

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-509079

(P2004-509079A)

(43) 公表日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 14/00
A61K 38/00
A61K 38/04
A61K 38/22
A61P 3/10

F I

C O 7 K 14/00 Z N A
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 K 37/24
 A 6 1 K 37/43

テーマコード (参考)

4 C O 8 4
 4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 137 頁)

(21) 出願番号 特願2002-515924 (P2002-515924)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月2日 (2001.8.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年2月3日 (2003.2.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2001/001119
 (87) 国際公開番号 W02002/010195
 (87) 国際公開日 平成14年2月7日 (2002.2.7)
 (31) 優先権主張番号 60/222, 619
 (32) 優先日 平成12年8月2日 (2000.8.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

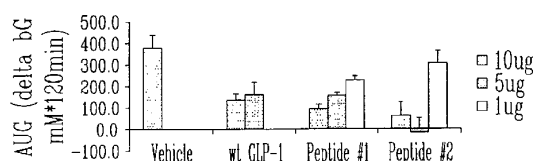
(71) 出願人 501094096
 セラテクノロジー・インコーポレーテッド
 カナダ国ケベック アッシュ4エス 2ア
 4, サン・ローラン, アルフレッド・ノー
 ベル・ブルヴァール 2310
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (72) 発明者 グラベル デニス
 カナダ国 ケベック州 サン・ランペール
 デ ビレネー 207

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 効力が増大した修飾生体ペプチド

(57) 【要約】

本発明は、それらの効力の増大、活性の延長および/または半減期の増大を提供する、修飾生体ペプチドに関する。修飾は、ペプチドのN末端、ペプチドのC末端、ペプチド鎖に沿った遊離アミノ基またはカルボキシ基上、またはこれらの複数の部位のいずれかでの、少なくとも1つの高次構造的に強固な置換基との、アミド結合を介したカップリングにより行われる。これらのペプチドは、例えばII型糖尿病のような病理関連性インスリン耐性の病態の治療における、臨床的有用性を示す。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

米国特許第 6, 0 2 0, 3 1 1 号の請求項 1 記載のペプチドを除く、式 $X_n - R_1$ のペプチド、ならびに、シス立体配置およびトランス立体配置、エピマー、エナンチオマー、ジアステレオマー、およびラセミ混合物を含む任意のその異性体；

式中、 R_1 は、ペプチド配列、それらの機能的類似体またはそれらの断片であり；

各 X は、互いに同一又は独立であることができ、かつ高次構造的に強固な (c o n f o r m a t i o n a l l y r i g i d) 部分 (m o i e t y) により構成された下記一覧

i) 直鎖の置換型 $C_1 - C_{10}$ アルキル；

ii) 分枝鎖の置換型 $C_1 - C_{10}$ アルキル；

iii) 直鎖または分枝鎖の未置換型または置換型の $C_1 - C_{10}$ アルケン；

iv) 直鎖または分枝鎖の未置換型または置換型の $C_1 - C_{10}$ アルキン；

v) ヘテロ原子が O、S または N である、未置換型または置換型で、飽和型または不飽和型の $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルまたはヘテロ環式アルキル (h e t e r o c y c l o a l k y l) ；

vi) ヘテロ原子が O、S または N である、未置換型または置換型の $C_5 - C_{14}$ アリールまたはヘテロアリール

から選択され、定義 i) から vi) の置換基は、1 つまたは複数の

a) 直鎖もしくは分枝鎖の $C_1 - C_6$ アルキル、

b) 直鎖もしくは分枝鎖の $C_1 - C_6$ アルケン、

c) 直鎖もしくは分枝鎖の $C_1 - C_6$ アルキン、

d) 少なくとも 2 つの炭素原子が、任意に $C_1 - C_{10}$ アルキル、 $C_1 - C_{10}$ アルケン、 $C_1 - C_{10}$ アルキン、 $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルもしくはヘテロ環式アルキル、および $C_5 - C_{14}$ アリールもしくはヘテロアリールに結合される、 $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルもしくはヘテロ環式アルキル、または

e) アリールもしくはヘテロアリールの少なくとも 2 つの炭素原子が、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、 $C_1 - C_{10}$ アルケン、 $C_1 - C_{10}$ アルキン、 $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルもしくはヘテロ環式アルキル、および $C_5 - C_{14}$ アリールもしくはヘテロアリールに結合される $C_5 - C_{14}$ アリールもしくはヘテロアリール

であり；

X 基はまた、以下から選択される少なくとも 1 つの基を含み：

）ペプチド配列の N 末端、ペプチド配列の C 末端、ペプチド配列鎖上の利用可能なカルボキシ部位又はアミノ部位におけるアミド結合を介したペプチド配列とのカップリングのためのカルボキシ基又はアミノ基、およびそれらの組合せ；ならびに

）ペプチド配列鎖上の利用可能なヒドロキシ部位でのエステル結合を介したペプチド配列とのカップリングのためのカルボキシ基、およびその組合せ；

n は 1 から 5 の任意の整数である。

【請求項 2】

ペプチド配列が以下からなる群より選択される、請求項 1 記載のペプチド：

成長ホルモン放出因子 (G R F)、ソマトスタチン、グルカゴン様ペプチド 1 (7 - 3 7

）アミドヒト (G L P - 1)、h G L P - 1 (7 - 3 6) NH_2 、副甲状腺ホルモン断片

(P T H 1 - 3 4)、副腎皮質刺激ホルモン (A C T H)、オステオカルシン、カルシ

トニン、コルチコトロピン放出因子、ダイノルフィン A、 - エンドルフィン、ビッグガ

ストリン - 1 (B i g G a s t r i n - 1)、G L P - 2、黄体形成ホルモン放出ホル

モン、メラニン細胞刺激ホルモン (M S H)、心房性ナトリウム利尿ペプチド、ニューロ

メジン B (N e u r o m e d i n B)、ヒトニューロペプチド Y、ヒトオレキシン A、

ヒトペプチド Y Y、ヒトセクレチン、血管作動性腸管ペプチド (V I P)、抗生物質系ペ

プチド (マガイニン 1、マガイニン 2、セクロピン A、およびセクロピン B)、サブスタ

ンス P (S P)、カソモルフィン - 5、エンドモルフィン - 2、プロコリパーゼ (P r

o c o l i p a s e)、エンテロスタチン、ガストリン阻害ペプチド、クロモグラニン A

10

20

30

40

50

、バソスタチン I および II、プロカルシトニン、P r o N C T、C G R P (カルシトニン遺伝子関連ペプチド)、I L 8 (単球由来)、G C P - 2、P F 4、I P - 1 0、M I G、S D F - 1、G R O -、I - T A C、R A N T E S、L D 7 8、M L P - 1、M C P - 1、M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4、エオタキシン、M D C、ならびにこれらの機能的類似体および誘導体または断片。

【請求項 3】

高次構造的に強固な部分が、少なくとも 1 つの二重結合、三重結合または飽和型もしくは不飽和型の環を含む、請求項 1 または 2 記載のペプチド。

【請求項 4】

高次構造的に強固な部分が、本明細書において定義された式 1 から式 6 3 のうち 1 つまたは複数の構造を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項記載のペプチド。 10

【請求項 5】

ペプチド配列が下記からなる群より選択される、請求項 1 から 4 のいずれか一項記載のペプチド、ならびにそれらの機能性ペプチドおよび誘導体または断片：

成長ホルモン放出因子 (G R F)

Xaa₁-Xaa₂-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Xaa₈-Ser-Tyr-Arg-Lys-Xaa₁₃-Leu-Xaa₁₅-Gln-Leu-

Xaa₁₈-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Ile-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-

Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂ 20

(式中、X a a₁ は、T y r または H i s であり、
X a a₂ は、V a l または A l a であり、
X a a₈ は、A s n または S e r であり、
X a a₁₃ は、V a l または I l e であり、
X a a₁₅ は、A l a または G l y であり、
X a a₁₈ は、S e r または T y r であり、
X a a₂₄ は、G l n または H i s であり、
X a a₂₅ は、A s p または G l u であり、
X a a₂₇ は、M e t、I l e または N l e であり、かつ
X a a₂₈ は、S e r または A s n である)；

ソマトスタチン

Ala₁-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp
|
Cys₁₄-Ser-Xaa₁₂-Phe-Thr-Lys

(式中、X a a₁₂ は、T y r または S e r である)；
グルカゴン様ペプチド 1 (7 - 3 7) (アミドヒト (h G L P - 1))

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-

Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-OH(NH₂) 40

；

副甲状腺ホルモン断片 (P T H 1 - 3 4)

Xaa₁-Val-Ser-Glu-Xaa₅-Gln-Xaa₇-Met-His-Asn-Leu-Gly-Xaa₁₃-His-Xaa₁₅-Xaa₁₆-
 Xaa₁₇-Xaa₁₈-Glu-Arg-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Trp-Leu-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-
 Xaa₃₃-Xaa₃₄-NH₂

(式中、X a a₁ は、S e r または A l a であり、
 X a a₅ は、I l e または M e t であり、
 X a a₇ は、L e u または P h e であり、
 X a a₁₃ は、L y s または G l u であり、
 X a a₁₅ は、L e u または A r g であり、
 X a a₁₆ は、A s n または A l a または S e r または H i s であり、
 X a a₁₇ は、S e r または T h r であり、
 X a a₁₈ は、M e t または V a l または L e u であり、
 X a a₂₁ は、V a l または m e t または G l n であり、
 X a a₂₂ は、G l u または G l n または A s p であり、
 X a a₂₅ は、A r g または G l n であり、
 X a a₂₆ は、L y s または M e t であり、
 X a a₃₃ は、A s n または S e r であり、かつ
 X a a₃₄ は、P h e または A l a である) ;

10

20

副腎皮質刺激ホルモン (A C T H)

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Xaa₁₃-Gly-Xaa₁₅-Lys-Arg-Arg-
 Pro-Xaa₂₀-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Xaa₂₉-Glu-Xaa₃₁-Xaa₃₂-Glu-
 Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Glu-Xaa₃₉-NH₂

(式中、X a a₁₃ は、V a l または M e t であり、
 X a a₁₅ は、L y s または A r g であり、
 X a a₂₀ は、V a l または I l e であり、
 X a a₂₆ は、G l y または S e r であり、
 X a a₂₇ は、A l a または P h e または V a l であり、
 X a a₂₈ は、G l u または G l n であり、
 X a a₂₉ は、A s p または A s n または G l u であり、
 X a a₃₁ は、S e r または T h r であり、
 X a a₃₂ は、A l a または V a l または S e r であり、
 X a a₃₄ は、A l a または A s n または G l y であり、
 X a a₃₅ は、P h e または M e t であり、
 X a a₃₆ は、P r o または G l y であり、
 X a a₃₇ は、L e u または V a l または P r o であり、かつ
 X a a₃₉ は、P h e または V a l または L e u である) ;

30

40

オステオカルシン

Tyr-Leu-Xaa₅₂-Xaa₅₃-Xaa₅₄-Leu-Gly-Ala-Pro-Xaa₅₉-Pro-Tyr-Pro-Asp-Pro-Leu-Glu-
 Pro-Xaa₆₈-Arg-Glu-Val-Cys-Glu-Leu-Asn-Pro-Xaa₇₇-Cys-Asp-Glu-Leu-Ala-Asp-
 His-Ile-Gly-Phe-Gln-Xaa₈₉-Ala-Tyr-Xaa₉₂-Arg-Xaa₉₄-Tyr-Gly-Xaa₉₇-Val-NH₂

(式中、X a a₅₂ は、T y r または A s p または A s n であり、

50

X a a₅₃ は、G l nまたはH i sまたはA s nであり、
 X a a₅₄ は、T r pまたはG l yであり、
 X a a₅₉ は、V a lまたはA l aであり、
 X a a₆₈ は、A r gまたはL y sまたはH i sであり、
 X a a₇₇ は、A s pまたはA s nであり、
 X a a₈₉ は、G l uまたはA s pであり、
 X a a₉₂ は、A r gまたはL y sであり、
 X a a₉₄ は、P h eまたはI l eであり、かつ
 X a a₉₇ は、P r oまたはT h rである) ;

カルシトニン

10

Cys-Xaa₈₆-Xaa₈₇-Leu-Ser-Thr-Cys-Xaa₉₂-Leu-Gly-Xaa₉₅-Xaa₉₆-Xaa₉₇-Xaa₉₈-Xaa₉₉-

Xaa₁₀₀-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Xaa₁₀₃-Xaa₁₀₄-Thr-Xaa₁₀₆-Xaa₁₀₇-Xaa₁₀₈-Xaa₁₀₉-Xaa₁₁₀-Xaa₁₁₁-

Gly-Xaa₁₁₃-Xaa₁₁₄-Xaa₁₁₅-Pro-NH₂

(式中、X a a₈₆ は、G l yまたはS e rまたはA l aであり、

X a a₈₇ は、A s nまたはS e rであり、

X a a₉₂ は、M e tまたはV a lであり、

X a a₉₅ は、T h rまたはL y sであり、

X a a₉₆ は、T y rまたはL e uであり、

X a a₉₇ は、T h rまたはS e rであり、

X a a₉₈ は、G l nまたはL y sであり、

X a a₉₉ は、A s pまたはG l uであり、

X a a₁₀₀ は、P h eまたはL e uであり、

X a a₁₀₁ は、A s nまたはH i sであり、

X a a₁₀₂ は、L y sまたはA s nであり、

X a a₁₀₃ は、P h eまたはL e uであり、

X a a₁₀₄ は、H i sまたはG l nであり、

X a a₁₀₆ は、P h eまたはT y rであり、

X a a₁₀₇ は、P r oまたはS e rであり、

X a a₁₀₈ は、G l nまたはG l yまたはA r gであり、

X a a₁₀₉ は、T h rまたはI l eであり、

X a a₁₁₀ は、A l aまたはG l yまたはS e rまたはA s pまたはA s nであり、

X a a₁₁₁ は、I l eまたはP h eまたはV a lまたはT h rであり、

X a a₁₁₃ は、V a lまたはA l aまたはS e rであり、

X a a₁₁₄ は、G l yまたはG l uであり、かつ

X a a₁₁₅ は、A l aまたはT h rである) ;

コルチコトロピン放出因子

20

30

40

Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-

Glu Met-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-

Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH₂

(式中、X a a₁₀₁ は、A l aまたはP r oであり、かつ

X a a₁₀₂ は、A r gまたはG l yである) ;

ダイノルフィン A

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH

50

;

- エンドルフィン

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Xaa₂₄₃-Glu-Xaa₂₄₅-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Xaa₂₅₁-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Xaa₂₅₉-Lys-Asn-Xaa₂₆₂-Xaa₂₆₃-Lys-Lys-Gly-Xaa₂₆₇-OH(式中、Xaa₂₄₃は、SerまたはProであり、Xaa₂₄₅は、LysまたはArgであり、Xaa₂₅₁は、ValまたはMetであり、Xaa₂₅₉は、IleまたはValであり、Xaa₂₆₂は、AlaまたはThrまたはSerまたはValであり、Xaa₂₆₃は、TyrまたはHisであり、かつXaa₂₆₇は、GluまたはLeuまたはGlnまたはHisである) ;

ビッグガストリン - 1

pXaa₅₉-Leu-Gly-Xaa₆₂-Gln-Xaa₆₄-Xaa₆₅-Xaa₆₆-Xaa₆₇-Xaa₆₈-Xaa₆₉-Ala-Asp-Xaa₇₂-Xaa₇₃-Lys-Lys-Xaa₇₆-Xaa₇₇-Pro-Xaa₇₉-Xaa₈₀-Glu-Xaa₈₂-Glu-Glu-Xaa₈₅-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂(式中、Xaa₅₉は、GluまたはGlnであり、Xaa₆₂は、ProまたはLeuであり、Xaa₆₄は、GlyまたはAspであり、Xaa₆₅は、ProまたはSerであり、Xaa₆₆は、ProまたはGlnであり、Xaa₆₇は、HisまたはGlnであり、Xaa₆₈は、LeuまたはMetまたはPheまたはGlnであり、Xaa₆₉は、ValまたはIleであり、Xaa₇₂は、ProまたはLeuであり、Xaa₇₃は、SerまたはAlaであり、Xaa₇₆は、GlnまたはGluであり、Xaa₇₇は、GlyまたはArgであり、Xaa₇₉は、TrpまたはProまたはArgであり、Xaa₈₀は、LeuまたはValまたはMetであり、Xaa₈₂は、GluまたはLysであり、かつXaa₈₅は、GluまたはAlaである) ;

GLP - 2

His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Xaa₁₅₂-Xaa₁₅₃-Xaa₁₅₄-Xaa₁₅₅-Xaa₁₅₆-Xaa₁₅₇-Xaa₁₅₈-Leu-Asp-Xaa₁₆₁-Xaa₁₆₂-Ala-Xaa₁₆₄-Xaa₁₆₅-Xaa₁₆₆-Phe-Xaa₁₆₈-Xaa₁₆₉-Trp-Xaa₁₇₁-Xaa₁₇₂-Xaa₁₇₃-Thr-Xaa₁₇₅-Xaa₁₇₆-Xaa₁₇₇-Xaa₁₇₈(式中、Xaa₁₅₂は、SerまたはThrであり、Xaa₁₅₃は、AspまたはSerであり、Xaa₁₅₄は、GluまたはAspであり、Xaa₁₅₅は、MetまたはPheであり、Xaa₁₅₆は、AsnまたはSerであり、Xaa₁₅₇は、ThrまたはLysであり、Xaa₁₅₈は、IleまたはValまたはAlaであり、

50

Xaa_{161} は、Asn または Ile または His または Ser であり、
 Xaa_{162} は、Leu または Lys であり、
 Xaa_{164} は、Ala または Thr であり、
 Xaa_{165} は、Arg または Gln または Lys であり、
 Xaa_{166} は、Asp または Glu であり、
 Xaa_{168} は、Ile または Leu であり、
 Xaa_{169} は、Asn または Asp であり、
 Xaa_{171} は、Leu または Ile であり、
 Xaa_{172} は、Ile または Leu であり、
 Xaa_{173} は、Gln または Asn または His であり、
 Xaa_{175} は、Lys または Pro であり、
 Xaa_{176} は、Ile または Val であり、
 Xaa_{177} は、Thr または Lys であり、かつ
 Xaa_{178} は、Asp または Glu である) ;

10

黄体形成ホルモン放出ホルモン

Xaa₁-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-OH

(式中、 Xaa_1 は、pGlu、5-oxoPro または Gln である。) ;
 メラニン細胞刺激ホルモン (MSH)

Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

20

;

心房性ナトリウム利尿ペプチド

H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Xaa₁₃₅-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-

Gln-Ser-Xaa₁₄₂-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH

(式中、 Xaa_{135} は、Met または Ile であり、かつ
 Xaa_{142} は、Gly または Ser である。) ;
 ニューロメジン B

30

H-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂

;

ヒトニューロペプチド Y

H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-asp-Met-Ala-

Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂

40

;

ヒトオレキシン A

pGlu-Pro-Leu-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-Leu-Tyr-Glu-

Leu-Leu-His-Gly-Ala-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu-NH₂

;

ヒトペプチド YY

H-Tyr-Pro-Ile-Lys-Pro-Glu-Ala-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-Glu-Leu-Asn-
 Arg-Tyr-Tyr-Ala-Ser-Leu-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-
 NH₂

;
 ヒトセクレチン

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-
 Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

10

;
 血管作動性腸管ペプチド (VIP)

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-
 Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

20

;
 下記の抗生物質系ペプチド：
 マガイニン 1

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-
 Glu-Ile-Met-Lys-Ser

;
 マガイニン 2

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-
 Glu-Ile-Met-Asn-Ser

30

;
 セクロピン A

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-Ala-
 Lys

;
 セクロピン B

40

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-Gly-
 Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-Leu .

;
 サブスタンス P (SP)

Arg-Pro-Leu-Pro-Gln-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-アミド

50

カソモルフィン - 5

T y r - P r o - P h e - P r o - G l y ;

エンドモルフィン - 2

T y r - P r o - P h e - P h e - N H 2 ;

プロコリパーゼ

100 aa ペプチド (X1-Pro-X2-Pro-Arg....)

;

エンテロスタチン

V a l - P r o - A s p - P r o - A r g ;

ガストリン阻害ペプチド

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala- Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-

Gln-Asp-Phe- Val-Asn-Trp-Leu- Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-

His-Asn- Ile-Thr-Gln

;

クロモグラニン A ;

バソスタチン I ;

バソスタチン I I

Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met Lys Cys Ile Val

Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met Pro Val Ser Gln Glu Cys Phe

Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu Leu

Lys Glu Leu Gln Asp Leu Ala Leu Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His Gln Gln Lys

Lys His Ser Gly Phe Glu Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn Gln Ser Ser Gln

Ala Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val Met Glu

;

プロカルシトニン ;

P r o N C T ;

P r o C G R P ;

ケモカインファミリー :

C X C 群

10

20

30

40

IL8(单球由来);

SerAlaLysGluLeuArgCysGlnCys...

GCP-2:

GlyProValSerAlaValLeuThrGluLeuArgCysThrCys...

PF4:

GluAlaGluGluAspGlyAspLeuGlnCysLeuCys...

10

IP-10:

ValProLeuSerArgThrValArgCCysThrCys...

MIG:

ThrProValValArgLysGlyArgCysSerCys...

20

SDF-1 α :

LysProValSerLeuSerTyrArgCysProCys...

GRO- α :

AlaProLeuAlaThrGluLeuArgCysGlnCys...

I-TAC:

PheProMetPheLysLysGlyArgCysLeuCys...

30

RANTES:

SerProTyrSerSerAspThrThrProCys...

LD78:

AlaProLeuAlaAlaAspThrProThrAlaCys...

MIP-1 α :

AlaProMetGlySerAspProProThrAlaCys...

10

MCP-1:

GlnProAspAlaIleAsnAlaProValThrCys...

MCP-2:

GlnProSerAspValSerIleProIleThrCys...

MCP-3:

GlnProValGlyIleTAsnSerThrThrCys...

20

MCP-4:

GlnProAspAlaLeuAspValProSerThrCys...

Eotaxin:

GlyProAlaSerValProThrThrCys...

30

MDC:

GlyProTyrGlyAlaAsnMetGluAspSerValCys...

