

己リン酸化の阻害である。

【図14A】図14Aは、ベヒクル、Ang2-h38c2、IGF1R抗体(2.12.1.fx)又はMAC-2(IP、1×/週)による治療後の、Colo205大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。データは、n=10/群の0-28日間の平均及びSEとして示す(28日を超える全ての群に対してn=10)。* : P<0.05、IGF1R抗体(2.12.1.fx)10mg/kg対MAC-2、10mg/kg ; ** : P<0.01、Ang2-h38c2対MAC-2 ; 二元Anova、ボンフェローニ事後検定。

【図14B】図14Bは、切除され、そして冷凍された腫瘍から調製された溶菌液中の相対的IGF1R発現レベルである。

【図15A】図15Aは、ベヒクル又はMAC-2(IP、1×/週、0.3-10mg/kg)による毎週のIP治療後の、Colo205大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。データは、n=10/群の平均及びSEとして示す。*** : P<0.001、PBS対MAC-2(全ての投与量) ; 二元Anova、ボンフェローニ事後検定。

【図15B】図15Bは、28日目の最終腫瘍重量である。

【図15C】図15Cは、ベヒクル又はMAC-2(IP、毎週1回)による治療後の、Colo205大腸腺癌異種移植腫瘍の微小血管密度である。

【図15D】図15Dは、切除され、そして冷凍された腫瘍から調製された溶菌液中の相対的Ang2発現レベルである。

【図15E】図15Eは、切除され、そして冷凍された腫瘍から調製された溶菌液中の相対的IGF1R発現レベルである。

【図16A】図16Aは、ベヒクル、Ang2-h38c2(10mg/kg)、IGF1R抗体(2.12.1.fx)(10mg/kg)又はMAC-2(1、3又は10mg/kg)による毎週1回のIP治療後の、Colo205大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。

【図16B】図16Bは、ベヒクル、IGF1R抗体(2.13.2)(10mg/kg)又はMAC-2(10mg/kg)による毎週1回のIP治療後の、Colo205大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。

【図16C】図16Cは、ベヒクル、Ang2-h38c2(10mg/kg)、IGF1R抗体(2.12.1.fx及び2.13.2)(10mg/kg)、MAC-2(1、3又は10mg/kg)或いは2.12.1.fx又は2.13.2(10mg/kg)のいずれかと組合せたAng2-h38c2(10mg/kg)による毎週1回のIP治療後の、Colo205大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。全てのデータは、n=10/群の平均及びSEとして示す。

【図17】図17は、ベヒクル又はMAC-2(IP、週1回)による毎週の治療後のMDA-MB-435黒色腫の腫瘍体積である。* : P<0.05、PBS対MAC-2、20mg/kg ; *** : P<0.01、PBS対Ang2-h38c2、10mg/kg又はMAC-2、3mg/kg ; 二元Anova、ボンフェローニ事後検定。データは、n=10/群の平均及びSEとして示す。

【図18A】図18Aは、m38c2、h38c2、及びヒト生殖系列の可変ドメインのアミノ酸配列の整列である。フレームワーク領域(FR)及び相補性決定領域(CDR)は、Kabata等によって定義されている。星印は、m38c2及びh38c2間又はh38c2及びヒト生殖系列間の差を示す。

【図18B】図18Bは、マウス定常軽鎖カッパ領域(mCLκ)、ヒト定常軽鎖カッパ領域(hCLκ)、及びヒト定常軽鎖ラムダ領域(HCLλ)のアミノ酸配列の整列である。mCLκ及びhCLκ間 ; 並びにhCLκ及びmCLλ間の差は、星印として示し、そして保存された置換(substitution)は、十字で示している。

【発明を実施するための形態】

【0330】

本発明をよりよく理解することができるために、以下の実施例が記載される。これらの

10

20

30

40

50

実施例は、例示のみの目的のためであり、そしていずれもの様式で本発明の範囲を制約すると解釈されるべきではない。

【 0 3 3 1 】

実施例

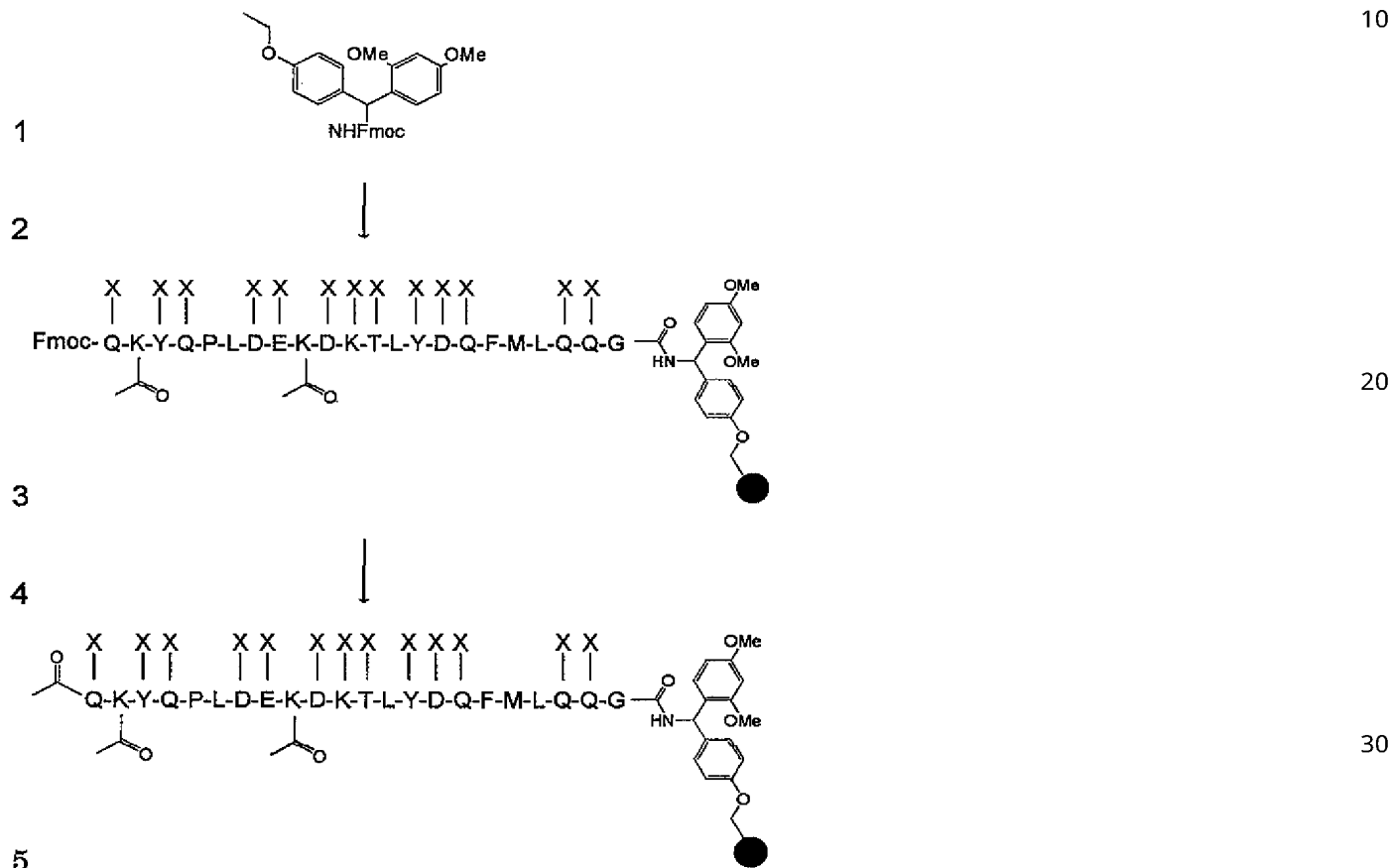
【実施例 1】

【 0 3 3 2 】

実施例 1 本発明で使用されるペプチドの合成

【 0 3 3 3 】

【化 6 8】



Rinkアミド樹脂

Fmoc化学を使用するSPPSのための工程: (i) 20%ピペリジン/DMFによるFmoc除去、(ii) アミノ酸カップリング; 樹脂のアミン付加に対するHBTU:アミノ酸:HOBT:NMM比は、5:5:5:20である。使用する溶媒は、NMPである、(iii) それぞれのアミノ酸カップリングのための工程を繰り返す。X=酸に不安定な側鎖保護基である。

完全に保護された樹脂に結合したペプチドの構築を完了する:

(i) 20%ピペリジン/DMFによるFmoc除去、(ii) アセチル化: 無水酢酸/NMM/NMP。

N-アセチル化され、保護された樹脂に結合したペプチドの構築を完了する。

スキーム 1. Fmoc化学を使用するペプチド鎖の固相合成(典型的なAng2結合ペプチド(ABP)配列番号:27で例示)

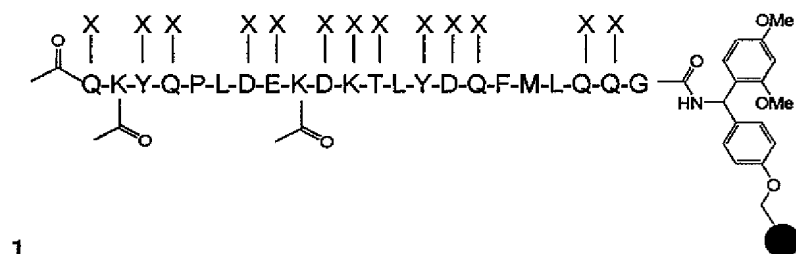
【実施例 2】

【 0 3 3 4 】

実施例 2 : 実施例 1 のように調製したペプチドの樹脂からの開裂。

【 0 3 3 5 】

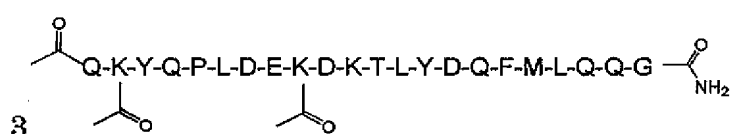
【 化 6 9 】



1

10

2



3

1. N-アセチル化され、保護された樹脂に結合されたペプチドの構築を完了。
2. TFA／水／フェノール／トリイソプロピルシラン(90:4:4:2)。

20

スキーム 2. 樹脂からのABP(配列番号:27)の開裂

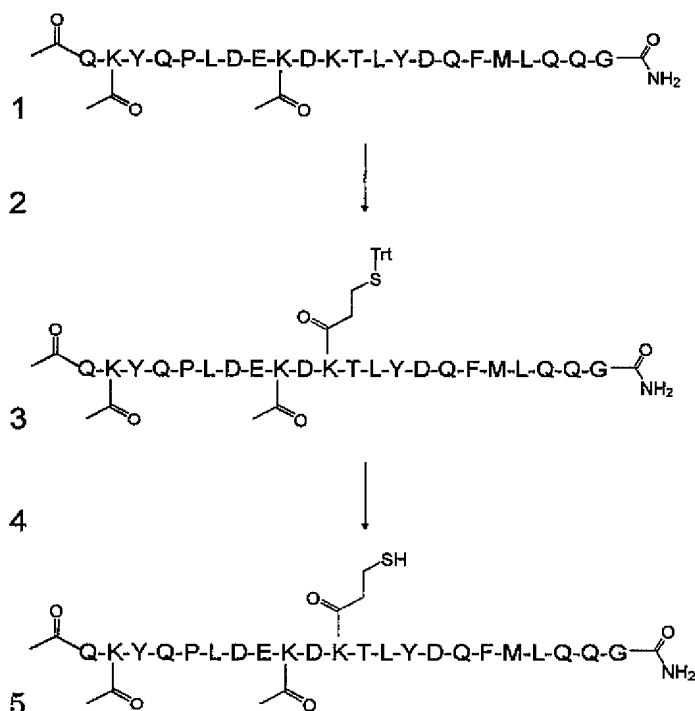
【 実施例 3 】

【 0 3 3 6 】

実施例 3 A B P - チオール - リンカー化合物の合成

【 0 3 3 7 】

【化 7 0】



10

20

1. Ang2結合ペプチド。

2. S-トリチル-メルカプトプロピオン酸/HBTU/NMM(Ang2ペプチドに対して5:5:10の比)。

3. トリチル-保護されたチオールAng2中間体。

4. TFA/DCM/TIPS(5:93:2の比)。

5. チオール保有Ang2修飾ペプチド。

30

スキーム 3: ABP-1-ti(3, 3)(連結残基K(SH)で置換されたK¹¹を伴う配列番号:27)の合成

【0338】

異なった繫留点を伴うAng2結合ペプチド(ABP)の類似体を合成した(実施例1及び2を参照)。最初に、遊離のチオールABP中間体を、合成及び精製し、そして次いでマレイミド-PEG₂-PFPLinkerを加え、続いて最終的な精製工程により、純粋なPFPLで活性化されたABPを得た。ペプチド鎖の構築及び開裂を、スキーム1及び2に概略示すように行って、純粋なABPを産生した。

【0339】

ABP(284mg、0.1mmol)を、ジメチルホルムアミド(0.5ml)中に撹拌しながら溶解した。別に、S-トリチル-メルカプトプロピオン酸(MPA、62mg、概略0.125mmol)、HBTU(48mg、0.125mmol)及びN-メチルモルホリン(0.025ml、0.25mmol)を、DMF(0.5ml)中で溶解するまで5分間撹拌した。ABP溶液及び活性化されたMPA溶液を、2時間一緒に混合した。反応の進行をLCMSによってモニターした。2時間後、溶液を、氷冷のエーテル(40ml)中にゆっくりと加えて、ABS-S-トリチル-MPA生成物を沈殿させた。白色の沈殿物を濾過によって収集し、次いで乾燥した。次いで固体の残渣を、トリフルオロ酢酸のジクロロメタン中の溶液(1:10、10ml)中に溶解し、トリイソプロピルシラン(TIPS)を加え(0.050ml)、そして1時間撹拌した。溶液を減圧下で明るい黄色の油状物まで蒸発し、次いで粗製のチオールペプチドを氷冷のエーテルの添加によって沈殿させた。生成物を遠心によって収集し、そして真空中で乾燥した。残渣

40

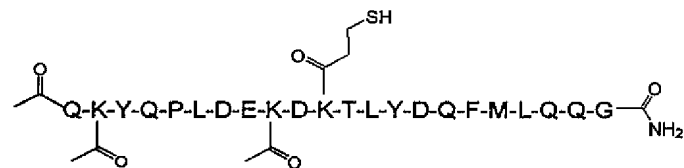
50

をアセトニトリルの50%水溶液中に溶解し、次いで凍結乾燥して、粗製のチオールペプチド（HPLC分析により概略80%の純度）を得た。粗製のチオールペプチドを準分離用HPLCによって精製して、145mgの配列番号：27を得た。

配列番号：27-K(SH)¹¹-MAL-2PEG-PFPの合成

【0340】

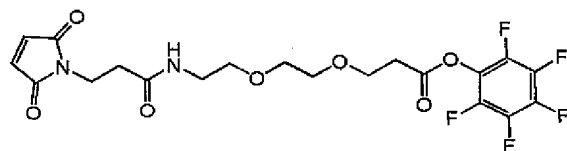
【化71】



10

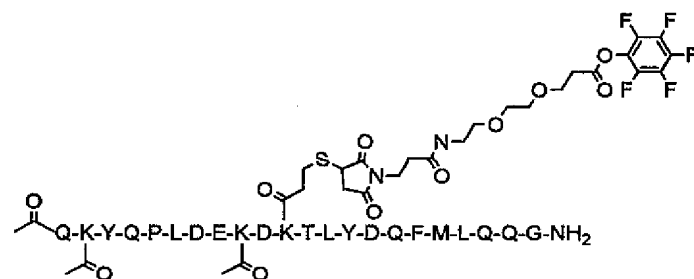
4.1 配列番号:27-K(SH)¹¹

+



4.2 (MAL-2PEG-PFP リンカー)

20



30

4.3 (配列番号:27-K(SH)¹¹-MAL-2PEG-PFP)

スキーム 4 配列番号:27-K(SH)¹¹-MAL-2PEG-PFPの合成

【実施例4】

【0341】

実施例4 Ang-2結合ペプチド-チオール中間体(ABP-ti)の産生

ペプチド鎖の構築を、0.1ミリモル規模で行った。使用した樹脂は、Fmoc-Rink-PL樹脂(150mg、0.67mmol/g置換)であった。標準的なFmoc化学プロトコルを使用して、ペプチドを構築した。Fmocの除去は、20%ピペリジン/DMFで3×5分間であり、そして全ての樹脂の洗浄工程はDMFを使用した。アミノ酸を組込むために、それぞれの残基に対して、HBTU/HOBt/NMM活性化を使用する一回のカップリング工程を2時間使用した。連結残基(K(SH))を、Fmoc-Lys(N^ε-メルカプトプロピオン酸-S-Trt)-OHとして組込んだ。鎖の構築後、N末端のFmoc基を除去し、そしてペプチド樹脂をアセチル化によってキャップした。最終の樹脂をDCMで洗浄し、そして一晩真空中で乾燥した。得られた最終の樹脂の重量は次のとおり：配列番号：29-K(SH)⁹：627mg、配列番号：30-K(SH)¹⁶：573mg、配列番号：31-K(SH)¹⁸：642mg、そして配列番号：32-K(SH)¹⁹：641mgであった。

40

50

【0342】

保護基の加酸分解的 (a c c i d o l y t i c) 除去及び樹脂からのペプチドの開裂は、T F A / 水 / ジチオトレイトール / トリイソプロピルシラン (9 0 : 4 : 4 : 2 の比、5 m l) のカクテルを2時間使用して達成した。溶液を樹脂から濾過し、そして樹脂を更なる5 m l の未希釈のT F A で洗浄した。混合した濾液をシロップ状まで蒸発し、次いで氷冷のエーテルの添加により、白色の粉末が沈殿物した。粉末を遠心によって収集し、次いでアセトニトリルの50%水溶液 (2 0 m l) 中に溶解し、冷凍し、そして一晩凍結乾燥した。

【0343】

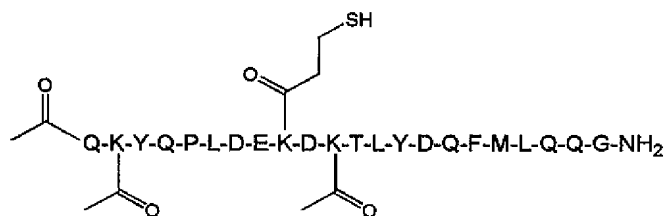
結果：

配列番号：29 - K (S H) ⁹

10

【0344】

【化72】



20

【0345】

得られた粗製の配列番号：29 - K (S H) ⁹ の量は、252 m g であった。H P L C による粗製の配列番号：29 - K (S H) ⁹ の分析は、きれいな主要ピークを示した；5 - 95 % B / 30 分、C 18、R t = 18 . 3 分。粗製の配列番号：29 - K (S H) ⁹ の更なるL C M S 分析は、主要ピークが所望の生成物であることを示した；[M + H] + = 2930、+ 2 = 1465、+ 3 = 977 を観察した。

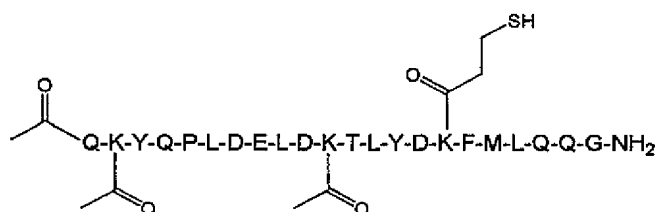
【0346】

配列番号：30 - K (S H) ¹⁶

【0347】

【化73】

30



【0348】

得られた粗製の配列番号：30 - K (S H) ¹⁶ の量は、229 m g であった。H P L C による粗製の配列番号：30 - K (S H) ¹⁶ の分析は、きれいな主要ピークを示した；5 - 95 % B / 30 分、C 18、R t = 22 . 0 分。粗製の配列番号：30 - K (S H) ¹⁶ の更なるL C M S 分析は、主要ピークが所望の生成物であることを示した；[M + H] + = 2915、+ 2 = 1458、+ 3 = 972 を観察した。

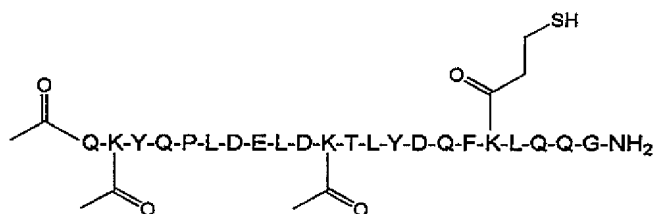
40

【0349】

配列番号：31 - K (S H) ¹⁸

【0350】

【化 7 4】



【 0 3 5 1】

得られた粗製の配列番号：31 - K (S H) ^{1 8} の量は、252 mgであった。H P L Cによる粗製の配列番号：31 - K (S H) ^{1 8} の分析は、きれいな主要ピークを示した；5 - 95 % B / 30分、C18、R t = 21 . 1分。粗製の配列番号：31 - K (S H) ^{1 8} の更なるL C M S分析は、主要ピークが所望の生成物であることを示した；[M + H] + = 2912、+ 2 = 1456、+ 3 = 971を観察した。

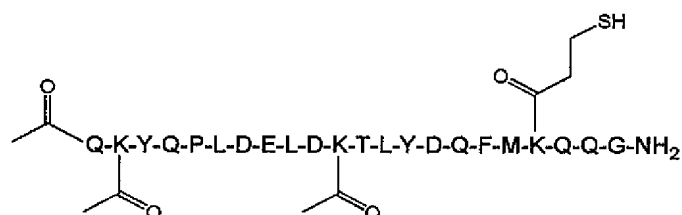
10

【 0 3 5 2】

配列番号：32 - K (S H) ^{1 9}

【 0 3 5 3】

【化 7 5】



20

【 0 3 5 4】

得られた粗製の配列番号：32 - K (S H) ^{1 9} の量は、261 mgであった。H P L Cによる粗製の配列番号：32 - K (S H) ^{1 9} の分析は、きれいな主要ピークを示した；5 - 95 % B / 30分、C18、R t = 20 . 0分。粗製の配列番号：32 - K (S H) ^{1 9} の更なるL C M S分析は、主要ピークが所望の生成物であることを示した；[M + H] + = 2930、+ 2 = 1465、+ 3 = 977を観察した。

30

【 0 3 5 5】

精製：

分離用H P L Cカラムを、T F Aの希釈水溶液及びアセトニトリルで事前平衡した。粗製のA B P - チオール中間体（即ち、連結残基としてK (S H)を伴うA B P）をD M F（3 m l）中に溶解し、次いでカラム上に吸着させ、そして希釈T F A中のアセトニトリルの勾配を適用することによって溶出した。画分を、質量（M = 1465）によって自動的に収集した。カラムからの溶出を、U Vによってモニターし、得られた画分を分析用R P - H P L Cによって分析した。最も純粋な画分（分析用H P L Cにより> 95 %）を混合し、そして凍結乾燥して、次の量：87 mgの純粋な配列番号：29 - K (S H) ⁹、50 mgの純粋な配列番号：30 - K (S H) ^{1 6}、59 mgの純粋な配列番号：31 - K (S H) ^{1 8}、及び39 mgの純粋な配列番号：32 - K (S H) ^{1 9}を得た。

40

【 0 3 5 6】

リンカーの合成

A B Pを、本発明の抗I G F 1 R抗体に共役するために、五つの異なった活性化戦略を考慮した、（実施例5 - 9）（例示的構造は、配列番号：27 - K (S H) ^{1 1}を使用し示す）：

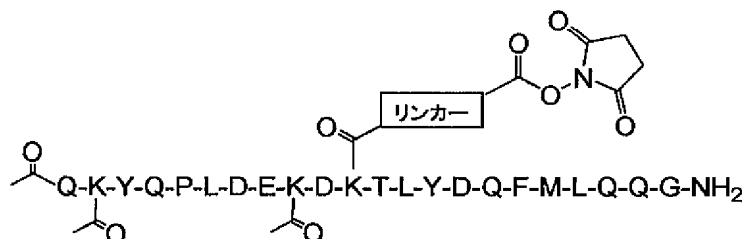
【実施例 5】

【 0 3 5 7】

実施例 5 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル（N H S）（配列番号：27 - K ¹

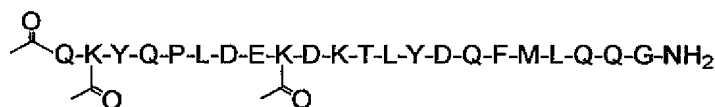
50

¹ - N H S)
【 0 3 5 8 】
【 化 7 6 】

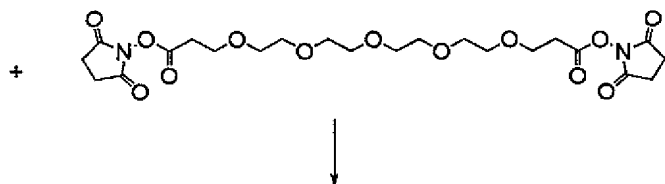


10

N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS) (配列番号:27-K¹¹-NHS)

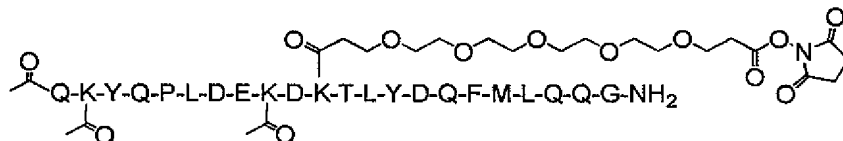


5.1 配列番号:27



20

5.2 ビス-PEG₅-NHS エステル



30

5.3 配列番号:27-K¹¹-5PEG-NHS

スキーム 5 配列番号:27-K(SH)¹¹-5PEG-NHSの合成

【 0 3 5 9 】

配列番号:27-K¹¹-5PEG-NHSの合成

配列番号:27-K(5.1)を、NHSで活性化されたカルボキシル基が最終の活性化されたペプチド精製物(5.3)上に残り、そしてその後の共役のために使用可能なままであるように、ビス-NHS、PEG_x-リンカー(5.2)と反応させた。これは、ABP上の4個の他の遊離カルボキシル基の存在によって必要とされた。これらは、活性化された基の位置が、容易に制御することができず、そしてこれが多数のカルボキシル側鎖が活性化されるものである可能性があるものであるために、簡単な*in situ*の活性化戦略を妨げる。

