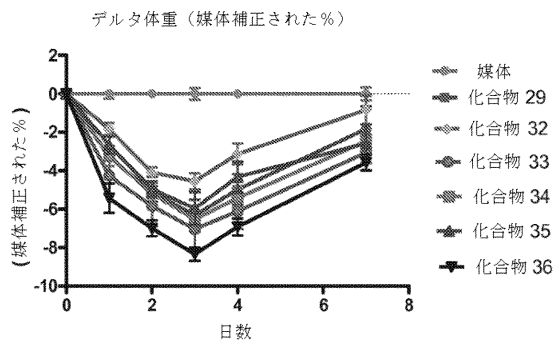
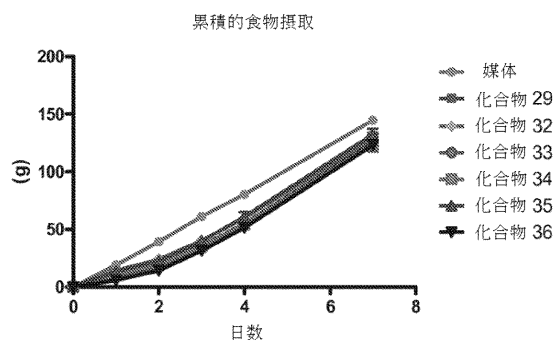


Fig. 7B



【 図 6 】

Fig. 6A

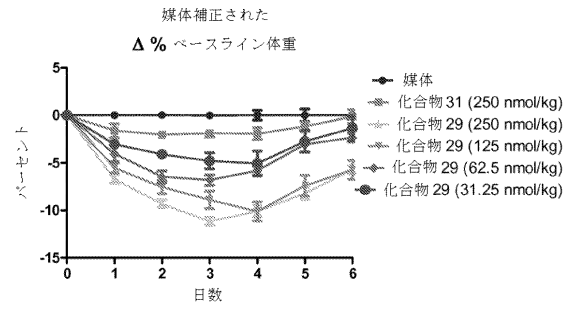
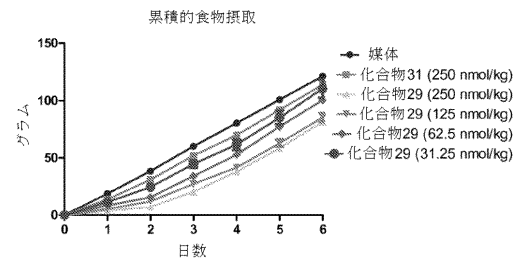


Fig. 6B



【 図 8 】

Fig. 8A

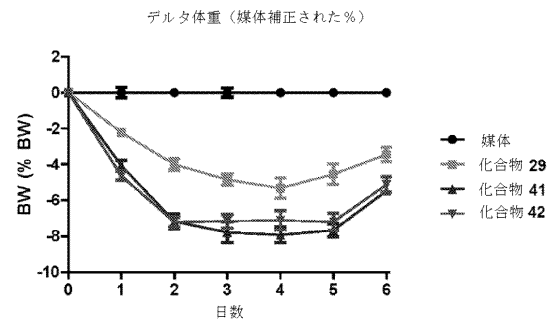
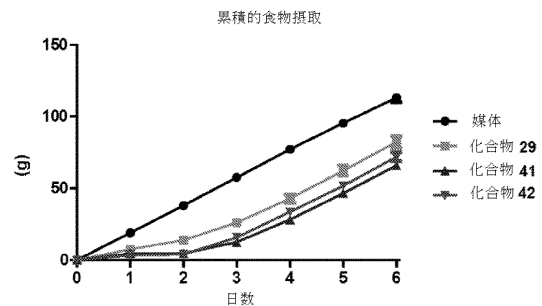


Fig. 8B



【配列表】

2014516049000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/39431

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61K 38/17; A61P 3/10 (2012.01)<br>USPC - 514/6.9; 514/21.3<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
|--|---|--|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC(8): A61K 38/17; A61P 3/10 (2012.01)<br>USPC: 514/6.9; 514/21.3<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>USPC: 514/6.8; 514/1.1<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google Scholar; esp@cenet; amylin, conjugate, diabetes, obesity, peptide, polyethylene glycol, duration, linker, cysteine, lysine, Amylin, Chengzao Sun, Manoj Samant   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                    | Relevant to claim No.  |
| Y  | US 2008/0274952 A1 (SOARES et al.) 6 November 2008 (06.11.2008), abstract; para [0018], [0025], [0199], SEQ ID NO: 2. | 1-3  |
| Y  | US 2009/0036364 A1 (LEVY et al.) 5 February 2009 (05.02.2009), abstract; para [0239], [0300], [0326].                 | 1-3  |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>   |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>1 August 2012 (01.08.2012)  |   | Date of mailing of the international search report<br><b>06 SEP 2012</b>                   |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201  |   | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT QSP: 571-272-7774 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/39431

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☒ Claims Nos.: 4-11  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.             | F I           | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 3/04 (2006.01)  | A 6 1 P 3/04  |            |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01)  | A 6 1 P 9/00  |            |
| A 6 1 P 1/00 (2006.01)  | A 6 1 P 1/00  |            |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |            |
| A 6 1 P 19/02 (2006.01) | A 6 1 P 19/02 |            |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01) | A 6 1 P 11/00 |            |
| A 6 1 K 47/48 (2006.01) | A 6 1 K 47/48 |            |
| A 6 1 K 47/34 (2006.01) | A 6 1 K 47/34 |            |

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

(71)出願人 513094387

アストラゼネカ・ファーマシューティカルズ・リミテッド・パートナーシップ  
AstraZeneca Pharmaceuticals LP  
アメリカ合衆国デラウェア州、ウィルミントン、コンコード・バイク1800番

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 スン・チェンザオ

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、インテレクチュアル・プロパティ・グループ内

(72)発明者 マノジ・ピー・サマント

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、インテレクチュアル・プロパティ・グループ内

(72)発明者 スウェタ・ネラヴェトラ

アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、タウン・センター・ドライブ9360番、アミリン・ファーマシューティカルズ・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー、インテレクチュアル・プロパティ・グループ内

Fターム(参考) 4C076 CC21 EE23 EE59

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19 BA23 CA59 NA14 ZA36 ZA42  
ZA59 ZA66 ZA70 ZA75 ZA96 ZB26 ZC33 ZC35  
4H045 AA10 AA30 BA18 BA19 BA57 CA40 EA23 EA27 EA28 FA33

FA58