。

【請求項 6】

ペプチド配列が、天然ペプチドの配列およびその機能的類似体もしくは断片、または臨床的に安全かつ許容できるそれらの誘導体もしくは類似体である、請求項 5 記載のペプチド

。

【請求項 7】

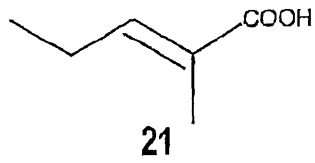
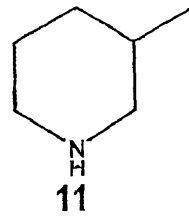
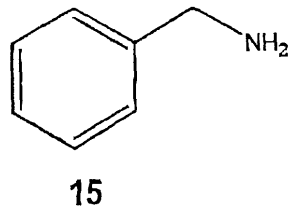
ペプチド配列がソマトスタチンであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、以下のような異なる位置においてアミド結合を介して該ソマトスタチンペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド：

40

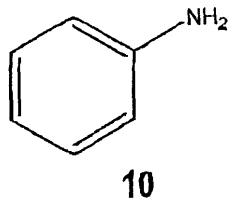
【化 1】

位置

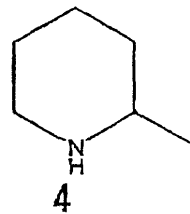
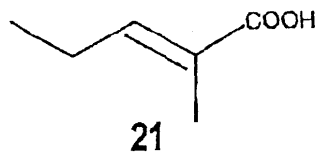
高次構造的に強固な部分

Ala₁Asp₅

10

Cys₁₄

20

Ala₁+Cys₁₄

30

。

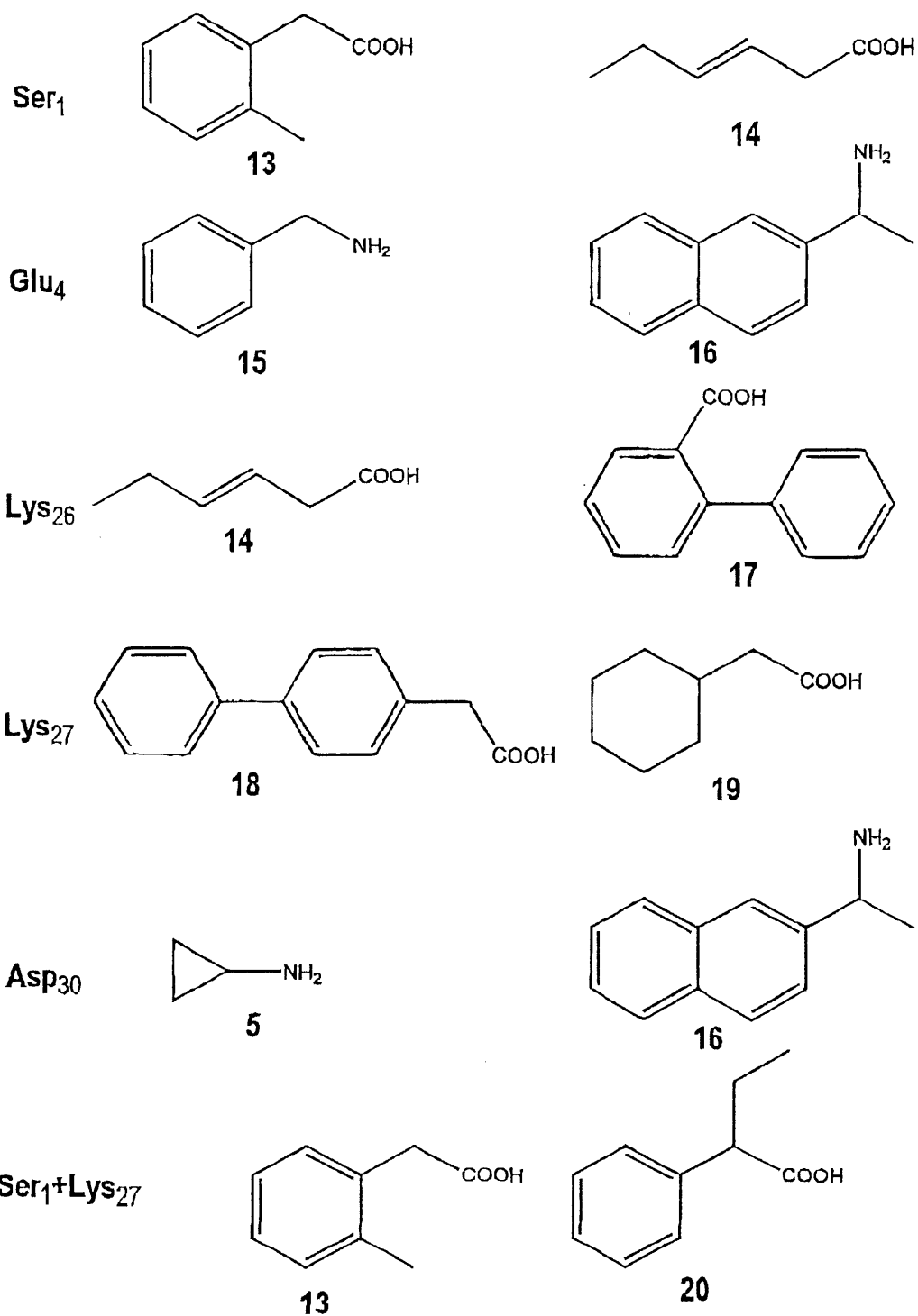
【請求項 8】

ペプチド配列が P T H 1 - 3 4 であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、以下のような異なる位置においてアミド結合を介して該 P T H 1 - 3 4 ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド：

【化 2】

位置

高次構造的に強固な部分



。

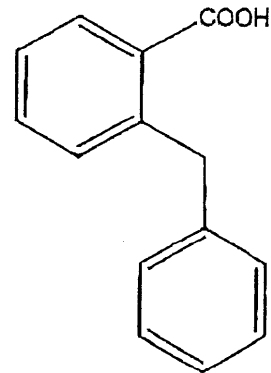
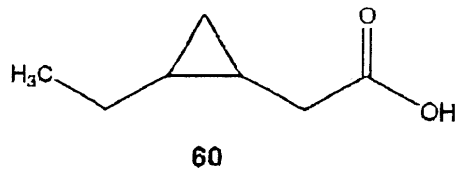
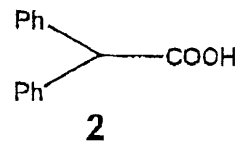
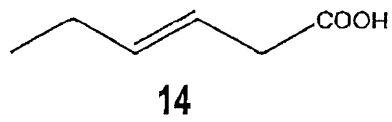
【請求項 9】

ペプチド配列が G L P - 1 であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、以下のような異なる位置においてアミド結合を介して該 G L P - 1 ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド：

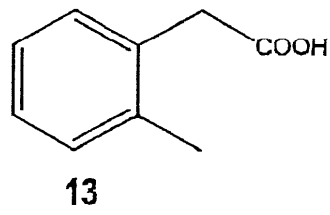
【化 3】

位置

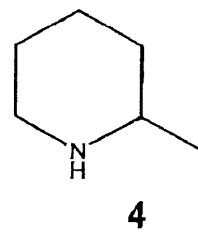
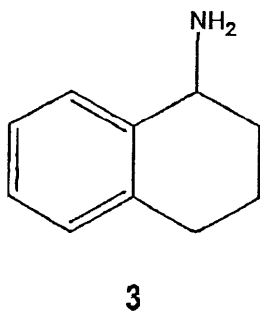
高次構造的に強固な部分

His₁

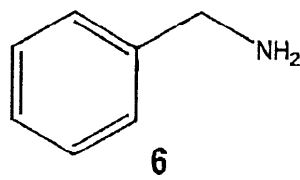
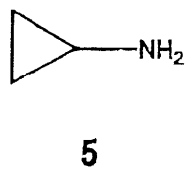
10



20

Glu₃

30

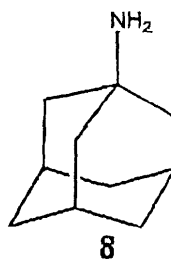
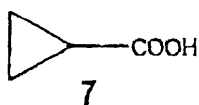
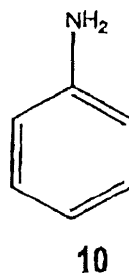
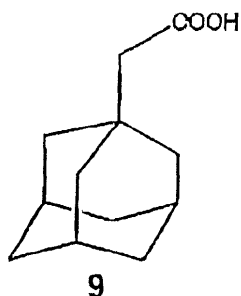
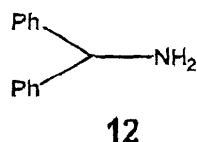
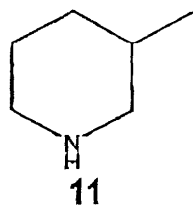
Asp₉

40

【化 4】

位置

高次構造的に強固な部分

His₁ + Glu₃His₁ + Asp₉Glu₃ + Asp₉

10

20

40

50

。

【請求項 10】

ペプチド配列が G L P - 2 であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該 G L P - 2 ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

30

【請求項 11】

ペプチド配列がエンテロスタチンであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合を介して該エンテロスタチンペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 12】

ペプチド配列が N P Y であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分は、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合を介して該 N P Y ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

40

【請求項 13】

ペプチド配列が N P Y Y であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合を介して該 N P Y Y ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 14】

ペプチド配列がセクレチンであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該セクレチンペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 15】

ペプチド配列が血管作動性腸管ペプチドであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固

な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該血管作動性腸管ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 16】

ペプチド配列がガストリン阻害ペプチドであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該ガストリン阻害ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 17】

ペプチド配列がバソスタチン I I であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該バソスタチン I I ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

10

【請求項 18】

ペプチド配列が R A N T E S であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該 R A N T E S ペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 19】

ペプチド配列がエオタキシンであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該エオタキシンペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 20】

高次構造的に強固な部分が、N 末端においてアミド結合またはエステル結合を介してペプチド配列へカップリングしている、請求項 1 から 18 のいずれか一項記載のペプチド。

20

【請求項 21】

高次構造的に強固な部分が、本明細書中に参照された式 60 を有する、請求項 8 から 19 のいずれか一項記載のペプチド。

【請求項 22】

ペプチド配列が G L P - 1 である、請求項 20 記載のペプチド。

【請求項 23】

インスリン耐性の病態に関連するまたはしないグルコース不耐 (g l u c o s e i n t o l e r a n c e) の治療における、請求項 22 記載のペプチドの使用。

【請求項 24】

I I 型糖尿病の治療における、請求項 23 記載の使用。

30

【請求項 25】

ペプチド配列が C G R P であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該 C G R P ペプチド配列へカップリングされる、請求項 1 記載のペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、生物学的効力の増大、活性の延長および / または半減期の増大を提供する修飾ペプチドに関する。修飾は、ペプチド N 末端、ペプチド C 末端、またはペプチド鎖に沿った遊離アミノ基もしくは遊離カルボキシ基、またはこれらの複数の部位のいずれかにおける、少なくとも 1 つの高次構造的に強固な置換基とのアミド結合を介したカップリングにより形成される。

40

【0002】

発明の背景

大部分のペプチドは、血清培地において迅速に分解され、その結果、それらの代謝産物は、最終的には残留生物活性をほとんどまたは全く有さないことがある。ペプチドの活性を増大するために、様々な技術が提唱されている。そのひとつは、ペプチド配列の N 末端もしくは C 末端、またはそのペプチド鎖に沿った他の残基における、疎水鎖の固定である。しかしこの技術には限界がある。例えば、ペプチドが長いペプチド鎖を含む場合、小さい

50

疎水基がN末端またはC末端に固定されるという事実は、必ずしも修飾ペプチドの活性の増加を生じるものではない。

【0003】

例えば、ペプチド配列のC末端におけるOHの、例えば - NEt₂ のようなより疎水性の基との置換によって、比活性の著しい増加が生じることがわかっている。しかしこれらの結果は、いくつかの刊行物において矛盾しており、例えば、ムラニチ (Murani) らは Pharm. Res., 1991, 8: 649 - 652 において、N末端の疎水基としてのラウロイル基は、活性を増加することにおいて効果がないことを強調している。従って、生物学的効力、活性の期間および/または半減期に関する一般的法則または結論があるようには思われず、これは、N末端またはC末端のいずれかのペプチド鎖上の、もしくはペプチド鎖に沿った特定の残基上への置換基の追加の結果として導かれている。

10

【0004】

米国特許第6,020,311号は、硬直化した疎水性残基が、ペプチドのN末端においてアミド結合を介してGRFペプチドヘカップリングしている、疎水性成長ホルモン放出因子 (GRF) 類似体を開示している。このような類似体は、用量の減少を伴う同化能の改善、および活性の延長を有すると言われている。しかしこの特許の内容によると、硬直化した疎水性残基は、常に、一方の先端にカルボニル基を含み、このことは、GRFへのアミドカップリングがアミノ部位においてのみ生じ、必要なアミド結合を形成することを意味している。この特許は、硬直化した疎水性残基のカルボニル基のアミノ基との置換により、アミドカップリングがC末端に形成された場合に同様の結果が得られることについては、言及、示唆、または暗示をしていない。この特許は、更にアミドカップリングがペプチド鎖の他の場所に生じることについても、言及、示唆、または暗示をしていない。

20

【0005】

Biochemistry, 2001, 40: p2860 ~ 2869 は、ヘキセン酸、硬直化された疎水性部分が、ペプチドのN末端で疎水性グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) ペプチドヘカップリングするような、GLP-1 類似体を説明している。この類似体のGLP-1受容体への親和性が低下するが、インビボの生体活性は、野生型GLP-1のものと同等もしくはわずかに優れていることがこれらの結果により示されており、その理由は、血清分解に対する耐性の増大のためと仮定されている。この研究によると、His¹へのアシル鎖の連結、Ala²のアミノ酸置換、およびN末端でのアミノ酸配列の付加は、インビボ生体活性を増加するための戦略としては硬直化した疎水鎖の固定よりも優れているであろう。しかし、これらの戦略のほとんどは天然の分子のアミノ酸組成の修飾に関連しており、これは免疫原性および副作用のリスクを含む臨床適用に関して、結果として負の安全性を有するであろう。

30

【0006】

従って、ペプチドの活性が増大されるような方法で修飾され、これにより効力が改善される、すなわち血清分解へのより大きい抵抗および/もしくは過剰アゴニスト特性が改善され、ならびに/または臨床的に安全かつ許容されうるアミノ酸配列を変更することなく半減期を延長するようなペプチドを開発する必要性は大きい。

40

【0007】

発明の概要

本発明により、式 X_n - R₁ のペプチドが提供される：

式中、

R₁ は、Xがペプチド配列のN末端部位で結合したtrans-3-ヘキセノイル基を表す場合、GRF配列であることができないペプチド配列であり；

各Xは、互いに同一又は独立であることができ、かつ、高次構造的に強固な部分により構成された下記一覧

a) ペプチド配列のN末端、ペプチド配列のC末端、ペプチド配列鎖上の利用可能なカルボキシ部位またはアミノ部位における、アミド結合を介したペプチド配列とのカップリン

50

グのためのカルボキシ基又はアミノ基、およびそれらの組合せ、ならびに

b) ペプチド配列鎖上での利用可能なヒドロキシ部位におけるエステル結合を介したペプチド配列とのカップリングのためのカルボキシ基、およびその組合せから選択され；ここで、

n は、1 から 5 の任意の整数であり；

X は、以下のように定義される；

i) 直鎖の置換型 $C_1 - C_{10}$ アルキル；

ii) 分枝鎖の置換型 $C_1 - C_{10}$ アルキル；

iii) 直鎖または分枝鎖の未置換型または置換型の $C_1 - C_{10}$ アルケン；

iv) 直鎖または分枝鎖の未置換型または置換型の $C_1 - C_{10}$ アルキン；

v) ヘテロ原子が O、S または N である、未置換型または置換型で、飽和型または不飽和型の $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルまたはヘテロ環式アルキル；

vi) ヘテロ原子が O、S または N である、未置換型または置換型の $C_5 - C_{14}$ アリールまたはヘテロアリール；

ここで、定義 i) から vi) の置換基は、1 つまたは複数の

a) 直鎖もしくは分枝鎖の $C_1 - C_6$ アルキル、

b) 直鎖もしくは分枝鎖の $C_1 - C_6$ アルケン、

c) 直鎖もしくは分枝鎖の $C_1 - C_6$ アルキン、

d) 少なくとも 2 つの炭素原子が、任意に $C_1 - C_{10}$ アルキル、 $C_1 - C_{10}$ アルケン、 $C_1 - C_{10}$ アルキン、 $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルもしくはヘテロ環式アルキル、および $C_5 - C_{14}$ アリールもしくはヘテロアリールと結合する、 $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルもしくはヘテロ環式アルキル、または

e) アリールもしくはヘテロアリールの少なくとも 2 つの炭素原子が、任意に $C_1 - C_{10}$ アルキル、 $C_1 - C_{10}$ アルケン、 $C_1 - C_{10}$ アルキン、 $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルもしくはヘテロ環式アルキル、および $C_5 - C_{14}$ アリールもしくはヘテロアリールに結合する、 $C_5 - C_{14}$ アリールもしくはヘテロアリール；

ならびに、シス立体配置およびトランス立体配置、エピマー、エナンチオマー、ジアステレオマー、およびラセミ混合物を含む、それらの任意の異性体である。

【0008】

「アリール」という用語は、フェニル、ナフチルなどを含み、「ヘテロ環式アルキル」という用語は、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオファニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピラニル、およびそれらの部分的に脱水素された誘導体、アゼチジニル、ペペリジニル、ピロリジニルなどを含み、「ヘテロアリール」という用語は、ピリジル、インドリル、フラニル、イミダゾリル、チオファニル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、ピリミジニル、オキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ピラゾリルなどを含む。

【0009】

「高次構造的に強固な部分」という用語は、高次構造的に制限されている、すなわち単結合について回転、移動性が制限されている部分を意味する。このような移動性は、例えば、高次構造的にほとんどまたは全く移動性を有さないような二重結合、三重結合、または飽和もしくは飽和環により制限される。結果的に、配座異性体または回転異性体の数は、例えば対応する直鎖の未置換型かつ飽和型の脂肪族鎖と比較すると、減少する。この高次構造的に強固な部分は、疎水性であるが、これは必須条件ではない。

【0010】

本発明の好ましい態様に従い、ペプチド配列は、成長ホルモン放出因子 (GRF)、ソマトスタチン、グルカゴン様ペプチド 1 (7-37)、アミドヒト (GLP-1)、hGLP-1 (7-36) NH_2 、副甲状腺ホルモン断片 (例えば PTH 1-34)、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、オステオカルシン、カルシトニン、コルチコトロピン放出因子、ダイノルフィン A、 β -エンドルフィン、ビッグガストリン-1、GLP-2、黄体形成ホルモン放出ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH)、心房性ナトリウム

10

20

30

40

50

利尿ペプチド、ニューロメジン B、ヒトニューロペプチド Y、ヒトオレキシン A、ヒトペプチド Y Y、ヒトセクレチン、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、抗生物質系ペプチド (マガイニン 1、マガイニン 2、セクロピン A、およびセクロピン B)、サブスタンス P (SP)、カソモルフィン - 5、エンドモルフィン - 2、プロコリパーゼ、エンテロスタチン、ガストリン阻害ペプチド、クロモグラニン A、バソスタチン I および II、プロカルシトニン、ProNCT、ProCGRP、IL 8 (単球由来)、GCP - 2、PF 4、IP - 10、MIG、SDF - 1、GRO - 、I - TAC、RANTES、LD 78、MLP - 1、MCP - 1、MCP - 2、MCP - 3、MCP - 4、エオタキシン、MDC、およびそれらの機能的誘導体または断片からなる群より選択される。

【0011】

10

発明の詳細な説明

本出願においてアミノ酸は、生化学用語に関する IUPAC - IUB 委員会により推奨された、一般にペプチド技術分野において許容されている、以下に示した慣習的三文字略号により確定される。

アラニン	Ala	ロイシン	Leu
アルギニン	Arg	リシン	Lys
アスパラギン	Asn	メチオニン	Met
アスパラギン酸	Asp	フェニルアラニン	Phe
システイン	Cys	プロリン	Pro
グルタミン酸	Glu	セリン	Ser
グルタミン	Gln	スレオニン	Thr
グリシン	Gly	トリプトファン	Trp
ヒスチジン	His	チロシン	Tyr
イソロイシン	Ile	バリン	Val

20

【0012】

30

本明細書において示した全てのペプチドは、一般に許容される慣例に従い記載されており、そのため N 末端アミノ酸は左側に記載され、かつ C 末端アミノ酸は右側に記載される。

【0013】

本発明は、薬学的特性の増大を伴うペプチドの新規ファミリーを作成するための、少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分の使用に関する。

【0014】

本発明の修飾ペプチドは、当技術分野において固相合成として周知である、下記の方法に従い調製される。

【0015】

カルボキシ基を含む高次構造的に強固な部分は、ペプチド N 末端同様リシン側鎖においても見出されるようなアミノ基への固定に使用される。アミノ基を含む高次構造的に強固な部分は、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸の側鎖またはペプチドの C 末端において見出されるようなカルボキシ基への固定に使用される。このような場合の固定反応は、文献 (B. Castro ら、Tetrahedron letters、14:1219 (1975)) において Castro が説明したようなベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロリン酸を使用し、固相支持体上で行われることが好ましい (Merrifield R. B.、J. Am. Chem. Soc.、85:2149 (1963) および J. Am. Chem. Soc.、86:304 (1964))。

40

【0016】

50

固定動態 (a n c h o r i n g d y n a m i c) に関して、好ましい作業温度は 20 ~ 60 である。より疎水性の残基の場合の固定反応時間は、温度に反比例して変動し、かつ 0.1 時間 ~ 24 時間の間を変動する。

【 0 0 1 7 】

合成段階を、手動ペプチド合成装置において、Fmoc 戦略を用い、固相法により実行した。Fmoc アミノ酸は、Chem Impex International 社 (シカゴ) および他の販売業者から供給された。C 末端カルボン酸生成のために、カップリング試薬として BOP を使用する逐次的 Fmoc 化学が、PL - Wang 樹脂 (Polymer Laboratories 社、カタログ番号 : 1463 - 4799) に適用した。

【 0 0 1 8 】

Fmoc 脱保護は、連続 3 段階において DMF を溶媒とする 20 % ピペリジン溶液により実現した。Fmoc 保護基の主要部分を除去するために、常時窒素相洗浄 (s c r u b b i n g) 下で、第一の 20 % ピリジン溶液を 1 分間使用した。その後この溶液を排液し、別の新鮮な 20 % ピリジン溶液をこの時点で 3 分間導入し、再度排液し、最後に別の 20 % ピリジン溶液を 10 分間導入した。その後このペプチド樹脂を、窒素相洗浄下で、DMF 50 mL により連続 4 回洗浄した。合成が完了した後、樹脂を DMF および DCM で十分洗浄し、その後乾燥した。

【 0 0 1 9 】

側鎖保護基およびペプチド樹脂結合の最終的な切断は、下記の混合物を用いて行った : TFA、エタンジチオール、トリイソプロピルシラン、チオアニオソール、フェノール、水 (92 : 1.66 : 1.66 : 1.66 : 1 : 2)。乾燥したペプチド樹脂 1 g 当り切断カクテル 20 mL の最終濃度で、樹脂からペプチドを切断した。この切断反応は、室温で 2 時間かけて行った。次に TFA カクテル溶液中の遊離ペプチドを、粗いガラス濾板付きロートで濾過した。その後この樹脂を、純粋な TFA で 3 回洗浄した。ペプチド / TFA 混合物を、回転蒸発器において減圧下で蒸発させ、沈殿させ、エーテルで洗浄した後、それを水に溶解し、凍結乾燥し、残留する微量の溶媒および捕捉剤を除去した。

【 0 0 2 0 】

第一の Fmoc - アミノ酸の Wang 樹脂へのカップリング

本発明者らは、4 - アルコキシベンジルアルコールポリスチレン (Wang 樹脂) および DMF を溶媒とする 2 当量の所望の Fmoc - アミノ酸を使用し、かつ両方の生成物を室温で 15 分間の窒素相洗浄下で混合した。その後 3.3 当量のピリジンおよび 2 当量の 2,6 - ジクロロ塩化ベンゾイルを連続添加し、この反応を窒素相洗浄下で 15 ~ 20 時間実行した (Seiber P., Tetrahedron Letters, 28 (49) : 6147 - 6150 (1987))。この反応後、反応容器から排液し、樹脂を窒素相洗浄下で DMF により連続 4 回洗浄した。樹脂の残留ヒドロキシル基を、2 時間かけて DCE (ジクロロエタン) 中の 3 当量の塩化ベンゾルおよびピリジンにより全てベンゾイル化した。

【 0 0 2 1 】

伸長中のペプチド上の各残留アミノ酸のカップリング

下記の Fmoc - アミノ酸の各々について、本発明者らは、3 当量の Fmoc - アミノ酸を、DMF を溶媒とする 3 当量の BOP (ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロリン酸) に溶解し (B. Castro, Tetrahedron Letters, 14 : 1219 (1975))、得られる溶液を反応容器中の樹脂に添加し、窒素相洗浄を開始し、6 当量の DIPEA (ジイソプロピルエチルアミン) を添加し、カップリング反応を開始した。このカップリング混合液を、反応容器中で、60 分間窒素相下で洗浄し、その後、容器から排液し、樹脂を 3 回連続して DMF で洗浄し、かつ定性的ニンヒドリン試験を行い反応が完了したことを確認した。

【 0 0 2 2 】

Fmoc - L - Lys (Alloc) - OH (PerSeptive Biosystem

10

20

30

40

50

s 社、カタログ番号：GEN911209)、Fmoc-L-Glu(OAl)-OH(PerSeptive Biosystems 社、カタログ番号：GEN911207) および Fmoc-L-Asp(OAl)-OH(PerSeptive Biosystems 社、カタログ番号：GEN911205) のカップリングを、先に記した Fmoc-アミノ酸と同じ方法で行った。

【0023】

アリル型基の脱保護

次に、ペプチド樹脂(Xmmol)を、窒素相洗浄下でDCM中に導入し、10分後、この混合液にPdCl₂(PPh₃)₂(Xmmol×0.05/0.05当量)(パラジウム(II)ビス-トリフェニルホスフィン)を添加した(Burger H., Kilion W., J. Organometallics, 18:299(1969))。次に、(CH₃CH₂CH₂)₃SnH(Xmmol×6/6当量)(トリブチル水素化スズ)をDCM中に希釈し、前記ペプチド樹脂懸濁液に、添加漏斗(addition funnel)を用い30分間かけて滴下した。この反応を、更に10分間継続し、その後容器を切断混合物から排液させ、その直後にDCMで4回およびDMFで4回洗浄した(Dangles O., Guibe F., Balavoine G., Lavieille S., Marquet A., J. Org. Chem., 52:4984(1987))。

10

【0024】

高次構造的に強固な酸およびアルキルアミドのカップリング

20

高次構造的に強固な酸およびアミンのペプチド樹脂の側鎖へのカップリングは、本発明者らがこれらの側鎖の修飾のために3当量ではなく10当量の強固な部分およびカップリング試薬を使用したこと以外は、Fmoc-アミノ酸の場合と同じ条件下で行われた。

【0025】

本発明は、特定のペプチド配列に限定されるものではない。好ましいペプチド配列R¹は、治療的特性を伴うもの、更にはそれらの機能的誘導体または断片である。本発明に従い使用することができるこのようなペプチドの治療的特性は、骨粗鬆症、閉経後骨粗鬆症および骨沈着を含む骨疾患の治療、癌治療、血糖値の調節、II型糖尿病、腸疾患患者における粘膜再生を増大するための治療、炎症反応に関連した疾患の治療、肥満症の治療、自閉症および広汎性発達障害の治療、過増殖性の皮膚病態、加齢、末梢血単核細胞増殖の変化、子宮筋収縮およびプロスタグランジン放出の調節、ACTH放出の刺激、インターロイキン-8産生の阻害、酸放出の刺激、腸疾患患者における粘膜調節の増大、ホルモン依存型癌のようなホルモン依存型疾患および病態の治療、メラニン細胞の情報伝達過程の調節、圧力および容量のホメオスタシス関連、外分泌および内分泌、平滑筋収縮、摂食、血圧、血糖値、体温並びに細胞増殖の調節、食物摂取およびエネルギーバランスの調節、癌細胞増殖の阻害、腓分泌の刺激、または細胞増殖の刺激を含むが、これらに限定されるものではない。