40

【 0 3 6 0 】

ビス-PEG₅-NHSエステル及びABP(配列番号:27)間の反応を試験した。DMSO中の10倍過剰のリンカーの溶液を使用して、ABP及びN-メチルモルホリン(塩基として)のDMSO中の溶液を、十分に攪拌された溶液中でゆっくりと滴定した。試料を採取し、そしてHPLC及びLCMSによって各種の時点で試験した。約2時間後、かなりの生成物の形成があり(5.1から5.3を形成するための概略80%転換)、そしてこれは、ビス-NHSリンカー試薬から容易に分離された。然しながら、DMSO

50

中でさえ、生成物 5 . 3 は時間をかけて遊離酸の形態にゆっくりと転換された（ここで N H S - エステル基は、不活性な遊離カルボキシルに転換される）。更に、粗製の反応混合物を分画して、所望の生成物 5 . 3 を単離する場合、これは、更に精製及びその後の凍結乾燥行程中に加水分解にさらされた。この方法は、ある程度の生成物を合成することにおいて好結果であったが、得られた N H S - エステルの水に対する不安定性が、その後の結合反応におけるその適用を制約するものであると考えられた。M A L - P E G 2 - N H S の更なる試験を、実施例 3 0 (Z * 基 Z 1 3 を含んでなる) に示す。

【実施例 6】

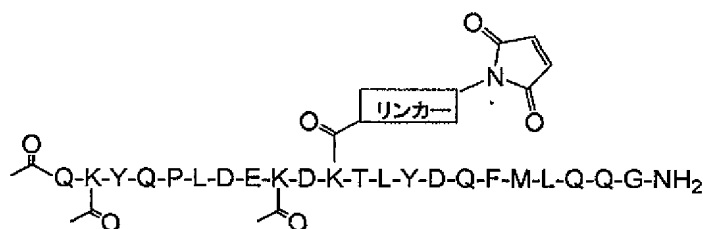
【0361】

実施例 6 マレイミド (M a l) (配列番号 : 2 7 - K ^{1 1} - M a l)

10

【0362】

【化 7 7】



【0363】

20

マレイミド活性化は、一般的に遊離チオール共役パートナーと協調して使用される。抗体 2 . 1 2 . 1 . f x 中に遊離チオール残基は存在しないが、遊離チオールをタンパク質に導入するために使用することができる、幾つかの化学的方法があり、そして従ってマレイミドに基づく共役のための連結部位が提供される。

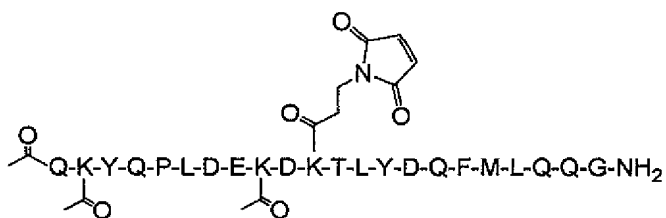
【0364】

M a l 含有ペプチドは、一般的に簡単なマレイミド / 酸含有リンカーを使用して比較的単純に合成される。幾つかの配列番号 : 2 7 - M A L 化合物が以下に示すように合成される。一般的に、マレイミドで活性化されたペプチドは、内因性チオール (遊離システイン側鎖から誘導される) 又は他の化学的手段、例えばトラウト (T r a u t ' s) 試薬によって導入されるチオールのいずれかを欠くタンパク質又は抗体にはよく共役しなかった。

30

【0365】

【化 7 8】



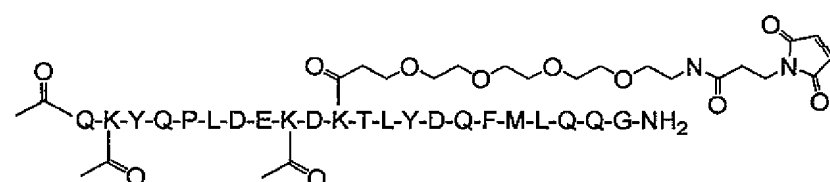
【0366】

40

配列番号 : 2 7 - K ^{1 1} - M a l

【0367】

【化 7 9】



【0368】

50

配列番号：27-K¹¹-4PEG-Ma1-2

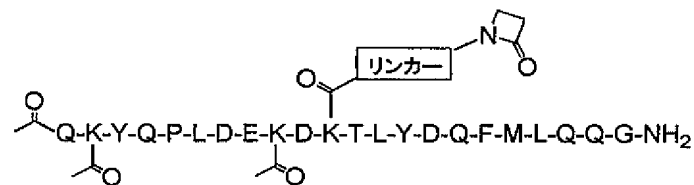
【実施例7】

【0369】

実施例7 アゼチジノン(AZD)(配列番号：27-K¹¹-AZD)

【0370】

【化80】

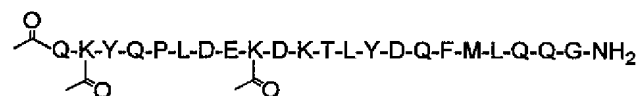


10

配列番号:27-AZD

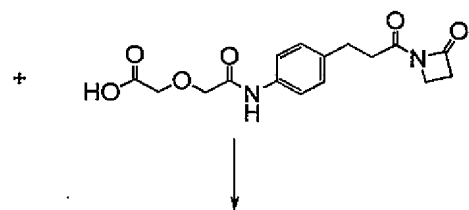
AZDで活性化されたABPを、AZD-酸リンカーをABPに溶液中で接続することによって合成した。

AZD 活性化:

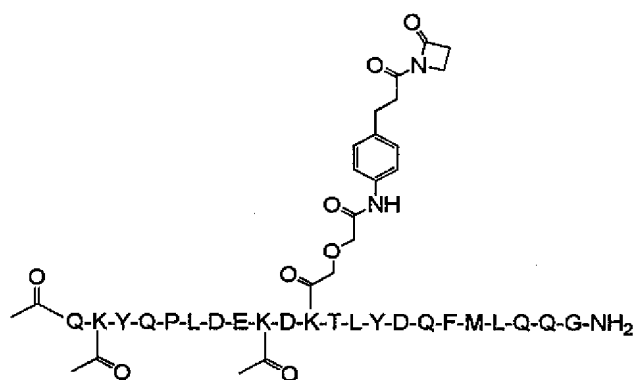


20

6.1 配列番号:27



6.2 AZD-酸リンカー



30

6.3 配列番号:27-K¹¹-AZDスキーム 6: 配列番号:27-K¹¹-AZD(6.3)の合成

【0371】

AZDで活性化されたABPは、リシン側鎖のアミノ酸と非常にゆっくりと反応した。リン酸緩衝液中のpH7ないし9で、共役を試みて、その電荷を減少することによって抗体表面のリシンの求核性の傾向を増加した(表面タンパク質上のリシンのpKaは、約9.1ないし11.2である)。抗体の安定性に伴う問題点及びAZDの加水分解は、9より上のpHの使用を妨げた。15モルのAZDで活性化されたABPを、抗体の1モル当

50

たり) 3 日間の反応時間をかけて加え、低いレベルの共役を得た(抗体当たり平均 2 個の A Z D で活性化された A B P)。塩基性の pH において、A Z D の加水分解が急速に起こり(24 時間後 50%)、減少したレベルの共役に寄与した。

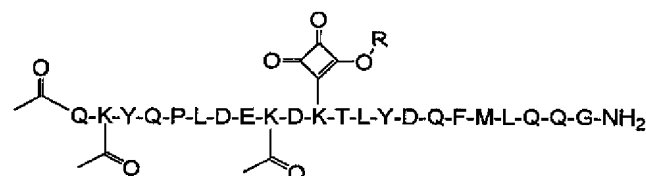
【実施例 8】

【0372】

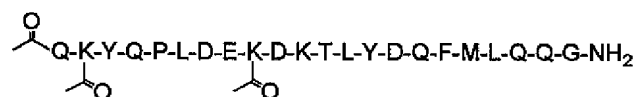
実施例 8 スクアリン酸のエステル(スクアリン酸塩)。(配列番号: 27 - スクアリン酸)

【0373】

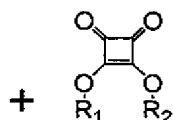
【化 8 1】



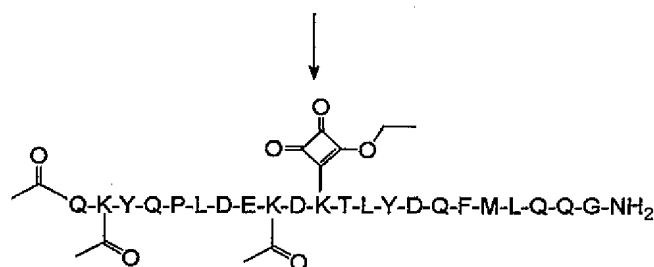
配列番号:27-K¹¹ スクアリン酸-R



7.1 配列番号:27



7.2 R1 及び R2 は、スクアリン酸に誘導され、この実施例において、R1 及び R2 は、両方とも CH₂CH₃ である。



スキーム 7: 7.3 配列番号:27-K¹¹-スクアリン酸-

スキーム 7: スクアリン酸誘導体 配列番号:27-K¹¹-スクアリン酸塩リンカー-1→ABP-1-スクアリン酸塩-1

【0374】

スクアリン酸から製造されたアルキルエステルは、中性の pH でチオールと選択的に反応し、一方高い pH (概略 8.5 以上) において、これらは、更にアミンと、しかし更にゆっくりと反応することができること知られている。スクアリン酸塩の反応性は、アルキル基のアリール基による置換によって有意に向上することができる。本発明は、A B P の幾つかのスクアリン酸塩誘導体を提供し、ここで、'R' の性質(R は、エチル、フェニル、2-メトキシカルボニルフェニル、3-フルオロフェニル及び 3,5-ジフルオロフェニルからなる群から選択される)、及びリンカーの位置が変化する場合、他の誘導体も変化する。スクアリン酸エチルは、遊離チオールによく共役するが、しかしタンパク質及び抗体上の遊離アミンに対して、pH が 9 より上の場合でない限り不良である。スクアリン酸アリールは、本発明の抗体上の遊離リシンに中性の pH で共役する場合、良好な効率

を示す。

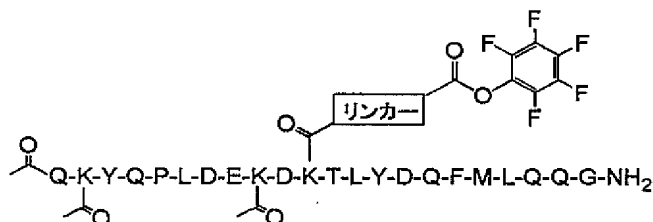
【実施例 9】

【0375】

実施例 9 ペンタフルオロフェニルエステル (P F P) (配列番号 : 27 - P F P)

【0376】

【化 8 2】



10

【0377】

本発明は、更に比較的安定な活性化されたペプチドを形成するためのペンタフルオロフェニル (P F P) エステルの使用を提供する。この方法は、 P F P 基が安定な活性化されたペプチド生成物から溶液中で容易に導入することができ、これ自体は観察される僅かな P F P エステルの加水分解を伴って標準的な H P L C 法を使用して精製することができることにおいて他の方法を超える幾つかの利点を有する。抗体に共役することが可能な反応性基を伴うリンカーに共有的に接続した A B P を合成することにおける挑戦は、 A B S 配列中の四つの酸性側鎖 (三つのアスパラギン酸及び一つのグルタミン酸) の存在である。これらは、一つの酸側鎖上の部位特異的活性化を確実にする既知の簡単な方法がないため、ペプチド及び活性化剤を使用する簡単な活性化戦略を妨げる。

20

【0378】

この問題を解決するために、本発明は、これによって、 P F P のような活性化されたエステル基が、化学選択性反応 (チオール / マレイミド化学を使用して) 又はペプチド側鎖とアミドを形成するが、しかし他の末端を活性なエステルとして残す二重活性なエステルを使用するかのいずれかによって、ペプチド上の側鎖リシンに直接カップリングすることができる合成経路を提供する。

【0379】

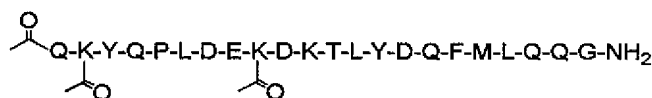
幾つかの態様において、戦略は、 P F P エステルとして活性化されたそれぞれの酸を伴うビス - 酸 P E G であることができる。ある塩基の存在を伴う有機溶液において、ビス - P F P リンカーの末端は、リシンの N - ε - アミノ側鎖と必要な繋留点で反応して、安定なアミド連結を形成し、一方他端は、他の P F P 基を維持した。この戦略に伴う一つの潜在的な問題は、ペプチドが、リンカーのそれぞれの末端に存在する P F P 分子のそれぞれに付加するものであるペプチドダイマーを形成する可能性である。幾つかの側面において、本発明は、化学量論並びにそれぞれのペプチド及びビス - P E G - P F P リンカーの付加を変更することによってこの更なる問題を克服する。本発明によって提供される一つの解答は、ペプチドを超える過剰のリンカーが常に存在するように、過剰のビス - P f p リンカーを溶液中に有し、そして溶液中のペプチドをゆっくりと加えることである。約 3 . 7 : 1 ないし約 4 . 3 : 1 間の比を、又は幾つかの態様において、約 4 : 1 のペプチドを超えるリンカーの比を有することによって、ダイマーの存在を伴わずに必要な P F P で活性化されたペプチドを合成することができる。配列番号 : 27 - K ^{1 1} - 5 P E G - P F P のための合成スキームを、以下のスキーム 8 に示す：

30

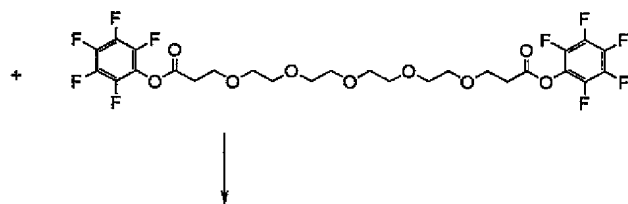
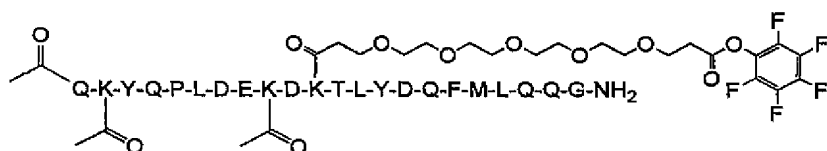
40

【0380】

【化 8 3】



配列番号:27 (8.1)

ビス-dPEG₅-OPfp (8.2)配列番号:27-K¹¹-5PEG-PFP (8.3)スキーム 8 配列番号:27-K¹¹-5PEG-PFP

【0381】

ビス-dPEG₅-OPfpリンカー (8.2) の合成

ビス-dPEG₅-酸 (1 mmol、338 mg) を、無水のジクロロメタン (5 ml) 中に溶解し、次いでペンタフルオロフェノール (2 mmol、368 mg) を、ジシクロヘキシルカルボジイミド (1 mmol、208 mg) と共に加えた。溶液を一晩室温で撹拌した。この時間後、微細な白色のジシクロヘキシル尿素副産物を濾過して除去し、そして濾液を乾燥状態まで蒸発して、淡黄色の軽油状物を得た。TLC 及び HPLC による分析は、正しい MS = 670 を持つ純粋な生成物を示した。生成物を更なる精製無しに次の工程で使用した。生成物は -20 °C で数ヶ月間安定である。

【0382】

配列番号:27-K¹¹-5PEG-PFP (8.3) の合成

配列番号:27 (8.1) (730 mg) を、無水のジメチルホルムアミド (8 ml) 中に溶解し、そして N-メチルモルホリン (0.05 ml) を加えた。未希釈のビス-dPEG₅-OPfp 試薬 (8.2) (0.5 ml) のアリコートガラスバイアル (20 ml) 中に入れた。激しく撹拌しながら、配列番号:27 / NMM 溶液を、4 × 2 ml のアリコートでビス-dPEG₅-OPfp 試薬に 2 時間かけて加え、次いで最終混合物を更に 1 時間撹拌した。配列番号:27-K¹¹-5PEG-PFP 生成物への転換の進行を分析用 HPLC によってモニターした。反応の終わりに、溶液を濾過し、そして 2.54 cm (1") の C8 カラムの準分離用 HPLC によって直接精製した。最も純粋な画分 (分析用 HPLC によって > 95 %) を混合し、そして凍結乾燥して、400 mg (48 % 収率) の最終 ABP-1-5PEG-PFP ペプチドリンカー-2 生成物を得た。類似の機構を、配列番号:27-K(SH)¹¹-マレイミド-2PEG-PFP を產生するために使用することができる (スキーム 4 参照)。

【0383】

マレイミド-2PEG-PFP の合成

【0384】

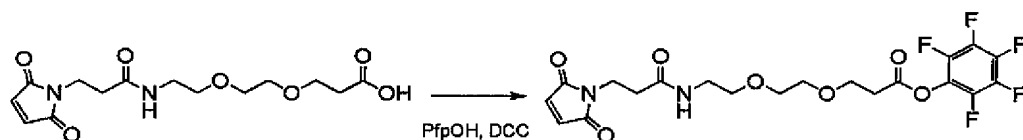
10

20

30

40

【化 8 4】



スキーム 9 マレイミド-dPEG2-酸(9.1)→マレイミド-2PEG-PFP(9.2)

【0385】

10

マレイミド-dPEG₂-酸(328mg、1mmol、Quanta Biodesign)、ペンタフルオロフェノール(0.103ml、1mmol、PFP)及びジシクロヘキシルカルボジイミド(206mg、1mmol、DCC)を、乾燥DCM(10ml)中に溶解し、そして1時間室温で撹拌した。形成した微細な白色の沈殿物(DCU副産物)を濾過によって除去し、そして濾液を乾燥状態まで真空中で蒸発した。生成物を微細な白色の粉末として高い収率(490mg、定量的)で得た。純度は、分析用HPLCによって>95%であった；MSは、 $[M+H]^+ = 495$ を示した。

【0386】

PFPで活性化されたABP類似体の合成

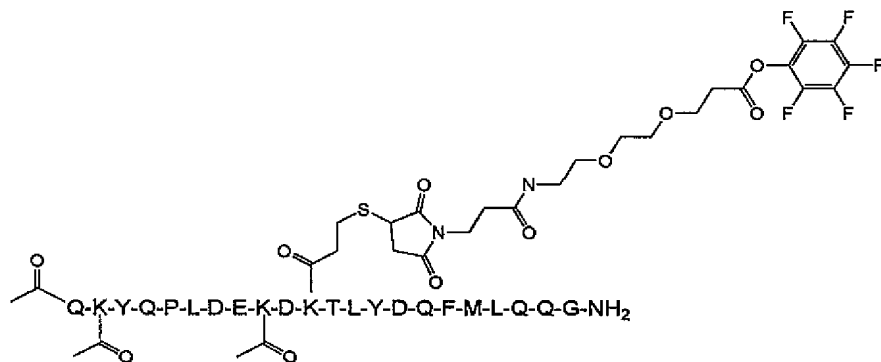
20

精製されたABP-チオール中間体(即ち、連結残渣としてK(SH)を伴うABP)のそれぞれの試料(30-40mg)を、無水のDMF(2ml)中に溶解した。MAL-PEG₂-PFP(20mg)を、N-メチルモルホリン(5mL)と共に加えた。反応物を撹拌し、そして生成物の形成の時間経過を追跡するために室温でモニターした。出発ペプチドのPFPで活性化されたABP生成物への完全な転換は、最初の2時間で観察された。溶液を濾過し、そして生成物のピークを、準分離用HPLCによって直接単離した。それぞれの場合、凍結乾燥後、生成物を概略40%の収率で単離した。

【0387】

【化 8 5】

30



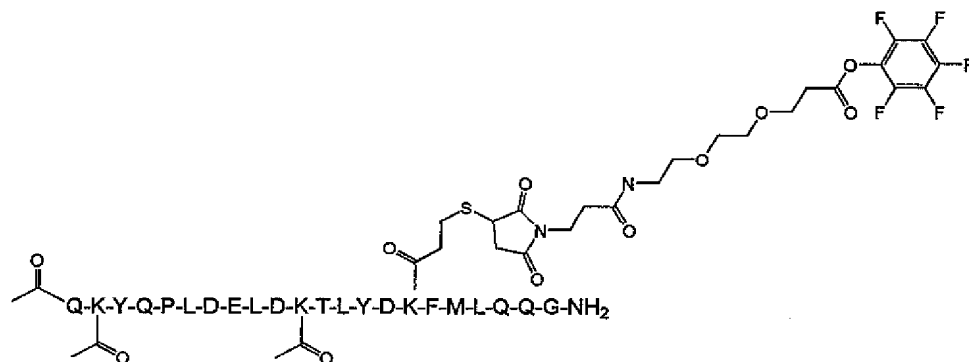
【0388】

40

配列番号：27-K(SH)¹¹-MAL-2PEG-PFP：21mg、

【0389】

【化 8 6】



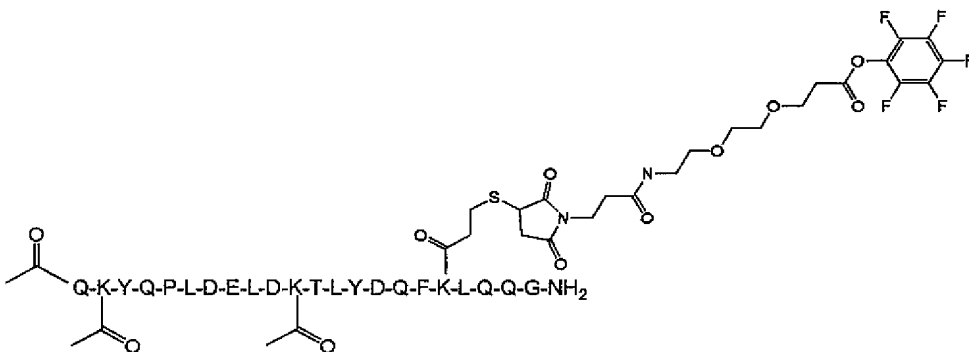
10

【 0 3 9 0】

配列番号：3 0 - K (S H) ^{1 6} - M A L - 2 P E G - P F P : 6 m g、

【 0 3 9 1】

【化 8 7】



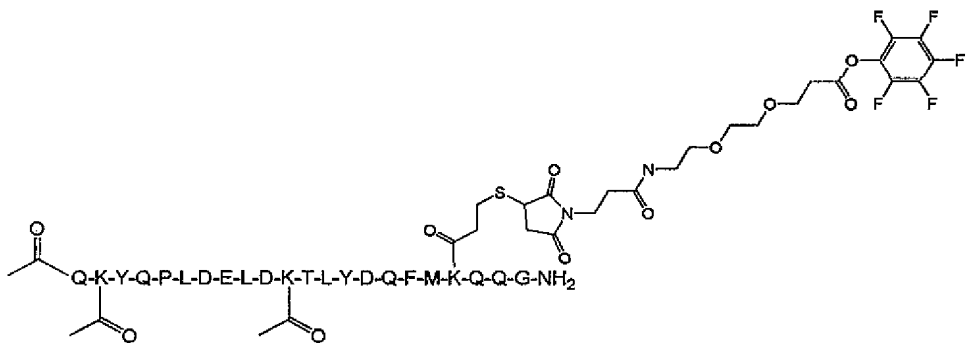
20

【 0 3 9 2】

配列番号：3 1 - K (S H) ^{1 8} - M A L - 2 P E G - P F P : 9 m g、

【 0 3 9 3】

【化 8 8】



30

【 0 3 9 4】

配列番号：3 2 - K (S H) ^{1 9} - M A L - 2 P E G - P F P : 1 2 m g。

【実施例 1 0】

【 0 3 9 5】

実施例 1 0 抗体の結合

MAC - 1 及び MAC - 2 薬物の生成物を、2 . 1 2 . 1 . f x を A n g 2 結合ペプチドと共役することによって製造した。MAC - 1 は、配列番号：2 7 - K (S H) ^{1 1} - M A L - 2 P E G - P F P を伴う 2 . 1 2 . 1 . f x を含んでなり、そして MAC - 2 は、配列番号：2 7 - K ^{1 1} - 5 P E G - P F P を伴う 2 . 1 2 . 1 . f x を含んでなる。それぞれの MAC の試料中の 2 . 1 2 . 1 . f x 分子当たりのペプチド共役の数を計算し

40

50

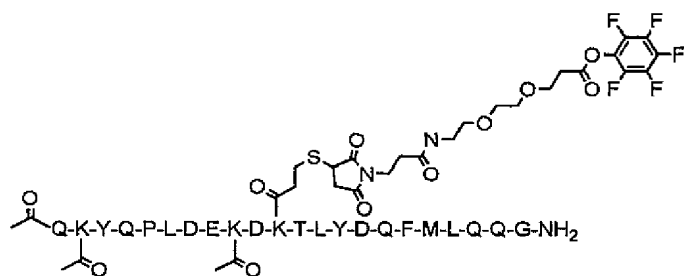
【表 1】

	共役付加 (CA) (%)					
	0	1	2	3	4	平均 CA
MAC-2	2	20	47	26	5	2.12
MAC-1	3	26	42	25	3	1.97

10

M A C - 1 の産生

【化 8 9】

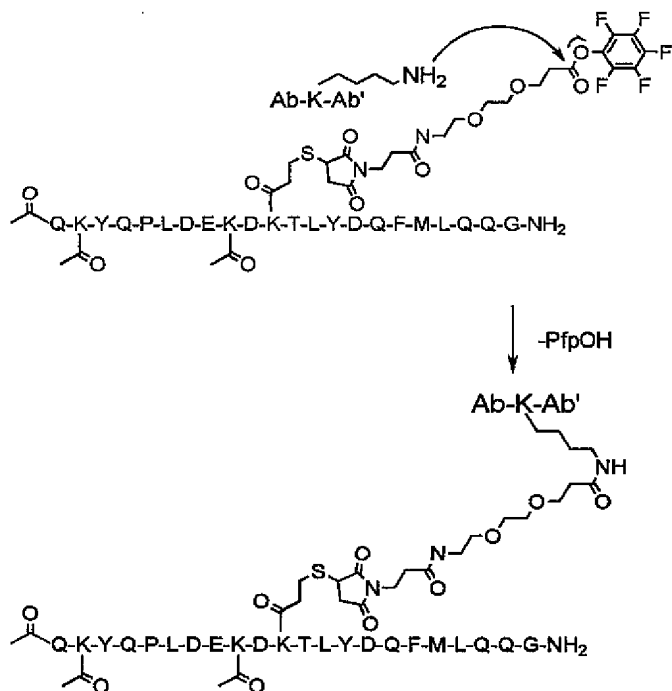


20

配列番号：27-K(SH)¹¹-MAL-2PEG-PFP。

【 0 4 0 0 】

【 化 9 0 】



10

20

MAC-1

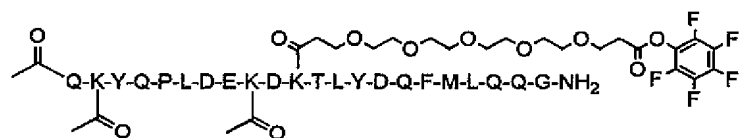
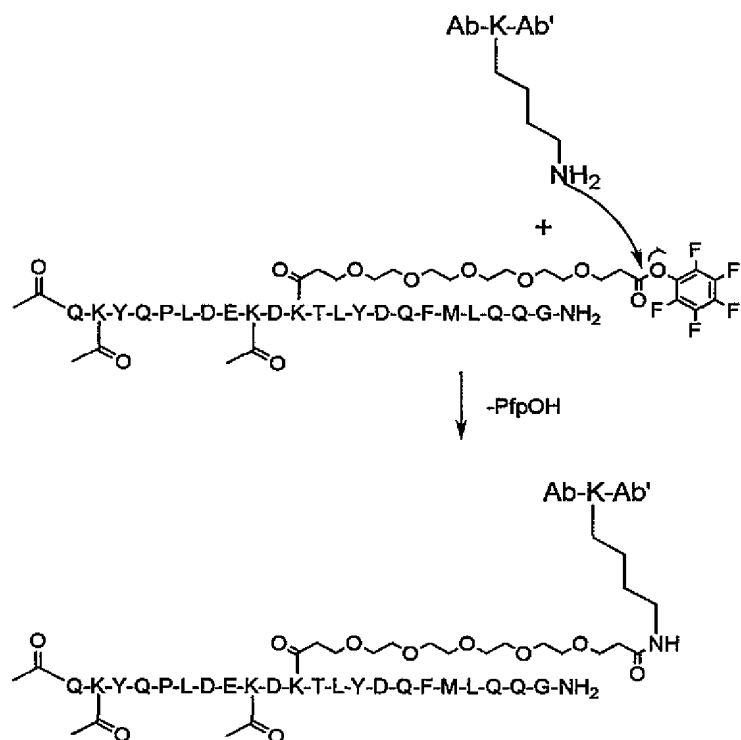
スキーム 10 配列番号:27-K(SH)¹¹-MAL-2PEG-PFPの抗体(Ab-K-Ab)のリシン側鎖との反応:ここで、抗体は2. 12. 1. fxであり、MACは、MAC-1である。

【 0 4 0 1 】

M A C - 2 の 産 生

【 0 4 0 2 】

【化 9 1】

配列番号:27-K¹¹-5PEG-PFP

10

20

30

40

50

MAC-2

スキーム 11: 配列番号:27-K¹¹-5PEG-PFPの抗体(Ab-K-Ab)のリシン側鎖との反応:ここで、抗体は2. 12. 1. fxであり、MACは、MAC-2である。

【実施例 1 1】

【0 4 0 3】

実施例 1 1 P F P ベースの共役のための条件の最適化

方向性共役のための最適反応条件を確立するために一連の実験を行った。それぞれの反応の共役の終了時に、反応をコハク酸塩及びグリシン緩衝液でクエンチし、pHを概略5. 5に低下し、そしていずれもの遊離ペプチド又はペプチド/リンカーをクエンチした。MAC-2の分析を、MACのインタクトな分子量(MW)を、エレクトロスプレー飛行時間型質量分析法検出を、続いてサイズ排除クロマトグラフィーカラムによる塩及び賦形剤からのタンパク質の分離を使用して測定することによって行った。

【0 4 0 4】

温度

2. 12. 1. fx抗体を、pH7. 7で18mg・ml⁻¹に、リン酸緩衝液で0. 06Mのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。ペプチド/リンカー(配列番号:27-K¹¹-5PEG-PFP)を、プロピレングリコール溶液中で10mg・ml⁻¹に再構成した。ペプチド/リンカーを、2. 12. 1. fx抗体に4. 3:1のモル比で加え、そして2時間、18、22、又は25℃で反応させた。結果を表2に示す。

【0 4 0 5】

【 表 2 】

	CA (%)					
温度	0	1	2	3	4	平均 CA
18C	1	16	51	23	8	2.21
22C	3	15	57	21	5	2.11
25C	2	12	53	25	7	2.24

表2: 4. 3:1のペプチド:抗体における0. 06Mのリン酸塩中の反応温度

10

【 0 4 0 6 】

反応 pH

2 . 1 2 . 1 . f x 抗体を、p H 6 . 5、6 . 7 5、7 . 0、7 . 2 5、7 . 5、7 . 7 5、又は 8 . 0 で、 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、リン酸緩衝液で 0 . 0 6 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。配列番号: 2 7 - K^{1 1} 5 P E G - P F P (L 2) を、プロピレングリコール溶液中で $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。ペプチド/リンカーを、2 . 1 2 . 1 . f x 抗体に 4 . 3 : 1 のモル比で加え、そして 2 時間室温で反応させた。結果を表 3 に示す。

【 0 4 0 7 】

20

【 表 3 】

	CA (%)					
pH	0	1	2	3	4	平均 CA
6.5	7	42	41	9	0	1.51
6.75	3	31	52	12	3	1.83
7.0	3	24	53	16	4	1.94
7.25	2	18	54	22	5	2.12
7.5	2	12	57	23	7	2.23
7.75	3	15	55	22	6	2.15
8.0	1	14	52	29	4	2.21

表3: 4. 3:1のペプチド:抗体における0. 06Mのリン酸ナトリウム緩衝液中のpH

30

【 0 4 0 8 】

2 . 1 2 . 1 . f x 抗体を、p H 7 . 0、7 . 5 及び 8 . 0 で、 $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、H E P E S 緩衝液で 0 . 0 2 M の最終濃度に調節した。配列番号: 2 7 - K^{1 1} 5 P E G - P F P を、D M S O 中で $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。ペプチド/リンカーを、2 . 1 2 . 1 . f x 抗体に 5 : 1 のモル比で加え、そして一晩室温で反応させた。結果を表 4 に示す。共役のレベルは、p H 8 . 0 より上で減少した。

40

【 0 4 0 9 】

【 表 4 】

	ABP 付加 (%)					
pH	0	1	2	3	4	平均 CA
7	2	21	41	28	4	2.03
7.5	3	22	44	26	5	2.08
8	9	30	42	17	2	1.73

表4: 5:1のペプチド:抗体における0.02MのHEPES緩衝液中のpH

10

【 0 4 1 0 】

結合反応の時間

2.12.1.f x 抗体を、pH 7.7で18 mg · ml⁻¹に、リン酸緩衝液で0.06 Mのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。配列番号: 27 / 5 P E G - P F Pを、プロピレングリコール溶液中で10 mg · ml⁻¹に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1.f x 抗体に4.3:1のモル比で加え、そして30、60、120、180、240、300、又は2400分間、室温で反応させた(表5)。

【 0 4 1 1 】

【 表 5 】

20

	CA (%)					
時間 (分)	0	1	2	3	4	平均 CA
30	6	38	44	13	0	1.64
60	1	22	52	21	3	2.02
120	0	15	50	29	6	2.24
180	1	12	51	31	5	2.28
240	1	9	51	33	5	2.33
300	1	9	50	35	5	2.35
2400	1	10	48	35	6	2.35

表5: 表3:4. 3:1のペプチド:抗体における0.06Mリン酸ナトリウム緩衝液中の共役反応の時間

30

【 0 4 1 2 】

ペプチドとタンパク質のモル比

2.12.1.f x 抗体を、pH 7.5で18 mg · ml⁻¹に、H E P E S 緩衝液で0.2 MのH E P E S の最終濃度に調節した。配列番号: 27 - K¹¹ 5 P E G - P F Pを、プロピレングリコール溶液中で10 mg · ml⁻¹に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1.f x 抗体に1、2、3、4、及び5:1のモル比で加え(表6)、そして少なくとも2時間、室温で反応させたが、しかし高濃度のH E P E S 緩衝液は、共役の減少したレベルをもたらした。

40

【 0 4 1 3 】

【 表 6 】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
1:1	80	20	0	0	0				0.20
2:1	60	35	5	0	0				0.45
3:1	39	49	12	0	0				0.73
4:1	27	51	19	3	0				0.98
5:1	11	47	37	5	0				1.36

10

表6: 0.2MのHEPES中の1:1-5:1のペプチドとタンパク質のモル比

【 0 4 1 4 】

2.12.1.fx 抗体を、pH 7.7 で $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、リン酸緩衝液で 0.06 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。配列番号: 27 - K¹¹ 5 PEG-PFP を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1.fx 抗体に 5、7、10、12、及び 15:1 のモル比で加え (表 7)、そして 2 時間、室温で反応させて、MAC を高いレベルの共役で産生した。

【 0 4 1 5 】

【 表 7 】

20

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
7:1	1	1	29	39	17	10	2	0	3.06
10:1	1	1	18	33	25	19	3	0	3.49
12:1	3	1	11	22	26	26	8	3	3.92
15:1	1	2	9	19	23	32	12	3	4.22

表7: 0.06Mのリン酸ナトリウム中の7:1-15:1のペプチドとタンパク質のモル比

30

【 0 4 1 6 】

2.12.1.fx 抗体及び配列番号: 27 - K¹¹ 5 PEG-PFP のモル比を更に最適化するために、2.12.1.fx 抗体を、pH 7.7 で $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、リン酸緩衝液で 0.06 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。ペプチド/リンカーを、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1.fx 抗体に 2.5、2.8、3.1、3.4、3.7、4.0、4.3、又は 4.6:1 のモル比で加え (表 8)、そして 2 時間、室温で反応させた。

【 0 4 1 7 】

【表 8】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
2.5:1	14	53	30	4	0				1.25
2.8:1	10	45	37	8	0				1.43
3.1:1	7	39	45	8	0				1.53
3.4:1	5	40	44	11	0				1.61
3.7:1	4	25	51	15	5				1.92
4.0:1	2	26	55	15	2				1.89
4.3:1	1	24	55	16	4				1.98
4.6:1	2	19	56	19	5				2.08

10

表8: 0.06Mのリン酸ナトリウム中の2.5:1-4.6:1のペプチドとタンパク質のモル比

【0418】

2.12.1.fx 抗体を、pH 7.0で、 $2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ に、HEPES 緩衝液で 0.02 Mの最終濃度に調節した。配列番号: 27-K¹¹-5PEG-PFPを、DM SO中で $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1.fx 抗体に、5、6、7、8、10:1のモル比で加え、そして一晩室温で反応させた。結果を表9に示す。

20

【0419】

【表 9】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
5:1	2	21	49	24	4	0	0	0	2.07
6:1	2	15	42	32	9	0	0	0	2.31
7:1	1	11	34	42	13	0	0	0	2.57
8:1	0	9	32	42	16	1	0	0	2.68
10:1	0	4	21	47	25	4	0	0	3.07

30

表9: 0.02MのHEPES中の5:1-10:1のペプチドとタンパク質のモル比

【0420】

各種のタンパク質濃度における2.12.1.fxの共役特性 (conjugation profile)

2.12.1.fxの、各種の濃度における配列番号: 27-K¹¹-5PEG-PFPとの共役特性を分析した。2.12.1.fxを $>50\text{ mg/mL}$ に濃縮し、20 mMの酢酸ナトリウム、pH 5.5の200 mMのトレハロースで所望の濃度に希釈し、そして60 mMのpH 7.7のリン酸ナトリウムと混合した。配列番号: 27-K¹¹-5PEG-PFPを50%のプロピレングリコールで再懸濁し、そして抗体と4.3:1のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を 2 mg/mL に希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー-質量分析法 (SEC-MS) によってインタクトな共役タンパク質として分析して、タンパク質の共役した形態の数及び量を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する; 多数の共役部位は、ペプチドの質量差によって分離される個別のシグナルとして観察される。多数の共役種の相対的な量は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表10は、抗体の各種の濃度における2.12.1.fxのペプチドとの共役特性を示す。 10 mg/mL ないし 50 mg/mL

40

50

/mLの抗体濃度において、共役は、1.8個又はそれより大きい付加の平均で0 - 5個間の付加の分布で起こる。0.5ないし5mg/mLの抗体濃度において、共役は、1.5個又はそれより小さい付加の平均で、0 - 3個間の付加の分布で起こる。

【0421】

【表10】

抗体濃度 (mg/ml)	CA (%)						平均 CA
	0	1	2	3	4	5	
0.5	65	32	3	-	-	-	0.37
1	44	44	12	-	-	-	0.67
5	10	41	40	8	-	-	1.45
10	3	30	47	17	2	1	1.87
15	1	24	51	20	3	1	2.02
20	1	16	57	22	2	1	2.11
30	2	20	55	20	3	1	2.04
40	2	21	53	22	2	0	2.04
50	2	19	50	24	4	1	2.11

表10: 抗体濃度の影響

【0422】

反応緩衝液の選択

2.12.1.f x 抗体を、pH 7.7で18mg・mL⁻¹に、炭酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、又はリン酸ナトリウム緩衝液で、0.05Mのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。配列番号: 27-K¹¹-5PEG-PFPを、プロピレングリコール溶液中で10mg・mL⁻¹に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1.f x 抗体に、1、2、3、4、又は5:1のモル比で加え、そして2時間、室温で反応させた。低い反応pHは、減少したレベルの共役をもたらした(表11)。

【0423】

【表11】

緩衝液	CA (%)					平均 CA
	0	1	2	3	4	
50mM 炭酸ナトリウム pH 7.4	2	24	48	26	0	1.98
50mM ホウ酸ナトリウム pH 7.0	1	17	45	31	5	2.20
50mM リン酸ナトリウム pH 7.0	10	48	38	4	0	1.36

表11: 緩衝液及びpHの変更

【0424】

2.12.1.f x 抗体を、pH 7.5、7.7及び8.0で、18mg・mL⁻¹に、ホウ酸ナトリウム及びリン酸ナトリウム緩衝液で、0.04Mの最終濃度に調節した。配列番号: 27-K¹¹-5PEG-PFPを、プロピレングリコール溶液中で10mg・mL⁻¹に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1.f x 抗体に、4.3:1のモル比で加え、そして2時間、室温で反応させた(表12)。

【0425】

10

20

30

40

【 表 1 2 】

	CA (%)					
緩衝液	0	1	2	3	4	平均 CA
リン酸, pH 7.5	1	21	53	21	3	2.02
リン酸, pH 7.7	0	15	50	29	6	2.26
リン酸, pH 8.0	1	14	52	29	4	2.21
ホウ酸, pH 7.5	46	44	10	0	0	0.64
ホウ酸, pH 7.7	22	51	23	4	0	1.09
ホウ酸, pH 8.0	1	17	48	30	4	2.19

10

表12: 緩衝液及びpHの変更

【 0 4 2 6 】

2 . 1 2 . 1 . f x 抗体を、pH 7 . 7 で $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、リン酸ナトリウム緩衝液で、0 . 0 4 M、0 . 0 6 M、又は0 . 0 8 Mのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。ペプチド/リンカー（配列番号：27 - K¹¹ 5 P E G - P F P）を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。ペプチド/リンカーを、2 . 1 2 . 1 . f x 抗体に4 . 3 : 1のモル比で加え、そして2時間、室温で反応させた。結果を表13に示す。

20

【 0 4 2 7 】

【 表 1 3 】

	CA (%)					
pH 7.7 における リン酸塩の濃度 (mM)	0	1	2	3	4	平均 CA
40	2	23	54	16	4	1.95
60	2	28	51	15	4	1.91
80	2	29	51	13	4	1.86

30

表13: リン酸塩の濃度

【 0 4 2 8 】

共役に対する緩衝液成分の影響

プロピレングリコール： 2 . 1 2 . 1 . f x 抗体を、pH 7 . 7 で、 $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、リン酸ナトリウム緩衝液で、0 . 0 6 Mのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。ペプチド/リンカー（配列番号：27 - K¹¹ 5 P E G - P F P）を、プロピレングリコール溶液（結合反応物中の5%プロピレングリコール）中で $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。ペプチド/リンカーを、2 . 1 2 . 1 . f x 抗体に4 . 3 : 1のモル比で加え、そして更なる0ないし15%のプロピレングリコールと混合し（5、10、15、及び20%の最終プロピレングリコールのパーセント）、そして2時間、室温で反応させた。結果を表14に示す。

40

【 0 4 2 9 】

【表 1 4】

	CA (%)					
プロピレングリコールパーセント(%)	0	1	2	3	4	平均 CA
5	2	18	55	20	5	2.08
10	2	20	53	21	5	2.09
15	2	23	49	20	5	2.01
20	4	23	50	19	4	1.96

表14: 0.06Mのリン酸ナトリウム中のプロピレングリコールのパーセント

10

【0 4 3 0】

塩化ナトリウム: 2.12.1. f x 抗体を、pH 7.0で、2 mg · ml⁻¹に、HEPES 緩衝液で0.02 Mの最終濃度に、0.14 Mの塩化ナトリウムの存在及び非存在中で調節した。配列番号: 27 - K^{1 1} - 5 PEG - PFPを、DMSO中で10 mg · ml⁻¹に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1. f x 抗体に5:1のモル比で加え、そして一晩室温で反応させた。結果を表15に示す。共役のレベルは、塩化ナトリウムの存在中で減少する。

【0 4 3 1】

【表 1 5】

20

	ABP 付加 (%)					
塩化ナトリウム濃度 (mM)	0	1	2	3	4	平均 CA
0	2	21	41	28	4	2.03
0.14	9	34	42	14	1	1.64

表15: 0.02MのHEPES中の塩化ナトリウムの濃度

【0 4 3 2】

HEPES: 2.12.1. f x 抗体を、pH 7.0で、2 mg · ml⁻¹に、HEPES 緩衝液で0.2 M及び0.02 Mの最終濃度に調節した。配列番号: 27 - K^{1 1} - 5 PEG - PFPを、50%のプロピレングリコール中で10 mg · ml⁻¹に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1. f x 抗体に5:1のモル比で加え、そして2時間、室温で反応させた。結果を表16に示す。共役のレベルは、0.2 MのHEPES 緩衝液で減少する。

30

【0 4 3 3】

【表 1 6】

	ABP 付加 (%)					
HEPES 濃度 (mM)	0	1	2	3	4	平均 CA
0.02	2	35	47	16	0	1.77
0.2	21	49	26	4	0	1.13

40

表16: HEPES濃度

【0 4 3 4】

DMSO: 2.12.1. f x 抗体を、pH 7.7で、15 mg · ml⁻¹に、リン酸ナトリウム緩衝液で0.06 Mのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節し、そしてDMSOを30%の最終濃度で加えた。配列番号: 27 - K^{1 1} - 5 PEG - PFPを、プロピレングリコール溶液中で10 mg · ml⁻¹に再構成した。ペプチド/リンカーを、2.12.1. f x 抗体に4:1のモル比で加え、そして2時間室温で反応させた。結果を表17に示す。

50

【 0 4 3 5 】

【 表 1 7 】

	ABP 付加 (%)					
DMSO パーセント	0	1	2	3	4	平均 CA
0	3	28	49	14	6	1.92
30	8	28	32	22	10	1.98

表17: 0. 06Mのリン酸ナトリウム中のDMSO

【 0 4 3 6 】

10

結合（共役）反応のパラメーターの考察

エフェクター分子（この実施例の場合、ペプチド）と抗体のモル比が、約 3 . 5 : 1 より低く減少した場合、共役のレベルは、表 8 に示すように減少する。別の場合として、表 9 は、モル比を増加することが、増加したレベルの共役をもたらすことを示す。抗体当たりのペプチドの数を増加することは、一般的にその抗原（この場合 I G F 1 R 受容体）に対する抗体（この場合 2 . 1 2 . 1 f x ）の結合効率を減少し、従って、ペプチドと抗体のモル比は、抗体 - 抗原、及びペプチド - 同族の結合の両方を最大にするように最適化された。

【 0 4 3 7 】

20

共役緩衝液を変更することは、共役パターンを変更することができることも更に見出された。アミンを含有する賦形剤は、これらが P F P 基と反応することができるため、一般的にあまり好ましくない。炭酸塩及びホウ酸塩のような緩衝液は、共役のために使用することができるが、しかしこれらの p K a （ホウ酸は p K a が約 9 並びに炭酸塩は二つの p K a が約 6 及び約 1 1 ）が、M A C - 1 及び M A C - 2 のために最適として確認された 7 . 7 の共役 p H から離れていた（表 1 1 ）ために回避された。共役のレベルは、反応の化学的条件のみに依存的ではなく、更に時間にも基づいている。2 時間後、殆どの P F P で活性化されたペプチドは、抗体と反応してしまったか、又は P F P Z * は、加水分解されている（表 5 ）。

【 0 4 3 8 】

30

P F P で活性化されたペプチド / リンカーは、リシンの側鎖のアミノ基と急速に反応した。共役は、リン酸緩衝液中の p H 6 . 5 ないし 8 で行われて、抗体表面のリシンの求核性の傾向を、表 3 及び 4 に示すようにその電荷（表面タンパク質上のリシンの p K a は約 9 . 1 ないし 1 1 . 2 である）を減少することによって増加した。

【 0 4 3 9 】

40

M A C - 1 及び M A C - 2 の共役のための最適な条件は、次のように記載される：2 . 1 2 . 1 . f x 抗体を、リン酸緩衝液で 0 . 0 6 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に p H 7 . 7 に調節した。ペプチド / リンカー（配列番号：2 7 - K ^{1 1} - 5 P E G - P F P ）を、プロピレングリコール中で 1 0 m g · m l ^{- 1} に再構成した（反応物中の最終プロピレングリコール濃度は 1 0 % ）。ペプチド / リンカーを、2 . 1 2 . 1 . f x 抗体に 4 . 3 : 1 のモル比で加え、そして 2 時間周囲の室温で反応させた。反応をコハク酸塩及びグリシン緩衝液でクエンチし、p H を概略 6 . 0 に低下させ、そしていずれもの遊離のペプチドをクエンチした。幾つかの側面において、反応混合物を濃縮することができ、そしてペプチド関連種（リンカーが水溶媒との反応によって加水分解されたペプチドのような）及び反応混合物中の他の要素（P F P のような）は、例えば 5 0 k D a 膜を使用するダイアフィльтраーション、又はサイズ排除クロマトグラフィーによって、コハク酸塩、グリシン、塩化ナトリウム、及び 3 0 m g · m l ^{- 1} で p H 5 . 5 のトレハロース緩衝液に除去することができる。

【 0 4 4 0 】

先に列挙した共役条件を、それぞれの工程パラメーターの範囲を決定するために変化させた。パラメーターの範囲は、共役中に起こることができる及び / 又は種の集団中に 1 0

50

%より大きい変化が観察される迄拡大した可変性に基づいて設定した。表 1 8 は、M A C - 2 に対して同様な共役特性をもたらすパラメーターを要約する。

【 0 4 4 1 】

【 表 1 8 】

試験されたパラメーター	試験されたパラメーターの範囲	パラメーターの好ましい範囲	最適反応条件
温度	18-25°C	18-25°C	RT
反応 pH	6.5 ないし 8.0	pH 7.25-8.0	7.7
反応時間	30-2400 分	180- 2400 分	>約 2 時間
ペプチドと抗体のモル比	2.5 ないし 4.6	3.7:1 ないし 4.3:1	4.3:1
共役反応に加えられた 2.12.1.fx 濃度	0.5 ないし 50 mg/mL	10 ないし 50 mg/mL	20mg/mL
反応緩衝液中のリン酸塩濃度	40 ないし 80mM	40-80mM	60mM
最終プロピレングリコール濃度	5 ないし 20%	5-20%	10 %

10

20

表18: MAC-2に対して最適化された工程パラメーター

【 実施例 1 2 】

【 0 4 4 2 】

実施例 1 2 抗体上のリンカー部位

一般的に、スクアリン酸塩及びN H S エステルが、ある状況において使用するためのある程度の可能性を示したが、ハロゲンフェニルエステルを含んでなるZ * 脱離基のみが方向性の共役の一貫したレベルを示した。