30

【0026】

成長ホルモン放出因子(GRF)：

Xaa₁-Xaa₂-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Xaa₈-Ser-Tyr-Arg-Lys-Xaa₁₃-Leu-Xaa₁₅-Gln-Leu-

40

Xaa₁₈-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Ile-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-

Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂

式中、Xaa₁は、TyrまたはHisであり；

Xaa₂は、ValまたはAlaであり；

Xaa₈は、AsnまたはSerであり；

Xaa₁₃は、ValまたはIleであり；

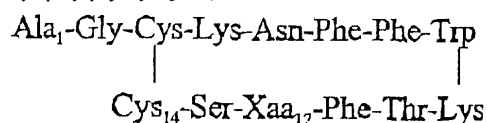
Xaa₁₅は、AlaまたはGlyであり；

50

X a a_{1 8} は、S e r または T y r であり ;
 X a a_{2 4} は、G l n または H i s であり ;
 X a a_{2 5} は、A s p または G l u であり ;
 X a a_{2 7} は、M e t、I l e または N l e であり ; かつ
 X a a_{2 8} は、S e r または A s n である。

【 0 0 2 7 】

ソマトスタチン :

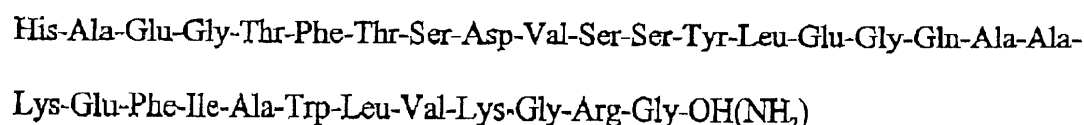


10

式中、X a a_{1 2} は、T y r または S e r である。

【 0 0 2 8 】

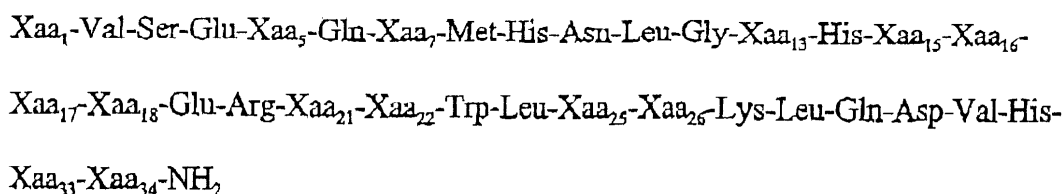
グルカゴン様ペプチド 1 (7 - 3 7) , (アミドヒト (h G L P - 1)) :



【 0 0 2 9 】

副甲状腺ホルモン断片 (P T H 1 - 3 4) :

20



式中、X a a₁ は、S e r または A l a であり ;

X a a₅ は、I l e または M e t であり ;

X a a₇ は、L e u または P h e であり ;

X a a_{1 3} は、L y s または G l u であり ;

30

X a a_{1 5} は、L e u または A r g であり ;

X a a_{1 6} は、A s n または A l a または S e r または H i s であり ;

X a a_{1 7} は、S e r または T h r であり ;

X a a_{1 8} は、M e t または V a l または L e u であり ;

X a a_{2 1} は、V a l または m e t または G l n であり ;

X a a_{2 2} は、G l u または G l n または A s p であり ;

X a a_{2 5} は、A r g または G l n であり ;

X a a_{2 6} は、L y s または M e t であり ;

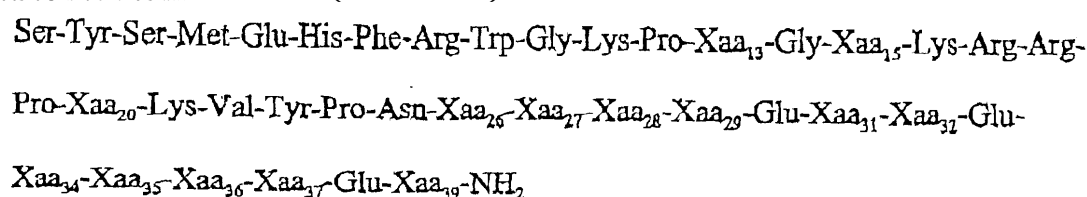
X a a_{3 3} は、A s n または S e r であり ; かつ

X a a_{3 4} は、P h e または A l a である。

40

【 0 0 3 0 】

副腎皮質刺激ホルモン (A C T H) :



式中、X a a_{1 3} は、V a l または M e t であり ;

X a a_{1 5} は、L y s または A r g であり ;

50

Xaa_{20} は、Val または Ile であり ;
 Xaa_{26} は、Gly または Ser であり ;
 Xaa_{27} は、Ala または Phe または Val であり ;
 Xaa_{28} は、Glu または Gln であり ;
 Xaa_{29} は、Asp または Asn または Glu であり ;
 Xaa_{31} は、Ser または Thr であり ;
 Xaa_{32} は、Ala または Val または Ser であり ;
 Xaa_{34} は、Ala または Asn または Gly であり ;
 Xaa_{35} は、Phe または Met であり ;
 Xaa_{36} は、Pro または Gly であり ;
 Xaa_{37} は、Leu または Val または Pro であり ; かつ
 Xaa_{39} は、Phe または Val または Leu である。

10

【0031】

オステオカルシン :

Tyr-Leu- Xaa_{32} - Xaa_{53} - Xaa_{54} -Leu-Gly-Ala-Pro- Xaa_{59} -Pro-Tyr-Pro-Asp-Pro-Leu-Glu-

Pro- Xaa_{68} -Arg-Glu-Val-Cys-Glu-Leu-Asn-Pro- Xaa_{77} -Cys-Asp-Glu-Leu-Ala-Asp-

His-Ile-Gly-Phe-Gln- Xaa_{89} -Ala-Tyr- Xaa_{92} -Arg- Xaa_{94} -Tyr-Gly- Xaa_{97} -Val-NH₂

20

式中、 Xaa_{52} は、Tyr または Asp または Asn であり ;
 Xaa_{53} は、Gln または His または Asn であり ;
 Xaa_{54} は、Trp または Gly であり ;
 Xaa_{59} は、Val または Ala であり ;
 Xaa_{68} は、Arg または Lys または His であり ;
 Xaa_{77} は、Asp または Asn であり ;
 Xaa_{89} は、Glu または Asp であり ;
 Xaa_{92} は、Arg または Lys であり ;
 Xaa_{94} は、Phe または Ile であり ; かつ
 Xaa_{97} は、Pro または Thr である。

30

【0032】

カルシトニン :

Cys- Xaa_{86} - Xaa_{87} -Leu-Ser-Thr-Cys- Xaa_{92} -Leu-Gly- Xaa_{95} - Xaa_{96} - Xaa_{97} - Xaa_{98} - Xaa_{99} -

Xaa_{100} - Xaa_{101} - Xaa_{102} - Xaa_{103} - Xaa_{104} -Thr- Xaa_{106} - Xaa_{107} - Xaa_{108} - Xaa_{109} - Xaa_{110} - Xaa_{111} -

Gly- Xaa_{113} - Xaa_{114} - Xaa_{115} -Pro-NH₂

式中、 Xaa_{86} は、Gly または Ser または Ala であり ;
 Xaa_{87} は、Asn または Ser であり ;
 Xaa_{92} は、Met または Val であり ;
 Xaa_{95} は、Thr または Lys であり ;
 Xaa_{96} は、Tyr または Leu であり ;
 Xaa_{97} は、Thr または Ser であり ;
 Xaa_{98} は、Gln または Lys であり ;
 Xaa_{99} は、Asp または Glu であり ;
 Xaa_{100} は、Phe または Leu であり ;
 Xaa_{101} は、Asn または His であり ;
 Xaa_{102} は、Lys または Asn であり ;
 Xaa_{103} は、Phe または Leu であり ;

40

50

Xaa_{104} は、His または Gln であり ;
 Xaa_{106} は、Phe または Tyr であり ;
 Xaa_{107} は、Pro または Ser であり ;
 Xaa_{108} は、Gln または Gly または Arg であり ;
 Xaa_{109} は、Thr または Ile であり ;
 Xaa_{110} は、Ala または Gly または Ser または Asp または Asn であり ;
 Xaa_{111} は、Ile または Phe または Val または Thr であり ;
 Xaa_{113} は、Val または Ala または Ser であり ;
 Xaa_{114} は、Gly または Glu であり ; かつ
 Xaa_{115} は、Ala または Thr である。

10

【0033】

コルチコトロピン放出因子 :

Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-
 Glu-Met-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-
 Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH₂

式中、 Xaa_{101} は、Ala または Pro であり ; かつ
 Xaa_{102} は、Arg または Gly である。

20

【0034】

ダイノルフィン A :

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH

【0035】

- エンドルフィン :

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Xaa₂₄₃-Glu-Xaa₂₄₅-Ser-Glu-Thr-Pro-Leu-Xaa₂₅₁-Thr-
 Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Xaa₂₅₉-Lys-Asn-Xaa₂₆₂-Xaa₂₆₃-Lys-Lys-Gly-Xaa₂₆₇-OH

30

式中、 Xaa_{243} は、Ser または Pro であり ;
 Xaa_{245} は、Lys または Arg であり ;
 Xaa_{251} は、Val または Met であり ;
 Xaa_{259} は、Ile または Val であり ;
 Xaa_{262} は、Ala または Thr または Ser または Val であり ;
 Xaa_{263} は、Tyr または His であり ; かつ
 Xaa_{267} は、Glu または Leu または Gln または His である。

【0036】

ビッグガストリン - 1 :

pXaa₅₉-Leu-Gly-Xaa₆₂-Gln-Xaa₆₄-Xaa₆₅-Xaa₆₆-Xaa₆₇-Xaa₆₈-Xaa₆₉-Ala-Asp-Xaa₇₂-
 Xaa₇₃-Lys-Lys-Xaa₇₆-Xaa₇₇-Pro-Xaa₇₉-Xaa₈₀-Glu-Xaa₈₂-Glu-Glu-Xaa₈₅-Ala-Tyr-Gly-
 Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

40

式中、 Xaa_{59} は、Glu または Gln であり ;
 Xaa_{62} は、Pro または Leu であり ;
 Xaa_{64} は、Gly または Asp であり ;
 Xaa_{65} は、Pro または Ser であり ;
 Xaa_{66} は、Pro または Gln であり ;

50

Xaa_{67} は、His または Gln であり ;
 Xaa_{68} は、Leu または Met または Phe または Gln であり ;
 Xaa_{69} は、Val または Ile であり ;
 Xaa_{72} は、Pro または Leu であり ;
 Xaa_{73} は、Ser または Ala であり ;
 Xaa_{76} は、Gln または Glu であり ;
 Xaa_{77} は、Gly または Arg であり ;
 Xaa_{79} は、Trp または Pro または Arg であり ;
 Xaa_{80} は、Leu または Val または Met であり ;
 Xaa_{82} は、Glu または Lys であり ; かつ
 Xaa_{85} は、Glu または Ala である。

10

【0037】

GLP - 2 :

His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe- Xaa_{162} - Xaa_{153} - Xaa_{154} - Xaa_{155} - Xaa_{156} - Xaa_{157} - Xaa_{158} -Leu-Asp-

Xaa_{161} - Xaa_{162} -Ala- Xaa_{164} - Xaa_{165} - Xaa_{166} -Phe- Xaa_{168} - Xaa_{169} -Trp- Xaa_{171} - Xaa_{172} - Xaa_{173} -

Thr- Xaa_{175} - Xaa_{176} - Xaa_{177} - Xaa_{178}

式中、 Xaa_{152} は、Ser または Thr であり ;

20

Xaa_{153} は、Asp または Ser であり ;
 Xaa_{154} は、Glu または Asp であり ;
 Xaa_{155} は、Met または Phe であり ;
 Xaa_{156} は、Asn または Ser であり ;
 Xaa_{157} は、Thr または Lys であり ;
 Xaa_{158} は、Ile または Val または Ala であり ;
 Xaa_{161} は、Asn または Ile または His または Ser であり ;
 Xaa_{162} は、Leu または Lys であり ;
 Xaa_{164} は、Ala または Thr であり ;
 Xaa_{165} は、Arg または Gln または Lys であり ;
 Xaa_{166} は、Asp または Glu であり ;
 Xaa_{168} は、Ile または Leu であり ;
 Xaa_{169} は、Asn または Asp であり ;
 Xaa_{171} は、Leu または Ile であり ;
 Xaa_{172} は、Ile または Leu であり ;
 Xaa_{173} は、Gln または Asn または His であり ;
 Xaa_{175} は、Lys または Pro であり ;
 Xaa_{176} は、Ile または Val であり ;
 Xaa_{177} は、Thr または Lys であり ; かつ
 Xaa_{178} は、Asp または Glu である。

30

40

【0038】

黄体形成ホルモン放出ホルモン :

Xaa_1 -His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-OH

式中、 Xaa_1 は、pGlu、5-oxoPro または Gln である。

【0039】

メラニン細胞刺激ホルモン (MSH) :

Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

【0040】

50

心房性ナトリウム利尿ペプチド：

H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Xaa₁₃₅-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-

Gln-Ser-Xaa₁₄₂-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH

式中、X a a_{1 3 5} は、M e t または I l e であり；かつ

X a a_{1 4 2} は、G l y または S e r である。

【 0 0 4 1 】

ニューロメジン B：

H-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂

10

【 0 0 4 2 】

ヒトニューロペプチド Y：

H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-asp-Met-Ala-

Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂

【 0 0 4 3 】

ヒトオレキシン A：

pGlu-Pro-Leu-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-Leu-Tyr-Glu-

20

Leu-Leu-His-Gly-Ala-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu-NH₂

【 0 0 4 4 】

ヒトペプチド Y Y：

H-Tyr-Pro-Ile-Lys-Pro-Glu-Ala-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-Glu-Leu-Asn-

Arg-Tyr-Tyr-Ala-Ser-Leu-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-

NH₂

30

【 0 0 4 5 】

ヒトセクレチン：

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-

Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

【 0 0 4 6 】

血管作動性腸管ペプチド (V I P)：

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-

Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

40

【 0 0 4 7 】

下記の抗生物質系ペプチド：

マガイニン 1：

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-

Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser

【 0 0 4 8 】

マガニン 2 :

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-

Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser

10

【 0 0 4 9 】

セクロピン A :

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-

Ala-Lys

【 0 0 5 0 】

セクロピン B :

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-

20

Gly-Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-

Leu.

【 0 0 5 1 】

サブスタンス P (S P) :

Arg-Pro-Leu-Pro-Gln-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-アミド

【 0 0 5 2 】

カソモルフィン - 5 :

T y r - P r o - P h e - P r o - G l y

【 0 0 5 3 】

エンドモルフィン - 2 :

T y r - P r o - P h e - P h e - N H 2

【 0 0 5 4 】

プロコリパーゼ :

100 aa ペプチド (X1-Pro-X2-Pro-Arg....)

30

【 0 0 5 5 】

エンテロスタチン :

V a l - P r o - A s p - P r o - A r g

【 0 0 5 6 】

ガストリン阻害ペプチド :

40

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala- Met-Asp-Lys-Ile-His-
 Gln-Gln-Asp-Phe- Val-Asn-Trp-Leu- Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-
 Trp-Lys-His-Asn- Ile-Thr-Gln

【 0 0 5 7 】

クロモグラニン A

バソスタチン I

バソスタチン I I :

10

Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met Lys Cys Ile
 Val Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met Pro Val Ser Gln Glu
 Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn
 Leu Leu Lys Glu Leu Gln Asp Leu Ala Leu Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His
 Gln Gln Lys Lys His Ser Gly Phe Glu Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn
 Gln Ser Ser Gln Ala Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val
 Met Glu

20

【 0 0 5 8 】

プロカルシトニン

P r o N C T

P r o C G R P

【 0 0 5 9 】

ケモカインファミリー :

30

CXC 群:**IL8(单球由来):**

SerAlaLysGluLeuArgCysGlnCys...

GCP-2:

GlyProValSerAlaValLeuThrGluLeuArgCysThrCys...

PF4:

GluAlaGluGluAspGlyAspLeuGlnCysLeuCys...

IP-10:

ValProLeuSerArgThrValArgCCysThrCys...

MIG:

ThrProValValArgLysGlyArgCysSerCys...

SDF-1 α :

LysProValSerLeuSerTyrArgCysProCys...

GRO- α :

AlaProLeuAlaThrGluLeuArgCysGlnCys...

10

20

I-TAC:

PheProMetPheLysLysGlyArgCysLeuCys...

CC 群:**RANTES:**

SerProTyrSerSerAspThrThrProCys...

LD78:

10

AlaProLeuAlaAlaAspThrProThrAlaCys...

MIP-1 α :

AlaProMetGlySerAspProProThrAlaCys...

MCP-1:

GlnProAspAlaIleAsnAlaProValThrCys...

20

MCP-2:

GlnProSerAspValSerIleProIleThrCys...

MCP-3:

GlnProValGlyIleTAsnSeerThrThrCys...

MCP-4:

GlnProAspAlaLeuAspValProSerThrCys...

30

Eotaxin:

GlyProAlaSerValProThrThrCys...

MDC:

GlyProTyrGlyAlaAsnMetGluAspSerValCys...

ならびにそれらの機能的誘導体または断片。

40

【0060】

先に列挙した配列の完全な定義は、特に、メントレイン (Mentlein), R (1999) Regul. Pept., 85: 9-24 およびデメスター (De Meester), I. ら (2000) Adv Exp Med Biol., 477: 67-87 において公知である。これらの論文は、本出願に参照として組入れられている。

【0061】

より好ましい態様において、ペプチドは、1つまたは複数の高次構造的に強固な部分により置換されている。高次構造的に強固な部分の構造は、二重結合、三重結合または飽和型もしくは不飽和型の環を持つ構造を含むことが好ましい。

【0062】

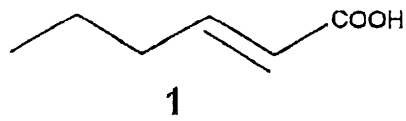
50

以下は、本発明の目的に適した、式 1 ~ 式 63 として同定された、好ましい高次構造的に強固な部分の式の簡単な一覧である。

【 0 0 6 3 】

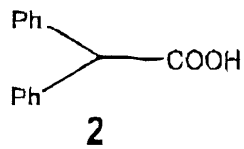
本発明による好ましい修飾ペプチドの中の、天然ペプチド配列であるペプチド配列を示す。