【 0 4 4 3 】

5 個の提案されたリンカーの 2 個のみ (P F P エステル及びスクアリン酸塩) が、M A C の調製において好結果であった。求電子性リンカーが、一般的にペプチド (A n g 2 ペプチド (A B P) のような) の抗体 (I G F 1 R 抗体のような) への共役を可能にするものであることを仮定したが、アゼチジノンリンカーは、受容可能な速度におけるペプチドの抗体への共役を可能にしなかった (反応は有意に過剰のアゼチジノンリンカーを要し、そして極端に遅かった) 。表 1 9 に M A C の調製のために使用したそれぞれのリンカーの幾つかの考慮事項を示す。

30

【 0 4 4 4 】

【表 19】

	PFP	スクアリン酸塩
合成の容易さ	チオール／マレイミドの使用により容易、ペプチドへの直接付加は困難	アミンとの反応で容易
リンカーの抗体表面のリシンとの反応の援助となる条件下のペプチド試薬の安定性	遊離酸への加水分解、半減期概略4時間	僅かな加水分解
形成される結合	アミド	スクアラミド
共役の速度	速い	かなり遅い
反応性の変更の容易さ	他のアルコール、例えば、NHS、HOBtの添加により容易。関連する化合物、例えば、テトラフルオロフェノールエステルは、活性が少ない。反応性の増加は、加水分解速度の増加を同時にもたらす。	フェノール上の置換のパターンを変更することによりかなり容易；PFPによる場合、更に反応性な形態は、Lys以外の抗体の他の側鎖との反応を含む副作用にさらされることができる。

10

表19: PFPエステル及びスクアリン酸塩による活性化法

【実施例 13】

20

【0445】

実施例 13 抗体上の共役したペプチドの位置

M A C - 2 薬物生成物分子は、2 . 1 2 . 1 . f x 抗体 (α - I G F 1 R - 1) に、スキーム 11 に記載したような 5 P E G - P F P リンカーを使用して接続した 1 - 4 個の配列番号：27 分子の分布からなる。これは、サイズ排除クロマトグラフィーカラムによる塩及び賦形剤からのタンパク質分離後に、エレクトロスプレー飛行時間型質量分析検出を使用して M A C - 2 のインタクトな分子量 (M W) を測定することによって決定された。2 . 1 2 . 1 . f x 抗体及び M A C - 2 の 3 個のロットのインタクトな分子量 (M W) を示す質量分析データを、図 3 に示す。図 2 A は、共役前の 2 . 1 2 . 1 . f x を示す。これは、単一の M W を示す均一な分子である。M A C - 2 のロットは、2 . 1 2 . 1 . f x に共役したペプチドの分布を示す；1 - 4 個間の共役付加 (C A) が観察される。それぞれの形態の相対的量は、ロット間で一貫し、そしてそれぞれのロット中の最も普通の形態は、それぞれの個々の 2 . 1 2 . 1 . f x 抗体に接続された 2 個のペプチド (配列番号：27) を有する。

30

【0446】

2 . 1 2 . 1 . f x 抗体中のジスルフィド結合を還元することによって、軽及び重鎖を別個に観察することができる。ジスルフィドの還元は、インタクトな 2 . 1 2 . 1 . f x 抗体を 20 m M のトリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) で処理することによって行われる。得られた重及び軽鎖の混合物を、先に記載したようにインタクトな分子量のために分析する。図 3 に示したデータは、2 . 1 2 . 1 . f x 上の A B P の位置に対する証拠を提供する。M A C - 2 のロット中の軽鎖の大部分 (> 65 %) は、共役している。殆どの共役した軽鎖は、1 個の C A を含有する。2 個の C A も低いレベルで更に観察される。殆ど全ての観察された重鎖 (> 90 %) は、非修飾であり、これは、非常に僅かな共役したペプチドが重鎖上に位置することを示唆している。

40

【0447】

ペプチドマッピングを、共役の正確な位置を決定するために使用した。この方法は、次のとおりであった：M A C - 2 のアリコートに 8 M のグアニジン塩酸塩で変性し、ジスルフィド結合を T C E P で還元し、そして得られたシステインスルフィドヒドリルをヨードアセトアミドでアルキル化する。次いでこの処理されたタンパク質の試料を、プロテアーゼキモトリプシン (1 : 125 のプロテアーゼ：M A C の重量比) で消化した。次いで得られ

50

たキモトリプシンペプチドを、C 8 液体クロマトグラフィーカラムによる分離後、質量分析によって個別に検出した。この技術により、M A C - 2 は、キモトリプシンによって、重及び軽鎖上で図 4 中の配列中に注記された（黒丸で）位置において断片に消化された。次いでそれぞれのペプチドの M W の液体クロマトグラフィー - 質量分析（L C - M S ）検出を使用して、どのリシン残基が共役ペプチドによって修飾されたかを決定した。断片が共役ペプチドの接続によって修飾された場合、その M W はそれに応じて変化する。

【 0 4 4 8 】

重鎖の断片 Y 1、Y 6、Y 9、Y 1 0、Y 2 0、Y 2 5、Y 2 6、Y 2 9、Y 3 2、Y 3 3、Y 3 4、Y 3 7、Y 4 0 及び Y 4 3 は、L y s 残基を含有する。これらの中で、ペプチドの共役は、Y 6、Y 1 0、Y 2 5、Y 3 3、及び Y 3 7 において検出された。軽鎖の断片 Y 3、Y 1 0、Y 1 1、Y 1 2、Y 1 3、Y 1 4、Y 1 5、及び Y 1 6 は、L y s 残基を含有する。これらの中で、共役は、Y 3、Y 1 3、及び Y 1 5 において検出された。

10

【 0 4 4 9 】

Y 1 5 と呼ばれる軽鎖断片（軽鎖上の N 末端から 1 5 番目のキモトリプシン断片）は、図 5 に示したデータに基づき共役していることが見いだされた。M A C の修飾された Y 1 5 断片の M W は、明確に検出された。非共役の 2 . 1 2 . 1 . f x 試料において、修飾された Y 1 5 断片の証拠は存在しなかった。非修飾の Y 1 5 断片は、M A C 及び 2 . 1 2 . 1 . f x の両方で観察された。この断片の大きさは、この断片の全てが非修飾の形態で存在するために、2 . 1 2 . 1 . f x 試料において高い。この断片が M A C - 2 中で共役されるため、非修飾 Y 1 5 の観察されるレベルは減少し、これは、図 5 中でより小さい面積を持つピークとして観察される。

20

【 0 4 5 0 】

M A C - 2 の軽鎖断片 Y 1 5 上で観察される配列番号：2 7 - 5 P E G の共役の量は、非修飾の Y 1 5 の減少したピーク面積を測定することによって推定される。非共役の 2 . 1 2 . 1 . f x が、1 0 0 % を示すようにシグナル強度を正規化した後、M A C - 2 の 3 個の独立したロットは、それぞれ 1 7 %、2 7 % 及び 2 2 % の非共役の Y 1 5 断片を示した。

【 0 4 5 1 】

M A C 試料中の Y 1 5 の観察された大きさを、2 . 1 2 . 1 . f x 試料中の Y 1 5 の大きさに正規化した。7 5 - 8 5 % 間の Y 1 5 断片を、M A C - 2 中で修飾されたと決定した。M A C - 2 が殆ど 1 - 2 個の共役付加を含有することを考慮して、これは、M A C - 2 中の共役の殆どが、軽鎖断片 Y 1 5 の 2 個の K 残基（K^{1 8 8} 又は K^{1 9 0}）の一つに位置することを示唆する。2 . 1 2 . 1 . f x の配列に関係する断片 Y 1 5 の位置を、図 4 に示す。

30

【 0 4 5 2 】

トリプシン酵素消化を、K^{1 8 8} 及び K^{1 9 0} 間を識別するために使用した（トリプシンは K 及び R の C 末端に対して特異性を有する）。トリプシンは、共役した K 残基を消化しないため、酵素的消化は、どの K 残基が共役されるかによって異なったペプチドの長さを産生する。トリプシンで消化された M A C - 2 からの L C M S データの試験は、ペプチドが、K^{1 8 8} に特異的に接続する証拠を提供する。修飾された K^{1 9 0} の証拠は、観察されなかった。

40

【 0 4 5 3 】

M A C - 2 を、T C E P で還元し、そして先に記載したようにグアニジン塩酸塩で変性した。タンパク質濃度を、2 m g / m l に、そして p H を 7 . 8 にトリス消化緩衝液で調節した。精製したトリプシンを、1 : 1 2 5 のプロテアーゼ：M A C の重量比で加え、そして 3 0 ° C で 4 時間インキュベートした。試料を、L C M S によって分析するまで、- 2 0 ° C で保存した。断片の試料を、C 1 8 逆相カラムで、水 / アセトニトリル + 0 . 1 % T F A の移動相を使用して分離した。断片の検出を、2 1 4 n m の U V 及び E S I - T O F 質量分析の両方によってモニターした。全てのデータの解析を、M a s s L y n x ソフト

50

性共役は、より低い P K を含む乱雑な非特異的共役によって起こされることができると可能な有害な影響の幾つかを最小にする利益を提供する。

【0460】

この方法の再現性を確立するために、実験を繰り返した。MAC-2 を 2 mg / ml に希釈し、そしてインタクトな共役タンパク質として、サイズ排除クロマトグラフィー - 質量分析 (SEC-MS) によって分析して、タンパク質の共役形態の数及び量を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数の共役部位が、共役されたペプチド / リンカーの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数の共役種の相対的な定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われた。図 8 は、代表的な MAC-2 のスペクトルを示す；定量化のために使用された計算を、表 20 に示す。インタクトな MAC-2 に対する平均共役付加は、次：SUMPRODUCT (共役付加の数 (CA)、CA 当たりパーセント) の式を使用して、2.11 と計算される。この例は、0 - 4 個間のペプチド付加の分布として起こるペプチドの共役を示し、最大の形態は、2 個のペプチド付加であり、そしてペプチド付加の平均数は 2.11 である。多数の個体による再現分析は、共役の特性が一貫し、そして再現可能であることを示す。

10

【0461】

【表 20】

共役付加	予測質量	強度	パーセント
0	149210	1615	1%
1	152350	20533	17%
2	155490	69395	56%
3	158630	27708	22%
4	161770	4818	4%
		124069	100%

20

表20: 共役付加の加重平均:2.11

【0462】

ペプチド結合 (共役) の程度を、2.12.1. f x の軽及び重鎖で別個に試験した。MAC-2 を変性し、そしてジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、LCMS を使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。図 9 は、それぞれの鎖の代表的なスペクトルを示す；定量化のために使用した計算を、表 21 に示す。還元された重鎖 MAC-2 に対する平均共役付加 (平均 CA) は、次：SUMPRODUCT (共役付加の数 (CA)、CA 当たりパーセント) の式を使用して、0.14 と計算され、そして還元された軽鎖 MAC-2 に対する平均 CA は、0.86 と計算された。これらのデータは、共役の位置が軽鎖においてより高いことを証明する；軽鎖上の最も豊富な形態は、一つのペプチド付加を含有し、そして軽鎖は、平均 0.86 個のペプチド付加を含有する。重鎖上の共役は、有意に低いレベルで観察される。多数の個体によるこの実験の再現分析は、共役の特性が一貫し、そして再現可能であることを示す。

30

40

【0463】

【 表 2 1 】

質量 (Da)	共役 付加	種	強度	パーセント	平均 CA
51020	0	HC	102093	86%	
54165	1	HC + (1x) ABP-1	16204	14%	
HC 合計			118297	100%	0.14
23584	0	LC	19752	21%	
26729	1	LC + (1x) ABP-1	68757	72%	
29874	2	LC + (2x) ABP-2	6561	7%	
LC 合計			95070	100%	0.86

表21: 共役の特異的位置を確認するMAC-2のペプチドマッピング評価

10

【 0 4 6 4 】

M A C - 2 を、ジチオトレイトールで還元し、そしてシステイン残基を、ヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化によってアルキル化した。キモトリプシンをタンパク質分解消化のために使用した。溶液中の消化された断片を、液体クロマトグラフィー 質量分析 (L C M S) を使用して分析した。個々の断片を C 1 8 の H P L C カラムで分離し、そしてその正確な質量を四重飛行時間 (Q - T o F) 質量分析器で測定した。得られた断片の質量を使用して、非修飾の断片又は共役ペプチドで修飾された断片を確認した。この実験は、リシン残基を含有するキモトリプシン断片に焦点を当てることによって、これらがペプチド共役のための可能な部位であると解釈された。表 2 2 は、全てのこのような断片の列挙を示す。空白の項目は、この技術を使用して検出されない断片である。ペプチド修飾物質を伴って観察された検出された断片は、共役の潜在的部位であると考えられる。

20

【 0 4 6 5 】

表 1 6 の表の項目を以下に説明する：

- 断片番号：N末端からのキモトリプシン断片番号；連結された断片（即ち、Y 1 - 2）は、欠損した開裂部位を示す。

【 0 4 6 6 】

- 始点 / 終点：N末端からの断片位置の番号。
- ペプチド質量 (D a)：ダルトンで記載された断片の理論的質量。
- 保持時間 (対照 / 分析物)：L C M S 断片マッピング実験におけるクロマトグラフの保持 / 溶出の時間。

30

【 0 4 6 7 】

- M S シグナル強度 (対照 / 分析物)：M S によって観察された観察シグナルの大きさ。
- 質量誤差 - p p m (対照 / 分析物)：断片の理論値対観察質量の比較；> 1 0、そして特にゼロ (0) に近い値は、良好な質量の精度を示す。

【 0 4 6 8 】

- 修飾物質：断片に対する潜在的共有付加；L y s 残基のペプチド - 抗体結合断片、C A M - システイン残基のカルボキシメチル化。
- 星印は、それぞれの断片の修飾された（例えば、共役された）変種を示す。

40

【 0 4 6 9 】

- P e p は、共役されたペプチドを示す。
- Y 1 5 断片へのペプチドの方向性共役は、共役レベルを定量化することによって示される。次の分析は、2 . 1 2 . 1 . f x 基準生成物のペプチドマッピング実験中に共役を有することが観察されたそれぞれのペプチド断片に対して行われた。共役された基準生成物 (M A C - 2) と比較した、非共役対照 (2 . 1 2 . 1 . f x 抗体骨格 - 共役無し) 中の非修飾ペプチドに対して観察されたシグナル強度の比を、表 2 3 に示す。それぞれの試料の同じペプチドの直接の比較が可能であるため、非修飾シグナルが使用される。例えば、非共役ペプチドは、一 (1) の比をもたらず、対照対生成物試料の同じ観察されたシグナル強度を有することが予測されるものである。共役は、生成物試料中の非修飾ペプチドの

50

観察される量の減少をもたらすものであり、これは、－（１）より大きい比によって示されるものである。表２３のデータは、対照及び生成物間の試料並びに実験の変動を補正するために更に正規化される。表２３は、軽鎖ペプチドＹ１５が、それぞれの他の共役されたペプチドより有意に高いレベルで共役されることを示す。これは、共役が、方向性の様式で起こり、そしてＫ残基間に無作為に分布されないことを示唆する。

【 ０ ４ ７ ０ 】

【 表 2 2 - 1 】

断片 番号	始点	終点	ペプチド 質量 (Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		修飾物質
				対照	分析物	対照	分析物	対照	分析物	
Y1	1	27	2617.3533							
Y1-2	1	29	2865.4695							
Y5-6	34	47	1657.8398							
Y6	37	47	1253.688	19.2	19.2	516640	583534	1.9	-1.1	
Y6-7	37	50	1602.8518	22.1	22.1	26537	37988	-1.6	-2.2	
Y6-7*	37	50	3295.7017		21.8		6316		-19.4	Pep(1)
Y8-9	51	68	1931.9337	16.5	16.5	60894	85742	-2.2	0.4	
Y9	61	68	878.461	11.3	11.3	376224	412997	0	-1	
Y9-10	61	80	2241.1501							
Y10	69	80	1380.6997	13.3	13.3	261813	299847	-1.1	0.7	
Y10*	69	80	3073.5498		23.4		6350		-8.7	Pep (1)
Y10-011	69	94	2972.4661							
Y19-20	111	157	4748.2773							
Y20	116	157	4160.0405							
Y20-21	116	166	5202.5527							
Y20-21*	116	166	5316.5957	34.1		6445		0.5		CAM(2)
Y24-25	202	245	4702.2109							
Y25	207	245	4151.9722							
Y25*	207	245	4437.0796	20.9	20.9	1495322	1800079	1.1	-3.1	CAM(5)
Y25*	207	245	6129.9297		24.4		6652		-4.5	CAM(5) Pep(1)
Y25-26	207	279	7985.9092							
Y26	246	279	3851.9478							
Y26-27	246	281	4152.0698							

表22 MAC-2重鎖参考生成物のペプチドマッピングの特徴

【表 2 2 - 2】

断片 番号	始点	終点	ペプチド 質量 (Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		終点
				対照	分析物	対照	分析物	断片 番号	始点	
Y28-29	282	300	2245.1128							
Y29	283	300	2082.0493	14.6	14.6	20665	16662	-0.6	-3.8	
Y29-30	283	304	2531.2405							
Y31-32	305	323	2241.1907							
Y32	318	323	722.3599	7.9	7.9	93966	96639	0.1	2.6	
Y32	318	323	722.3599	17.7	18.4	37943	12802	11.4	30.6	
Y32	318	323	722.3599	18.4		11761		23.8		
Y32-33	318	353	4028.188							
Y33	324	353	3323.8386	20		5422		3.1		
Y33*	324	353	3380.8601	19.7	19.7	2196329	2497507	-2.5	-3.1	CAM(1)
Y33*	324	353	5073.71		24		5973		1.3	CAM(1) Pep(1)
Y33-34	324	376	5883.1577							
Y34	354	376	2577.3293							
Y34-35	354	385	3637.8159							
Y34-35*	354	385	3694.8374	33	32.9	10095	20682	1.9	-2.4	CAM(1)
Y36-37	386	408	2527.0808							
Y37	396	408	1394.6388	19.6	19.6	62942	71902	-0.9	-0.4	
Y37-38	396	409	1541.7072	25.1	25.1	827336	878570	0	-1.9	
Y37-38*	396	409	3234.5571		29.7		7749		-5.3	Pep(1)
Y39-40	410	421	1494.8195							
Y40	412	421	1218.672	15.8	15.8	77917	88243	-0.3	-1.6	
Y40-41	412	427	1891.9905	20.3	20.3	107513	149676	0.2	-2	
Y42-43	428	450	2525.1792							
Y43	441	450	1016.5502							

表22 (続き) MAC-2重鎖参考生成物のペプチドマッピングの特徴

【 表 2 2 - 3 】

断片 番号	始点	終点	ペプチド 質量 (Da)	保持時間		MS シグナル強度			質量誤差(ppm)		終点
				対照	分析物	対照	分析物	断片 番号	始点		
Y2-3	36	49	1688.9725	16.2	16.2	145374	170451	-1.7	-2.6		
Y2-3*	36	49	3381.8225		24.2		7192		-9.2	Pep(1)	
Y3	37	49	1525.9093	15.5	15.5	331068	393638	-2.7	-2.9		
Y3*	37	49	3218.7593		24		28193		-9	Pep(1)	
Y3-4	37	62	2882.6355								
Y9-10	88	116	3244.729								
Y10	99	116	1871.0992								
Y10-11	99	139	4331.335								
Y11	117	139	2478.2463		22.8		47035		-5.9		
Y11-12	117	148	3635.8445								
Y12	140	148	1175.6088								
Y12-13	140	173	3886.8245								
Y13	149	173	2729.2263	13.1	13.1	1140556	1218022	-1.1	0.1		
Y13*	149	173	4422.0762		21.4		8424		-6.5	Pep(1)	
Y13-14	149	186	4095.9243								
Y14	174	186	1384.7086								
Y14-15	174	192	2169.1318								
Y15	187	192	802.4337	7.5	7.5	275639	62720	-1.9	-0.2		
Y15*	187	192	2495.2837		20.9		936267		-9.8	Pep(1)	
Y15-16	187	209	2574.29								
Y16	193	209	1789.8668	18.7		5400		4.4			
Y16*	193	209	1846.8883	18.1	18.1	169490	235914	-1.7	-2.5	CAM(1)	
Y16-17	193	214	2349.0842	17.8		9211		0.1			

表22 MAC-2 軽鎖参考生成物のペプチドマッピングの特徴

10

20

30

40

【表 2 3】

断片	非修飾強度比: 対照/分析物- 正規化済
軽鎖 Y3	1.000
軽鎖 Y13	1.112
軽鎖 Y15	5.218
重鎖 Y6	0.831
重鎖 Y10	1.038
重鎖 Y25	0.988
重鎖 Y33	1.045
重鎖 Y37	1.120

10

表23: 軽鎖上のY15断片へのペプチドの方向性共役

[実施例 1 3]

【 0 4 7 4 】

実施例 1 3 Ang 1 - 4 結合 E L I S A

20

ハイバインディングハーフウェル (High - binding half - well) プレート、50 μ l の P B S 中の組換えヒト Ang 1、ヒト Ang 2、マウス Ang 3 又はヒト Ang 4 (全ての試薬は R & D Systems から、250 μ g / m l) で被覆し、そして 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。プレートを 3 回洗浄緩衝液 (0 . 1 % の T w e e n 2 0、P B S、p H 7 . 4) で洗浄し、そして 150 μ l / ウェルの S u p e r b l o c k で室温で 1 時間遮断した。プレートを 3 回洗浄緩衝液で洗浄した。洗浄後、調製した投与溶液 (範囲 : 0 . 0 0 5 - 5 0 , 0 0 0 n g / m l) をプレートに加え、そして 1 時間インキュベートして、プレート上の被覆された Ang ファミリーのメンバーへの化合物の結合を可能にした。それぞれのアンギオポイエチンに対する正の対照は、それぞれのファミリーメンバー (R & D Systems によって供給された) に対するモノクローナル又はポリクローナル抗体のいずれかを含んでいた。プレートを 3 回洗浄し、そして 50 μ l の H R P と共役した抗ヒト I g G (0 . 8 μ g / m l) (又は正の対照に対してそれぞれの種) を加え、そして室温で 1 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、そして 50 μ l (25 μ l の T M B + 25 μ l の H ₂ O ₂) の基質溶液を加え、そして 1 - 5 分間インキュベートした。発色を 25 μ l の 2 M の H ₂ S O ₄ で停止した。450 n m の O D を、450 n m の補正波長で測定した。

30

【実施例 1 4】

【 0 4 7 5 】

実施例 1 4 Ang 2 の逆競合アッセイ

40

Ang 2 の逆競合 E L I S A のために、ヒト T i e 2 - F c、アンギオポイエチン - 2 タンパク質、ビオチニル化抗ヒト Ang 2 抗体、及びストレプトアビジン H R P (R & D Systems) 並びに P i e r c e から T M B 基質を使用した。ハイバインディングハーフウェルプレートを、50 μ l の P B S 中の T i e 2 - F c (50 n g / ウェル) で被覆し、そして 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。プレートを 3 回洗浄緩衝液 (0 . 1 % の T w e e n 2 0、P B S、p H 7 . 4) で洗浄し、そして 150 μ l / ウェルの S u p e r b l o c k で室温で 1 時間遮断した。プレートを 3 回洗浄した。洗浄後、S u p e r b l o c k 中の 50 n g / m l (0 . 83 n M) の Ang 2 の存在中の 50 μ l の Ang 2 結合ペプチド化合物 (50 n M、一連の 5 $\times$ 希釈) を加え、そして室温で 1 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、S u p e r b l o c k 中の 50 μ l の 1 μ g / m l のビオチニル化抗 Ang 2 検出抗体を加え、そして 2 時間室温でインキュベートした。

50

プレート を 3 回 洗 浄 し、そし て 5 0 μ l の ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン H R P (S u p e r b l o c k 中 の 1 : 2 0 0 希 釈) を 室 温 で 2 0 分 間 で 加 え た。プ レ ー ト を 3 回 洗 浄 し、そし て 5 0 μ l (2 5 μ l の T M B + 2 5 μ l の H ₂ O ₂) の 基 質 溶 液 を 加 え、そし て 2 0 - 3 0 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。発 色 を 2 5 μ l の 2 M の H ₂ S O ₄ で 停 止 し た。4 5 0 n m の O D を、5 4 0 n m の 補 正 波 長 で 測 定 し た。I C ₅₀ 値 (A n g 2 - T i e 2 結 合 の 5 0 % 阻 害) を、P r i s m 4 ソ フ ト ウ ェ ア 中 の 非 線 形 S 字 状 用 量 - 反 応 曲 線 フ ィ ッ テ ィ ン グ 機 能 を 使 用 し て 計 算 し た。

【 0 4 7 6 】

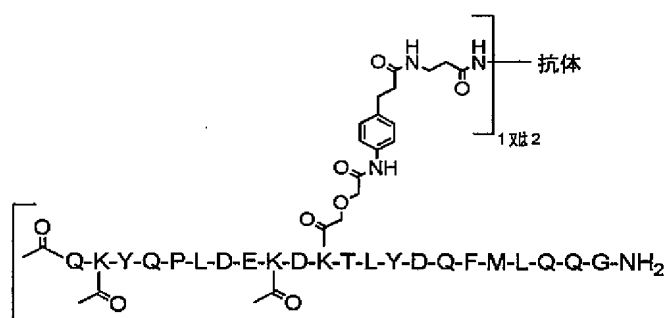
A n g 2 - h 3 8 C 2 - I g G 1 を、ある 実 施 例 に お け る 対 照 と し て 使 用 し た。A n g 2 - h 3 8 C 2 の 産 生 及 び 構 造 は、W O 2 0 0 8 0 5 6 3 4 6 中 の 化 合 物 4 3 と し て 完 全 に 記 載 さ れ、そ の 内 容、化 合 物 4 3 の 産 生 に 関 す る 側 面 に 対 す る 特 別 な 言 及 は、本 明 細 書 中 に 組 込 ま れ る。簡 単 に は、構 造 は、以 下：