【 化 5 】

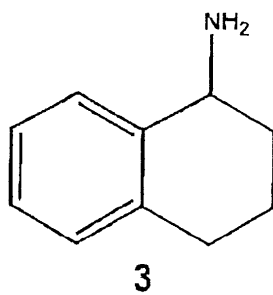


10

【 化 6 】

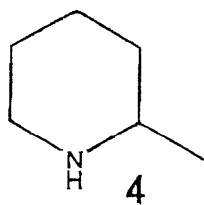


【 化 7 】



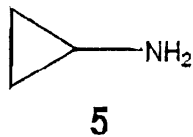
20

【 化 8 】

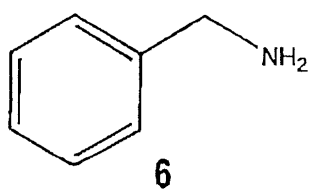


30

【 化 9 】

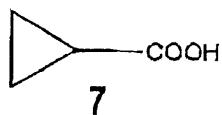


【 化 1 0 】



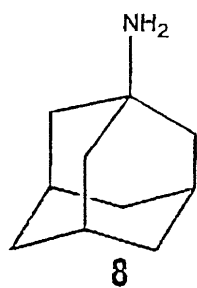
40

【 化 1 1 】

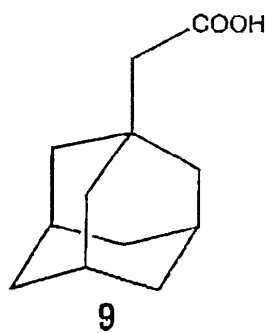


【 化 1 2 】

50

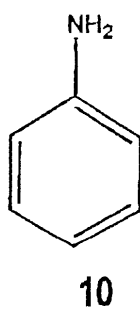


【化 1 3】



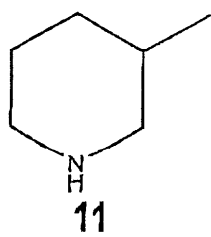
10

【化 1 4】



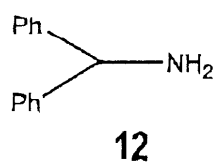
20

【化 1 5】



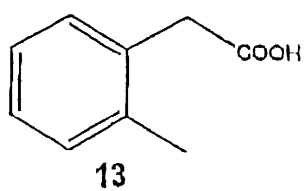
30

【化 1 6】



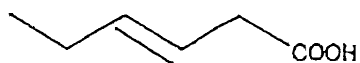
40

【化 1 7】

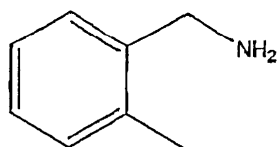


【化 1 8】

50

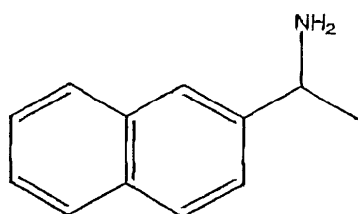
**14**

【化 1 9】

**15**

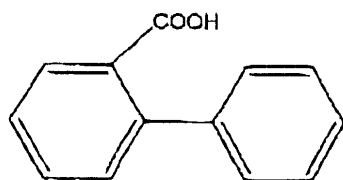
10

【化 2 0】

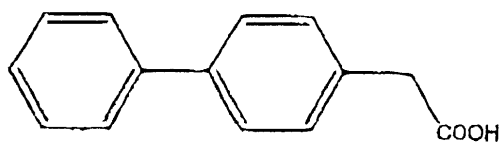
**16**

20

【化 2 1】

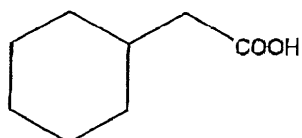
**17**

【化 2 2】

**18**

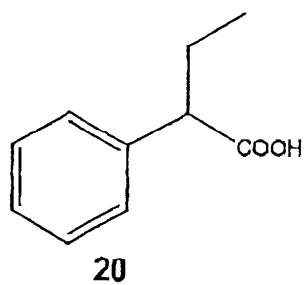
30

【化 2 3】

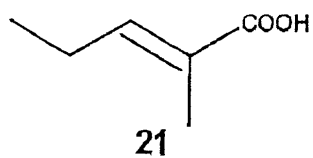
**19**

40

【化 2 4】

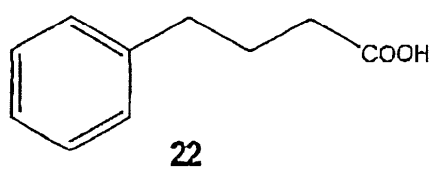


【化 2 5】



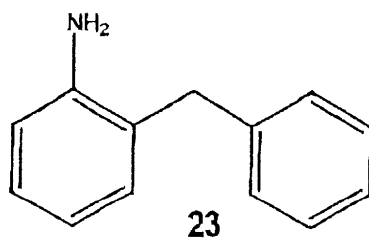
10

【化 2 6】

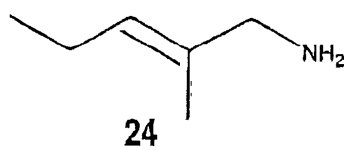


20

【化 2 7】

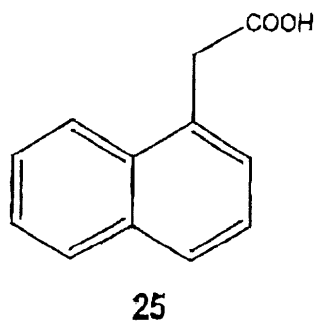


【化 2 8】



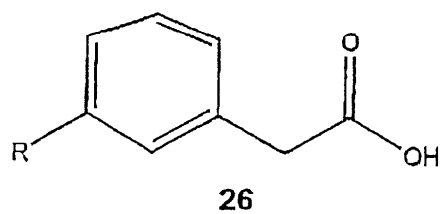
30

【化 2 9】

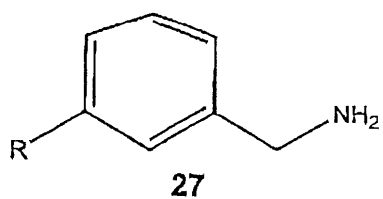


40

【化 3 0】

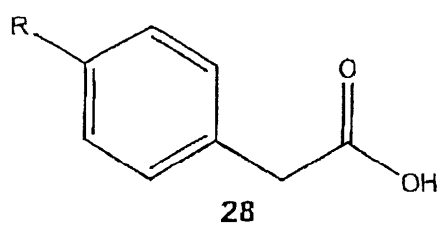


【化 3 1】



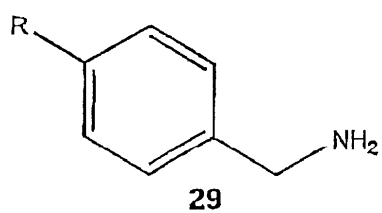
10

【化 3 2】

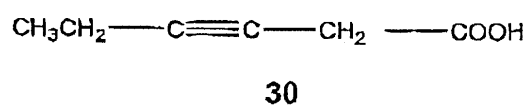


20

【化 3 3】

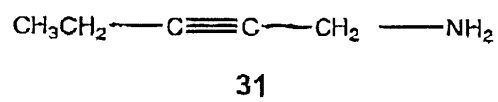


【化 3 4】

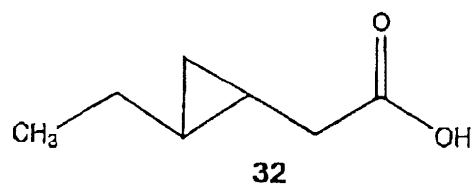


30

【化 3 5】

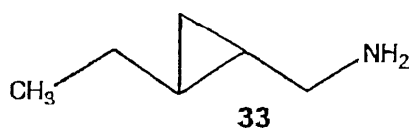


【化 3 6】

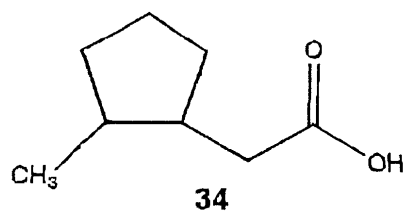


40

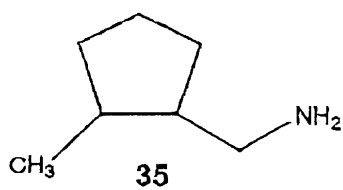
【化 3 7】



【化 3 8】

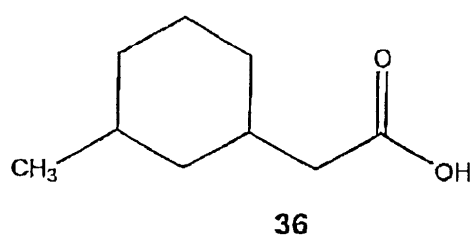


【化 3 9】



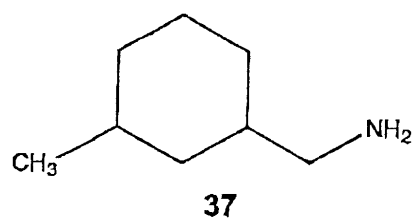
10

【化 4 0】

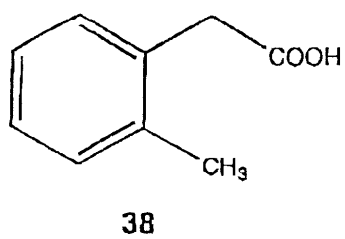


20

【化 4 1】

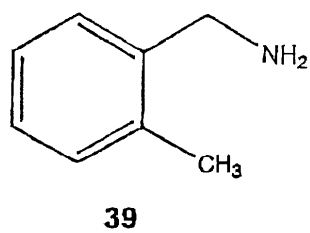


【化 4 2】



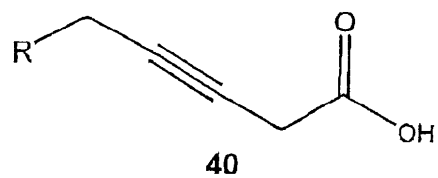
30

【化 4 3】

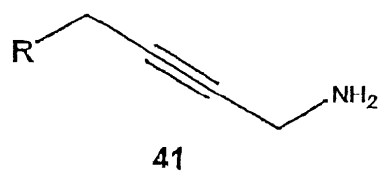


40

【化 4 4】

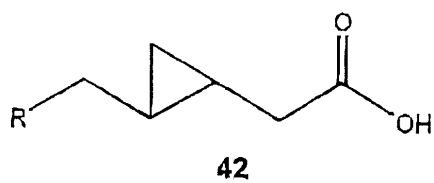


【化 4 5】

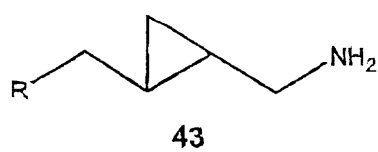


10

【化 4 6】

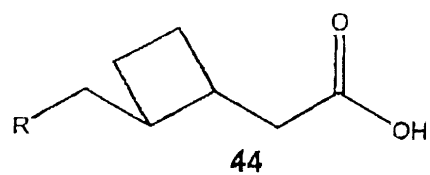


【化 4 7】



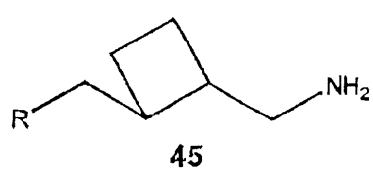
20

【化 4 8】

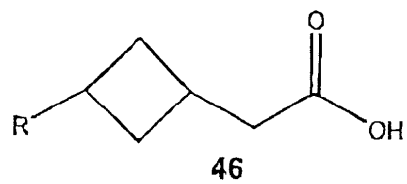


30

【化 4 9】

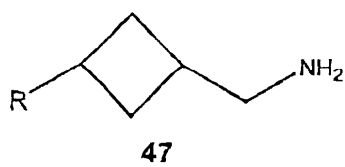


【化 5 0】

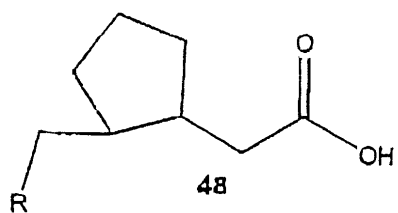


40

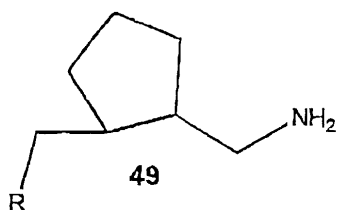
【化 5 1】



【化 5 2】

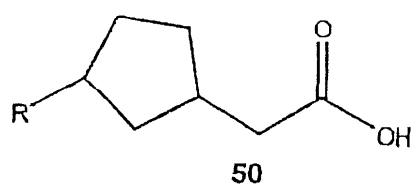


【化 5 3】



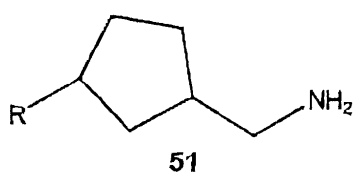
10

【化 5 4】

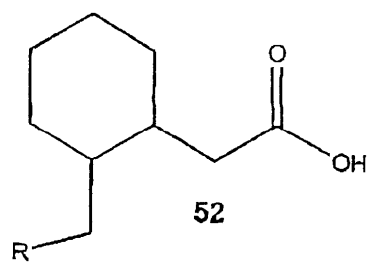


【化 5 5】

20

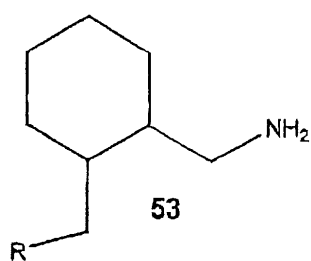


【化 5 6】



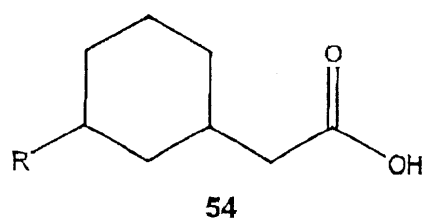
30

【化 5 7】



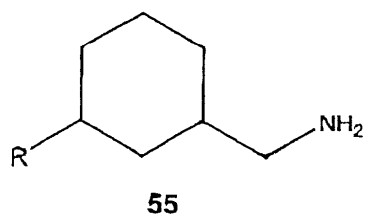
40

【化 5 8】

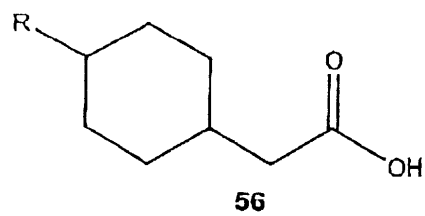


50

【化 5 9】

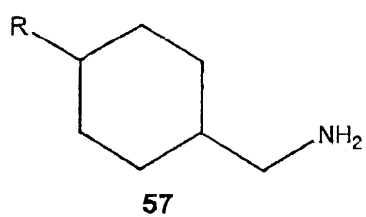


【化 6 0】



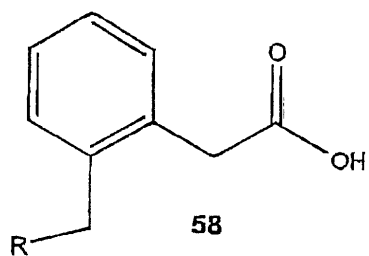
10

【化 6 1】



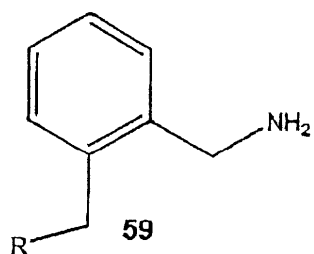
20

【化 6 2】



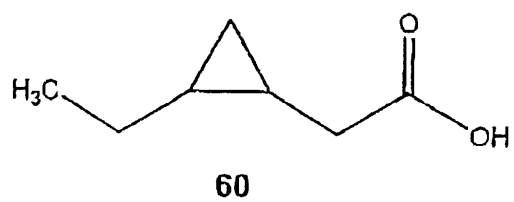
30

【化 6 3】

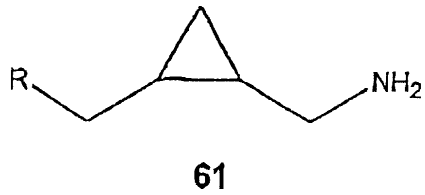


40

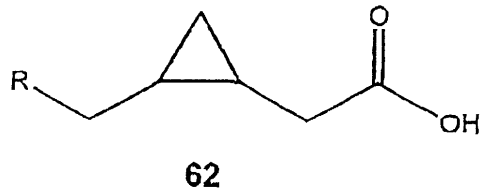
【化 6 4】



【化 6 5】

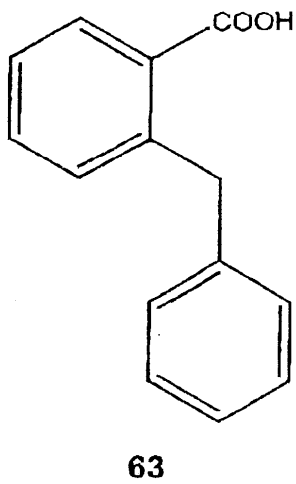


【化 6 6】



10

【化 6 7】



20

(式中、Rは、水素、 CH_3 、または CH_2CH_3 である。)。

【 0 0 6 4】

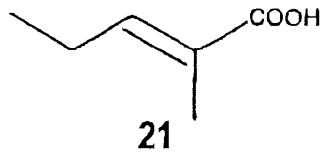
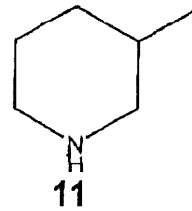
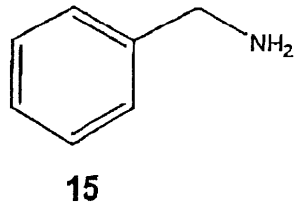
30

本発明の好ましい態様は、以下のペプチドにより構成され、ここでペプチド配列はソマトスタチンであり、かつ少なくとも1つの高次構造的に強固な部分が、異なる位置においてアミド結合を介して該ソマトスタチンペプチド配列へカップリングされる。

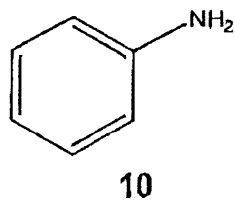
【化 6 8】

位置

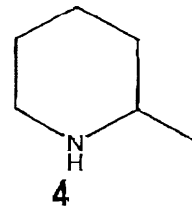
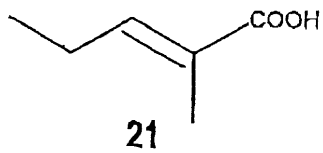
高次構造的に強固な部分

Ala₁Asp₅

10

Cys₁₄

20

Ala₁+Cys₁₄

30

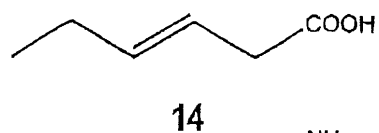
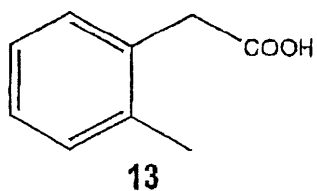
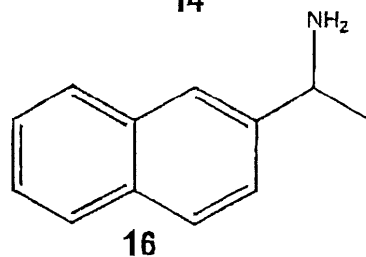
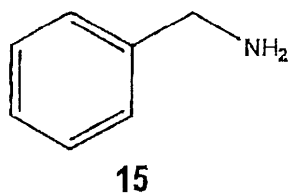
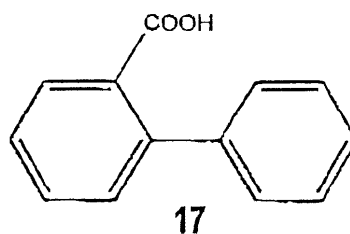
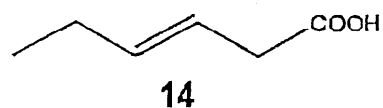
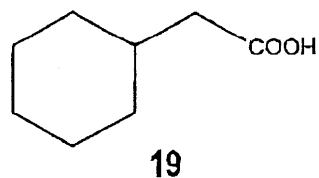
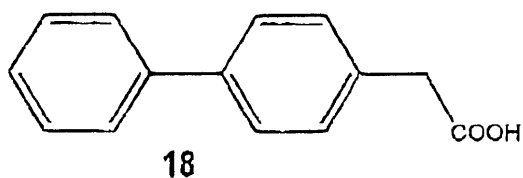
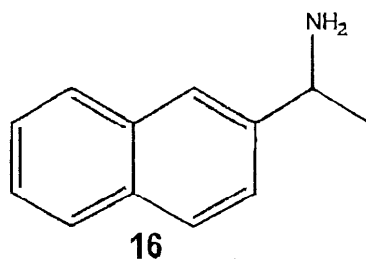
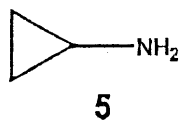
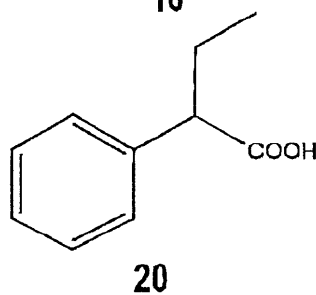
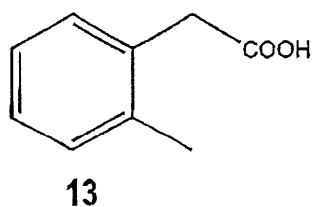
【 0 0 6 5 】

本発明の別の好ましい態様は、以下のペプチドにより構成され、ここでペプチド配列は P T H 1 - 3 4 であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、異なる位置においてアミド結合を介して該 P T H 1 - 3 4 ペプチド配列へカップリングされる。

【 化 6 9 】

位置

高次構造的に強固な部分

Ser₁Glu₄Lys₂₆Lys₂₇Asp₃₀Ser₁+Lys₂₇

10

20

30

40

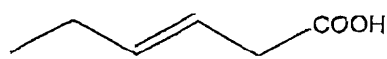
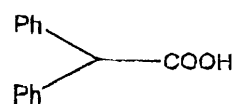
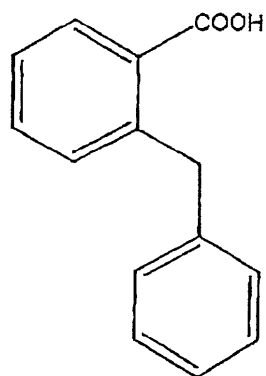
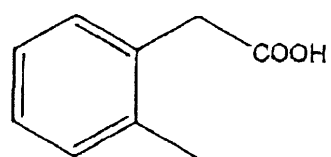
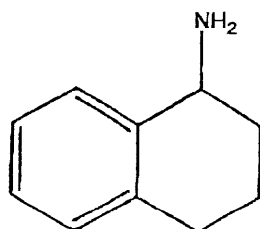
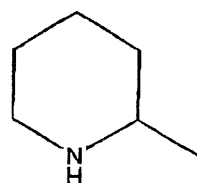
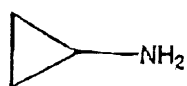
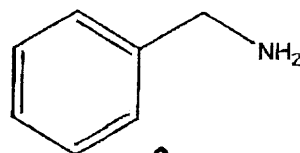
【 0 0 6 6 】

本発明の更に好ましい態様は、以下のペプチドにより構成され、ここでペプチド配列が G L P - 1 であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、異なる位置においてアミド結合を介して該 G L P - 1 ペプチド配列へカップリングされる。

【 化 7 0 】

位置

高次構造的に強固な部分

His₁**14****2****60****63****13****Glu₃****3****4****Asp₉****5****6**

10

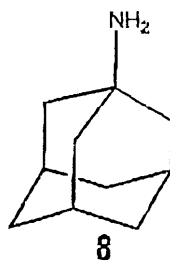
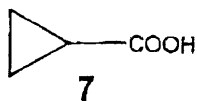
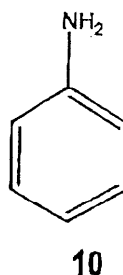
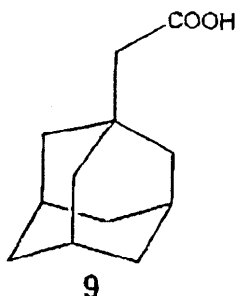
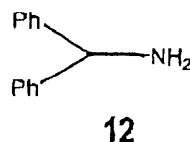
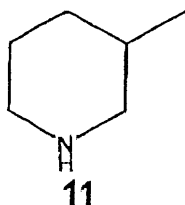
20

30

40

位置

高次構造的に強固な部分

His₁ + Glu₃His₁ + Asp₉Glu₃ + Asp₉

10

20

【 0 0 6 7 】

また、本発明による修飾ペプチドの中では、以下のようなペプチドが好ましい：

ペプチド配列が G L P - 2 であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該 G L P - 2 ペプチド配列へカップリングされる；

30

ペプチド配列がエンテロスタチンであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合を介して該エンテロスタチンペプチド配列へカップリングされる；

ペプチド配列が N P Y であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該 N P Y ペプチド配列へカップリングされる；

ペプチド配列が N P Y Y であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該 N P Y Y ペプチド配列へカップリングされる；

40

ペプチド配列がセクレチンであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該セクレチンペプチド配列へカップリングされる；

ペプチド配列が血管作動性腸管ペプチドであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該血管作動性腸管ペプチド配列へカップリングされる；

ペプチド配列がガストリン阻害ペプチドであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該ガストリン阻害ペプチド配列へカップリングされる；

50

ペプチド配列がバソスタチン I I であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該バソスタチン I I ペプチド配列へカップリングされる；

ペプチド配列が R A N T E S であり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該 R A N T E S ペプチド配列へカップリングされる；

ペプチド配列がエオタキシンであり、かつ少なくとも 1 つの高次構造的に強固な部分が、ペプチド配列の異なる位置においてアミド結合またはエステル結合を介して該エオタキシンペプチド配列へカップリングされる。

【0068】

本発明の修飾ペプチドにおいて、高次構造的に強固な部分は、好ましくは N 末端においてアミド結合を介して該ペプチド配列へカップリングされる。

【0069】

高次構造的に強固な部分が本明細書において式 60 と記載されたような、本発明による修飾ペプチドが、特に関心対象となる。

【0070】

本発明の修飾ペプチドを、例えば静脈内、皮下、皮内、経皮的、腹腔内、経口または局所的など、様々な方法で投与することができる。また本発明の修飾ペプチドを、粉末の形状またはエアゾールの形状である場合には、吸入により投与することもできる。更に、本発明の修飾ペプチドの送達のための薬学的に許容できる担体は、リポソーム、ナノソーム、貼付剤、移植片または任意の送達装置を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0071】

各々、ペプチドの C 末端および N 末端に存在するカルボキシ基およびアミノ基に加え、ペプチド鎖上のその他のカルボキシ部位およびアミノ部位を利用することができる。例えば、ペプチド鎖がアスパラギン酸およびグルタミン酸のようなカルボン酸側鎖を備えたアミノ酸を含む場合、これによりその鎖上の追加のカルボキシ部位を、アミド化に利用できるでと考えられる。ペプチド鎖が、アスパラギンおよびグルタミンのようなカルボキシアミド側鎖を伴うアミノ酸を含むならば、これらに対応するアスパラギン酸およびグルタミン酸により合成的に接続される (access) という条件下で、これらはまた高次構造的に強固な部分によるアミド化のための追加のカルボキシ基を提供する。更に、ペプチドがアルギニン、ヒスチジンまたはリシンのような塩基性側鎖を備えたアミノ酸を含むならば、追加のアミノ部位は、高次構造的に強固な部分によるアミド化のための鎖上で利用可能であると考えられる。ペプチド鎖は、酸性および塩基性のアミノ酸を両方含むことができ、このことは、高次構造的に強固な置換基は、N 末端、C 末端、ペプチド鎖上のカルボキシ部位、ペプチド鎖上のアミノ部位、またはこれらのうち複数の部位で、ペプチド鎖へカップリングされうることを意味している。

【0072】

本発明は、下記の実施例を参照することによりより容易に理解されることが考えられるが、これらは本発明の例示のために提供されるものであり、その範囲を限定するものではない。

【0073】

実施例 1

GLP - 1 類似体の合成

本発明に従い、下記のように、少なくとも 1 つの下記の高次構造的に強固な部分を、異なる位置においてアミド結合を介して GLP - 1 ペプチド配列へカップリングした。

【化 72】

10

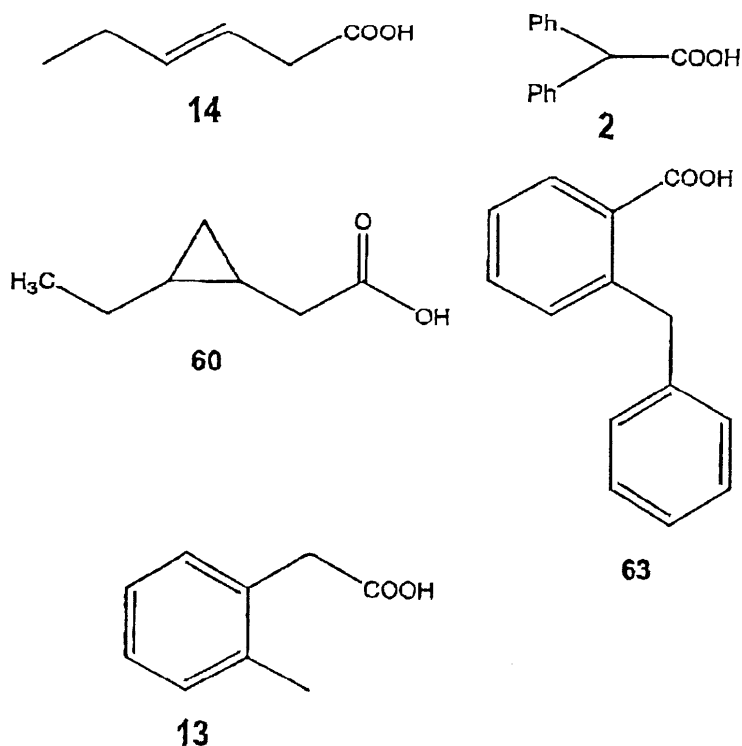
20

30

40

位置

高次構造的に強固な部分

His₁

10

20

【0074】

hGLP-1 (7-37) 類似体の合成

アミノ末端で強固な疎水性部分により修飾された hGLP-1 (7-37) 誘導体を、Symphony 装置 (Rainin Instrument 社) 上で、Fmoc 化学を用いて合成した (1)。Fmoc-Gly-Wang 樹脂 (0.70 mmol/g) および 5 当量の試薬 (100 μm スケール、アミノ酸濃度 200 mM) を、カップリング時間 (time coupling) 30 分間で使用した。反応を、Kaiser 試験によりモニタリングした。hGLP-1 (7-37) の N 末端に導入された 3 つの高次構造的に強固な部分は、以下の通りである：

30

ペプチド # 1 = (O-トリル酢酸-His⁷) - hGLP-1 (7-37) [O-トリル酢酸 (13) (10 当量 / カップリング; カップリング時間 45 分間) ;

ペプチド # 2 = ((+, -) - cis-2-エチルシクロプロピル酢酸-His⁷) - hGLP-1 (7-37) [(+, -) - cis-2-エチルシクロプロピル酢酸 (60) (7.5 当量 / カップリング; カップリング時間 60 分間)]。