10

【 0 4 7 7 】

【 化 9 4 】

20



【 0 4 7 8 】

の と お り で あ り、式 中、そし て リ ン カ ー は、抗 体 の 結 合 部 位 の K ^{9 9} (K a b a t 番 号 に よ り K ^{9 3}) の ϵ - ア ミ ノ 基 に 共 有 的 に 接 続 し、そし て 抗 体 は、h 3 8 C 2 - I g G 1 (配 列 番 号：5 1 及 び 5 2) (W O 2 0 0 8 / 0 5 6 3 4 6 の 配 列 番 号：1 8 9 及 び 配 列 番 号：1 9 0) で あ る。

【 実 施 例 1 5 】

【 0 4 7 9 】

30

実 施 例 1 5 I G F 1 R 競 合 ア ッ セ イ

I G F 1 R 競 合 E L I S A の た め に、組 換 え ヒ ト I G F 1 R (R & D S y s t e m s)、ビ オ チ ニ ル 化 I G F 1 (G r o P e p L t d .) ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン - ポ リ - H R P 2 0 (S D T)、S u p e r b l o c k、及 び T M B 基 質 (P i e r c e) を 使 用 し た。ハ イ バ イ ン デ ィ ン グ ハ ー フ ウ ェ ル プ レ ー ト を、5 0 μ l の P B S 中 の I G F 1 R (6 2 . 5 n g / ウ ェ ル) で 被 覆 し、そし て 4 $^{\circ}$ C で 一 晩 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。プ レ ー ト を 3 回 洗 浄 緩 衝 液 (0 . 1 % の T w e e n 2 0、P B S、p H 7 . 4) で 洗 浄 し、そし て 1 5 0 μ l / ウ ェ ル の S u p e r b l o c k で 室 温 で 1 時 間 遮 断 し た。プ レ ー ト を 3 回 洗 浄 緩 衝 液 で 洗 浄 し た。洗 浄 後、S u p e r b l o c k 中 の 1 0 0 n g / m L (1 3 . 3 n M) の ビ オ チ ニ ル 化 I G F 1 の 存 在 中 の 5 0 μ l の I G F 1 R 結 合 化 合 物 (1 μ M、一 連 の 5 $\times$ 希 釈) を 加 え、そし て 室 温 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。プ レ ー ト を 3 回 洗 浄 し、そし て 5 0 μ l の ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン - ポ リ - H R P 2 0 (S u p e r b l o c k 中 の 1 : 5 0 0 0 希 釈) を 室 温 で 2 0 分 間 で 加 え た。プ レ ー ト を 3 回 洗 浄 し、そし て 5 0 μ l (2 5 μ l の T M B + 2 5 μ l の H ₂ O ₂) の 基 質 溶 液 を 加 え、そし て 5 - 1 0 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。発 色 を 2 5 μ l の 2 M の H ₂ S O ₄ で 停 止 し た。4 5 0 n m の O D を、4 5 0 n m の 補 正 波 長 で 測 定 し た。I C ₅₀ 値 (I G F 1 と I G F 1 R の 結 合 の 5 0 % 阻 害) を、P r i s m 4 ソ フ ト ウ ェ ア 中 の 非 線 形 S 字 状 用 量 - 反 応 曲 線 フ ィ ッ テ ィ ン グ 機 能 を 使 用 し て 計 算 し た。

40

【 実 施 例 1 6 】

【 0 4 8 0 】

50

実施例 16 IGF1誘導IGF1R自己リン酸化阻害アッセイ

IGF1R自己リン酸化阻害アッセイのために、ヒトIGF1Rを発現するように操作されたマウス3T3細胞を使用し、そしてリン酸化を、Cell Signaling Technologiesのホスホ-IGF1受容体 β (Tyr1131) サンドイッチ ELISAキット#7302によって決定した。ヒトIGF1Rを発現しているインタクトな細胞を、96ウェルの組織培養処理丸底プレート中に播種し(5.0×10^4 細胞/ウェル)、そして50 μ lの増殖培地(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、10%のFBS、2mMのL-グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン、及び500 μ g/mLのジェネチシンを伴うDMEMからなる培養培地)中で一晚付着させた。16時間後、増殖培地を吸引によって除去し、そしてウェル当たり50 μ lの100ng/mL(13.3nM)の組織換えヒトIGF1の存在中のIGF1R結合化合物(1mM、一連の8 $\times$ 希釈)を含有する新しい増殖培地を加え、そして10分間室温でインキュベートした。プレートを液体を吸引により除去し、そしてウェル当たり100 μ lの氷冷のPBSを加えることによって洗浄した。冷PBSを直ちに吸引して除去し、そして60 μ lの溶菌緩衝液(溶菌緩衝液で開始、全ての以下の試薬は、Cell Signaling Technologiesによって製造された、チロシン1131におけるIGF1Rのリン酸化を定量するために設計された商業的キットの一部として供給された)を、それぞれのウェルに加え、そして振盪しながら室温で10分間インキュベートした。次いでプレートを4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心した。次いで上清(ウェル当たり50 μ l)を除去し、そしてホスホ-IGF1受容体ベータ(Tyr1131)ウサギ抗体で事前被覆され、そしてウェル当たり50 μ lの試料希釈物を含有する96ウェルプレートに加えた。プレートを一晚16時間穏やかに振盪しながら4 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液で4回洗浄し、そして100 μ lのヒトIGF1受容体検出抗体(マウス由来)を、それぞれのウェルに1時間で37 $^{\circ}$ Cで加えた。プレートを洗浄緩衝液で4回洗浄し、そして100 μ lのHRPと連結したマウスIgG二次抗体を、それぞれのウェルに30分間で37 $^{\circ}$ Cで加えた。プレートを4回洗浄し、そして100 μ lのTMB基質をそれぞれのウェルに加え、そして30分間インキュベートした。発色を、50 μ lの2MのH₂SO₄で停止した。450nmのODを、540nmの補正波長で測定した。IGF1処理を伴う及び伴わない内部対照は、リン酸化現象の特異性を確認し、そして膜通過シグナル伝達の阻害%を決定した。EC₅₀値(最大半量シグナルが達成される濃度)を、Prism4ソフトウェア中の非線形S字状用量-反応曲線フィッティング機能を使用して計算した。

10

20

30

【実施例 17】

【0481】

実施例 17 IGF1R下方制御アッセイ

IGF1Rの下方制御のために、ヒト大腸腺癌Colo205細胞を使用し、そしてIGF1Rの細胞表面の発現を、フローサイトメトリーによって決定した。増殖培地(RPMI、10%胎児ウシ血清、グルタミン)中の 5×10^4 細胞/ウェルを蒔かれた組織培養96ウェルプレートを、化合物の滴定で3時間37 $^{\circ}$ Cで処理した。細胞をPBSで洗浄し、Cell Stripperで取出し、そして新しい96ウェルプレートに移した。細胞を、2.5%の胎児ウシ血清を伴うPBSで3回洗浄した。細胞を、フィコエリトリンと共役したマウスモノクローナル抗-ヒトIGF1R(R&D FAB391P、10 μ l/ 5×10^5 細胞)と共に暗所で1時間インキュベートした。次いで細胞を、3回、2.5%の胎児ウシ血清を伴うPBSで洗浄した。細胞表面上のIGF1Rの存在を、FACSアレイを使用するフローサイトメトリーによって決定し、そしてデータをFlowJoソフトウェアで解析した。受容体の数を、QuantibRITE beads(BD 340495)を使用して発生した標準曲線に、データを適合させることによって計算した。データを、負の対照のhIgG2に対する試験化合物による下方制御のパーセントとして報告した。

40

【0482】

結果及び考察

50

ヒト Ang 2 に特異的に結合する MAC - 2 の能力を、図 10 に示す。MAC - 2 及び Ang 2 - h 3 8 c 2 は、ヒト Ang 2 に結合することが可能であったが、しかしヒト Ang 1、ヒト Ang 4 又はマウス Ang 3 には可能ではなく、Ang 2 に対して高い特異性を示し、そして他のアンギオポイエチンファミリーのメンバーに対しては示さなかった。

【0483】

MAC - 1 及び MAC - 2 は、Ang 2 競合アッセイ（図 11 及び表 24）に示すように、Ang 2 を結合することが可能であり、そして Tie 2 への結合を防止した。驚くべきことに、Ang 2 - h 3 8 c 2 との比較において、MAC - 1 及び MAC - 2 の両方は、Ang 2 を競合的に結合する能力の増加を示した。共役した MAC が結合し、そして Ang 2 の Tie 2 への結合が阻害されたことを確認した後、IGF 1 が、IGF 1 R に結合することに対して競合する能力を、IGF 1 R 競合アッセイ（図 12）によって決定した。MAC - 1 及び MAC - 2 は、IGF 1 R 結合に対して IGF 1 と競合するために、親の抗 - IGF 1 R 抗体（2 . 1 2 . 1 . f x）のように効率的であった。MAC - 1 及び MAC - 2 は、低いナノモルの範囲の IC₅₀ 値を示した。対照的に、ある他の抗 - IGF 1 R 抗体による試験において、ペプチドの共役は、IGF 1 R と相互作用する抗体の能力と干渉することが観察された（データは示していない）。

【0484】

競合アッセイにおいて観察された IGF 阻害を、IGF 誘導のシグナル伝達現象を阻害することに翻訳することを確認するために、細胞ベースの機能アッセイを使用して、IGF 刺激後の IGF 1 R の自己リン酸化の阻害を決定した（図 13 及び表 24）。MAC - 1 及び MAC - 2 は、親の抗 - IGF 1 R 抗体（2 . 1 2 . 2 . f x）と、同様な活性を有していた；従って、制約された Ang 2 ペプチドの共役は、MAC の自然の結合及び阻害を変化しないように見受けられる。

【0485】

IGF 1 R の自己リン酸化を阻害することに加えて、抗 - IGF 1 R 抗体は、更に IGF 1 R の内部移行及び分解を起こし、受容体の下方制御をもたらす。この行動は、処理の 2 時間内に観察され、そして 24 時間維持される。MAC を、ヒト大腸腺癌細胞系 Colo 205 上の IGF 1 R レベルを下方制御する能力に対して試験した。細胞を、3 時間培養液中で MAC 化合物の滴定により処理した。細胞を収集し、そして IGF 1 R の表面発現をフローサイトメトリーによって決定した。負の対照の h Ig G 2 と比較した IGF 1 R の下方制御のパーセントを決定した（表 24）。MAC - 1 及び MAC - 2 は、親の IGF 1 R 抗体（2 . 1 2 . 1 . f x）と同様な IGF 1 R 下方制御活性を有する。

【0486】

【表 24】

	Ang2 IC ₅₀ (nM)	IGF1R IC ₅₀ (nM)	IGF1R リン酸化 IC ₅₀ (nM)	下方制御された IGF1R %
MAC-1	0.092 ± 0.049	5.1 ± 1.1	150.7 ± 59.6	43 ± 5
MAC-2	0.057 ± 0.022	6.1 ± 1.1	91.4 ± 40.2	50 ± 5
2.12.1.fx 抗体	決定せず	3.8 ± 0.8	48.7 ± 14.0	48 ± 3
Ang2-h38c2-IgG1	0.582 ± 0.242	決定せず	決定せず	決定せず

表24: IGF1R及びAng2を結合及び調節するMAC-1並びにMAC-2の能力

【0487】

抗体当たり 2 個のペプチドを共役することが IGF 1 R の自己リン酸化及び下方制御を行うことに関して理想的であり、そして抗体当たり 2 個より多い又は少ないペプチドの共役が、これらの機能を MAC が行う能力を減少することを示した。

【0488】

IGF1R活性を調節するための2.12.1.fxの能力に対する、抗体当たりのペプチドの数の影響を評価するために、MAC-1の2種類の試料を調製し、ここで、反応条件は、共役を減少する（低MAC-1）か、又は共役を増加する（高MAC-1）かのいずれかを提供するように設定された（表25）。試料を、IGF1Rを下方制御及びリン酸化する能力に対して分析した（表25）。IGF1R経路を効率よく調節するための高MAC-1の、低MAC-1と比較した能力に、有意な差が存在する。抗体当たり約2個より多いペプチドの共役は、抗体当たり約2個又はそれより少ないペプチドの共役と比較して、IGF1Rの自己リン酸化を阻害する及びIGF1Rの下方制御を誘導するの両方に対するMACの機能の活性を制約する。従って、一つの二重機能性成分中の二つの異なった生物学的経路を効率よく調節するために、（ペプチド及び標的の薬物動態によるが）抗体当たり約2個のペプチドの共役が理想的であるかもしれない。

10

【0489】

【表25】

	Ang2 IC ₅₀ (nM)	下方制御され た IGF1R%	リン酸化 IGF1R IC ₅₀ (nM)	CA (%)						平均 CA
				0	1	2	3	4	5	
低 MAC-1	0.103	32 ± 1	12.8	14	42	32	12	0	0	1.42
高 MAC-1	0.035	9 ± 2	>300	0	4	19	41	32	5	3.18
2.12.1.fx	決定せず	36 ± 3	3.5							
Ang2-h38c2-IgG1	0.252	決定せず	決定せず							

20

表25: 高MAC-1及び低MAC-1の解析

【実施例18】

【0490】

実施例18 In vivoの薬物動態
プロトコル

マウス及びサルの血清中の血清MACレベルを測定するために、検証された直接結合の酵素結合免疫吸着検定（ELISA）法を使用した。簡単には、試料中のMACを、IGF1R又はAng2と結合させ、これを、マイクロタイタープレートに受動的に吸着させ、そしてホースラディッシュペルオキシダーゼと共役した抗-ヒトIgGを、発色性基質と共に使用して、血清試料中のMAC-2の濃度に比例するシグナルを発生させる。マウス血清中のMAC-2の定量化の上限及び下限は、26.0及び1000 ng/mlであり、そしてカニクイザルの血清中では、52.0及び2000 ng/mlである。

30

【0491】

Ang2及びIGF1Rの逆ELISA

ハイバインディングハーフウェルプレートを、50 µlのPBS中のIGF1R（62.5 ng/ウェル）又はAng2（6.25 ng/ml）で被覆し、そして4℃で一晩インキュベートした。プレートを3回洗浄緩衝液（0.1%のTween 20、PBS、pH 7.4）で洗浄し、そして150 µl/ウェルのSuperblockで室温で1時間遮断した。プレートを3回洗浄緩衝液で洗浄した。洗浄後、調製した投与溶液の標準液（範囲：3.91 - 500 ng/ml）及び血清試料をプレートに加え、そして1時間インキュベートして、MAC複合体の、プレート上の被覆されたAng2又はIGF1Rへの結合を可能にした。プレートを3回洗浄し、そして50 µlのHRPと共役したヤギ抗-ヒトIgG（0.8 µg/ml）を加え、そして室温で1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、そして50 µl（25 µlのTMB + 25 µlのH₂O₂）の基質溶液を加え、そして1 - 5分間インキュベートした。発色を25 µlの2MのH₂SO₄で停止した。450 nmのODを、450 nmの補正波長で測定した。MAC複合体の血清濃度を、標準曲線を使用して計算した。ELISAによって決定されたMAC複合体の濃度を、時間の関数としてプロットした。更なるデータ解析を、WinNonlinバージョン

40

50

ョン 4 . 1 (P h a r s i g h t C o r p o r a t i o n) を使用して行って、M A C 複合体の β 半減期 ($T_{1/2}$) 及び曲線下面積 (A U C) を決定した。

【 0 4 9 2 】

マウス

P K の研究を、投与の開始時の体重が概略 2 0 - 2 2 グラムのオスの S w i s s W e b s t e r マウス (C F W , C h a r l e s R i v e r , H o l l i s t e r , C A) を使用して行った。M A C 化合物を静脈内投与した。血液試料を、時点当たり 4 匹のマウスから、次の時点：0 . 0 8、0 . 5、1、3、5、7 及び 2 4 時間に採取した。試料収集の前に、プロテアーゼ阻害剤カクテルを全ての血液試験管に加えた。血液を氷上で 3 0 分間凝固させ、そして次いで 1 2 0 0 0 r p m で 5 - 1 0 分間 4 °C で遠心して、血清を収集し、そして E L I S A による分析まで - 8 0 °C で直ちに保存した。投与溶液を、A n g 2 又は I G F 1 R の逆 E L I S A による血清試料の分析のための標準曲線を確認するために使用した。それぞれの血清試料のアリコートを、A n g 2 又は I G F 1 R の逆 E L I S A のいずれかによって分析した。

10

【 0 4 9 3 】

サル

M A C - 2 の薬物動態学的特性を決定した。2 匹のオスのカニクイザル (M a c a c a f a s c i c u l a r i s) を、研究において使用した；M A C - 2 を、静脈内 (ボーラス) 注射によって 1 0 m g / k g の投与量レベルで投与した。全てのサルを、投与の一日目に、投与後 5 分、1 5 分、1 時間、4 時間及び 8 時間に、そしてその後一日二回、治療に対する何らかの反応に対して観察した。1、2、3、4、5、7 及び 1 4 日目に体重を測定し、そして記録した。血液試料を、毒物動態学的分析のために所定の時点で得て、そして血清を分離し、そして - 8 0 °C で保存した。

20

【 0 4 9 4 】

M A C - 2 による治療に關係することができると注目すべき不都合な臨床的徴候は、研究中になかった。体重の特性は、満足であった。概略 1 . 0 m L の血液試料を、それぞれのサルの大腿の静脈から時点 (0 . 0 8 - 5 0 4 時間) に単純な凝固試験管に収集した。血液試料を、収集後室温で 1 時間静置させたままにし、そして次いで 3 0 0 0 r p m で 1 0 分間 4 °C で遠心した。得られた血清試料を、分析に先だって概略 - 8 0 °C で保存した。

30

【 0 4 9 5 】

結果

探索的非 G L P 薬物動態 (P K) 研究を、オスの S w i s s W e b s t e r マウス及びオスのカニクイザルで行った (表 2 6 及び 2 7)。M A C の A n g 2 及び I G F 1 R 結合活性の両方を解析した。マウスにおいて、M A C - 1 及び M A C - 2 は、3 8 3 - 3 9 7 時間のベータ相半減期を持つ、親の抗 - I G F 1 R 抗体と同様な滞留時間を示した。M A C - 1 及び M A C - 2 A n g 2 結合能力は、一回投与の I V 研究のマウスにおける 1 0 5 - 1 2 0 時間のベータ相半減期を持つ、A n g 2 - h 3 8 c 2 と同様な滞留時間を示した。カニクイザルにおいて、M A C - 2 は、1 0 0 . 4 時間のベータ相半減期を持つ、親の抗 - I G F 1 R 抗体よりわずかに短い滞留時間を示した。M A C - 2 A n g 2 結合能力は、9 7 . 8 時間のベータ相半減期と、A n g 2 - h 3 8 c 2 と同様な滞留時間を示した。

40

【 0 4 9 6 】

【表 2 6】

化合物 (mg.Kg ⁻¹)	ベータ t _{1/2} (時間) Ang2 部分	ベータ t _{1/2} (時間) IGF1R 部分
Ang2-h38c2, (10)	95.2	--
α-IGF1R 抗体, (10)	--	390
MAC-1, (10)	105	383
MAC-2, (10)	120	397

表26: マウスに10mg/mkでIV投与されたMACの一回投与のPK

10

【 0 4 9 7】

【表 2 7】

化合物 (mg.Kg ⁻¹)	ベータ t _{1/2} (時間) Ang2 部分	ベータ t _{1/2} (時間) IGF1R 部分
Ang2-h38c2, (10) mpk	95.3	--
α-IGF1R 抗体, (5) mpk	--	146.4
MAC-2, (10) mpk	97.8	100.4

表27: カニクイザルに10mg/mkでIV投与されたMACの一回投与にPK

20

【実施例 1 9】

【 0 4 9 8】

実施例 1 9 In vivo の薬理学
プロトコル

MAC-2 の抗腫瘍活性を、C o l o 2 0 5 (ヒト大腸腺癌) 又は M D A - M B - 4 3 5 (黒色腫) 異種移植モデルで評価した。C o l o 2 0 5 又は M D A - M B - 4 3 5 細胞を、10%の F B S R P M I 培地で培養し、そして 0 . 1 m l のハンクス平衡塩液 (H B S S) 中の 3×10^6 細胞を、生後 5 - 7 週のメスの n u / n u マウスの上部側腹部に皮下注射し、そして治療の開始に先立ち $200 - 400 \text{ mm}^3$ の体積を確立させた。腫瘍が確立された後、マウスを、同一の腫瘍体積を持つ治療群 ($n = 9 - 10$ / 群) にランダム化し、そして MAC-2 治療剤を腹腔内 (I P) 注射によって毎週 1 回投与した。組合せ研究において、更なる抗癌剤を、MAC-2 と同時に開始して毎週 I P 注射によって投与した。腫瘍体積をノギスを使用して週 1 回又は 2 回測定し、そして体重を、治療期間中毎週測定した。幾つかの研究において、ベヒクル治療の対照群の腫瘍体積が 2000 mm^3 に達した時点で、全てのマウスを C O₂ 窒息によって安楽死させ、そして腫瘍を切除し、秤量し、そして更なる組織学的及び / 又は免疫化学的評価のために加工した。仮性生存研究において、それぞれの治療群の平均腫瘍体積が 2000 mm^3 を超えた時点で、マウスを C O₂ 窒息によって安楽死させ、そして腫瘍を切除し、そして秤量した。

30

40

【 0 4 9 9】

結果

C o l o 2 0 5 (ヒト大腸腺癌) 異種移植モデルで行った実験を、図 1 2 A 及び 1 3 A に例示する。A n g 2 - h 3 8 c 2 又は抗 - I G F 1 R 抗体 (2 . 1 2 . 1 . f x) の毎週の投与は、C o l o 2 0 5 腫瘍の成長を阻害した。毎週投与される A n g 2 - h 3 8 c 2 及び抗 - I G F 1 R 抗体の組合せは、C o l o 2 0 5 腫瘍の成長を阻害することにおいて、更なる利点を示した。単独の MAC-2 の毎週の投与は、組合せと同様な利益を示した (図 1 4 A) 。別個の研究において、MAC-2 は、C o l o 2 0 5 腫瘍の成長、及び最終腫瘍重量を用量依存的に阻害した (図 1 5 A 、 B) 。

【 0 5 0 0】

50

28日目に、化合物で治療されたマウスを犠牲にし、そして腫瘍を切除し、そして瞬間冷凍した。MAC-2の抗血管新生効果を評価するために、腫瘍の微小血管密度を、ペヒクル(PBS)又はMAC-2(0.3mg/kgから10mg/kgまでの用量反応範囲)で治療したColo205大腸腺腫異種移植腫瘍の冷凍された切片に対して免疫組織化学的に評価した。腫瘍を、マウス特異的モノクローナル抗体でCD31に対して染色し、そして免疫反応性を、それぞれの腫瘍からの三つの切片の五つの部分から定量した(図13C)。腫瘍の微小血管密度は、MAC-2(10mg/kg、毎週一回)によって、ペヒクル治療群との比較において、約42%有意に減少され、MAC-2治療の抗血管新生活性を確認した。

【0501】

MAC-2が、in vivoでAng2及びIGF1Rの両方を標的とするか否かを調査するために、Ang2及びIGF1R発現レベルに対するMAC-2の効果を、ペヒクル、Ang2-h38c2、IGF1R抗体(2.12.1.fx)又はMAC-2(0.3mg/kgから10mg/kgまでの用量反応範囲)で治療された二つの独立のColo205異種移植腫瘍で評価した。溶菌液を冷凍された切除腫瘍から調製し、そしてAng2及びIGF1Rの免疫反応性を、ELISAによって定量した。Ang2及びIGF1Rの免疫反応性は、MAC-2の治療によって用量依存的様式(1、3及び10mg/kg)で、ペヒクル治療群との比較において有意に減少した(図14B、15D、及び15E)。IGF1Rレベルに対するMAC-2の効果は、IGF1R拮抗性抗体(2.12.1.fx)に対して観察されたものと同様である(図14B)。更に、リン酸化されたIGF1Rのレベルは、MAC-2で治療されたマウスからの腫瘍中で減少された(データは示されていない)。これらに腫瘍の固定された切片の免疫蛍光も、更にIGF1R及びpIGF1Rの減少を確認した(データは示されていない)。これらのデータは、MAC-2治療が、Colo205異種移植モデルのAng2及びIGF1R経路に両方に影響することを示す。

【0502】

三つの別個の研究において、MAC-2治療は、ペヒクル(PBS)、Ang2-h38c2及びIGF1R抗体(2.12.1.fx及び2.13.2)と比較して、継続した腫瘍阻害に導いた(図16A、16B、16C)。抗-IGF1R抗体2.13.1は、WO02/053596中の、それぞれのシグナル配列を差引いた配列番号:45及び配列番号:47として記載されている。MAC-2による腫瘍の阻害は、Ang2-h38c2及び2.12.1.fxの組合せと同様であり、そしてAng2-h38c2及び2.13.2より更に活性である(図16C)。MAC-2治療は、体重増加に影響せず(データは示されていない)、そしてマウスは、研究を通して良好な健康状態であるように見受けられた。マウスのそれぞれの群の腫瘍を、疑似生存研究として2000mm³まで進行させた。Ang2-h38c2及び抗IGF1R抗体治療群の両方は、48日目に中止した; 然しながら、MAC-2治療(3-10mpk)の腫瘍は、研究を停止した94日目においてなお2000mm³より小さかった。

【0503】

MAC-2の抗腫瘍効力も、更にMDA-MB-435黒色腫異種移植モデルにおいて評価した。MAC-2の毎週の投与(3及び20mg/kg IP)は、MDA-MB-435モデルにおける腫瘍の成長の有意な40%の減少(67日目)をもたらした(図17)。従って、MAC-2は、二つの異なったヒト異種移植腫瘍モデルにおいて有意な抗腫瘍効力を示した。

【実施例20】

【0504】

実施例20 各種の抗体のペプチド共役特性

幾つかの異なった抗体のペプチドとの共役特性を、配列番号:27及び5PEGをそれぞれ例示的ペプチド及びリンカーとして使用して解析した。全ての試験された抗体は、十分に確認され、そして特徴付けされた抗原相互作用を持つヒト又は完全にヒト化されたI

10

20

30

40

50

g G 抗体であった。h A b λ テストは、C L λ を含んでなり、一方、2 . 1 2 . 1 . f x 、m A b κ テスト1、h 2 8 C 2 - I g G 1 (配列番号 : 5 1 及び 5 2) 及び h 3 8 C 2 - I g G 2 (配列番号 : 5 3 及び 5 4) は、それぞれ C L κ を含んでなる。それぞれの抗体を、2 0 m M の p H 7 . 0 の H E P E S に緩衝液交換し、そして 5 - 2 0 m g / m L に濃縮した。配列番号 : 2 7 / K ^{1 1} - 5 P E G - P F P を、5 0 % のプロピレングリコールで再懸濁し、そして関連する抗体と 4 . 3 : 1 のモル比で混合し、そして少なくとも 2 時間室温で反応させた。全ての試料を 2 m g / m l に希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー - 質量分析 (S E C - M S) によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する ; 多数のペプチド共役部位は、結合したペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表 2 2 は、各種の抗体のペプチド共役特性を示す。

10

【 0 5 0 5 】

C L κ を含有する抗体に対して、ペプチド共役は、0 - 4 個間のペプチド付加の分布で起こり、最大の形態は 2 ないし 3 個のペプチド付加である。対照的に、C L λ を含んでなる抗体、h A b λ テストに対して、ペプチドの共役は、0 - 4 個間のペプチド付加の分布で起こり、最大の形態は、1 又は 2 個のペプチド付加である。

【 0 5 0 6 】

ペプチド共役の程度を、軽及び重鎖で別個に行った。それぞれの試料を変性し、そしてジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、L C M S を使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。各種の抗体の軽及び重鎖上のペプチド共役特性を、表 2 8 に示す。2 . 1 2 . 1 . f x 及び h A b κ テスト 1 において、データは、共役の位置が軽鎖において高いことを示す ; 軽鎖上の最も豊富な形態は、一つ (1 個) のペプチド付加を含有する。重鎖上の共役は、有意に低いレベルで観察される。h 3 8 C 2 - I g G 1 及び h 3 8 C 2 - I g G 2 において、共役の匹敵するレベルが軽及び重鎖上で観察され、軽鎖上に僅かな共役の優先性がある。C L λ を含有する抗体 (h A b λ テスト) において、共役の大部分は重鎖において起こり、低いレベルの共役が軽鎖において観察された。

20

【 0 5 0 7 】

【 表 2 8 】

30

抗体	CA (%)					平均 CA	軽鎖%CA			重鎖%CA		
	0	1	2	3	4		0	1	2	0	1	2
2.12.1.fx	1	15	53	26	5	2.2	20	70	9	84	16	0
hAbλ テスト	10	37	37	11	6	1.66	95	5	0	74	22	4
hAbκ テスト 1	7	10	35	27	14	2.55	11	74	14	87	13	0
h38C2 IgG1	1	3	28	55	13	2.75	49	46	4	70	30	0
h38C2 IgG2	4	6	31	44	15	2.6	61	35	4	73	27	0

40

表28: 各種の抗体の共役特性

【 0 5 0 8 】

それぞれの抗体 2 . 1 2 . 1 . f x 、h A b λ テスト及び h A b κ テスト 1 を、共役過程の後に評価して、その受容体結合を保持する抗体骨格の能力に対する共役付加の効果を決定した (天然の m A b と比較して) (表 2 9) 。結果は、試験抗体へのペプチドの方向性共役が、抗体結合を変更しなかったように見受けられることを示す。

【 0 5 0 9 】

【表 29】

抗体	受容体結合	
	天然(IC ₅₀ , nM)	共役後(IC ₅₀ , nM)
2.12.1.fx	3.2	5.7
hAbλ テスト	0.4	1.7
hAbκ テスト 1	59	53

表29: 共役の前後の天然の抗原への抗体の結合

【実施例 21】

10

【0510】

実施例 21 IgG2-κ の代表的抗体のペプチド共役特性

IgG2-κ 抗体 (hAbκ テスト 2) の、39-マーペプチドによる共役特性を解析した。抗体を 8 mg/mL に濃縮し、そして緩衝されたものを、pH 8.0 の 40 mM の HEPES に交換した。ペプチドを 100% の DMSO で再懸濁し、そして抗体と 5.0 : 1 のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を 2 mg/mL に希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー - 質量分析 (SEC-MS) によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数のペプチド共役部位は、ペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表 30 は、39-マーペプチドによる hAbκ テスト 2 のペプチド共役特性を示す。ペプチドの共役は、0 - 4 個間のペプチド付加の分布で起こり、2.03 個のペプチド付加の平均であり、そして CLK-K¹⁸⁸ 上の方向性共役と一致する。

20

【0511】

【表 30】

抗体骨格	結合ペプチド	%CA					平均 CA
		0	1	2	3	4	
hAbκ テスト 2	39-マーペプチド	1	22	53	18	5	2.03

30

表30: 39-マーペプチド及びhAbκ Test2の共役特性

【0512】

別個の実験において、39-マーペプチドを、先に記載したように、h38C2-IgG2 に MAL-2PEG-PFP と共に、異なったモル濃度で共役させた。更に、39-マーペプチドに対する同族受容体の結合を分析した。示した結果 (表 31) は、K¹⁸⁸-CLK における方向性共役と一致する。更に、抗体当たりのペプチドの平均数の増加は、標的に対する全体的結合を、実質的に増加しなかった。これは、抗体当たりの共役の増加が標的結合を増加することができないというある種のシナリオを示し、本発明の利点の一つを示す；抗体当たりの共役したペプチドの数の制御は、単位ペプチド当たりの最大の標的結合を達成することを援助することができる。

40

【0513】

【表 3 1】

39-マーペプチド: h38C2-IgG2 モル比	CA (%)				共役 平均数	ペプチド標的: EC50 (nM)
	0	1	2	3		
2:1	57	32	10	0	0.52	0.99
2.5:1	19	56	25	0	1.06	1.06
4:1	20	25	35	20	1.55	1.01
5:1	0	16	45	40	2.26	0.82

10

表31: 39-マーペプチド及びH38C2-IgG2の共役特性

【実施例 2 2】

【0 5 1 4】

実施例 2 2: ビオチンの 2 . 1 2 . 1 . f x F a b への共役

ビオチン - 2 . 1 2 . 1 . f x

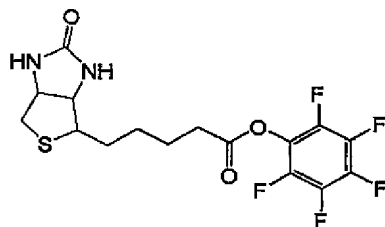
2 . 1 2 . 1 . f x の F a b 領域 (配列番号: 5 0 及び 4) の、P F P - ビオチンとの共役特性を解析した。抗体 F a b を 2 0 m g / m L に濃縮し、そして緩衝されたものを、p H 5 . 5 の 2 0 m M の酢酸ナトリウム + 2 0 0 m M のトレハロースに交換し、そして p H 7 . 7 の 6 0 m M のリン酸ナトリウムを添加した。P F P - ビオチンを 1 0 0 % の D M S O で再懸濁し、そして抗体と一連のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を 2 m g / m l に希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー - 質量分析 (S E C - M S) によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する; 多数の共役部位は、共役したペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表 3 2 は、2 . 1 2 . 1 . f x の P F P - ビオチンのモル比による共役特性を示す。共役は、モル比の増加に従って、0 - 2 個間の付加の分布で起こる。抗体当たりの低い分子の数は、使用されたモル比に基づき、先の結果と一致する。これは、一つ又はそれより多い反応のパラメーターを変更することによって共役の量を制御するこの方法の柔軟性の有用な証明である。

20

30

【0 5 1 5】

【化 9 5】



40

【0 5 1 6】

ビオチン - P F P

【0 5 1 7】

【表 3 2】

抗体 骨格	結合 ペプチド	ペプチド:抗体 モル比	%CA				平均 CA
			0	1	2	3	
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	1:1	54	46	-	-	0.46
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	1.5:1	42	51	7	-	0.65
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	2:1	34	55	10	-	0.76
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	3:1	28	55	17	-	0.88
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	4:1	21	46	26	8	1.21

表32: ビオチンの2. 12. 1. fx Fabへの共役特性

【実施例 2 3】

【0 5 1 8】

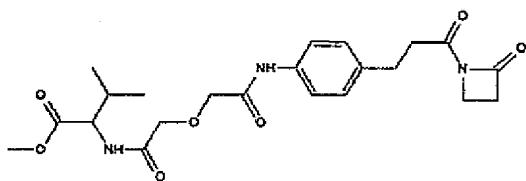
実施例 2 3 ビオチンの h 3 8 C 2 - I g G 1 への共役

ビオチン - h 3 8 C 2 - I g G 1

抗体 h 3 8 C 2 - I g G 1 を、p H 7 . 5 の H E P E S 緩衝液で、0 . 0 2 M の最終濃度に、2 0 m g / m L に調節した。ビオチン - P F P を、水中で 1 0 m g / m L に再構成し、そして h 3 8 C 2 - I g G 1 に 5 : 1 のモル比で加え、そして室温で 2 時間反応させた。未反応の P F P - ビオチンを、サイズ排除クロマトグラフィーによって除去し、そして p H 6 . 5 のヒスチジン、グリシン、及びスクロース緩衝液に緩衝液交換した。試料を 2 m g / m l に希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー - 質量分析 (S E C - M S) によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。表 3 3 は、h 3 8 C 2 - I g G 1 のビオチン - P F P との共役特性を示す。h 3 8 C 2 - I g G 1 の共役は、1 . 1 個の共役の平均で、0 - 3 個間の C A の分布で起こる。共役の増加は、反応条件の最適化後に可能となるものである。h 3 8 C 2 - I g G 1 上の V H - K ^{9 9} (K a b a t 番号によれば K ^{9 3}) の反応性は、触媒抗体試験化合物 C A T C - 1 と反応させた場合、> 9 5 % であることが確認され、そして逆相クロマトグラフィーによって分析された。

【0 5 1 9】

【化 9 6】



【0 5 2 0】

C A T C - 1

h 3 8 C 2 - I g G 1

【0 5 2 1】

【表 3 3】

抗体	0	1	2	3	平均 CA
h38C2-IgG1	16	61	20	3	1.1

表33: ビオチン及びh38C2-IgG1の共役

【実施例 2 4】

【0522】

実施例24 2.12.1.f x及びK¹⁸⁸、K¹⁹⁰変異体の共役特性

ペプチドマッピングに基づけば、Y15断片中には2個のLysが存在する。活性な共役部位を識別するために、K¹⁸⁸及びK¹⁹⁰を、Rにそれぞれ又は組合せて変異させた。変異体を、QuickChange部位特異的変異誘発キット(Stratagene)に記載されたプロトコルに従って産生した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって誘発し、そしてDNA配列決定によって確認した。変異されたmAbsを、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、そしてタンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbsをMSを使用して特徴づけした。配列番号：33、34及び35は、2.12.1.f xのIGF1r変異体軽鎖配列を示す。

10

【0523】

抗体を、pH7.5又は6.5の0.02MのHEPESに、2mg/mLで緩衝液交換した。pHが6.5の場合、次いでpH7.7の60mMのリン酸ナトリウムを添加した。配列番号：27-K¹¹-5PEG-PFPを、50%のプロピレングリコールで希釈し、そしてタンパク質と4.3:1のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を2mg/mLに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー-質量分析(SEC-MS)によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数の共役部位は、結合したペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表34は、非修飾の2.12.1.f x、2.12.1.f x-K¹⁸⁸R(LC:配列番号：33)、2.12.1.f x-K¹⁹⁰R(LC:配列番号：34)、及び2.12.1.f x-K¹⁸⁸R-K¹⁹⁰R(LC:配列番号：35)の共役特性を示す。K¹⁸⁸R変異体は、減少した共役を示した。K¹⁹⁰Rは、未共役の2.12.1.f xと類似の共役を有していた。MAC-2の共役は、組合せのHEPES/リン酸塩緩衝液を使用するの他のアッセイで観察されたものより低かった。

20

【0524】

【表34】

30

LCの配列 番号:	変異体	CA(%)					平均 CA
		0	1	2	3	4	
15	MAC-2	14	49	31	5	1	1.29
33	K188R	82	14	4	0	0	0.22
34	K190R	11	46	36	6	0	1.37
35	K188R / K190R	51	37	9	3	0	0.63

40

表34: 2.12.1.f x並びにK¹⁸⁸及びK¹⁹⁰変異体の共役特性

【実施例25】

【0525】

実施例25 K¹⁸⁸に対する方向性共役の機構を解明するための2.12.1.f x変異体

K¹⁸⁸に接近した残基を試験した。H¹⁸⁹側鎖は、K¹⁸⁸のε-アミノ基に非常に近い。Hisは、プロトン移動反応にしばしば関係するために、H¹⁸⁹は、K¹⁸⁸共役のために必要である可能性が非常にある。K¹⁸⁸部位特異的共役におけるH¹⁸⁹の役割を研究するために、本出願人等は、ヒスチジンをアラニンで置換することによってイミダゾール環を除去した。

50

【0526】

D¹⁵¹A及びD¹⁵¹A/H¹⁸⁹A変異体を、部位特異的共役におけるD¹⁵¹の役割並びにD¹⁵¹及びH¹⁸⁹の組合せ効果を研究するために製造した。

変異体を、QuickChange部位特異的変異誘発キット(Stratagene)に記載されたプロトコルに従って産生した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって誘発し、そしてDNA配列決定によって確認した。変異されたmAbsを、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、そしてタンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbsを、MSを使用して特徴づけした。次の2.12.1.f x軽鎖変異体：D¹⁵¹A(配列番号：36)、K¹⁸⁸A(配列番号：37)、H¹⁸⁹A(配列番号：38)、K¹⁹⁰A(配列番号：39)及びD¹⁵¹A/H¹⁸⁹A(配列番号：40)を産生した。

10

【0527】

それぞれの抗体を、pH5.5の20mMの酢酸ナトリウム、200mのトレハロースに200mg/mlで緩衝液交換した。次いでタンパク質にpH7.7の60mMのリン酸ナトリウムを添加した。配列番号：27-K¹¹-5PEG-PFPを、50%のプロピレングリコールで再懸濁し、そして抗体と4.3：1のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を2mg/mlに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー-質量分析(SEC-MS)によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数の共役部位は、共役したペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。

20

【0528】

表35は、2.12.1.f x、2.12.1.f x-D¹⁵¹A、2.12.1.f x-K¹⁸⁸A、2.12.1.f x-H¹⁸⁹A、2.12.1.f x-K¹⁹⁰A、及び2.12.1.f x-D¹⁵¹A/H¹⁸⁹A変異体の共役特性を示す。方向性共役を維持したK¹⁹⁰Aを除く、全ての変異体は、非修飾の2.12.1.f x抗体と比較して、減少した平均共役レベルを示した。

【0529】

共役の程度を、軽及び重鎖上で別個に試験した。それぞれの試料を変性し、そしてジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。2.12.1.f x及び変異体上の軽並びに重鎖上の共役特性を表35に示す。表に記載した全ての変異体は、K¹⁹⁰Aを除き、非修飾の2.12.1.f xと比較して軽鎖上の減少した共役レベルを示した。変異体の重鎖の共役レベルは、非修飾の2.12.1.f xと同様なレベルであった。

30

【0530】

【表 3 5】

LC の配列 番号:	変異体	CA (%)					平均 CA	LC CA%			LC 平均 CA- LC	HC CA %			HC 平均 CA- HC
		0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2	
15	MAC-2	1	15	53	26	5	2.2	23	69	8	0.85	86	14	0	0.14
36	D ¹⁵¹ A	17	38	31	14	0	1.41	68	30	1	0.33	79	21	0	0.21
37	K ¹⁸⁸ A	56	31	10	4	0	0.61	89	11	0	0.11	91	9	0	0.09
38	H ¹⁸⁹ A	34	44	17	6	0	0.95	89	11	0	0.11	78	22	0	0.22
39	K ¹⁹⁰ A	9	7	31	37	16	2.42	8	77	15	1.06	83	17	0	0.17
40	D ¹⁵¹ A/ H ¹⁸⁹ A	34	39	18	9	0	1.02	83	17	0	0.17	87	13	0	0.13

表35: MAC-2並びにK¹⁸⁸A、D¹⁵¹及びH¹⁸⁹変異体の共役特性

【実施例 2 6】

【0 5 3 1】

実施例 2 6 ラムダ / カッパ置換

hAbλ テスト 1 中の LCλ を、LCκ で置換して、これが LC 誘導体化のレベル、方向性及び / 又は制御を増加するか否かを決定した。LCλ / LCκ ドメイン置換ハイブリッド構築物を、オーバーラップ PCR を使用して産生した。LVλ 及び LCκ を、hAbλ テスト及びカッパ mAb 軽鎖を、別個にテンプレートとして使用して PCR で増幅した。これらの二つの PCR 産物をテンプレートとして混合した；hAbλ テスト 1 順方向プライマー及び LCκ 逆方向プライマーを、オーバーラップ PCR 反応中で使用して、全長の hAbλ テスト LV / LCκ DNA を増幅した。ハイブリッド抗体構築物を、HEK 293 細胞中で過渡的に発現させ、そしてタンパク質 A 親和カラムを使用して精製した。精製した抗体を、MS を使用して特徴づけした。hAbλ テスト LCκ ハイブリッドは、その同族受容体に天然の mAb (hAbλ テスト) と同様に結合した (表 3 6)。配列番号：41、42 及び 43 は、hAbλ テスト、hAbλ テスト - λκ (λ J を伴う)、及び hAbλ テスト - λκ J (κ J を伴う) からの軽鎖定常領域である。

【0 5 3 2】

【表 3 6】

hAbλ テスト 1 変異体	LC の配列番号:	受容体結合 (IC ₅₀ , nM)
hAbλ テスト(対照)	41	0.4
hAbλ テスト-λκ	42	0.3
hAbλ テスト-λκJ	43	0.3

表36: ラムダ / カッパ置換の抗体: 抗原結合

【実施例 2 7】

【0 5 3 3】

実施例 2 7 hAbλ テスト 1 変異体: モチーフ修飾

短いモチーフ "KH" が、CLλ の対応する領域で MAC 形成のために十分であるか否かを確立するために、hAbλ テスト中の残基 CLλ¹⁸⁸ / ¹⁸⁹ の簡単な配列スイッチを伴う変異体を、K¹⁸⁷ の傍のヒスチジンに入れるために製造し、従って "K¹⁸⁷ S¹⁸⁸ H¹⁸⁹" は、"K¹⁸⁷ H¹⁸⁸ S¹⁸⁹" となった。変異体を、Quick

C h a n g e 部位特異的変異誘発キット (S t r a t a g e n e) に記載されたプロトコルに従って産生した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって誘発し、そしてDNA配列決定によって確認した。変異抗体構築物を、H E K 2 9 3 細胞中で過渡的に発現させ、そしてタンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製した抗体をM S を使用して特徴づけした。h A b λ テスト - S ^{1 8 8} H / H ^{1 8 9} S (L C : 配列番号 : 4 4) 変異体は、その受容体、並びに親 h A b λ テスト抗体にも結合した (表 3 7) 。

【 0 5 3 4 】

【 表 3 7 】

hAbλ テスト 1 変異体	LC の配列番号:	受容体結合(IC ₅₀ , nM)
hAbλ テスト(対照)	41	0.3
hAbλ テスト-S ¹⁸⁸ H/H ¹⁸⁹ S	44	0.4

10

表37: hAbλ テスト-S¹⁸⁸H/H¹⁸⁹S

【 実施例 2 8 】

【 0 5 3 5 】

実施例 2 8 h A b λ テスト 1 変異体の共役特性

それぞれの抗体 (h A b λ テスト、h A b λ テスト - λ κ、h A b λ テスト - λ κ J 及び h A b λ テスト - S ^{1 8 8} H / H ^{1 8 9} S) を、p H 5 . 5 の 2 0 m M 酢酸ナトリウム、2 0 0 m のトレハロースに、2 0 m g / m l で緩衝液交換した。次いでタンパク質に p H 7 . 7 の 6 0 m M のリン酸ナトリウムを添加した。配列番号 : 2 7 - K ^{1 1} - 5 P E G - P F P を、5 0 % のプロピレングリコールで再懸濁し、そして抗体と 4 . 3 : 1 のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を 2 m g / m l に希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー - 質量分析 (S E C - M S) によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する ; 多数のペプチド共役部位は、ペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表 3 8 は、共役の全体のレベルが、二つの L C がスイッチされたハイブリッド中で増加されたことを示す (λ κ 及び λ κ J - 前者はラムダ J 断片を含み、後者はカップ J 断片を含む) 。共役レベルは、h A b λ テスト対照の平均 C A を超えて増加し、1 . 6 6 から、それぞれ 2 . 1 9 (λ κ) 及び 2 . 5 3 (λ κ J) まで行った。変異体は、天然の配列と比較して僅かな影響を有し、単独の “ K H ” モチーフが M A C に形成のために十分ではないことを示唆した。

20

30

【 0 5 3 6 】

ペプチド共役の程度を、軽及び重鎖上で別個の試験した (表 3 8) 。それぞれの試料を変性し、そしてジスルフィド結合をグアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、L C M S を使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。還元分析において、天然の h A b λ テストの L C は、5 % のみの 1 個の C A を有するが、然しこれは、h A b λ テスト - λ κ において 5 8 % の 1 個の C A 及び h A b λ テスト λ κ J において 6 3 % の 1 個の C A に劇的に跳ね上がる。L C スイッチは、H C 共役のレベルに対して僅かな影響を有し、これは、かなり一定なままであった (H C 共役が中程度に増加する λ κ J を除く) 。再び、変異体は、天然の配列と比較して僅かな影響を有し、単独の “ K H ” モチーフが M A C 形成のために十分ではないことを示唆した。

40

【 0 5 3 7 】

【表 3 8】

hAbλ テスト 変異体	LC の 配列 番号:	CA (%)					平均 CA	LC CA%			平均 CA- LC	HC CA %			平均 CA- HC
		0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2	
hAbλ テスト	41	10	37	37	11	6	1.66	95	5	0	0.05	74	22	4	0.3
hAbλ テスト -λκ	42	3	18	43	29	7	2.19	42	58	0	0.58	78	22	0	0.22
hAbλ テスト -λκJ	43	2	11	34	36	17	2.53	33	63	4	0.71	64	36	0	0.36
hAbλ テスト -S ¹⁸⁸ H/H ¹⁸⁹ S	44	7	34	37	16	6	1.79	82	18	0	0.18	79	21	0	0.21

表38: hAbλテスト変異体の共役特性

【0 5 3 8】

これらの共役形態の受容体結合特質を、更に評価して、共役した抗体のその受容体になお結合する能力に対する、配列番号：27 - K^{1 1} - 5 P E G - P F Pによる共役の効果を決定した（表 3 9）。

【0 5 3 9】

【表 3 9】

配列番号:27 共役 hAbλ テスト 1 変異体	LC 配列番号:	受容体結合 (IC ₅₀ , nM)
hAbλ テスト	41	1.7
hAbλ テスト-λκ	42	1.5
hAbλ テスト λκJ	43	1.6
hAbλ テスト 1-S ¹⁸⁸ H/H ¹⁸⁹ S	44	1.6

表39: 抗体におけるラムダの抗体:抗原結合

【実施例 2 9】

【0 5 4 0】

実施例 2 9 異なった脱離基を使用する M A C の産生

活性なエステル脱離基の活性の程度及び / 又は構造が、方向性共役効果を規定することにおいて重要であるか否かを調査するために、配列番号：27 - K^{1 1} (S H) M A C - 2 P E G - P F P の一連の代替活性化エステル類似体を合成した。共役生成物の分布を、インタクトな複合体の M S によって試験し、そしてインタクトな複合体の還元及び軽及び重鎖の分離後、軽及び重鎖の両方へのペプチド付加の程度も更に M S によって決定した。

【0 5 4 1】

代替活性化エステルの構造及び命名を、以下に示す。

代替活性化ペプチドを、実施例 1 - 3 に先に示したものと同一戦略及び方法を使用して合成した。簡単には、それぞれの活性化された基を、Z^{*} が P F P を置換する新しい脱離基であるマレイミド - 2 P E G - Z^{*} リンカーに組込んだ。上記の化合物を合成するために、精製された A B P - チオールペプチド（即ち、連結残基として K (S H) を伴う A B P ）の試料（30 - 40 m g ）を、無水の D M F （2 m l ）中に溶解した。M A L - P E G 2 - Z^{*} （20 m g ）を、N - メチルモルホリン（5 m l ）と共に加えた。反応物を攪拌し、そして生成物の形成の時間経過を追跡するために室温で H P L C によってモニター

した。出発ペプチドの活性化エステルが連結した A B P 生成物への完全な転換は、2 - 6 時間内に観察された。溶液を濾過し、そして生成物のピークを、準分離用 H P L C によって直接単離した。生成物を、凍結乾燥後、概略 3 0 - 5 0 % の範囲の収率で単離した。