【0075】

ペプチドを、TFA カクテル (92% TFA、2% エタンジチオール、2% チオアニソール、2% トリイソプロピルシラン、2% 水、2% (w/v) フェノール) を用い、2 時間かけて切断した。全ての類似体を、逆相 HPLC で精製した。これらを、分析的 HPLC および MS (MALDI-TOF) により分析した。

40

【0076】

GLP-1 類似体の合成は、当業者に周知であり、かつ更に一般的参考文献である「Fmoc 固相ペプチド合成：実践法 (Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach)」Chan, W. C. および White, P. D. (2000) Oxford University Press 社、ニューヨーク、USA の 346 頁に例示されており、これは本明細書に参照として組入れられている。

【0077】

50

G L P - 1 類似体の生物学的評価

材料および方法

経口耐糖能試験 (O G T T)

6 週齢のメス C D 1 マウス (C h a r l e s R i v e r 社) を、少なくとも 16 時間絶食させた。マウスに、体重 1 g 当り 1 . 5 m g のグルコースを水に溶かし、胃への挿管栄養補給により、 $t = 0$ 分時点にて経口投与し、かつ $t = 0$ 分、10 分、20 分、30 分、60 分、90 分および 120 分に、尾静脈から採血し、糖測定器 (g l u c o s e m e t e r) (L i f e s c a n 社) を用い血糖値を測定した。ペプチドまたは溶媒を、グルコース投与の 5 分前に皮下注射した。データを、台形則を用い、各時点における血糖値の変化 () から算出した曲線下面積として示した。従って、データは、グルコース投与後 120 分間にわたる血糖値の積分された増加を表している。示されたデータを、1 群につき 4 匹 ~ 11 匹の動物の平均 \pm S E M で表した。

10

【0078】

被験物質

野生型 G L P - 1 (7 - 37) を含む全てのペプチドを、下記の 3 種の異なる濃度において、O G T T 試験で試験した：マウス一匹あたり 1 μ g、5 μ g、および 10 μ g。最初の実験セット (試験 A) においては、ペプチド 3 を、溶媒および h G L P - 1 (7 - 37) と比較試験した。第二の実験セット (試験 B) においては、ペプチド 1 および 2 を、溶媒および h G L P - 1 (7 - 37) と比較試験した。

20

野生型 G L P 1 : h G L P (7 - 37)

ペプチド # 1 : (O - トリル酢酸 - H i s ⁷) - h G L P - 1 (7 - 37)

ペプチド # 2 : ((+ , -) - c i s - 2 - エチルシクロプロピル酢酸 - H i s ⁷) - h G L P - 1 (7 - 37)

ペプチド # 3 : (ヘキセノイル - t r a n s - 3 - H i s ⁷) - h G L P - 1 (7 - 37)

【0079】

結果および結論

結果を、図 1 (試験 A) および図 2 (試験 B) に示した。

【0080】

試験 A および B において、溶媒の投与により、グルコースレベルについて同様の積分 (i n t e g r a t e d) 反応が生じ (試験 A : 380 ± 57 対 試験 B : 309 ± 68 m M \times 120 分)、これは本方法論の正当性および再現性を示している。野生型 G L P - 1 は、グルコース反応における用量関連性減少を誘導したが、このペプチドは、いずれの用量においても、グルコース反応を完全に抑制することはできず、これは、その臨床的有用性の可能性の限界として解釈される。対照的に、ペプチド 3 (試験 A、図 1) は、10 μ g 用量においてのみ (9 ± 26 m M \times 120 分間)、グルコース反応を完全になくすことができた。驚くべきことに、ペプチド 2 (試験 B、図 2) はペプチド 3 よりも更により強力であり、5 μ g および 10 μ g の両用量においてグルコース反応を全般的に妨害することができる (5μ g : -17 ± 67 m M \times 120 分間 ; 10 μ g : 61 ± 64 m M \times 120 分間)。結論として、ペプチド 2 に相当する G L P - 1 類似体は、野生型 G L P - 1 (7 - 37) よりも顕著に増大した生物学的効力を伴うことが同定され、この効力の増大により、このペプチドは、I I 型糖尿病などの病理関連性インスリン耐性の病態の治療において臨床的に有用でありうる。

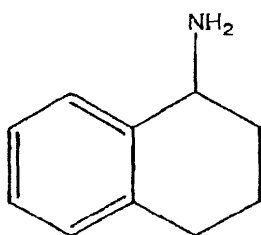
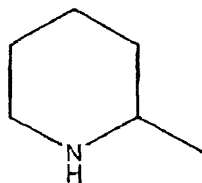
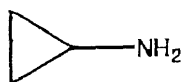
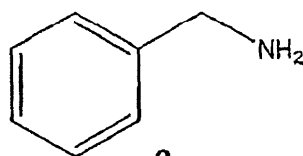
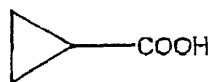
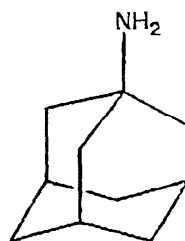
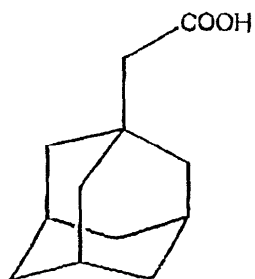
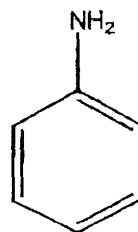
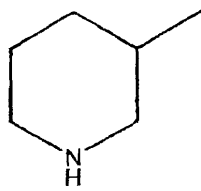
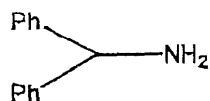
30

40

【化73】

位置

高次構造的に強固な部分

Glu₃**3****4****Asp₉****5****6****His₁ + Glu₃****7****8****His₁ + Asp₉****9****10****Glu₃ + Asp₉****11****12**

10

20

30

40

【 0 0 8 1 】

実施例 2

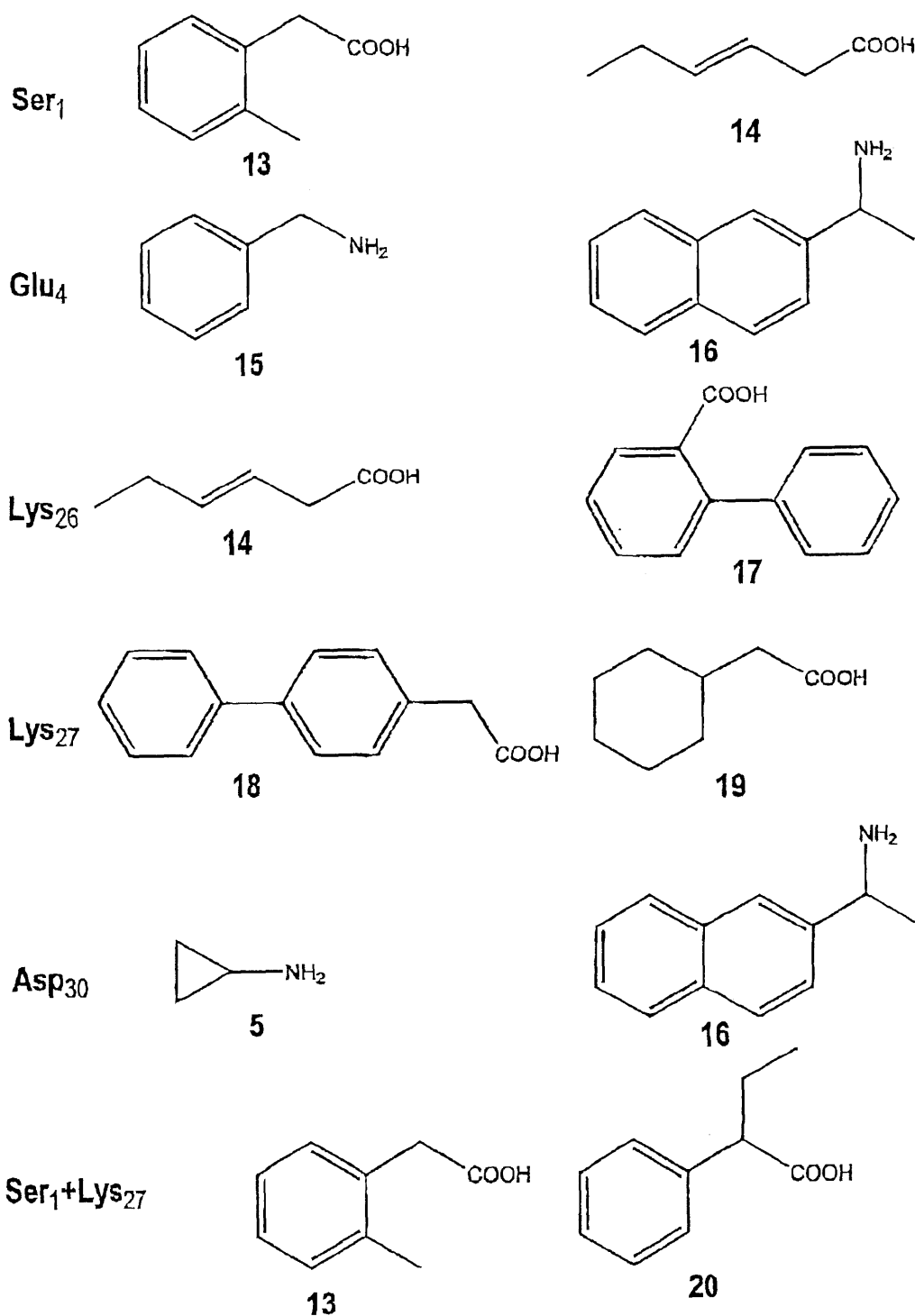
P T H 1 - 3 4 類似体

本発明に従い、下記の高次構造的に強固な部分のうち少なくとも1種が、異なる位置においてアミド結合を介してP T H 1 - 3 4 ペプチド配列へカップリングされる。

【 化 7 4 】

位置

高次構造的に強固な部分



【 0 0 8 2 】

実施例 3

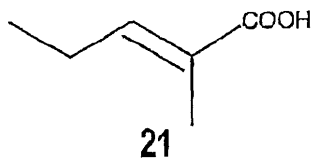
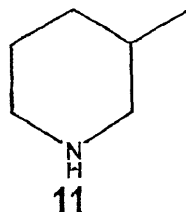
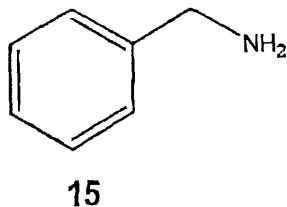
ソマトスタチン類似体

本発明に従い、下記の高次構造的に強固な部分のうち少なくとも1種が、異なる位置においてアミド結合を介してソマトスタチンペプチド配列へカップリングされる。

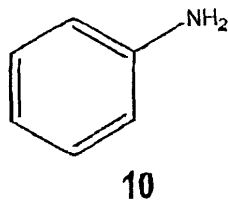
【 化 7 5 】

位置

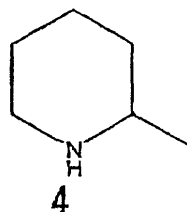
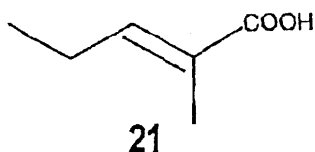
高次構造的に強固な部分

Ala₁Asp₅

10

Cys₁₄

20

Ala₁+Cys₁₄

30

【 0 0 8 3 】

本発明は特定の態様に関連して説明されているが、更なる変更が可能であること、および、一般に本発明の原理に従う本発明の任意の変法、用途または適合に及ぶことが意図されており、かつ、本発明が属する技術分野に公知または慣習的実践内であり、かつ本明細書において前述した本質的特徴に適合しうり、かつ添付の特許請求の範囲に従うような記載からの逸脱を、本発明が含むことができることが、理解されると考えられる。

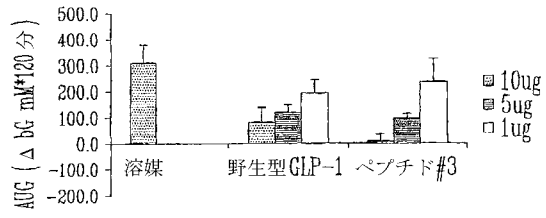
【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 試験 A の結果を示す。

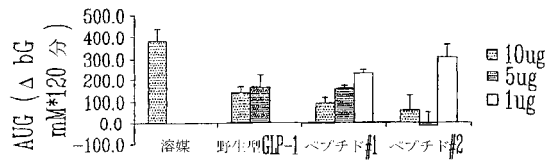
【 図 2 】 試験 B の結果を示す。

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/10195 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/CA01/01119 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 2 August 2001 (02.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/222,619 2 August 2000 (02.08.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THERATECHNOLOGIES INC. [CA/CA], 2310, Alfred-Nobel Boulevard, Saint-Laurent, Québec H4S 2A4 (CA).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GRAVEL, Denis [CA/CA], 207, des Pyrénées, St-Lambert, Québec J4S 1L3 (CA); HABI, Abdelkrim [CA/CA], 7961, Champ d'Eau, Anjou, Québec H1J 1X4 (CA); ABRIBAT, Thierry [CA/CA], 4659, Hutchison, Montréal, Québec H2V 4A2 (CA).
- (74) Agent: SWABEY OGILVY RENAULT, Suite 1600, 1981 McGill College Avenue, Montréal, Québec H3A 2Y3 (CA).



WO 02/10195 A2

(54) Title: MODIFIED BIOLOGICAL PEPTIDES WITH INCREASED POTENCY

(57) Abstract: The present invention is concerned with modified biological peptides providing increased potency, prolonged activity and/or increased half-life thereof. The modification is made via coupling through an amide bond with at least one conformationally rigid substituent, either at the N-terminal of the peptide, the C-terminal of the peptide, on a free amino or carboxyl group along the peptide chain, or at a plurality of these sites. Those peptides exhibit clinical usefulness for example in treating states of insulin resistance associated with pathologies such as type II diabetes.

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 1 -

MODIFIED BIOLOGICAL PEPTIDES WITH INCREASED POTENCY**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention is concerned with modified peptides providing
5 increased biological potency, prolonged activity and/or increased half-life thereof.
The modification is made via coupling through an amide bond with at least one
conformationally rigid substituent either at the N-terminal of the peptide, the C-
terminal of the peptide, or a free amino or carboxyl group along the peptide chain, or
at a plurality of these sites.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Most peptides are rapidly degraded in a serum medium and as a result,
their metabolites may sometimes end up with little or no residual biological activity.
To increase the activity of a peptide, various techniques have been proposed. One of
15 them is to anchor a hydrophobic chain at the N- or C-terminal of the peptidic
sequence or at other residues along the peptidic chain. This technique nevertheless
has limitations. For example, if the peptide comprises a long peptidic chain, the fact
that a small hydrophobic group is anchored to the N- or C-terminal does not
necessarily result in an increased activity of the peptide so-modified.

20

For example, it is known that substituting OH for a more hydrophobic
group like -NEt₃ at the C-terminal of a peptide sequence can result in a significantly
increased specific activity. However, these results are contradicted by several

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 2 -

publications, such as Muranichi et al. in *Pharm. Res.*, 1991, 8, 649-652, which stresses the inefficacy of a lauroyl group as a hydrophobic group at the N-terminal to increase activity. Accordingly, there does not seem to be any general rule or conclusion concerning biological potency, duration of activity and/or half life, that
5 can be derived as a result of the addition of substituents on a peptide chain, whether at the N- or C-terminal, or on certain residues along the peptidic chain.

US 6,020,311 discloses a hydrophobic growth hormone-releasing factor (GRF) analog wherein a rigidified hydrophobic moiety is coupled to the GRF peptide
10 via an amide bond at the N-terminal of the peptide. Such analog is said to have an improved anabolic potency with reduced dosage, and a prolonged activity. According to the teaching of this patent, however, the rigidified hydrophobic moiety always comprises a carbonyl group at one extremity, which means that an amide coupling thereof to the GRF can only take place at an amino site to form the required
15 amide bond. The patent does not mention, suggest or imply that similar results could be obtained if the amide coupling was made at the C-terminal by replacing the carbonyl group on the rigidified hydrophobic moiety with an amino group. The patent does not further mention, suggest or imply that the amide coupling could take place elsewhere on the peptide chain.

20

Biochemistry 2001, 40, pages 2860 to 2869 describes an hydrophobic glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog wherein hexenoic acid, a rigidified hydrophobic moiety is coupled to the GLP-1 peptide at the N-terminal of the peptide. The results show that

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 3 -

this analog exhibits a decreased affinity for the GLP-1 receptor, but an in vivo bioactivity similar to or slightly better than that of the wild type GLP-1, hypothetically because of increased resistance to serum degradation. According to this study, the linkage of acyl chains to His¹, amino-acid substitutions of Ala², and
5 the addition of amino-acid sequences at the N-terminal of the molecule would be better strategies to increase the in vivo biological activity than anchoring rigidified hydrophobic chains. However, most of these strategies involve a modification of the amino-acid composition of the natural molecule, which might have negative safety consequences for clinical applications, including the risks for immunogenicity and
10 side effects.

There is therefore a great need to develop peptides modified in a manner such that their activity will be increased, thereby improving their potency, i.e. greater resistance to serum degradation and/or from hyperagonistic properties, and/or
15 increasing their half-life without changing the amino-acid sequence that would be clinically safe and acceptable.

SUMMARY OF THE INVENTION

20 In accordance with the present invention, there is now provided a peptide of formula X_n-R₁ wherein:

- R₁ is a peptide sequence which cannot be the GRF sequence when X represents a trans-3-hexenoyl group attached at N-terminal position of the peptide sequence;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 4 -

- each X can be identical or independent from the others and is selected from the following list constituted by conformationally rigid moieties bearing:
- a) a carboxy or an amino group for coupling with the peptide sequence via an amide bond at the N-terminal of the peptide sequence, the C-terminal of the peptide sequence, at an available carboxy or amino site on the peptide sequence chain, and combinations thereof; and
 - b) a carboxy group for coupling with the peptide sequence via an ester bond at an available hydroxy site on the peptide sequence chain, and combinations thereof;
- wherein,
- n is any digit between 1 to 5;
- X being defined as:
- i) a straight, substituted C₁-C₁₀ alkyl;
 - ii) a branched, substituted C₁-C₁₀ alkyl;
 - iii) a straight or branched, unsubstituted or substituted C₁-C₁₀ alkene;
 - iv) a straight or branched, unsubstituted or substituted C₁-C₁₀ alkyne;
 - v) an unsubstituted or substituted, saturated or unsaturated C₃-C₁₀ cycloalkyl or heterocycloalkyl wherein the heteroatom is O, S or N;
 - vi) an unsubstituted or substituted C₅-C₁₄ aryl or heteroaryl wherein the heteroatom is O, S or N;
- wherein the substituent in the definitions i) to vi) comprises one or more
- a) straight or branched C₁-C₆ alkyl;
 - b) straight or branched C₁-C₆ alkene;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 5 -

c) straight or branched C₁-C₆ alkyne;

d) C₃-C₁₀ cycloalkyl or heterocycloalkyl wherein at least 2 carbon atoms are optionally connected to the C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkene, C₁-C₁₀ alkyne, C₃-C₁₀ cycloalkyl or heterocycloalkyl, and C₅-C₁₄ aryl or heteroaryl; or

5 e) C₅-C₁₄ aryl or heteroaryl wherein at least 2 carbon atoms of the aryl or heteroaryl are optionally connected to the C₁-C₁₀ alkyl, C₁-C₁₀ alkene, C₁-C₁₀ alkyne, C₃-C₁₀ cycloalkyl or heterocycloalkyl, and C₅-C₁₄ aryl or heteroaryl; and any isomers thereof, including cis and trans configurations, epimers, enantiomers, diastereoisomers, and racemic mixtures.

10

The term "aryl" includes phenyl, naphthyl and the like; the term "heterocycloalkyl" includes tetrahydrofuranyl, tetrahydrothiophanyl, tetrahydrothiopyranyl, tetrahydropyranyl and partially dehydrogenated derivatives thereof, azetidiny, piperidiny, pyrrolidiny, and the like; the term "heteroaryl" 15 comprises pyridiny, indoly, furanyl, imidazolyl, thiophanyl, pyrroly, quinoliny, isoquinoliny, pyrimidiny, oxazolyl, thiazolyl, isothiazolyl, isooxazolyl, pyrazolyl, and the like.

The expression "conformationally rigid moiety" means an entity having 20 limited conformational, i.e., rotational, mobility about its single bonds. Such mobility is limited, for example, by the presence of a double bond, a triple bond, or a saturated or unsaturated ring, which have little or no conformational mobility. As a result, the number of conformers or rotational isomers is reduced when compared, for

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 6 -

example, with the corresponding straight, unsubstituted and saturated aliphatic chain.

The conformationally rigid moiety may be hydrophobic, although this is not a prerequisite.

- 5 According to a preferred embodiment of the present invention the peptide sequence is selected from the group consisting of Growth hormone releasing factor (GRF), Somatostatin, Glucagon-like peptide 1 (7-37), amide human (GLP-1), hGLP-1 (7-36) NH₂ Parathyroid hormone fragments such as (PTH 1-34), Adrenocorticotrophic hormone (ACTH), Osteocalcin, Calcitonin, Corticotropin releasing factor, Dynorphin
- 10 A, β -Endorphin, Big Gastrin-1, GLP-2, Luteinizing hormone-releasing hormone, Melanocyte Stimulating Hormone (MSH), Atrial Natriuretic Peptide, Neuromedin B, Human Neuropeptide Y, Human Orexin A, Human Peptide YY, Human Secretin, Vasoactive Intestinal peptide (VIP), Antibiotic peptides (Magainin 1, Magainin 2, Cecropin A, and Cecropin B), Substance P (SP), Beta Casomorphin-5,
- 15 Endomorphin-2, Procolipase, Enterostatin, gastric inhibitory peptide, Chromogranin A, Vasostatin I & II, Procalcitonin, ProNCT, ProCGRP, IL8 (monocyte-derived), GCP-2, PF4, IP-10, MIG, SDF-1 α , GRO- α , I-TAC, RANTES, LD78, MIP-1 α , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, Eotaxin, MDC, and functional derivatives or fragments thereof.

20

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The amino acids are identified in the present application by the conventional three-letter abbreviations as indicated below, which are as generally

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 7 -

accepted in the peptide art as recommended by the IUPAC-IUB commission in biochemical nomenclature:

	Alanine	Ala	Leucine	Leu
	Arginine	Arg	Lysine	Lys
5	Asparagine	Asn	Methionine	Met
	Aspartic acid	Asp	Phenylalanine	Phe
	Cysteine	Cys	Proline	Pro
	Glutamic acid	Glu	Serine	Ser
	Glutamine	Gln	Threonine	Thr
10	Glycine	Gly	Tryptophan	Trp
	Histidine	His	Tyrosine	Tyr
	Isoleucine	Ile	Valine	Val

All the peptide sequences set out herein are written according to the generally accepted convention whereby the N-terminal amino acid is on the left and the C-terminal amino acid is on the right.

The present invention relates to the use of at least one conformationally rigid moiety, to produce a new family of peptides with enhanced pharmacological properties.

The modified peptides of the present invention are prepared according to the following general method, well known in the art of solid phase synthesis.

Conformationally rigid moieties comprising a carboxy group are used for anchoring to amino groups such as those found on the lysine side chain as well

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 8 -

as the N-terminus of peptides. Those comprising an amino group are used for anchoring to carboxyl groups such as those found on the aspartic or glutamic acid side chains or the C-terminus of peptides. For such cases, the anchoring reaction is preferably performed on a solid phase support (Merrifield R.B. 1963, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, **85**, 2149 and *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, **86**, 304) using Benzotriazole-1-yl-oxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate described by Castro in the article (B. Castro et al., 1975, *Tetrahedron letters*, Vol. **14** :1219).

With respect to the anchoring dynamic, the preferred working temperatures are between 20°C and 60°C. The anchoring reaction time in the case of the more hydrophobic moieties, varies inversely with temperature, and varies between 0.1 and 24 hours.

Synthesis steps were carried out by solid-phase methodology on a manual peptide synthesizer using the Fmoc strategy. Fmoc amino acids were supplied by Chem Impex International Inc. Chicago and other commercial sources. Sequential Fmoc chemistry using BOP as coupling reagent was applied to the PL-Wang resin (Polymer Laboratories, catalog number : 1463-4799) for the production of the C-terminal carboxylic acid.

20

Fmoc deprotections were accomplished with piperidine 20% solution in DMF in three consecutive steps. Always under nitrogen scrubbing, a first solution of piperidine 20% was used for 1min. to remove the major part of the Fmoc

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 9 -

protecting groups. Then, the solution was drained, and another fresh piperidine 20% solution was introduced this time for 3min., drained again and finally another solution of piperidine 20% for 10min. The peptide-resin was then washed 4 times successively with 50 mL of DMF under nitrogen scrubbing. After completion of
5 the synthesis, the resin was well washed with DMF and DCM prior to drying.

Final cleavage of side chain protecting groups and peptide-resin bonds were performed using the following mixture: TFA, ethanedithiol, triisopropylsilane, thioanisole, phenol, water (92:1.66:1.66:1.66:1:2). A final
10 concentration of 20 mL of cleavage cocktail per gram of dried peptide-resin was used to cleave the peptide from the resin. The cleavage reaction was performed at room temperature for 2 hours. The free peptide, now in solution in the TFA cocktail, was then filtered on a coarse fritted disk funnel. The resin was then washed 3 times with pure TFA. The peptide/TFA mixture was evaporated under
15 vacuum on a Rotary evaporator, precipitated and washed with ether prior to its dissolution in water and freeze drying to eliminate the remaining traces of solvent and scavengers.

Coupling of the first Fmoc-amino acid to the Wang resin

20 We used 4-alkoxybenzyl alcohol polystyrene (Wang resin) and 2 eq of the desired Fmoc-amino acid in DMF and let both products mix together under nitrogen scrubbing for 15min at room temperature. Then 3.3 eq of pyridine and 2 eq of 2,6-dichlorobenzoylchloride were added successively and the reaction was

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 10 -

carried out under nitrogen scrubbing for 15-20 hours. (Seiber P., 1987, *Tetrahedron Letters*, Vol. 28, No. 49, pp 6147-6150). After this reaction, the reaction vessel was drained and the resin washed 4 times successively with DMF under nitrogen scrubbing. Any remaining hydroxyl groups of the resin were
5 benzoylated with 3 eq of benzoylchloride and pyridine in DCE (dichloroethane) for 2 hours.

Coupling of each remaining amino acid on the growing peptide

For each of the following Fmoc-amino acid we dissolved 3 eq of the
10 Fmoc-amino acid with 3 eq of BOP (Benzotriazole-1-yl-oxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate) (B. Castro et al., 1975, *Tetrahedron letters*, Vol. 14 :1219) in DMF, added the resulting solution to the resin in the reaction vessel, started the nitrogen scrubbing and added 6 eq of DIPEA (diisopropylethylamine) to start the coupling reaction. The coupling mixture was
15 scrubbed under nitrogen for 60 min. in the reaction vessel; then drained from the vessel, the resin was washed 3 times successively with DMF and a qualitative ninhydrin test was performed to verify completion of the reaction.

The coupling of the Fmoc-L-Lys(Aloc)-OH (PerSeptive Biosystems,
20 catalog number : GEN911209), Fmoc-L-Glu(OAl)-OH (PerSeptive Biosystems, catalog number : GEN911207) and Fmoc-L-Asp(OAl)-OH (PerSeptive Biosystems, catalog number : GEN911205) were carried out in the same way as for the Fmoc-amino acids as described above.

Deprotection of allylic groups

The peptide-resin (X mmol) was then introduced in DCM under nitrogen scrubbing and after 10 min. the $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (X mmol x 0.05 / 0.05 eq) (palladium(II) bis-triphenylphosphine) was added to the mixture (Bürger H., Kilion W., *J. Organometallics*, 1969, **18**:299). Then the $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{SnH}$ (X mmol x 6 / 6eq) (tributyltinhydride) was diluted in DCM and added dropwise to the peptide-resin suspension with an addition funnel over a period of 30 minutes. The reaction was continued for another 10 minutes then the vessel was drained from the cleavage mixture and right after the peptide-resin was washed 4 times with DCM and 4 times with DMF (Dangles O., Guibé F., Balavoine G., Lavielle S., Marquet A., 1987, *J. Org. Chem.*, **52**: 4984).

Coupling of the conformationally rigid acids and alkylamines

The coupling of the conformationally rigid acids and amines to the side chains of the peptide-resin was conducted under the same conditions as those of the Fmoc-amino acids except that for these side chain modifications we used 10 equivalents of the rigid moieties and coupling reagent instead of 3.

The invention is not limited to any particular peptide sequence. Preferred peptide sequences R^1 comprise those with therapeutic properties, as well as functional derivatives or fragments thereof. The therapeutic properties of such peptides which may be used in accordance with the present invention include,

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 12 -

without limitation, treatment of bone diseases including osteoporosis, postmenopausal osteoporosis and bone deposits, cancer treatment, regulating blood glucose, type II diabetes, treatment to enhance mucosal regeneration in patients with intestinal diseases, treatment for diseases related to inflammatory responses, 5 obesity treatment, treatment for autism and pervasive development disorders, hyperproliferative skin conditions, aging, altering the proliferation of peripheral blood mononuclear cells, regulation of myometrial contractility and of prostaglandin release, stimulation of ACTH release, inhibition of interleukin-8 production, stimulation of acid release, enhancement of mucosal regeneration in 10 patients with intestinal diseases, treatment for hormone-dependent diseases and conditions including for hormone-dependent cancers, modulation of melanocyte information process, involved in pressure and volume homeostasis, regulation of exocrine and endocrine secretions, smooth muscle contraction, feeding, blood pressure, blood glucose, body temperature and cell growth, regulation of food 15 intake and energy balance, inhibition of cancer cell growth, stimulation of pancreatic secretion, or stimulate cell growth.

Growth hormone releasing factor (GRF):

Xaa₁-Xaa₂-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Xaa₆-Ser-Tyr-Arg-Lys-Xaa₁₃-Leu-Xaa₁₅-Gln-Leu-
20 Xaa₁₈-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Ile-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-
Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂

wherein,

Xaa, is Tyr or His;

Xaa, is Val or Ala;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 13 -

Xaa₈ is Asn or Ser;
 Xaa₁₁ is Val or Ile;
 Xaa₁₃ is Ala or Gly;
 Xaa₁₆ is Ser or Tyr;
 5 Xaa₂₄ is Gln or His;
 Xaa₂₅ is Asp or Glu;
 Xaa₂₇ is Met, Ile or Nle; and
 Xaa₂₈ is Ser or Asn.

10 **Somatostatin:**

Ala₁-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp
 | |
 Cys₁₄-Ser-Xaa₁₂-Phe-Thr-Lys

15 wherein,

Xaa₁₂ is Tyr or Ser.

Glucagon-like peptide 1 (7-37), (amide human (hGLP-1)):

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-
 Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-OH(NH₂)

20

Parathyroid hormone fragments (PTH 1-34):

Xaa₁-Val-Ser-Glu-Xaa₃-Gln-Xaa₇-Met-His-Asn-Leu-Gly-Xaa₁₃-His-Xaa₁₅-Xaa₁₆-
 Xaa₁₇-Xaa₁₈-Glu-Arg-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Trp-Leu-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-
 Xaa₃₁-Xaa₃₄-NH₂

25 wherein,

Xaa₁ is Ser or Ala;

Xaa₃ is Ile or Met;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 14 -

Xaa₇ is Leu or Phe;

Xaa₁₃ is Lys or Glu;

Xaa₁₅ is Leu or Arg;

Xaa₁₆ is Asn or Ala or Ser or His;

5 Xaa₁₇ is Ser or Thr;

Xaa₁₈ is Met or Val or Leu;

Xaa₂₁ is Val or met or Gln;

Xaa₂₂ is Glu or Gln or Asp;

Xaa₂₃ is Arg or Gln;

10 Xaa₂₆ is Lys or Met;

Xaa₃₃ is Asn or Ser; and

Xaa₃₄ is Phe or Ala.

Adrenocorticotrophic hormone (ACTH):

15 Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Xaa₁₃-Gly-Xaa₁₅-Lys-Arg-Arg-
Pro-Xaa₂₀-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Xaa₂₉-Glu-Xaa₃₁-Xaa₃₂-Glu-
Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Glu-Xaa₃₉-NH₂

wherein,

Xaa₁₃ is Val or Met;

20 Xaa₁₅ is Lys or Arg;

Xaa₂₀ is Val or Ile;

Xaa₂₆ is Gly or Ser;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 15 -

Xaa₂₇ is Ala or Phe or Val;

Xaa₂₈ is Glu or Gln;

Xaa₂₉ is Asp or Asn or Glu;

Xaa₃₁ is Ser or Thr;

5 Xaa₃₂ is Ala or Val or Ser;

Xaa₃₄ is Ala or Asn or Gly;

Xaa₃₅ is Phe or Met;

Xaa₃₆ is Pro or Gly;

Xaa₃₇ is Leu or Val or Pro; and

10 Xaa₃₉ is Phe or Val or Leu.

Osteocalcin:

Tyr-Leu-Xaa₂₂-Xaa₃₃-Xaa₅₄-Leu-Gly-Ala-Pro-Xaa₅₉-Pro-Tyr-Pro-Asp-Pro-Leu-Glu-

Pro-Xaa₆₈-Arg-Glu-Val-Cys-Glu-Leu-Asn-Pro-Xaa₇₇-Cys-Asp-Glu-Leu-Ala-Asp-

His-Ile-Gly-Phe-Gln-Xaa₈₉-Ala-Tyr-Xaa₉₂-Arg-Xaa₉₄-Tyr-Gly-Xaa₉₇-Val-NH₂

15 wherein,

Xaa₃₂ is Tyr or Asp or Asn;

Xaa₃₃ is Gln or His or Asn;

Xaa₃₄ is Trp or Gly;

Xaa₃₉ is Val or Ala;

20 Xaa₄₆ is Arg or Lys or His;

Xaa₇₇ is Asp or Asn;

Xaa₈₉ is Glu or Asp;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 16 -

Xaa₉₂ is Arg or Lys;

Xaa₉₄ is Phe or Ile; and

Xaa₉₇ is Pro or Thr.

5 **Calcitonin:**

Cys-Xaa₈₆-Xaa₈₇-Leu-Ser-Thr-Cys-Xaa₉₂-Leu-Gly-Xaa₉₅-Xaa₉₆-Xaa₉₇-Xaa₉₈-Xaa₉₉-

Xaa₁₀₀-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Xaa₁₀₃-Xaa₁₀₄-Thr-Xaa₁₀₆-Xaa₁₀₇-Xaa₁₀₈-Xaa₁₀₉-Xaa₁₁₀-Xaa₁₁₁-

Gly-Xaa₁₁₃-Xaa₁₁₄-Xaa₁₁₅-Pro-NH₂

wherein,

10 **Xaa₈₆** is Gly or Ser or Ala;

Xaa₈₇ is Asn or Ser;

Xaa₉₂ is Met or Val;

Xaa₉₅ is Thr or Lys;

Xaa₉₆ is Tyr or Leu;

15 **Xaa₉₇** is Thr or Ser;

Xaa₉₈ is Gln or Lys;

Xaa₉₉ is Asp or Glu;

Xaa₁₀₀ is Phe or Leu;

Xaa₁₀₁ is Asn or His;

20 **Xaa₁₀₂** is Lys or Asn;

Xaa₁₀₃ is Phe or Leu;

Xaa₁₀₄ is His or Gln;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 17 -

Xaa₁₀₆ is Phe or Tyr;

Xaa₁₀₇ is Pro or Ser;

Xaa₁₀₈ is Gln or Gly or Arg;

Xaa₁₀₉ is Thr or Ile;

5 Xaa₁₁₀ is Ala or Gly or Ser or Asp or Asn;

Xaa₁₁₁ is Ile or Phe or Val or Thr;

Xaa₁₁₃ is Val or Ala or Ser;

Xaa₁₁₄ is Gly or Glu; and

Xaa₁₁₅ is Ala or Thr.

10

Corticotropin releasing factor:

Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-

Glu-Met-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-

Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH₂

15

wherein,

Xaa₁₀₁ is Ala or Pro; and

Xaa₁₀₂ is Arg or Gly.

Dynorphin A:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH

20

β-Endorphin:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Xaa₂₄₃-Glu-Xaa₂₄₅-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Xaa₂₅₁-Thr-

Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Xaa₂₅₉-Lys-Asn-Xaa₂₆₂-Xaa₂₆₅-Lys-Lys-Gly-Xaa₂₆₇-OH

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 18 -

wherein,

Xaa₂₄₃ is Ser or Pro;

Xaa₂₄₅ is Lys or Arg;

Xaa₂₅₁ is Val or Met;

5 **Xaa₂₅₉** is Ile or Val;

Xaa₂₆₂ is Ala or Thr or Ser or Val;

Xaa₂₆₃ is Tyr or His; and

Xaa₂₆₇ is Glu or Leu or Gln or His.

10 **Big Gastrin-1:**

pXaa₃₈-Leu-Gly-Xaa₆₂-Gln-Xaa₆₄-Xaa₆₅-Xaa₆₆-Xaa₆₇-Xaa₆₈-Xaa₆₉-Ala-Asp-Xaa₇₂-

Xaa₇₃-Lys-Lys-Xaa₇₆-Xaa₇₇-Pro-Xaa₇₈-Xaa₈₀-Glu-Xaa₈₂-Glu-Glu-Xaa₈₃-Ala-Tyr-Gly-

Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

wherein,

15 **Xaa₃₉** is Glu or Gln;

Xaa₆₂ is Pro or Leu;

Xaa₆₄ is Gly or Asp;

Xaa₆₅ is Pro or Ser;

Xaa₆₆ is Pro or Gln;

20 **Xaa₆₇** is His or Gln;

Xaa₆₈ is Leu or Met or Phe or Gln;

Xaa₆₉ is Val or Ile;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 19 -

Xaa₇₂ is Pro or Leu;

Xaa₇₃ is Ser or Ala;

Xaa₇₆ is Gln or Glu;

Xaa₇₇ is Gly or Arg;

5 Xaa₇₉ is Trp or Pro or Arg;

Xaa₈₀ is Leu or Val or Met;

Xaa₈₃ is Glu or Lys; and

Xaa₈₅ is Glu or Ala.

10 **GLP-2:**

His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Xaa₁₅₂-Xaa₁₅₃-Xaa₁₅₄-Xaa₁₅₅-Xaa₁₅₆-Xaa₁₅₇-Xaa₁₅₈-Leu-Asp-
Xaa₁₆₁-Xaa₁₆₂-Ala-Xaa₁₆₄-Xaa₁₆₅-Xaa₁₆₆-Phe-Xaa₁₆₈-Xaa₁₆₉-Trp-Xaa₁₇₁-Xaa₁₇₂-Xaa₁₇₃-
Thr-Xaa₁₇₅-Xaa₁₇₆-Xaa₁₇₇-Xaa₁₇₈;

wherein,

15 Xaa₁₅₂ is Ser or Thr;

Xaa₁₅₃ is Asp or Ser;

Xaa₁₅₄ is Glu or Asp;

Xaa₁₅₅ is Met or Phe;

Xaa₁₅₆ is Asn or Ser;

20 Xaa₁₅₇ is Thr or Lys;

Xaa₁₅₈ is Ile or Val or Ala;

Xaa₁₆₁ is Asn or Ile or His or Ser;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 20 -

- Xaa₁₆₂ is Leu or Lys;
Xaa₁₆₄ is Ala or Thr;
Xaa₁₆₅ is Arg or Gln or Lys;
Xaa₁₆₆ is Asp or Glu;
5 Xaa₁₆₈ is Ile or Leu;
Xaa₁₆₉ is Asn or Asp;
Xaa₁₇₁ is Leu or Ile;
Xaa₁₇₂ is Ile or Leu;
Xaa₁₇₃ is Gln or Asn or His;
10 Xaa₁₇₅ is Lys or Pro;
Xaa₁₇₆ is Ile or Val;
Xaa₁₇₇ is Thr or Lys; and
Xaa₁₇₈ is Asp or Glu.
- 15 **Luteinizing hormone-releasing hormone:**
Xaa₁-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-OH
wherein,
Xaa₁ is pGlu, 5-oxoPro or Gln.
- 20 **Melanocyte Stimulating Hormone (MSH):**
Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 21 -

Atrial Natriuretic Peptide:H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Xaa₁₃₅-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Xaa₁₄₂-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH

wherein,

5 Xaa₁₃₅ is Met or Ile; andXaa₁₄₂ is Gly or Ser.**Neuromedin B:**H-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂

10

Human Neuropeptide Y:

H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-asp-Met-Ala-

Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂15 **Human Orexin A:**

pGlu-Pro-Leu-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-Leu-Tyr-Glu-

Leu-Leu-His-Gly-Ala-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu-NH₂**Human Peptide YY:**

20 H-Tyr-Pro-Ile-Lys-Pro-Glu-Ala-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-Glu-Leu-Asn-

Arg-Tyr-Tyr-Ala-Ser-Leu-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-

NH₂

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 22 -

Human Secretin:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-
Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

5 Vasoactive Intestinal peptide (VIP):

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-
Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

Antibiotic peptides such as:**10 Magainin 1:**

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-
Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser

Magainin 2:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-
15 Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser

Cecropin A:

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-
Ala-Lys

Cecropin B:

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-
20 Gly-Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-
Leu.

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 23 -

Substance P (SP):

Arg-Pro-Leu-Pro-Gln-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-amide

Beta Casomorphin-5:

Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly

5 **Endomorphin-2:**Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂**Procolipase:**

100 aa peptide (X1-Pro-X2-Pro-Arg....)

Enterostatin:

10 Val-Pro-Asp-Pro-Arg

Gastrin Inhibitory Peptide:

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala- Met-Asp-Lys-Ile-His-
 Gln-Gln-Asp-Phe- Val-Asn-Trp-Leu- Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-
 Trp-Lys-His-Asn- Ile-Thr-Gln

15 **Chromogranin A****Vasostatin I****Vasostatin II:**

Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met Lys Cys Ile
 Val Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met Pro Val Ser Gln Glu
 20 Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn
 Leu Leu Lys Glu Leu Gln Asp Leu Ala Leu Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His
 Gln Gln Lys Lys His Ser Gly Phe Glu Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 24 -

Gln Ser Ser Gln Ala Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val

Met Glu

Procalcitonin

ProNCT

5 ProCGRP

Chemokine family:**CXC-group:**10 **IL8(monocyte-derived):**

SerAlaLysGluLeuArgCysGlnCys...

GCP-2:

15 GlyProValSerAlaValLeuThrGluLeuArgCysThrCys...

PF4:

GluAlaGluGlnAspGlyAspLeuGlnCysLeuCys...

20 **IP-10:**

ValProLeuSerArgThrValArgCCysThrCys...

25 **MIG:**

ThrProValValArgLysGlyArgCysSerCys...

SDF-1 α :

30 LysProValSerLeuSerTyrArgCysProCys...

GRO- α :

35 AlaProLeuAlaThrGluLeuArgCysGlnCys...

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 25 -

I-TAC:

PheProMetPheLysLysGlyArgCysLeuCys...

5 **CC-group:****RANTES:**

10 SerProTyrSerSerAspThrThrProCys...

LD78:

AlaProLeuAlaAlaAspThrProThrAlaCys...

15 **MIP-1 α :**

AlaProMetGlySerAspProProThrAlaCys...

MCP-1:

20 GlnProAspAlaIleAsnAlaProValThrCys...

MCP-2:

25 GlnProSerAspValSerIleProIleThrCys...

MCP-3:

30 GlnProValGlyIleTAsnSerThrThrCys...

MCP-4:

GlnProAspAlaLeuAspValProSerThrCys...

35 **Eotaxin:**

GlyProAlaSerValProThrThrCys...

MDC:

40 GlyProTyrGlyAlaAsnMetGluAspSerValCys...

and functional derivatives or fragments thereof.

45 The complete definition of the previously listed sequences are known inter alia from
Mentlein, R (1999) Regul. Pept. 85:9-24 and from De Meester, I. Et al. (2000) Adv

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 26 -

ExpMed Biol. 477:67-87. Those documents are incorporated by reference to the present application.

In a more preferred embodiment, the peptide is substituted with one or more
5 conformationally rigid moieties. Preferred structures of the conformationally rigid moieties comprise those with a double bond, a triple bond or a saturated or unsaturated ring.

The following is a brief list of the formula of preferred conformationally
10 rigid moieties, identified as Formula 1 to 63, which are suitable for the purposes of the present invention.

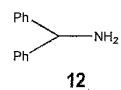
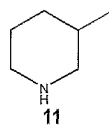
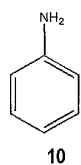
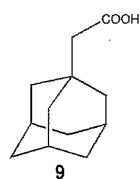
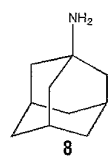
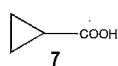
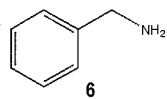
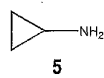
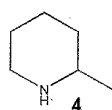
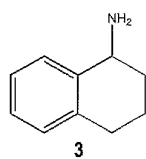
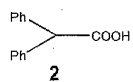
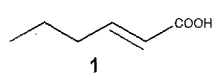
Among the preferred modified peptides according to the present invention, are those wherein the peptide sequence is the sequence of a natural peptide.

15

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

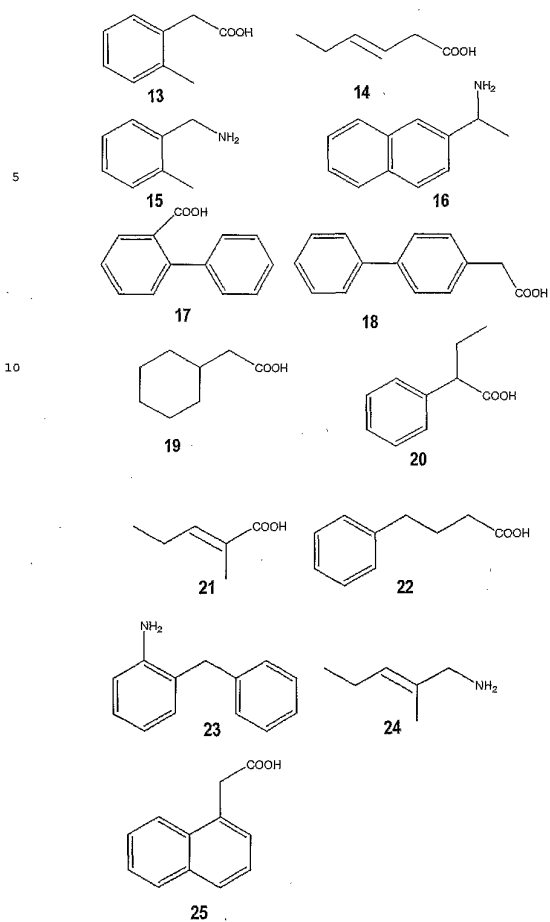
- 27 -



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

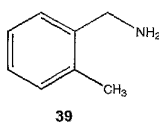
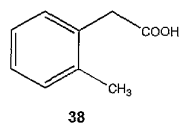
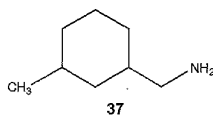
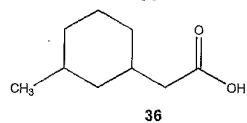
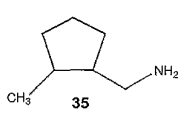
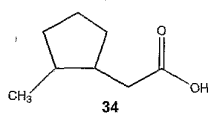
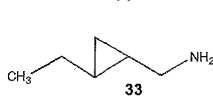
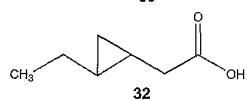
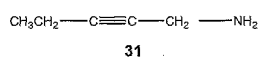
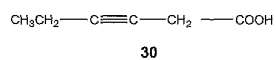
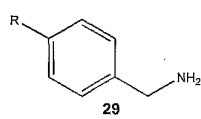
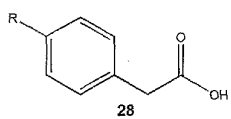
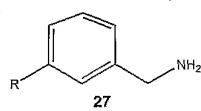
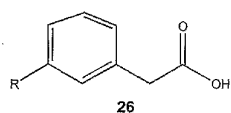
- 28 -



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

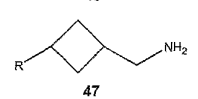
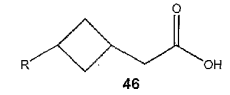
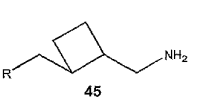
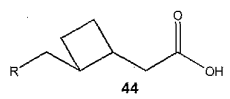
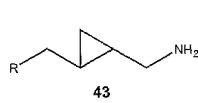
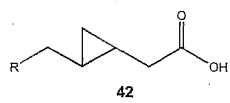
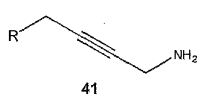
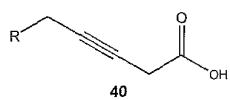
- 29 -



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

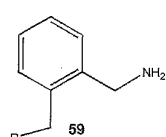
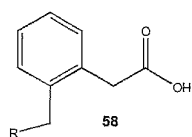
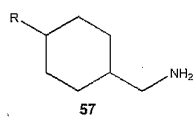
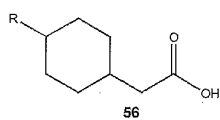
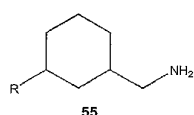
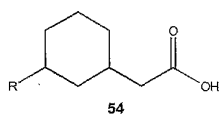
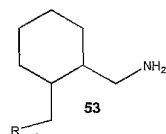
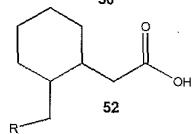
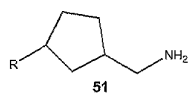
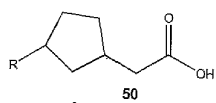
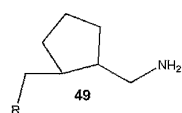
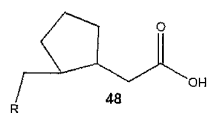
- 30 -



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

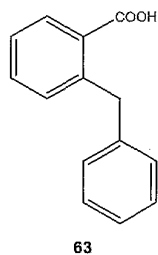
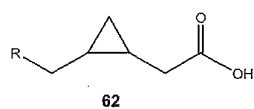
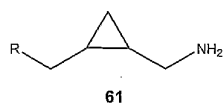
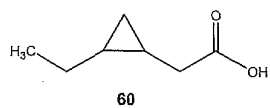
- 31 -



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 32 -



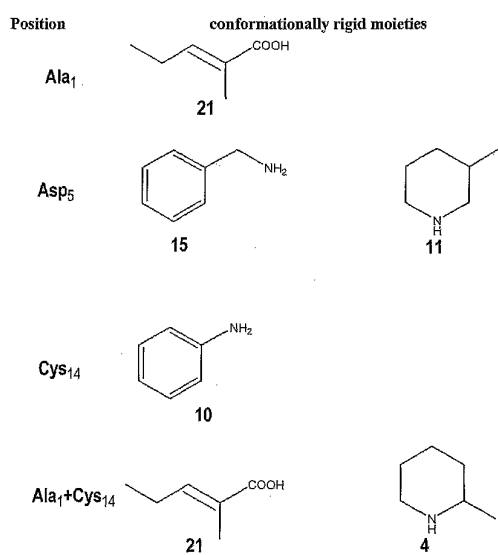
wherein, R is hydrogen, CH₃ or CH₂CH₃.