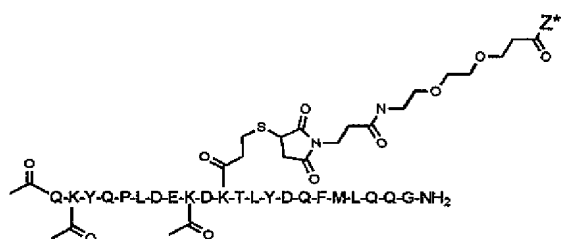
【 0 5 4 2 】

結合反応を標準的な条件下で行った。簡単には、2 . 1 2 . 1 . f x 溶液を、p H 7 . 7 のリン酸ナトリウムで 0 . 0 6 M の最終濃度に希釈することによって、2 . 1 2 . 1 . f x 抗体溶液を調製した。別個に、ペプチドをプロピレングリコール中で 2 0 m g / m l に溶解し、次いでこの溶液を水で 1 0 m g / m l に希釈することによって、ペプチド溶液を調製した。結合反応のために、ペプチド及び抗体溶液を 4 : 1 のモル比で、処方された時間混合した。時間経過研究のために、結合反応の試料を、p H 4 . 0 の 4 0 m M のコハク酸、2 0 0 m M のグリシン (1 : 1 、容量 / 容量) の溶液と混合することによって、共役溶液の試料を各種の時点でクエンチした。結合反応の時間経過を、H P L C によって追跡した。配列番号 : 2 7 を、例示的なペプチドとして使用した。

10

【 0 5 4 3 】

【 化 9 7 】



20

【 0 5 4 4 】

配列番号 : 2 7 - K ^{1 1} - M A L - 2 P E G - Z *

【 0 5 4 5 】

【 表 4 0 】

	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8 NH5 NB2, 3 DCI	Z9 2H I 1,3 D	Z10 4N P	Z11 2,6-DF P	Z12 1 NA P
CA	PFP	TFP	TFP	TCP	DCP	DCN	DCQ					
0	3	32	17	100	81	38	73	34	20	41	50	100
1	34	45	43	0	19	45	25	40	36	42	39	0
2	51	20	30	0	0	16	2	18	31	15	11	0
3	12	3	11	0	0	2	0	5	12	3	0	0

30

表40: 反応性エステル-24時間目のインタクトな複合体

40

【 0 5 4 6 】

表 4 0 は、結合反応の開始後 2 4 時間目のインタクトな複合体の最終生成物分布を示す。結果は、幾つかのエステルは全く反応せず (Z 4 、 Z 1 2) 、他は緩慢に反応し (例えば Z 5) 、一方幾つかは P F P (Z 1) のそれに近づく特性を与えた (例えば Z 3) ことを示す。

【 0 5 4 7 】

共役の動態

それぞれの最終複合体に対する時間をかけた付加の速度を、表 4 1 、 4 2 、 4 3 及び 4 4 に示す。0 C A は、誘導体化されていない 2 . 1 2 . 1 . f x 抗体であり、一方、1、

50

2又は3 C Aは、それぞれの試験された時点における2 . 1 2 . 1 . f x 抗体への1、2
又は3個のペプチドの付加である。

【 0 5 4 8 】

【表 4 1】

OCA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (時間)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
0	84	97	94	100	100	100	100	95	95	96	100	100
1	5	83	58	100	100	95	96	43	24	79	93	100
2	4	75	40	100	100	89	93	42	20	67	88	100
4	4	62	27	100	96	81	88	40	20	54	79	100
24	3	32	17	100	81	38	73	34	20	41	50	100

10

表41: OCAを得る異なったZ*基の共役動態

【 0 5 4 9 】

【表 4 2】

1CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (時間)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
0	16	3	6	0	0	0	0	5	5	5	0	0
1	38	17	36	0	0	5	4	39	39	21	8	0
2	37	25	45	0	0	11	7	39	38	29	12	0
4	33	34	43	0	4	19	12	42	39	37	21	0
24	34	45	43	0	19	45	25	40	36	42	39	0

20

30

表42: 1CAを得る異なったZ*基の共役動態

【 0 5 5 0 】

【表 4 3】

2CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (時間)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	49	0	6	0	0	0	0	15	27	0	0	0
2	50	0	14	0	0	0	0	16	30	4	0	0
4	52	4	25	0	0	0	0	15	29	9	0	0
24	51	20	30	0	0	16	2	18	31	15	11	0

40

表43: 2CAを得る異なったZ*基の共役動態

【 0 5 5 1 】

50

【表 4 4】

3CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (時間)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	0	0	0	0	0	0	3	11	0	0	0
2	10	0	2	0	0	0	0	3	12	0	0	0
4	12	0	5	0	0	0	0	4	12	0	0	0
24	12	3	11	0	0	2	0	5	12	3	0	0

10

表44: 3CAを得る異なったZ*基の共役動態

【0 5 5 2】

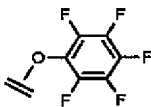
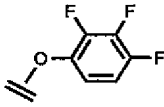
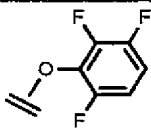
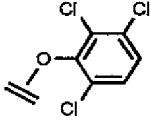
軽及び重鎖の分布

それぞれの代替活性化エステルに対するペプチド共役の程度を、軽及び重鎖に対して別個に試験した。それぞれの試料を変性し、そしてジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。2, 12, 1, f xの軽及び重鎖並びに変異体上のペプチド共役特性を、表45に示す。表に記載した殆ど全ての活性化ペプチドは、PFP(Z1)を使用する化合物と比較して、同様な共役のレベルを示した2, 3, 6-トリフルオロフェニル(Z3)を除き、軽鎖上の減少した共役レベルを示した。N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)から誘導された活性化されたエステル、即ち、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボン酸イミド及び2-ヒドロキシ-イソインドリン-1, 3-ジオン(Z8及びZ9)は、重鎖の誘導体化に対してより大きい傾向を示した。

20

【0 5 5 3】

【表 4 5 - 1】

Z #	Z* 名称	Z* 構造	共役付加体の時間経過 [太字以外は24時間で分離]	24時間における共役の 減少																																										
1	ペンタフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>84</td><td>5</td><td>4</td><td>4</td><td>3</td></tr><tr><td>1</td><td>16</td><td>38</td><td>37</td><td>33</td><td>34</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>49</td><td>50</td><td>52</td><td>51</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>8</td><td>10</td><td>12</td><td>12</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	84	5	4	4	3	1	16	38	37	33	34	2	0	49	50	52	51	3	0	8	10	12	12	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>30</td><td>64</td><td>7</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>94</td><td>6</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	30	64	7	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	94	6	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	84	5	4	4	3																																									
1	16	38	37	33	34																																									
2	0	49	50	52	51																																									
3	0	8	10	12	12																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
30	64	7																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
94	6	-																																												
2	2, 3, 4-トリフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>97</td><td>83</td><td>75</td><td>62</td><td>32</td></tr><tr><td>1</td><td>3</td><td>17</td><td>25</td><td>34</td><td>45</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td><td>20</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>3</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	97	83	75	62	32	1	3	17	25	34	45	2	0	0	0	4	20	3	0	0	0	0	3	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>59</td><td>41</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>94</td><td>6</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	59	41	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	94	6	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	97	83	75	62	32																																									
1	3	17	25	34	45																																									
2	0	0	0	4	20																																									
3	0	0	0	0	3																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
59	41	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
94	6	-																																												
3	2, 3, 6-トリフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>94</td><td>58</td><td>40</td><td>27</td><td>17</td></tr><tr><td>1</td><td>6</td><td>36</td><td>45</td><td>43</td><td>43</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>6</td><td>14</td><td>25</td><td>30</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>5</td><td>11</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	94	58	40	27	17	1	6	36	45	43	43	2	0	6	14	25	30	3	0	0	2	5	11	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>30</td><td>64</td><td>7</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>90</td><td>10</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	30	64	7	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	90	10	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	94	58	40	27	17																																									
1	6	36	45	43	43																																									
2	0	6	14	25	30																																									
3	0	0	2	5	11																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
30	64	7																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
90	10	-																																												
4	2, 3, 6-トリクロロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td></tr><tr><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	100	100	100	100	100	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>95</td><td>5</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>100</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	95	5	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	100	-	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	100	100	100	100	100																																									
1	0	0	0	0	0																																									
2	0	0	0	0	0																																									
3	0	0	0	0	0																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
95	5	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
100	-	-																																												

10

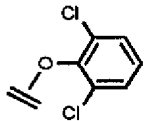
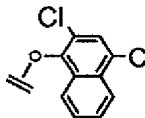
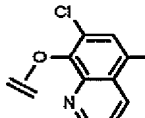
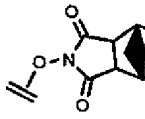
20

30

40

【 0 5 5 4 】

【表 4 5 - 2】

5	2, 6 - ジクロロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><th>0</th><td>100</td><td>100</td><td>100</td><td>96</td><td>81</td></tr><tr><th>1</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td><td>19</td></tr><tr><th>2</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><th>3</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	100	100	100	96	81	1	0	0	0	4	19	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	<table><tr><th>LC</th><th>LC+</th><th>L+</th></tr><tr><td></td><td>1CA</td><td>2CA</td></tr><tr><td>89</td><td>11</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+</th><th>HC+</th></tr><tr><td></td><td>1CA</td><td>2CA</td></tr><tr><td>100</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+	L+		1CA	2CA	89	11	-	HC	HC+	HC+		1CA	2CA	100	-	-
CA	0	1	2	4	24																																															
0	100	100	100	96	81																																															
1	0	0	0	4	19																																															
2	0	0	0	0	0																																															
3	0	0	0	0	0																																															
LC	LC+	L+																																																		
	1CA	2CA																																																		
89	11	-																																																		
HC	HC+	HC+																																																		
	1CA	2CA																																																		
100	-	-																																																		
6	2, 4 ジクロロナフタレン		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><th>0</th><td>100</td><td>95</td><td>89</td><td>81</td><td>38</td></tr><tr><th>1</th><td>0</td><td>5</td><td>11</td><td>19</td><td>45</td></tr><tr><th>2</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>16</td></tr><tr><th>3</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	100	95	89	81	38	1	0	5	11	19	45	2	0	0	0	0	16	3	0	0	0	0	2	<table><tr><th>LC</th><th>LC+</th><th>L+</th></tr><tr><td></td><td>1CA</td><td>2CA</td></tr><tr><td>66</td><td>34</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+</th><th>HC+</th></tr><tr><td></td><td>1CA</td><td>2CA</td></tr><tr><td>95</td><td>5</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+	L+		1CA	2CA	66	34	-	HC	HC+	HC+		1CA	2CA	95	5	-
CA	0	1	2	4	24																																															
0	100	95	89	81	38																																															
1	0	5	11	19	45																																															
2	0	0	0	0	16																																															
3	0	0	0	0	2																																															
LC	LC+	L+																																																		
	1CA	2CA																																																		
66	34	-																																																		
HC	HC+	HC+																																																		
	1CA	2CA																																																		
95	5	-																																																		
7	5, 7 - ジクロロキノリン - 8 - イル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><th>0</th><td>100</td><td>96</td><td>93</td><td>88</td><td>73</td></tr><tr><th>1</th><td>0</td><td>4</td><td>7</td><td>12</td><td>25</td></tr><tr><th>2</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><th>3</th><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	100	96	93	88	73	1	0	4	7	12	25	2	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	<table><tr><th>LC</th><th>LC+</th><th>L+</th></tr><tr><td></td><td>1CA</td><td>2CA</td></tr><tr><td>92</td><td>8</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+</th><th>HC+</th></tr><tr><td></td><td>1CA</td><td>2CA</td></tr><tr><td>95</td><td>5</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+	L+		1CA	2CA	92	8	-	HC	HC+	HC+		1CA	2CA	95	5	-
CA	0	1	2	4	24																																															
0	100	96	93	88	73																																															
1	0	4	7	12	25																																															
2	0	0	0	0	2																																															
3	0	0	0	0	0																																															
LC	LC+	L+																																																		
	1CA	2CA																																																		
92	8	-																																																		
HC	HC+	HC+																																																		
	1CA	2CA																																																		
95	5	-																																																		
8	N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2, 3 - ジカルボン酸イミド		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><th>0</th><td>95</td><td>43</td><td>42</td><td>40</td><td>38</td></tr><tr><th>1</th><td>5</td><td>39</td><td>39</td><td>42</td><td>40</td></tr><tr><th>2</th><td>0</td><td>15</td><td>16</td><td>15</td><td>18</td></tr><tr><th>3</th><td>0</td><td>3</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	95	43	42	40	38	1	5	39	39	42	40	2	0	15	16	15	18	3	0	3	3	4	5	<table><tr><th>LC</th><th>LC+</th><th>L+</th></tr><tr><td></td><td>1CA</td><td>2CA</td></tr><tr><td>77</td><td>23</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+</th><th>HC+</th></tr><tr><td></td><td>1CA</td><td>2CA</td></tr><tr><td>82</td><td>18</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+	L+		1CA	2CA	77	23	-	HC	HC+	HC+		1CA	2CA	82	18	-
CA	0	1	2	4	24																																															
0	95	43	42	40	38																																															
1	5	39	39	42	40																																															
2	0	15	16	15	18																																															
3	0	3	3	4	5																																															
LC	LC+	L+																																																		
	1CA	2CA																																																		
77	23	-																																																		
HC	HC+	HC+																																																		
	1CA	2CA																																																		
82	18	-																																																		

10

20

30

40

【表 4 5 - 3】

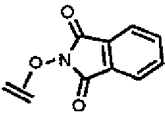
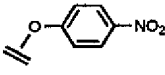
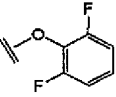
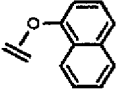
9	2-ヒドロキシ イソインドリン -1,3-ジオン		CA	0	1	2	4	24	LC	LC+	L+
			0	95	24	20	20	20			
			1	5	39	38	39	36			
			2	0	27	30	29	31			
			3	0	11	12	12	12			
10	4-ニトロ フェニル		CA	0	1	2	4	24	LC	LC+	L+
			0	96	79	67	54	41			
			1	5	21	29	37	42			
			2	0	0	4	9	15			
			3	0	0	0	0	3			
11	2,6-ジフルオ ロフェニル		CA	0	1	2	4	24	LC	LC+	L+
			0	100	93	88	79	50			
			1	0	8	12	29	39			
			2	0	0	0	0	11			
			3	0	0	0	0	0			
12	1-ナフ チル		CA	0	1	2	4	24	LC	LC+	L+
			0	100	100	100	100	100			
			1	0	0	0	0	0			
			2	0	0	0	0	0			
			3	0	0	0	0	0			

表45: 活性化エステルの結果の要約. 幾つかのデータは、更に表40-44中に与えられる.

【実施例 3 0】

10

20

30

40

50

【 0 5 5 6 】

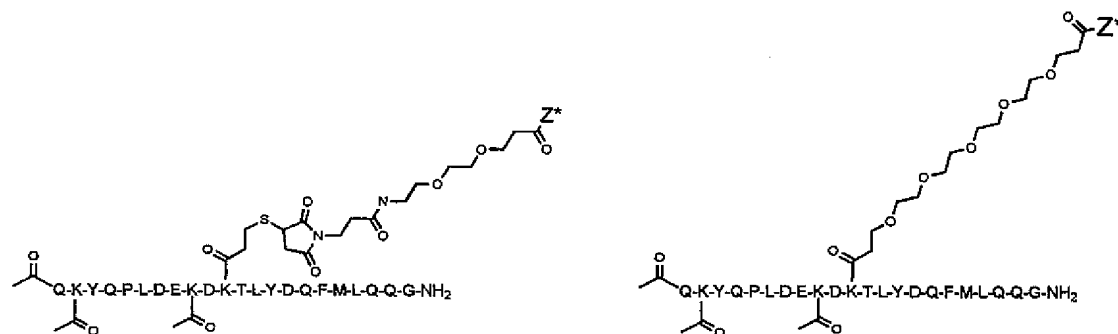
実施例 3 0

代替活性化エステルの更なる例を、表 4 5 に示す。P F P エステルの幾つかの類似体の共役の時間経過を試験した。P F P 中のフッ素基の数及び位置を減少することによって、より低い反応性の活性なエステルの形態を合成することができ、そして調査した。2 , 3 , 5 , 6 - テトラフルオロフェニルエステル及び 2 , 4 , 6 - トリフルオロフェニルエステルを、配列番号 : 2 7 - K¹¹ (S H) M A C - 2 P E G - P F P への共役後、両方試験した。1 - ヒドロキシ - ピロリジン - 2 , 5 - ジオン (N H S) を、配列番号 : 2 7 - K¹¹ - 5 P E G - P F P に共役した。

【 0 5 5 7 】

10

【 化 9 8 】



20

配列番号:27-K¹¹(SH)MAC-2PEG-PFP配列番号:27-K¹¹-5PEG-PFP

【 0 5 5 8 】

2 時間の共役後、これらのより少なく活性化された形態は、P F P より低い 2 . 1 2 . 1 . f x への全体的共役を与えた。N H S 基は、更により低い全体的な共役を示した。N H S 及び P F P を含有するペプチドは、2 . 1 2 . 1 . f x に共役した。還元された形態を、2 時間目における分布を観察するために分析した。P F P は、1 - ヒドロキシ - ピロリジン - 2 , 5 - ジオン (N H S) (全体的に L C に 3 1 % 、しかし全体的に重鎖に 3 4 %) と比較して、軽鎖の誘導体化に、はるかに大きい傾向 (全体的に L C に 7 7 % 、重鎖に 6 % のみ) を示した。

30

【 0 5 5 9 】

【表 4 6】

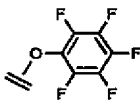
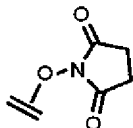
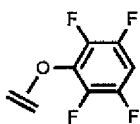
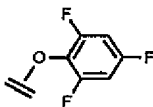
	名称	構造	2時間目における CA	2時間目における複合体の還元分析																								
1	ペンタフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>2時間</th></tr><tr><td>0</td><td>3</td></tr><tr><td>1</td><td>40</td></tr><tr><td>2</td><td>42</td></tr><tr><td>3</td><td>14</td></tr><tr><td>4</td><td>1</td></tr></table>	CA	2時間	0	3	1	40	2	42	3	14	4	1	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>LC+ 2CA</th><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>23</td><td>72</td><td>5</td><td>94</td><td>6</td><td>0</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	LC+ 2CA	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	23	72	5	94	6	0
CA	2時間																											
0	3																											
1	40																											
2	42																											
3	14																											
4	1																											
LC	LC+ 1CA	LC+ 2CA	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																							
23	72	5	94	6	0																							
13	1-ヒドロキシルピロリジン-2,5-ジオン (NHS)		<table><tr><th>CA</th><th>2時間</th></tr><tr><td>0</td><td>18</td></tr><tr><td>1</td><td>44</td></tr><tr><td>2</td><td>24</td></tr><tr><td>3</td><td>12</td></tr><tr><td>4</td><td>3</td></tr></table>	CA	2時間	0	18	1	44	2	24	3	12	4	3	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>LC+ 2CA</th><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>70</td><td>28</td><td>3</td><td>66</td><td>31</td><td>3</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	LC+ 2CA	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	70	28	3	66	31	3
CA	2時間																											
0	18																											
1	44																											
2	24																											
3	12																											
4	3																											
LC	LC+ 1CA	LC+ 2CA	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																							
70	28	3	66	31	3																							
14	2,3,5,6-テトラフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>2時間</th></tr><tr><td>0</td><td>21</td></tr><tr><td>1</td><td>44</td></tr><tr><td>2</td><td>29</td></tr><tr><td>3</td><td>5</td></tr><tr><td>4</td><td>2</td></tr></table>	CA	2時間	0	21	1	44	2	29	3	5	4	2													
CA	2時間																											
0	21																											
1	44																											
2	29																											
3	5																											
4	2																											
15	2,4,6-トリフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>2時間</th></tr><tr><td>0</td><td>80</td></tr><tr><td>1</td><td>27</td></tr><tr><td>2</td><td>2</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td></tr><tr><td>4</td><td>0</td></tr></table>	CA	2時間	0	80	1	27	2	2	3	0	4	0													
CA	2時間																											
0	80																											
1	27																											
2	2																											
3	0																											
4	0																											

表46: 代替活性化エステル—更なる例

【0560】

化合物 Z 1 - Z 1 5 は、各種の異なった構造の種類活性なエステルである。これは、芳香族環の周りの異なった数及びパターンのフッ素原子の置換を有する一連のフッ素化された芳香族の活性なエステル（化合物 Z 1、Z 2、Z 3、Z 1 1、Z 1 4 及び Z 1 5）を考慮し、そしてこれらの構造が、タンパク質の誘導体化のためにその反応性及び傾向が如何に影響するかを考慮することを啓発する。これらの誘導体の抗体共役の動態は、ペンタフルオロフェニル（Z 1）の反応が完結に達する、2時間の時点で好都合に比較すること

ができる。環の周りのフッ素置換のレベルの増加に伴い、全体の共役の増加したレベル、及び未反応抗体の同時の減少が存在する。反応の速度は、フッ素化されたフェニル脱離基の pK_a に直接関係し、最も酸性のフェノールがより高い反応速度を与える。共役の速度は、 $Z1 > Z14 > Z3 > Z15 > Z2 > Z11$ である。フッ素置換パターンの微妙な影響は、化合物 $Z2$ 、 $Z3$ 及び $Z15$ を比較することによって観察することができる。

【0561】

活性なエステルの構造は、更に結合反応の方向性に有意に影響した。一般的に、フッ素化された芳香族エステルは、軽鎖誘導体化（先に記述したように主として $CLK-K^{18}$ ）に対する顕著な傾向を示した。対照的に、 N -スクシンイミド誘導体に基づく幾つかのエステル（ $Z8$ 、 $Z9$ 及び $Z13$ ）は、より少ない優先性を示し、しばしばより大きいレベルの重鎖誘導体化が観察された。

10

【実施例31】

【0562】

実施例31

$MAC-1$ （ペプチド及び PFP 活性化基間の $PED-2$ -マレイミド-メルカプトプロピオニルリンカー）及び $MAC-2$ （ペプチド及び PFP 活性化基間の直鎖 $PEG-5$ リンカー）間の共役の速度を評価した。表47は、 $2.12.1 \times$ に対するこれらの活性化されたペプチドを比較している。結果は、活性化されたペプチドは、これらの僅かに異なったリンカーの構造にもかかわらず、誘導体化の速度及び程度に関して非常に類似して行動することを示す。

20

【0563】

【表47】

インタクト時間 (分)	MAC-2					MAC-1				
	OCA	1CA	2CA	3CA	4CA	OCA	1CA	2CA	3CA	4CA
0	72	27	1	0	0	82	18	1	0	0
10	26	56	17	1	0	29	49	20	2	0
20	13	53	29	5	0	15	47	33	5	0
30	9	51	32	8	1	9	43	40	8	0
40	7	45	39	9	1	8	41	41	8	2
50	6	43	39	11	1	7	41	42	9	2
60	5	41	40	11	2	6	36	45	11	2
70	4	40	40	14	2	6	35	46	11	2
80	3	38	44	14	2	5	36	47	10	2
90	4	37	45	13	1	6	35	46	12	2
100	4	40	41	13	2	6	35	46	11	2
110	3	40	42	14	1	6	34	46	12	3
120	4	37	44	13	1	5	35	46	12	2

30

40

表47: $MAC-1$ 及び $MAC-2$ 間の共役の比較

【実施例32】

【0564】

実施例32 リンカーの長さの影響

異なった長さのリンカーを有する最終共役分布特性に対する影響を試験した。ペプチドを PFP 基に接続する、異なった PEG の長さのリンカーを持つ化合物を合成した。0、1、2、3 及び 4 個のペプチドの $2.12.1.f \times$ への付加に対する結果を、表48に

50

要約する。全体的に、PEGリンカーの長さを変化することは、一般的に共役の分布に僅かな影響を有したことが得られた。

【0565】

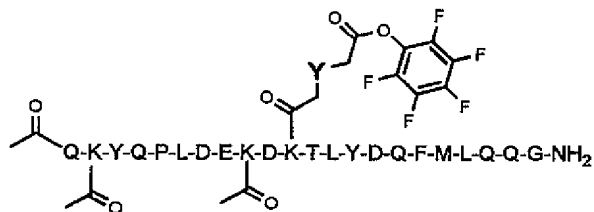
【表48】

Y= 	CA (%)				
n	0	1	2	3	4
2	8	39	44	8	0
3	6	34	47	10	2
5	4	37	44	13	1
7	4	35	49	11	0
9	3	28	49	19	2
13	3	32	54	10	0
17	6	37	51	7	0
21	4	43	45	5	2
25	11	44	38	7	0

表48: リンカーの長さの影響

【0566】

【化99】



実施例 32 の化合物の構造

【実施例33】

【0567】

実施例33: 代替ペプチド配列の共役

他のペプチド配列における本発明の適用の可能性を確認するために、配列番号: 60及び配列番号: 61 (テスト - ペプチド - 1、及び - 2) を共役した。配列番号: 60及び61を、5 - PEG - PFPとの、そして次いで2.12.1.f x抗体との共役に、配列番号: 27 - K¹¹ - 5 PEG - PFPとの反応のために先に最適化した条件下でかけた。共役特性及びLC/H C共役の分析の結果を、表49に示す。配列番号: 60及び配列番号: 61の両方は、軽鎖に対する方向性共役を示した。LC/H C分布の更なる分析において、MAC - 2のそれに対する概略70%のLCの誘導体化、及びHCに対する10%より少ない誘導体化を伴う同様な特性が観察された。

【0568】

【表 4 9】

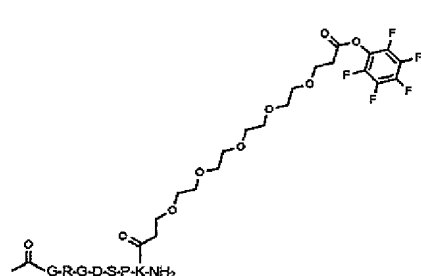
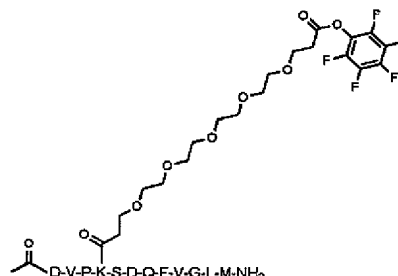
配列 番号:	% CA					LC %CA			HC %CA		
	0	1	2	3	4	LC	LC + 1	LC + 2	HC	HC + 1	HC + 2
27	2	24	55	17	3	24	65	11	91	9	-
60	11	39	43	8	0	32	68	-	95	5	-
61	8	35	48	10	0	29	71	-	94	6	-