- 5 A preferred embodiment of the present invention is constituted by peptides wherein the peptide sequence is Somatostatin and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said somatostatin peptide sequence via an amide bond at different positions as follows:

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 33 -



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 34 -

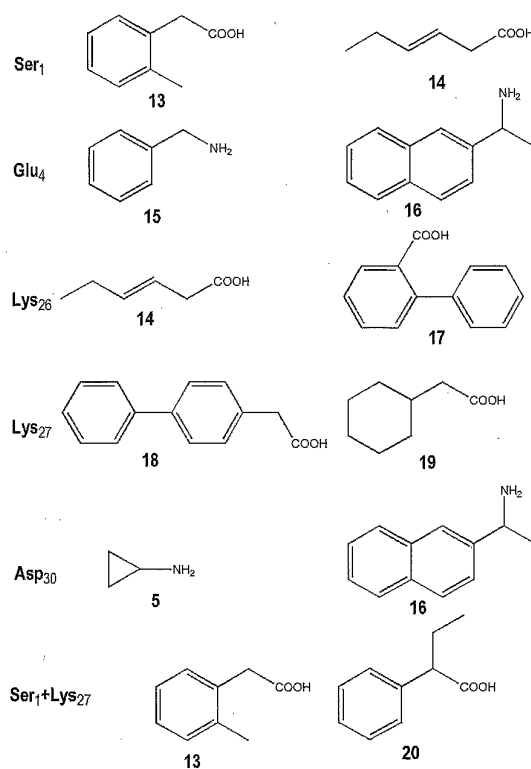
An another preferred embodiment of the present invention is constituted by those peptides wherein the peptide sequence is PTH 1-34 and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said PTH 1-34 peptide sequence via an amide bond at different positions as follows:

Position	conformationally rigid moieties
----------	---------------------------------

WO 02/10195

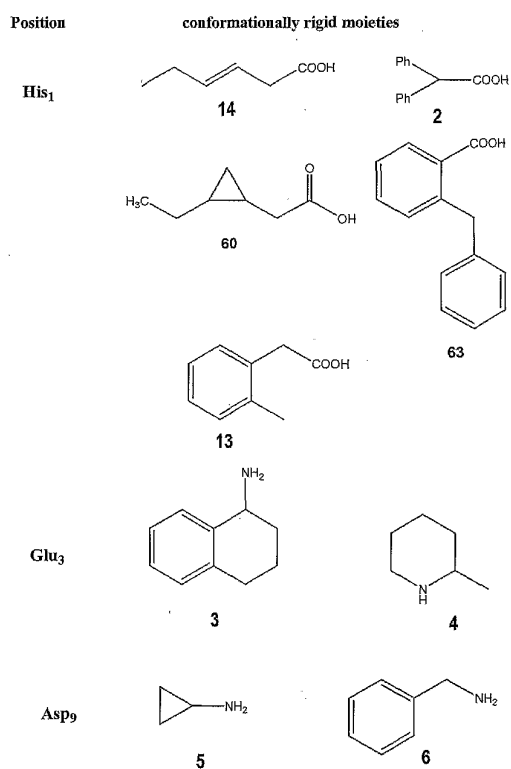
PCT/CA01/01119

- 35 -



A further preferred embodiment of the present invention is constituted by those peptides wherein the peptide sequence is GLP-1 and at least one

conformationally rigid moiety is coupled with said GLP-1 peptide sequence via an amide bond at different positions as follows:



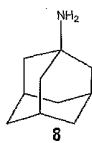
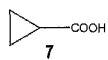
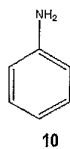
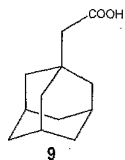
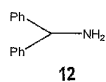
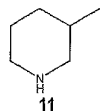
WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 37 -

Position

conformationally rigid moieties

His₁ + Glu₃His₁ + Asp₉Glu₃ + Asp₉

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 38 -

Also preferred among the modified peptides according to the invention are those peptides wherein;

- the peptide sequence is GLP-2 and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said GLP-2 peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence;
- the peptide sequence is Enterostatin and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Enterostatin peptide sequence via an amide bond at different positions of the peptide sequence;
- the peptide sequence is NPY and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said NPY peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence;
- the peptide sequence is NPY and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said NPY peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence;
- the peptide sequence is Secretin and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Secretin peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence;
- the peptide sequence is Vasoactive Intestinal Peptide and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Vasoactive Intestinal Peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 39 -

- the peptide sequence is Gastrin Inhibitory Peptide and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Gastrin Inhibitory Peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence;
- 5 - the peptide sequence is Vasostatin II and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Vasostatin II peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence;
- the peptide sequence is RANTES and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said RANTES peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence;
- 10 - the peptide sequence is Eotaxin and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Eotaxin peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

15 In the modified peptides of the invention, the conformationally rigid moiety is preferably coupled with said peptide sequence via an amide bond at the N-terminal.

The modified peptides according to the invention, wherein the
20 conformationally rigid moiety is the formula referenced 60 in the description, are of a particular interest.

The modified peptides of the present invention can be administered in various ways, such as for example, intravenously, subcutaneously, intradermally,

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 40 -

transdermally, intraperitoneally, orally, or topically. The modified peptides of the present invention can also be administered by inhalation, when in a powder form or aerosol form. Furthermore, pharmaceutically acceptable carriers for delivery of modified peptides of the present invention include, without limitation, liposome,
5 nanosome, patch, implant or any delivery devices.

In addition to the carboxy and amino groups present at the C- and N-terminals respectively of the peptide, other carboxy and amino sites can be available on the peptide chain. For example, if the peptide chain comprises amino acids
10 provided with a carboxylic acid side chain such as aspartic acid and glutamic acid, additional carboxy sites will therefore be available on the chain for amidation. Should the peptide chain comprise amino acids with a carboxamide side chain such as asparagine and glutamine, these also provide additional carboxy groups for amidation by a conformationally rigid moiety, provided that they are accessed
15 synthetically via the corresponding aspartic and glutamic acids. Further, if the peptide comprises amino acids provided with a basic side chain such as arginine, histidine or lysine, additional amino sites will then be available on the chain for amidation by a conformationally rigid moiety. The peptide chain may also include both acidic and basic amino acids, meaning that the conformationally rigid
20 substituents could be coupled to the peptide chain via the N-terminal, the C-terminal, a carboxy site on the peptide chain, an amino site on the peptide chain, or a plurality of these sites.

WO 02/10195

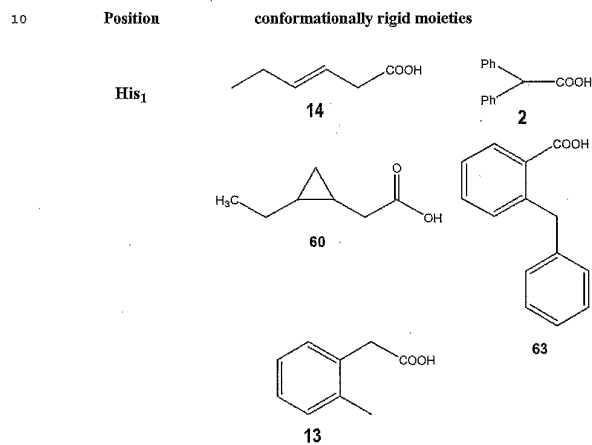
PCT/CA01/01119

- 41 -

The present invention will be more readily understood by referring to the following examples which are given to illustrate the invention rather than to limit its scope.

EXAMPLE 1**Synthesis of GLP-1 analogs**

In accordance with the present invention, at least one of the following conformationally rigid moiety is coupled with the GLP-1 peptide sequence via an amide bond at different positions as follows.

**hGLP-1 (7-37) analogs synthesis**

15 hGLP-1 (7-37) derivatives modified at the amino terminus with rigid hydrophobic moieties were synthesized using Fmoc chemistry (1), on the Symphony apparatus (Rainin Instrument Co., Inc.). Fmoc-Gly-Wang resin (0.70mmole/g) and five

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 42 -

equivalents of reagents (100 μ m scale, amino acids concentration of 200mM), were used with a time coupling of 30 minutes. The reactions have been monitored by the Kaiser test. The three conformationally rigid moieties introduced at the N-terminus of the hGLP-1 (7-37) are:

- 5 - **Peptide # 1** = (O-Tolylacetic acid-His⁷)-hGLP-1 (7-37) [O-Tolylacetic acid (13) (10 equivalents per coupling; coupling time 45 min)]
- **Peptide # 2** = ((+,-)-cis-2-Ethylcyclopropylacetic acid -His⁷)-hGLP-1 (7-37) [(+,-)-cis-2-Ethylcyclopropylacetic acid (60) (7.5 equivalents per coupling; coupling time 60 min)].

10

The peptides were cleaved using a TFA cocktail (92% TFA, 2% ethanedithiol, 2% thioanisole, 2% triisopropylsilane, 2% water, 2% (w/v) phenol) for 2 hours. All the analogs have been purified by reverse-phase HPLC. They have been analyzed by analytical HPLC and by MS (MALDI-TOF).

15

The synthesis of GLP-1 analogs is well known to the person skilled in the art and is further illustrated by the general references Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach (2000). Chan, W.C. and White, P.D., Oxford University Press, New York, USA, 346p which are incorporated by reference.

20

Biological assess of GLP-1 analogs

Materials & Methods

25

Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 43 -

Six-week old female CD1 mice (Charles River) were fasted for at least 16 hours. Mice were given 1.5 mg of glucose per gram of body weight orally in water through a gastric gavage tube at $t = 0$ min and blood was collected from a tail vein at $t = 0, 10, 20, 30, 60, 90$ and 120 min for measurement of blood glucose using a glucose meter (Lifescan). Peptides or vehicle were injected subcutaneously 5 min prior to the glucose administration. Data were expressed as the area under the curve, calculated from the change (Δ) in blood glucose for each time, using the trapezoidal rule. Therefore, the data represent the integrated increase in blood glucose over a 120 min period following glucose administration. Data presented are the mean \pm SEM of 4 to 11 animals per group.

Test articles

All peptides, including wild-type GLP-1 (7-37), were tested in the OGTT test at 3 different concentrations: 1, 5 and 10 μ g per mouse. In a first set of experiments (study A), peptide 3 was tested in comparison with vehicle and hGLP-1 (7-37). In a second set of experiments (study B), peptides 1 and 2 were tested in comparison with vehicle and hGLP-1 (7-37).

wt GLP1: hGLP(7-37)

Peptide #1: (O-Tolylacetic acid-His³)-hGLP-1 (7-37)

Peptide #2: ((+,-)-cis-2-Ethylcyclopropylacetic acid-His³)-hGLP-1 (7-37)

Peptide #3: (Hexenoyl-trans-3-His³)-hGLP-1 (7-37)

Results and conclusions

Results are shown in Fig I(study A) and Fig.II (study B)

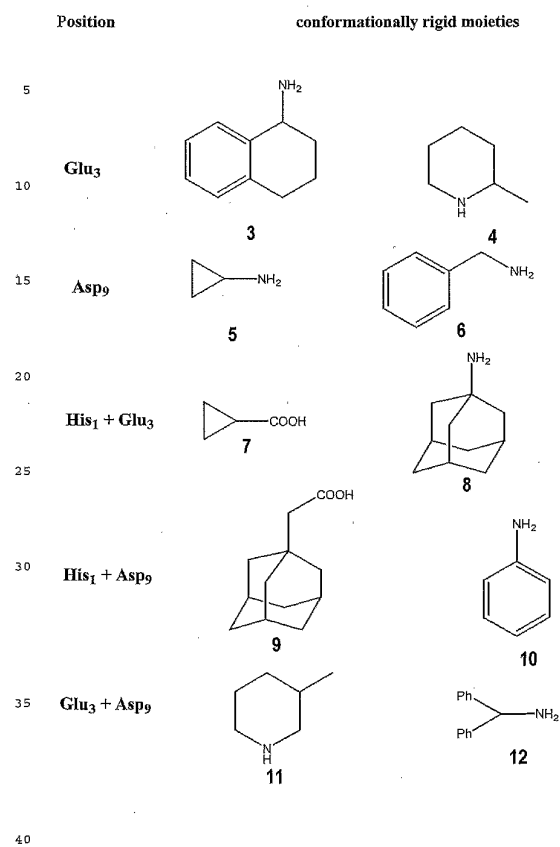
In studies A and B, administration of vehicle resulted in a similar integrated response in glucose levels (study A: 380 ± 57 vs study B: 309 ± 68 mMx120 min), illustrating the validity and reproducibility of the methodology. Although wt GLP-1 induced a dose-related decrease in the glucose response, this peptide was not able to completely suppress the glucose response at any dose, which might be

interpreted as a limitation in its potential clinical usefulness. In contrast, peptide 3 (study A, Fig.1) was able to completely abolish the glucose response, but only at the 10 ug dose (9 ± 26 mMx120 min). Surprisingly, peptide 2 (study B, Fig.2) was even more potent than peptide 3, being able to totally prevent the glucose response both at the 5 ug and the 10 ug doses (5 ug: -17 ± 67 mMx120 min; 10 ug: 61 ± 64 mMx120 min). In conclusion, the GLP-1 analog corresponding to peptide 2 was identified with marked increased biological potency over the wild type GLP-1 (7-37), because of this increased potency, this peptide may have clinical usefulness in treating states of insulin resistance associated with pathologies such as type II diabetes.

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 45 -



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 46 -

EXAMPLE 2**PTH 1-34 analogs**

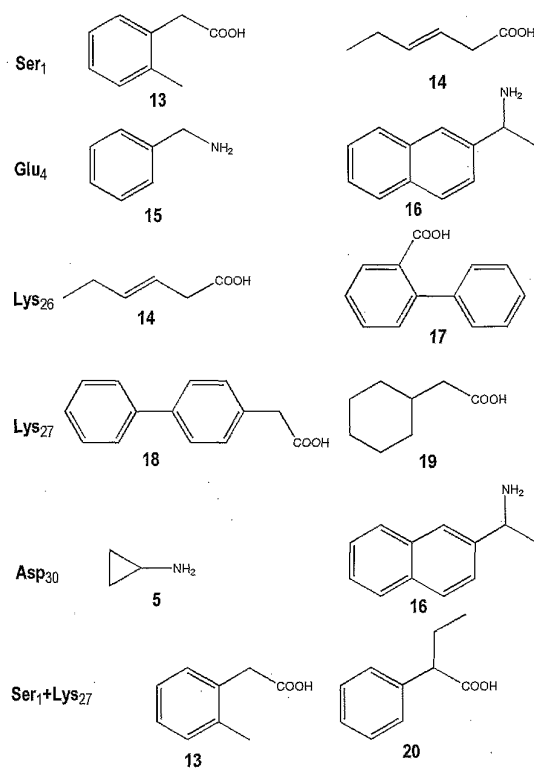
In accordance with the present invention, at least one of the following
5 conformationally rigid moiety is coupled with the PTH 1-34 peptide sequence via an
amide bond at different positions as follows.

Position	conformationally rigid moieties
----------	---------------------------------

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

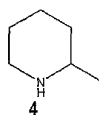
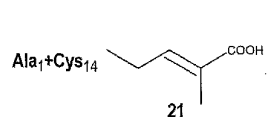
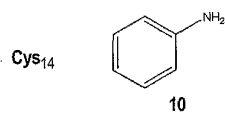
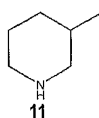
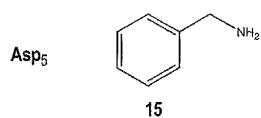
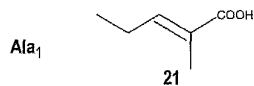
- 47 -



EXAMPLE 3**Somatostatin analogs**

In accordance with the present invention, at least one of the following conformationally rigid moiety is coupled with the somatostatin peptide sequence via an amide bonds at different position as follows.

Position **conformationally rigid moieties**



While the invention has been described in connection with specific
 10 embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further modifications,
 and this application is intended to cover any variations, uses or adaptations of the
 invention following, in general, the principles of the invention, and including such

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 49 -

departures from the present description as come within known or customary practice within the art to which the invention pertains, and as may be applied to the essential features hereinbefore set forth, and as follows in the scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A peptide of formula X_n-R_1 wherein:

- R_1 is a peptide sequence, a functional analog thereof or a fragment thereof;
- each X can be identical or independent from the others and is selected from the following list constituted by conformationally rigid moieties:
- i) a straight, substituted C_1-C_{10} alkyl;
 - ii) a branched, substituted C_1-C_{10} alkyl;
 - iii) a straight or branched, unsubstituted or substituted C_1-C_{10} alkene;
 - iv) a straight or branched, unsubstituted or substituted C_1-C_{10} alkyne;
 - v) an unsubstituted or substituted, saturated or unsaturated C_3-C_{10} cycloalkyl or heterocycloalkyl wherein the heteroatom is O, S or N;
 - vi) an unsubstituted or substituted C_5-C_{14} aryl or heteroaryl wherein the heteroatom is O, S or N;

wherein the substituent in the definitions i) to vi) comprises one or more

- a) straight or branched C_1-C_6 alkyl;
- b) straight or branched C_1-C_6 alkene;
- c) straight or branched C_1-C_6 alkyne;
- d) C_3-C_{10} cycloalkyl or heterocycloalkyl wherein at least 2 carbon atoms are optionally connected to the C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkene, C_1-C_{10} alkyne, C_3-C_{10} cycloalkyl or heterocycloalkyl, and C_5-C_{14} aryl or heteroaryl; or
- e) C_5-C_{14} aryl or heteroaryl wherein at least 2 carbon atoms of the aryl or heteroaryl are optionally connected to the C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} alkene, C_1-C_{10}

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 51 -

alkyne, C₃-C₁₀ cycloalkyl or heterocycloalkyl, and C₅-C₁₄ aryl or heteroaryl, said group X also comprising at least one group selected from:

- α) a carboxy or an amino group for coupling with the peptide sequence via an amide bond at the N-terminal of the peptide sequence, the C-terminal of the peptide sequence, at an available carboxy or amino site on the peptide sequence chain, and combinations thereof; and
- β) a carboxy group for coupling with the peptide sequence via an ester bond at an available hydroxy site on the peptide sequence chain, and combinations thereof;

wherein,

n is any digit between 1 to 5;

and any isomers thereof, including cis and trans configurations, epimers, enantiomers, diastereoisomers, and racemic mixtures,

the peptides defined in claim 1 of U.S. Patent No. 6,020,311 being excluded.

2. A peptide as claimed in claim 1 wherein the peptide sequence is selected from the group consisting of Growth hormone releasing factor (GRF), Somatostatin, Glucagon-like peptide 1 (7-37), amide human (GLP-1) hGLP-1 (7-36) NH₂, Parathyroid hormone fragments (PTH 1-34), Adrenocorticotrophic hormone (ACTH), Osteocalcin, Calcitonin, Corticotropin releasing factor, Dynorphin A, β-Endorphin, Big Gastrin-1, GLP-2, Luteinizing hormone-releasing hormone, Melanocyte Stimulating Hormone (MSH), Atrial Natriuretic Peptide, Neuromedin B, Human

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 52 -

Neuropeptide Y, Human Orexin A, Human Peptide YY, Human Secretin, Vasoactive Intestinal peptide (VIP), Antibiotic peptides (Magainin 1, Magainin 2, Cecropin A, and Cecropin B), Substance P (SP), Beta Casomorphin-5, Endomorphin-2, Procolipase, Enterostatin, gastric inhibitory peptide, Chromogranin A, Vasostatin I & II, Procalcitonin, ProNCT, CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide), IL8 (monocyte-derived), GCP-2, PF4, IP-10, MIG, SDF-1 α , GRO- α , I-TAC, RANTES, LD78, MIP-1 α , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, Eotaxin, MDC, and functional analogs and derivatives or fragments thereof.

3. A peptide as claimed in claim 1 or 2 wherein the conformationally rigid moiety comprises at least a double bond, a triple bond or a saturated or unsaturated ring.

4. A peptide as claimed in any one of claims 1 to 3 wherein the conformationally rigid moiety comprises one or more of the structures of Formula 1 to 63 as defined in the description.

5. A peptide as claimed in any one of claims 1 to 4 wherein the peptide sequence is selected from the group consisting of:

Growth hormone releasing factor (GRF):

Xaa₁-Xaa₂-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Xaa₄-Ser-Tyr-Arg-Lys-Xaa₁₃-Leu-Xaa₁₅-Gln-Leu-Xaa₁₈-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Ile-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂

wherein,

Xaa_i is Tyr or His;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 53 -

Xaa₂ is Val or Ala;
 Xaa₄ is Asn or Ser;
 Xaa₁₃ is Val or Ile;
 Xaa₁₅ is Ala or Gly;
 Xaa₁₈ is Ser or Tyr;
 Xaa₂₄ is Gln or His;
 Xaa₂₅ is Asp or Glu;
 Xaa₂₇ is Met, Ile or Nle; and
 Xaa₂₉ is Ser or Asn;

Somatostatin:

Ala₁-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp
 |
 Cys₁₄-Ser-Xaa₁₂-Phe-Thr-Lys

wherein,

Xaa₁₂ is Tyr or Ser;**Glucagon-like peptide 1 (7-37), (amide human (hGLP-1)):**

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-
 Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-OH(NH₂)

Parathyroid hormone fragments (PTH 1-34):

Xaa₁-Val-Ser-Glu-Xaa₅-Gln-Xaa₇-Met-His-Asn-Leu-Gly-Xaa₁₃-His-Xaa₁₅-Xaa₁₆-
 Xaa₁₇-Xaa₁₈-Glu-Arg-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Trp-Leu-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-
 Xaa₃₃-Xaa₃₄-NH₂

wherein,

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 54 -

Xaa₁ is Ser or Ala;

Xaa₅ is Ile or Met;

Xaa₇ is Leu or Phe;

Xaa₁₃ is Lys or Glu;

Xaa₁₅ is Leu or Arg;

Xaa₁₆ is Asn or Ala or Ser or His;

Xaa₁₇ is Ser or Thr;

Xaa₁₈ is Met or Val or Leu;

Xaa₂₁ is Val or met or Gln;

Xaa₂₂ is Glu or Gln or Asp;

Xaa₂₃ is Arg or Gln;

Xaa₂₆ is Lys or Met;

Xaa₃₃ is Asn or Ser; and

Xaa₃₄ is Phe or Ala;

Adrenocorticotrophic hormone (ACTH):

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Xaa₁₃-Gly-Xaa₁₅-Lys-Arg-Arg-

Pro-Xaa₂₀-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Xaa₂₉-Glu-Xaa₃₁-Xaa₃₂-Glu-

Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Glu-Xaa₃₉-NH₂

wherein,

Xaa₁₃ is Val or Met;

Xaa₁₅ is Lys or Arg;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 55 -

Xaa₂₀ is Val or Ile;

Xaa₂₆ is Gly or Ser;

Xaa₂₇ is Ala or Phe or Val;

Xaa₂₈ is Glu or Gln;

Xaa₂₉ is Asp or Asn or Glu;

Xaa₃₁ is Ser or Thr;

Xaa₃₂ is Ala or Val or Ser;

Xaa₃₄ is Ala or Asn or Gly;

Xaa₃₅ is Phe or Met;

Xaa₃₆ is Pro or Gly;

Xaa₃₇ is Leu or Val or Pro; and

Xaa₃₉ is Phe or Val or Leu;

Osteocalcin:

Tyr-Leu-Xaa₃₂-Xaa₃₅-Xaa₃₄-Leu-Gly-Ala-Pro-Xaa₃₉-Pro-Tyr-Pro-Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Xaa₆₈-Arg-Glu-Val-Cys-Glu-Leu-Asn-Pro-Xaa₇₇-Cys-Asp-Glu-Leu-Ala-Asp-His-Ile-Gly-Phe-Gln-Xaa₆₉-Ala-Tyr-Xaa₂₇-Arg-Xaa₆₄-Tyr-Gly-Xaa₉₇-Val-NH₂

wherein,

Xaa₃₂ is Tyr or Asp or Asn;

Xaa₃₅ is Gln or His or Asn;

Xaa₆₄ is Trp or Gly;

Xaa₆₉ is Val or Ala;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 56 -

Xaa₆₈ is Arg or Lys or His;

Xaa₇₇ is Asp or Asn;

Xaa₈₉ is Glu or Asp;

Xaa₉₂ is Arg or Lys;

Xaa₉₄ is Phe or Ile; and

Xaa₉₇ is Pro or Thr;

Calcitonin:

Cys-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Leu-Ser-Thr-Cys-Xaa₃₂-Leu-Gly-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-

Xaa₁₀₀-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Xaa₁₀₃-Xaa₁₀₄-Thr-Xaa₁₀₅-Xaa₁₀₇-Xaa₁₀₈-Xaa₁₀₉-Xaa₁₁₀-Xaa₁₁₁-

Gly-Xaa₁₁₅-Xaa₁₁₄-Xaa₁₁₅-Pro-NH₂

wherein,

Xaa₈₆ is Gly or Ser or Ala;

Xaa₈₇ is Asn or Ser;

Xaa₉₂ is Met or Val;

Xaa₉₅ is Thr or Lys;

Xaa₉₆ is Tyr or Leu;

Xaa₉₇ is Thr or Ser;

Xaa₉₈ is Gln or Lys;

Xaa₉₉ is Asp or Glu;

Xaa₁₀₀ is Phe or Leu;

Xaa₁₀₁ is Asn or His;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 57 -

Xaa₁₀₂ is Lys or Asn;

Xaa₁₀₃ is Phe or Leu;

Xaa₁₀₄ is His or Gln;

Xaa₁₀₆ is Phe or Tyr;

Xaa₁₀₇ is Pro or Ser;

Xaa₁₀₈ is Gln or Gly or Arg;

Xaa₁₀₉ is Thr or Ile;

Xaa₁₁₀ is Ala or Gly or Ser or Asp or Asn;

Xaa₁₁₁ is Ile or Phe or Val or Thr;

Xaa₁₁₃ is Val or Ala or Ser;

Xaa₁₁₄ is Gly or Glu; and

Xaa₁₁₅ is Ala or Thr;

Corticotropin releasing factor:

Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-
Glu-Met-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-
Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH₂

wherein,

Xaa₁₀₁ is Ala or Pro; and

Xaa₁₀₂ is Arg or Gly;

Dynorphin A:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 58 -

 β -Endorphin:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Xaa₂₄₃-Glu-Xaa₂₄₅-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Xaa₂₅₁-Thr-
Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Xaa₂₅₉-Lys-Asn-Xaa₂₆₂-Xaa₂₆₅-Lys-Lys-Gly-Xaa₂₆₇-OH

wherein,

Xaa₂₄₃ is Ser or Pro;

Xaa₂₄₅ is Lys or Arg;

Xaa₂₅₁ is Val or Met;

Xaa₂₅₉ is Ile or Val;

Xaa₂₆₂ is Ala or Thr or Ser or Val;

Xaa₂₆₅ is Tyr or His; and

Xaa₂₆₇ is Glu or Leu or Gln or His;

Big Gastrin-1:

pXaa₅₉-Leu-Gly-Xaa₆₂-Gln-Xaa₆₄-Xaa₆₅-Xaa₆₆-Xaa₆₇-Xaa₆₈-Xaa₆₉-Ala-Asp-Xaa₇₂-
Xaa₇₅-Lys-Lys-Xaa₇₆-Xaa₇₇-Pro-Xaa₇₉-Xaa₈₀-Glu-Xaa₈₂-Glu-Glu-Xaa₈₅-Ala-Tyr-Gly-
Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

wherein,

Xaa₅₉ is Glu or Gln;

Xaa₆₂ is Pro or Leu;

Xaa₆₄ is Gly or Asp;

Xaa₆₅ is Pro or Ser;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 59 -

Xaa₆₆ is Pro or Gln;

Xaa₆₇ is His or Gln;

Xaa₆₈ is Leu or Met or Phe or Gln;

Xaa₆₉ is Val or Ile;

Xaa₇₂ is Pro or Leu;

Xaa₇₃ is Ser or Ala;

Xaa₇₆ is Gln or Glu;

Xaa₇₇ is Gly or Arg;

Xaa₇₈ is Trp or Pro or Arg;

Xaa₈₀ is Leu or Val or Met;

Xaa₈₃ is Glu or Lys; and

Xaa₈₅ is Glu or Ala;

GLP-2:

His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Xaa₁₅₂-Xaa₁₅₃-Xaa₁₅₄-Xaa₁₅₅-Xaa₁₅₆-Xaa₁₅₇-Xaa₁₅₈-Leu-Asp-

Xaa₁₆₁-Xaa₁₆₂-Ala-Xaa₁₆₄-Xaa₁₆₅-Xaa₁₆₆-Phe-Xaa₁₆₈-Xaa₁₆₉-Trp-Xaa₁₇₁-Xaa₁₇₂-Xaa₁₇₃-

Thr-Xaa₁₇₅-Xaa₁₇₆-Xaa₁₇₇-Xaa₁₇₈;

wherein,

Xaa₁₅₂ is Ser or Thr;

Xaa₁₅₃ is Asp or Ser;

Xaa₁₅₄ is Glu or Asp;

Xaa₁₅₅ is Met or Phe;

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 60 -

Xaa₁₅₆ is Asn or Ser;
Xaa₁₅₇ is Thr or Lys;
Xaa₁₅₈ is Ile or Val or Ala;
Xaa₁₆₁ is Asn or Ile or His or Ser;
Xaa₁₆₂ is Leu or Lys;
Xaa₁₆₄ is Ala or Thr;
Xaa₁₆₅ is Arg or Gln or Lys;
Xaa₁₆₆ is Asp or Glu;
Xaa₁₆₈ is Ile or Leu;
Xaa₁₆₉ is Asn or Asp;
Xaa₁₇₁ is Leu or Ile;
Xaa₁₇₂ is Ile or Leu;
Xaa₁₇₃ is Gln or Asn or His;
Xaa₁₇₅ is Lys or Pro;
Xaa₁₇₆ is Ile or Val;
Xaa₁₇₇ is Thr or Lys; and
Xaa₁₇₈ is Asp or Glu;

Luteinizing hormone-releasing hormone:Xaa₁-His-Trip-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-OH

wherein,

Xaa₁ is pGlu, 5-oxoPro or Gln.

Melanocyte Stimulating Hormone (MSH):

Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

Atrial Natriuretic Peptide:

H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Xaa₁₃₅-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-
Gln-Ser-Xaa₁₄₂-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH

wherein,

Xaa₁₃₅ is Met or Ile; and

Xaa₁₄₂ is Gly or Ser;

Neuromedin B:

H-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂

Human Neuropeptide Y:

H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-asp-Met-Ala-
Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂

Human Orexin A:

pGlu-Pro-Leu-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-Leu-Tyr-Glu-
Leu-Leu-His-Gly-Ala-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu-NH₂

Human Peptide YY:

H-Tyr-Pro-Ile-Lys-Pro-Glu-Ala-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-Glu-Leu-Asn-Arg-Tyr-Tyr-Ala-Ser-Leu-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂

Human Secretin:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

Vasoactive Intestinal peptide (VIP):

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

Antibiotic peptides such as:**Magainin 1:**

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser

Magainin 2:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser

Cecropin A:

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-Ala-Lys

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 63 -

Cecropin B:

Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-Arg-Asn-Gly-
Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-Lys-Ala-Leu .

Substance P (SP):

Arg-Pro-Leu-Pro-Gln-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-amide

Beta Casomorphin-5:

Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly

Endomorphin-2:

Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂

Procolipase:

100 aa peptide (X1-Pro-X2-Pro-Arg....)

Enterostatin:

Val-Pro-Asp-Pro-Arg

Gastrin Inhibitory Peptide:

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala- Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-
Gln-Asp-Phe- Val-Asn-Trp-Leu- Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-
His-Asn- Ile-Thr-Gln

Chromogranin A**Vasostatin I****Vasostatin II:**

Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met Lys Cys Ile Val
Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met Pro Val Ser Gln Glu Cys Phe
Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu Leu

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 64 -

Lys Glu Leu Gln Asp Leu Ala Leu Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His Gln Gln Lys
Lys His Ser Gly Phe Glu Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn Gln Ser Ser Gln
Ala Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val Met Glu

Procalcitonin**ProNCT****ProCGRP****Chemokine family:****CXC-group:****IL8(monocyte-derived):**

SerAlaLysGluLeuArgCysGlnCys...

GCP-2:

GlyProValSerAlaValLeuThrGluLeuArgCysThrCys...

PF4:

GluAlaGluGluAspGlyAspLeuGlnCysLeuCys...

IP-10:

ValProLeuSerArgThrValArgCCysThrCys...

MIG:

ThrProValValArgLysGlyArgCysSerCys...

SDF-1 α :

LysProValSerLeuSerTyrArgCysProCys...

GRO- α :

AlaProLeuAlaThrGluLeuArgCysGlnCys...

I-TAC:

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 65 -

PheProMetPheLysLysGlyArgCysLeuCys...

CC-group:

RANTES:

SerProTyrSerSerAspThrThrProCys...

LD78:

AlaProLeuAlaAlaAspThrProThrAlaCys...

MIP-1 α :

AlaProMetGlySerAspProProThrAlaCys...

MCP-1:

GlnProAspAlaIleAsnAlaProValThrCys...

MCP-2:

GlnProSerAspValSerIleProIleThrCys...

MCP-3:

GlnProValGlyIleTAsnSerThrThrCys...

MCP-4:

GlnProAspAlaLeuAspValProSerThrCys...

Eotaxin:

GlyProAlaSerValProThrThrCys...

MDC:

GlyProTyrGlyAlaAsnMetGluAspSerValCys...

and functional analogs and derivatives or fragments thereof.

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 66 -

6. A peptide according to claim 5 wherein the peptide sequence is the sequence of a natural peptide and functional analog or a fragment thereof or a clinically safe and acceptable derivative or analog thereof.

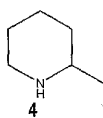
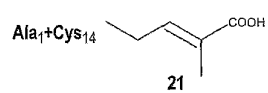
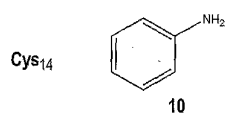
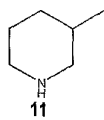
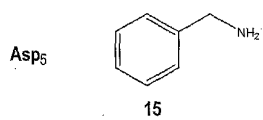
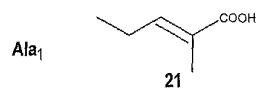
7. A peptide as claimed in claim 1 wherein the peptide sequence is Somatostatin and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said somatostatin peptide sequence via an amide bond at different positions as follows:

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 67 -

Position conformationally rigid moieties



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 68 -

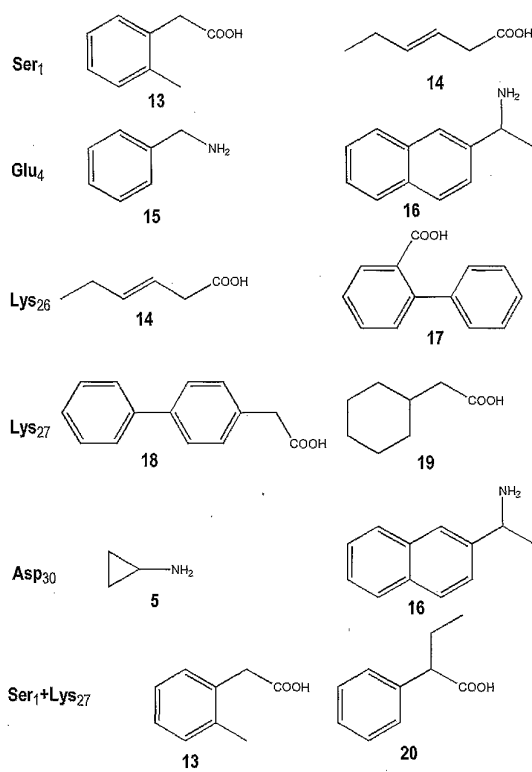
8. A peptide as claimed in claim 1 wherein the peptide sequence is PTH 1-34 and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said PTH 1-34 peptide sequence via an amide bond at different positions as follows:

Position	conformationally rigid moieties
----------	---------------------------------

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 69 -



WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 70 -

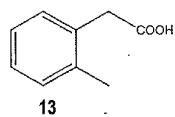
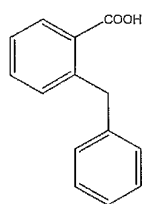
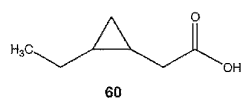
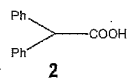
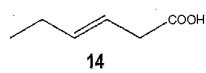
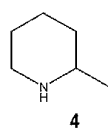
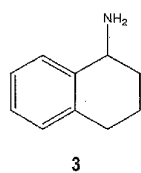
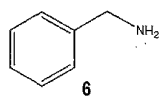
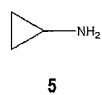
9. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is GLP-1 and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said GLP-1 peptide sequence via an amide bond at different positions as follows:

Position	conformationally rigid moieties
----------	---------------------------------

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 71 -

His₁Glu₃Asp₉

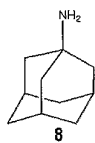
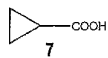
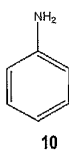
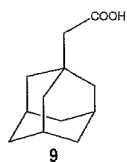
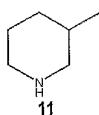
WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 72 -

Position

conformationally rigid moieties

His₁ + Glu₃His₁ + Asp₉Glu₃ + Asp₉

10. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is GLP-2 and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said GLP-2 peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

11. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is Enterostatin and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Enterostatin peptide sequence via an amide bond at different positions of the peptide sequence.

12. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is NPY and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said NPY peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

13. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is NPY and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said NPY peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

14. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is Secretin and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Secretin peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

15. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is Vasoactive Intestinal Peptide and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

- 74 -

Vasoactive Intestinal Peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

16. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is Gastrin Inhibitory Peptide and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Gastrin Inhibitory Peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

17. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is Vasostatin II and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Vasostatin II peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

18. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is RANTES and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said RANTES peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

19. A peptide as claimed in claim 1 wherein said peptide sequence is Eotaxin and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said Eotaxin peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

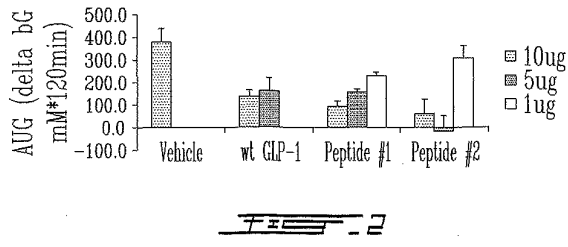
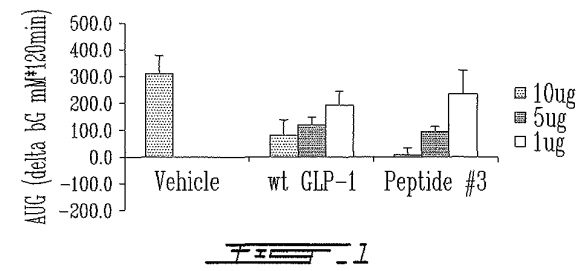
- 75 -

20. A peptide as in any one of claims 1 to 18, wherein said conformationally rigid moiety is coupled with said peptide sequence via an amide or ester bond at the N-terminal.
21. A peptide according to any one of claims 8 to 19, wherein the conformationally rigid moiety has the formula 60 referenced in the description.
22. A peptide according to claim 20, wherein the peptide sequence is GLP-1.
23. Use of the peptide according to claim 22 in the treatment of glucose intolerance associated or not with insuline resistance pathologies.
24. Use according to claim 23 in the treatment of type II diabetes.
25. A peptide according to claim 1 wherein said peptide sequence is CGRP and at least one conformationally rigid moiety is coupled with said CGRP peptide sequence via an amide or ester bond at different positions of the peptide sequence.

WO 02/10195

PCT/CA01/01119

1/1



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/010195 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/605,
14/00, 14/47, A61K 38/04, C07K 14/635, 14/655

(21) International Application Number: PCT/CA01/01119

(22) International Filing Date: 2 August 2001 (02.08.2001)

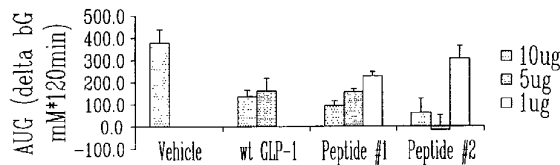
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/222,619 2 August 2000 (02.08.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THER-
ATECHNOLOGIES INC. [CA/CA]; 2310, Alfred-Nobel
Boulevard, Saint-Laurent, Québec H4S 2A4 (CA).(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD,
TG).Published:
with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
3 October 2002(74) Agent: SWABEY OGILVY RENAULT, Suite 1600,
1981 McGill College Avenue, Montréal, Québec H3A 2Y3
(CA).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MODIFIED PEPTIDES WITH INCREASED POTENCY



(57) Abstract: The present invention is concerned with modified biological peptides providing increased potency, prolonged activity and/or increased half-life thereof. The modification is made via coupling through an amide bond with at least one conformationally rigid substituent, either at the N-terminal of the peptide, the C-terminal of the peptide, on a free amino or carboxyl group along the peptide chain, or at a plurality of these sites. Those peptides exhibit clinical usefulness for example in treating states of insulin resistance associated with pathologies such as type II diabetes.

WO 02/010195 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/CA 01/01119	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/605 C07K14/00 C07K14/47 A61K38/04 C07K14/635 C07K14/655	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
A	WO 00 14236 A (THERATECHNOLOGIES) 16 March 2000 (2000-03-16) the whole document --- 7-9, 20, 21, 23, 24
A	WO 96 37514 A (THERATECHNOLOGIES) 28 November 1996 (1996-11-28) the whole document & US 6 020 311 A (THERATECHNOLOGIES) 1 February 2000 (2000-02-01) cited in the application --- 7-9, 20, 21, 23, 24
A	WO 98 08871 A (NOVO NORDISK) 5 March 1998 (1998-03-05) the whole document --- 9, 20, 21, 23, 24
-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 July 2002	26/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Masturzo, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 01/01119

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 34332 A (SOCIETE DE CONSEILS, DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES) 15 June 2000 (2000-06-15) the whole document ---	9,20,21, 23,24
A	WO 00 34331 A (SOCIETE DE CONSEILS ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES) 15 June 2000 (2000-06-15) the whole document ---	9,20,21, 23,24
A	WO 99 43707 A (NOVO NORDISK) 2 September 1999 (1999-09-02) the whole document ---	9,20,21, 23,24
A	US 5 093 233 A (M ROSENBLATT ET AL.) 3 March 1992 (1992-03-03) the whole document ---	8,20,21, 23,24
A	WO 98 01474 A (DOX-AL ITALIA) 15 January 1998 (1998-01-15) the whole document ---	7,20,21, 23,24
A	EP 0 187 622 A (SANDOZ-PATENT GMBH ET AL.) 16 July 1986 (1986-07-16) the whole document ---	7,20,21, 23,24
A	EP 0 030 920 A (CIBA-GEIGY) 24 June 1981 (1981-06-24) the whole document -----	7,20,21, 23,24

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/CA 01/01119

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-6, 10-25

Present claims 1-25 relate to an extremely large number of possible compounds and pertinent methods of use. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds and methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds of claim 7-9 and pertinent methods.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA 01/01119
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 23-24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 1-6, 10-25 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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		
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/CA 01/01119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0014236 A	16-03-2000	US 6020311 A	01-02-2000
		AU 5500799 A	27-03-2000
		BR 9913515 A	05-06-2001
		WO 0014236 A2	16-03-2000
		DE 1109909 T1	23-05-2002
		EP 1109909 A2	27-06-2001
		ES 2164626 T1	01-03-2002
WO 9637514 A	28-11-1996	AT 204881 T	15-09-2001
		AU 697119 B2	24-09-1998
		AU 5683396 A	11-12-1996
		BR 9608799 A	07-12-1999
		CA 2222068 A1	28-11-1996
		WO 9637514 A1	28-11-1996
		DE 69614849 D1	04-10-2001
		DE 69614849 T2	16-05-2002
		DK 828758 T3	07-01-2002
		EP 0828758 A1	18-03-1998
		ES 2163020 T3	16-01-2002
		JP 11505807 T	25-05-1999
		PT 828758 T	28-02-2002
		US 6020311 A	01-02-2000
		US 5939386 A	17-08-1999
		US 5861379 A	19-01-1999
WO 9808871 A	05-03-1998	AU 732957 B2	03-05-2001
		AU 3847897 A	19-03-1998
		AU 4112497 A	19-03-1998
		BR 9711437 A	18-01-2000
		CN 1232470 A	20-10-1999
		CZ 9900629 A3	14-07-1999
		WO 9808871 A1	05-03-1998
		WO 9808872 A1	05-03-1998
		EP 0944648 A1	29-09-1999
		EP 0929576 A1	21-07-1999
		HU 9903714 A2	28-03-2000
		JP 2000500505 T	18-01-2000
		JP 3149958 B2	26-03-2001
		JP 2000517308 T	26-12-2000
		JP 2001011095 A	16-01-2001
		NO 990950 A	28-04-1999
		PL 331896 A1	16-08-1999
		US 6268343 B1	31-07-2001
		US 2001011071 A1	02-08-2001
		US 2002025933 A1	28-02-2002
WO 0034332 A	15-06-2000	AU 1751200 A	26-06-2000
		BR 9916027 A	28-08-2001
		CN 1342166 T	27-03-2002
		CZ 20011895 A3	12-12-2001
		EP 1137666 A1	04-10-2001
		NO 20012787 A	06-08-2001
		WO 0034332 A1	15-06-2000
WO 0034331 A	15-06-2000	AU 1973600 A	26-06-2000
		BR 9915961 A	21-08-2001
		CN 1329620 T	02-01-2002
		CZ 20011748 A3	13-02-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/CA 01/01119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0034331	A	WO 0034331 A2	15-06-2000
		EP 1137667 A2	04-10-2001
		NO 20012786 A	20-07-2001
WO 9943707	A 02-09-1999	AU 2610699 A	15-09-1999
		AU 2610799 A	15-09-1999
		AU 2610899 A	15-09-1999
		WO 9943706 A1	02-09-1999
		WO 9943341 A1	02-09-1999
		WO 9943707 A1	02-09-1999
		EP 1060191 A1	20-12-2000
		EP 1061946 A1	27-12-2000
		EP 1062240 A1	27-12-2000
		JP 2002504518 T	12-02-2002
		JP 2002512175 T	23-04-2002
		JP 2002506792 T	05-03-2002
		US 6268343 B1	31-07-2001
		US 2001011071 A1	02-08-2001
		ZA 9901569 A	27-08-1999
		ZA 9901570 A	02-09-1999
US 5093233	A 03-03-1992	NONE	
WO 9801474	A 15-01-1998	IT MI961408 A1	08-01-1998
		AU 3693097 A	02-02-1998
		WO 9801474 A2	15-01-1998
		EP 0914342 A2	12-05-1999
EP 187622	A 16-07-1986	DE 3511206 A1	09-10-1986
		AU 5184886 A	10-07-1986
		DK 4686 A	08-07-1986
		EP 0187622 A2	16-07-1986
		ES 550692 D0	01-05-1987
		ES 8705469 A1	16-07-1987
		FI 860029 A	08-07-1986
		GR 860010 A1	30-04-1986
		HU 42101 A2	29-06-1987
		JP 61161300 A	21-07-1986
		US 4728638 A	01-03-1988
		ZA 8600115 A	26-08-1987
EP 30920	A 24-06-1981	AT 6251 T	15-03-1984
		AU 544256 B2	23-05-1985
		AU 6534580 A	18-06-1981
		CA 1161033 A1	24-01-1984
		DD 154098 A5	24-02-1982
		DE 3066654 D1	22-03-1984
		DK 532180 A	15-06-1981
		EP 0030920 A2	24-06-1981
		ES 497696 D0	16-11-1981
		ES 8200861 A1	16-02-1982
		FI 803849 A	15-06-1981
		GR 73621 A1	26-03-1984
		JP 56092850 A	27-07-1981
		KR 8500415 B1	26-03-1985
		KR 8500414 B2	26-03-1985
		NO 803757 A	15-06-1981
		NZ 195817 A	06-07-1984

Form PCT/ISA(210) (patent family annex) (July 1992)

Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 01/01119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 30920	A	PT 72191 A ,B	01-01-1981
		US 4369179 A	18-01-1983
		ZA 8007796 A	27-01-1982

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ハビ アブデルクリム

カナダ国 ケベック州 アンジュ シャン ドー 7 9 6 1

(72)発明者 アブリバット ティエリー

カナダ国 ケベック州 モントリオール ハッチソン 4 6 5 9

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA28 BA31 BA44 CA59 DB05 DB06 DB09

DB14 DB21 DB31 DB38 DB41 NA14 ZC35

4H045 AA10 BA10 BA16 BA17 BA18 BA19 BA50 EA20 EA27 FA33