表49: 配列番号:60及び配列番号:61の共役特性

10

【 0 5 6 9 】

【 化 1 0 0 】



20

配列番号:60/K⁷-5PEG-PFP配列番号:61/K⁴-5PEG-PFP

【 実施例 3 4 】

【 0 5 7 0 】

実施例 3 4 :

ペプチドマッピング実験を、抗体の軽鎖上の K¹⁸⁸ において方向性共役に導く重要なパラメーターを確認する目的のために、ある範囲のタンパク質 / 共役の組合せに対して行った。表 5 0 は、行われたペプチドマッピング実験の結果を記載する。それぞれの研究パラメーターに対して、先に記載したペプチドマッピング法を使用した。“ * * * ” は、K¹⁸⁸ - C L K に対する高いレベルの方向性共役を示す。“ * * ” 及びより低い程度に対する“ * ” は、方向性共役はなお観察されるが、しかし遅い反応条件、少ない全体的共役、又は一つの軽鎖のみにおける平均のような差を示すことができ、そして従って、抗体当たり 0 . 0 ないし 1 . 5 個間のペプチドを伴う M A C を産生する（例えば）ような特異的状况に更に適していることができることを示す。“ - ” は、これらの反応条件が、K¹⁸⁸ - C L K における方向性共役に対して好ましくないように見受けられるものを示す。

30

【 0 5 7 1 】

K¹⁸⁸ - C L K が方向性共役の位置である M A C - 2 において観察されたために、別のパラメーターにおけるペプチドマッピング研究は、この位置に焦点を合わせた。それぞれの研究のパラメーターに対する詳細なペプチドマッピングデータは含まれていないが、しかし他の K 残基における有意な共役レベルは観察されず、そして他の M A C の観察は、K¹⁸⁸ - C L K における方向性共役と一致した。

40

【 0 5 7 2 】

2 . 1 2 . 1 . f x の K¹⁸⁸ R 及び K¹⁸⁸ A 変異は、この部位における方向性共役の喪失をもたらす；この特異的残基の本質的な役割を示唆した。K¹⁹⁰ R、及び K¹⁹⁰ A の変異は、K¹⁸⁸ に対する方向性共役を妨害せず、そしてなおこれを向上することができる。試験された他の研究パラメーターの、軽鎖定常領域のサブタイプの少なくとも一部は、方向性共役に対する有意な影響を有することが観察された；軽鎖サブタイプカップの少なくとも一部は、必要であることが決定された。ラムダ軽鎖サブタイプへの共役（例示的なλ 含有抗体、h A b λ テスト 1 を使用）は、方向性共役を示さなかった。h A b

50

λ テスト 1 の L C λ が L C κ に変異された場合、 $K^{1 \ 8 \ 8}$ における方向性共役は回復された。

【 0 5 7 3 】

【表 5 0】

抗体	LC	変異／差 対 MAC1/2	配列 番号	リンカー	Z*	方向性共役
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	PFP	***
2.12.1.fx	κ		27	5PEG	PFP	***
2.12.1.fx Fab	κ		27	5PEG	PFP	***
h38C2-IgG1	κ		27	5PEG	PFP	***
h38C2-IgG2	κ		27	5PEG	PFP	***
hAbλ テスト	λ	K ¹⁸⁸ SH	27	5PEG	PFP	-
hAbκ テスト 1	κ		27	5PEG	PFP	***
hAbκ テスト 3	κ		39-マー	5PEG	PFP	***
hAbλ テスト	λκ		27	5PEG	PFP	***
hAbλ テスト	λκJ		27	5PEG	PFP	***
2.12.1.fx	κ	K ¹⁸⁸ R	27	5PEG	PFP	-
2.12.1.fx	κ	K ¹⁹⁰ R	27	5PEG	PFP	***
2.12.1.fx	κ	K ¹⁸⁸ R/R ¹⁹⁰ R	27	5PEG	PFP	-
2.12.1.fx	κ	D ¹⁵¹ A	27	5PEG	PFP	**
2.12.1.fx	κ	K ¹⁸⁸ A	27	5PEG	PFP	-
2.12.1.fx	κ	H ¹⁸⁹ A	27	5PEG	PFP	-
2.12.1.fx	κ	K ¹⁹⁰ A	27	5PEG	PFP	***
2.12.1.fx	κ	D ¹⁵¹ A/H ¹⁸⁹ A	27	5PEG	PFP	-
hAbλ テスト 1	λ	S ¹⁸⁸ H/H ¹⁸⁹ S	27	5PEG	PFP	-
2.12.1.fx	κ		39-マー	5PEG	PFP	***
2.12.1.fx	κ		60	5PEG	PFP	***
2.12.1.fx	κ		61	5PEG	PFP	***
h38C2-IgG2	κ		39-マー	5PEG	PFP	***
2.12.1.fx Fab	κ		ピオチン	5PEG	PFP	***
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	PFP	***
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2,3,4 TFP (2)	**
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2,3,6 TFP (3)	**
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2,3,6 TCP (4)	-
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2,6 DCP (5)	-
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2,4 DCN (6)	*
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	5,7 DCQ (7)	-
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	NH-5-N2,3DI (8)	*
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2Hi1,3 DIO (9)	*
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	4NP (10)	**
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2,6 DFP (11)	**
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	NAP (12)	-
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	1HP 2,5D (13)	*
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2,3,5,6 TFP (14)	**
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	2,4,6 TFP (15)	**
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	スクアリン酸塩	*
2.12.1.fx	κ		27	MAL-2PEG	AZD	*
2.12.1.fx	κ		27	PEG 2-17	PFP	***
2.12.1.fx	κ		27	PEG 17-21	PFP	**
2.12.1.fx	κ		27	PEG 25	PFP	**

表50: K¹⁸⁸-CLκにおける方向性共役の要約

本発明は、先に記載した代表的な態様を参照して、上に述べたように幅広く開示され、そして例示されている。当業者は、本発明に対する各種の改変を、その思想及び範囲から逸脱することなく行うことができることを認識するものである。全ての刊行物、特許出願、及び公表された特許は、本明細書中に参考文献として、あたかもそれぞれの個々の刊行物、特許出願公開又は公表された特許が、具体的に、そして個別に、その全てが参考文献として組込まれることが示されるように、同じ程度に援用される。参考文献によって組込まれた文章中に含有される定義は、これらが、本開示中の定義に矛盾する範囲に対して排除される。

【 0 5 7 5 】

明確化のために別個の態様中の文脈に記載された本発明のある種の特徴を、更に一つの態様の組合せにおいて提供することができることは認識されることである。対照的に、簡潔のために、一つの態様の文脈において記載された本発明の各種の特徴は、別個に又はいずれもの適した部分的組合せにおいて提供することができる。

10

【 0 5 7 6 】

本発明の一つの態様に関して考察されたいずれもの制約を、本発明のいずれもの他の態様に適用することができることは明確に意図されている。更に、本発明のいずれもの組成物は、本発明のいずれもの方法において使用することができる、そして本発明のいずれもの方法は、本発明のいずれもの組成物を製造又は使用するために使用することができる。特に、単独で或いは一つ又はそれより多い更なる請求項、及び／又は記載の側面との組合せで特許請求項に記載される本発明のいずれもの側面は、請求項及び／又は記載及び／又は配列の列挙及び／又は図面中の他の場所に明記された本発明の他の側面と組合せ可能であると理解されることである。

20

【 0 5 7 7 】

本明細書中に見出される具体的な例が発明の範囲内に入らない限り、前記具体的例は、明確に否認することができる。

特許請求の範囲における用語“又は”の使用は、代替物のみを指すために明確に示さない限り、“及び／又は”、或いは、開示が代替物のみ及び“及び／又は”を指す定義を支持するが、代替物が互いに排他的であることを意味するために使用される。

本明細書の仕様中で使用する場合、“一つ”又は“一つの”は、他に明確に示さない限り、一つ又はそれより多くを意味することができる。本明細書の特許請求項（等）で使用する場合、用語“含んでなる”と組合せて使用する場合、用語“一つ”又は“一つの”は、一つ又は一つより多くを意味することができる。本明細書中で使用する場合、“もう一つ”は、少なくとも二つ目又はそれより多くを意味することができる。本明細書中で他に定義しない限り、本発明に関して使用される科学的及び技術的用語は、当業者によって普通に理解される意味を有するものである。更に、文脈によって他に要求されない限り、単数の用語は、複数を含むものであり、そして複数の用語は、単数を含むものである。用語“含んでなる／含んでなり”及び用語“有し／含み”は、本発明に関して本明細書中で使用する場合、記述した特徴、整数、工程又は成分の存在を規定するために使用されるが、しかしその一つ又はそれより多い他の特徴、整数、工程、成分又は基の存在或いは付加を妨げない。

30

40

【 0 5 7 8 】

【化 1 0 1】

配列表

配列番号	説明	配列
1	重鎖2. 12. 1	図1参照
2	軽鎖2. 12. 1	図1参照
3	重鎖2. 12. 1. fx	図1参照
4	軽鎖2. 12. 1. fx	図1参照
5	CH 2.12.1 & 2.12.1.fx	図1参照
6	コンセンサス VH 2.12.1 & 2.12.1.fx. $x^2=V/A$	QxQLVESGGGLVKGPGGSLRLSCAASGFTTFSDIYMSWIRQAPGKGLEWVSYYISSSG STRDYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDGVETTFYYYYY GMDVNGQGTTVT
7	VHCDR1 2.12.1/2.12.1.fx	GFTTFSDIYMS
8	VHCDR2 2.12.1/2.12.1.fx	YISSSGSTRD YADSV
9	VHCDR3 2.12.1/2.12.1.fx	DGVETTFYYY YYGMDV
10	VHFR1 2.12.1/2.12.1.fx	QxQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAAS $[x^2=V/A]$
11	VHFR1 2.12.1.fx	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAAS
12	VHFR2 2.12.1/2.12.1.fx	WIRQAPGKGL EWVS
13	VHFR3 2.12.1/2.12.1.fx	KGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVY YCVR
14	VHFR4 2.12.1/2.12.1.fx	WGQGTTVT
15	ヒトCL κ 1-106 K ⁸⁰ は太字及び下線	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
16	CL2. 12. 1及び2. 12. 1. fx $x^{21}=I/F$ $x^{107}=K/I$	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTxTCRASQDIRRDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFAFYCYCLQHNNYPRTFGGGTKLVIXR
17	VLCDR1 2.12.1/2.12.1.fx	CRASQDIRRD LGW
18	VLCDR2 2.12.1/2.12.1.fx	IYAASRL
19	VLCDR3 2.12.1/2.12.1.fx	LQHNNYPRT
20	VLFR1 2.12.1/2.12.1.fx	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT xT $[x^{21}=I/F]$
21	VLFR1 2.12.1.fx	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT IT
22	VLFR2 2.12.1/2.12.1.fx	YQQKPGKAPK RL
23	VLFR3 2.12.1/2.12.1.fx	QSGVPSRFSG SSGSGTEFTLT ISSLPEDFA TYYC $[x^{107}=K/I]$
24	VLFR4 2.12.1/2.12.1.fx	FGQGTKLVIXR
25	2.12.1.fx VLFR4	FGQGTKLVIX R
26	ABP X2=AcK X9=AcK/L	QxYQPLDExKD KTLYDQFNLQ QG
27	ABP X2=AcK X9=AcK	QxYQPLDExKD KTLYDQFNLQ QG
28	ABP X2=AcK	QxYQPLDELD KTLYDQFNLQ QG
29	ABP X2=AcK X11=AcK	QxYQPLDEKD xTLYDQFNLQ QG
30	ABP X2=AcK X11=AcK	QxYQPLDELD xTLYDQFNLQ QG
31	ABP X2=AcK X11=AcK	QxYQPLDELD xTLYDQFNLQ QG
32	ABP X2=AcK X11=AcK	QxYQPLDELD xTLYDQFNLQ QG
33	2.12.1.fx K ¹⁸⁸ R	LC
34	2.12.1.fx K ¹⁹⁰ R	LC

10

20

30

40

【 0 5 7 9 】

【化 1 0 2】

35	2.12.1.fx K ¹⁸⁸ R/K ¹⁹⁰ R	LC
36	2.12.1.fx D ¹⁵¹ A	LC
37	2.12.1.fx K ¹⁸⁸ A	LC
38	2.12.1.fx H ¹⁸⁹ A	LC
39	2.12.1.fx K ¹⁹⁰ A	LC
40	2.12.1.fx D ¹⁵¹ A/H ¹⁸⁹ A	LC
41	hAbλテストLC軽鎖 定常領域 (ラムダ)	FGGGTQLTLVGLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVANKAD SSPVKAGVETTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
42	hAbλテスト-λx	FGGGTQLTLVLTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
43	hAbλテスト-λxJ	FGGGTQVEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
44	hAbλテスト S ¹⁸⁸ H/H ¹⁸⁹ S	FGGGTQLTLVGLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVANKAD SSPVKAGVETTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
45	hCLκ1-106 x ⁸² =Pでは ないいずれものAA x ⁴⁵ =V /A x ⁸³ =L/V	TVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNQLQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
46	ヒトCLκ1-106 x ⁴⁵ =V/A x ⁸³ =L/V	TVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNQLQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
47	ヒトCLκ1-106 x ⁸² =P以外のいずれのものaa	TVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
48	ヒトCLλ	図18参照
49	mCLκ	図18参照
50	2.12.1.fx Fab HC	図1参照
51	h38C2-IgG1 LC	図18参照
52	h38C2-IgG1 HC	図18参照
53	h38C2-IgG2 LC	配列番号:51参照
54	h38C2-IgG2 HC:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQSPKGLEWVSEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRRAEDTGIYYCKTYFYSFSYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCKVECPGPCPAPFVAG PSVPLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTQVHGDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	VL h38C2	図18参照
56	VH h38C2	図18参照
57	VL m38C2	図18参照
58	VH m38C2	図18参照
59	(gly, Ser) ₃	GGGGSGGGG SGGGGG
60	テストペプチドー1	GRGDSPE
1	テストペプチドー2	DVPKSDQFVG LM

10

20

30

40

FIG. 1A

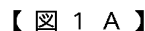
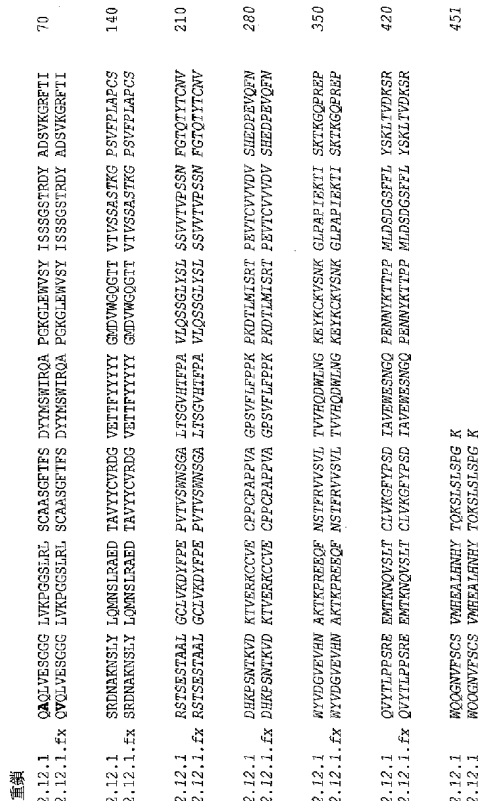
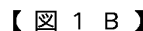
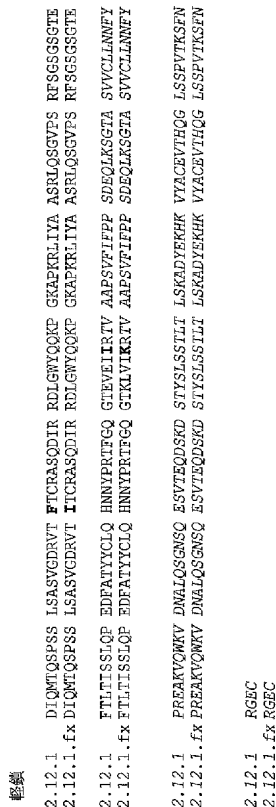
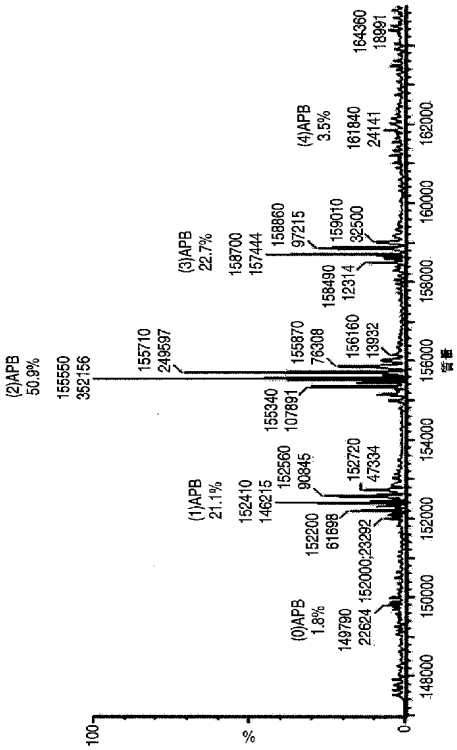


FIG. 2B



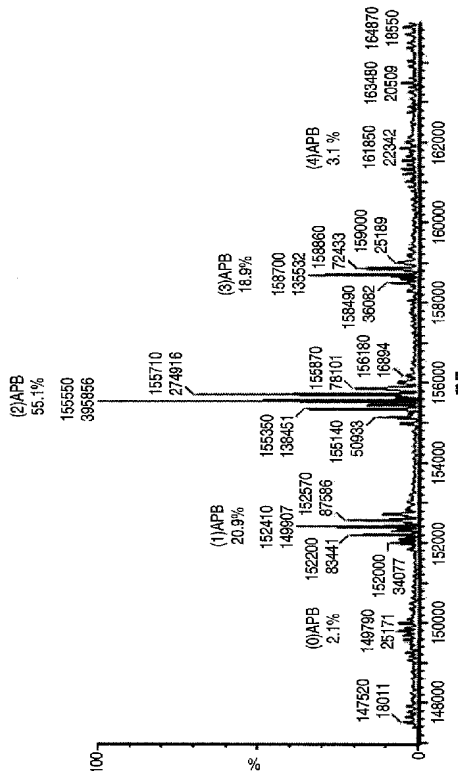
【 図 2 C 】

FIG. 2C



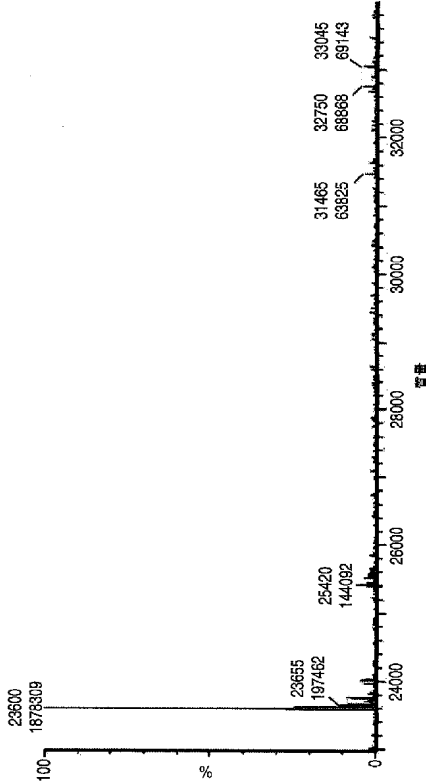
【 図 2 D 】

FIG. 2D



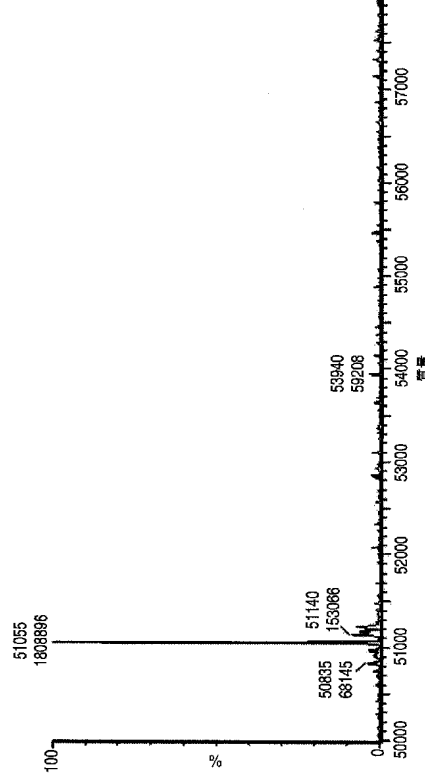
【 図 3 A 】

FIG. 3A

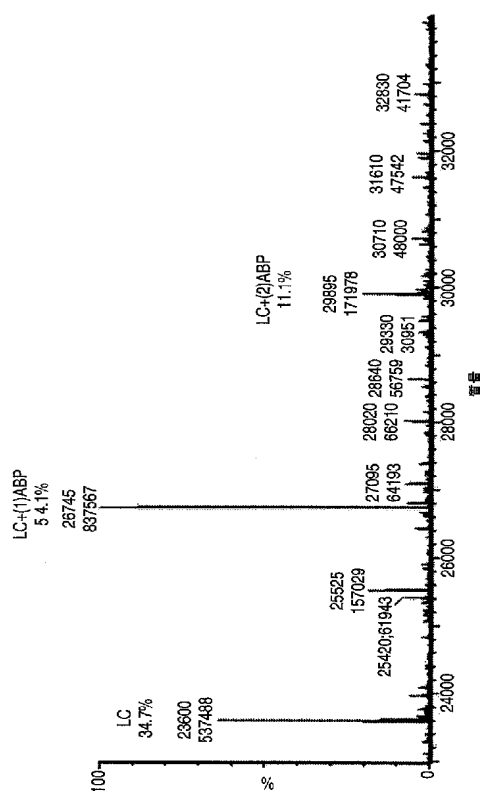


【 図 3 B 】

FIG. 3B



【 図 3 F 】



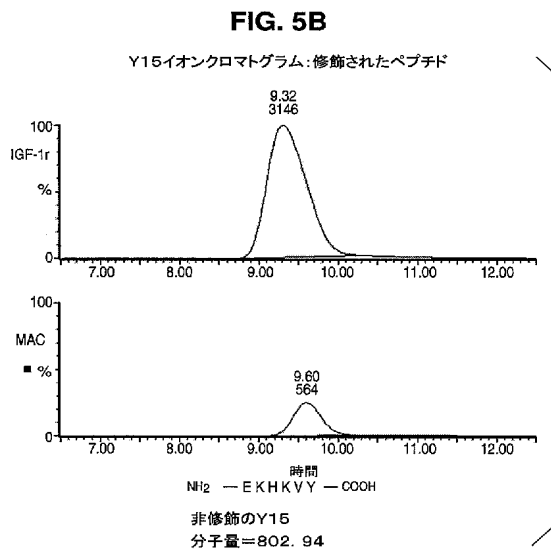
Mass spectrum of the sample showing relative intensity (%) versus m/z . The base peak is at m/z 51175. Other significant peaks are labeled at m/z 50925, 56683, 51055, 1255449, 53345, 52240, 53495, 185580, 54195, 97237, 55070, 45253, 56465, 39356, 56845, 57315, 54305, and 37842. An arrow points to the peak at m/z 54195, which is labeled HC+(1)ABP 7.2%.

Mass spectrum of HC+(-1)ABP. The x-axis represents mass (m/z) from 50000 to 57000. The y-axis represents relative intensity (%). The base peak is at m/z 51285. Other labeled peaks include:

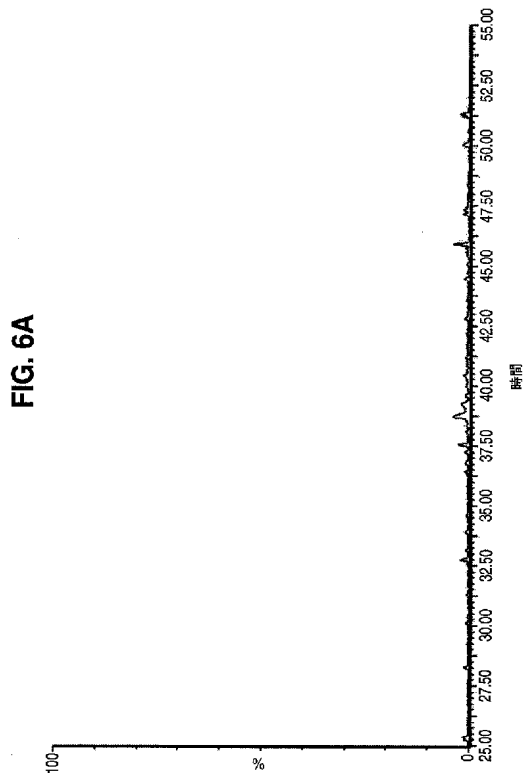
- 50015
- 50150
- 51050
- 723831
- 51215
- 271833
- 53345
- 52835
- 43720
- 21836
- 33615
- 53570
- 54360
- 53495
- 233806
- 55070
- 55580
- 32316
- 24346
- 56465
- 36923
- 57605
- 35911
- 25973
- 57000

An arrow points to the peak at m/z 53495, labeled HC+(-1)ABP 7.5%.

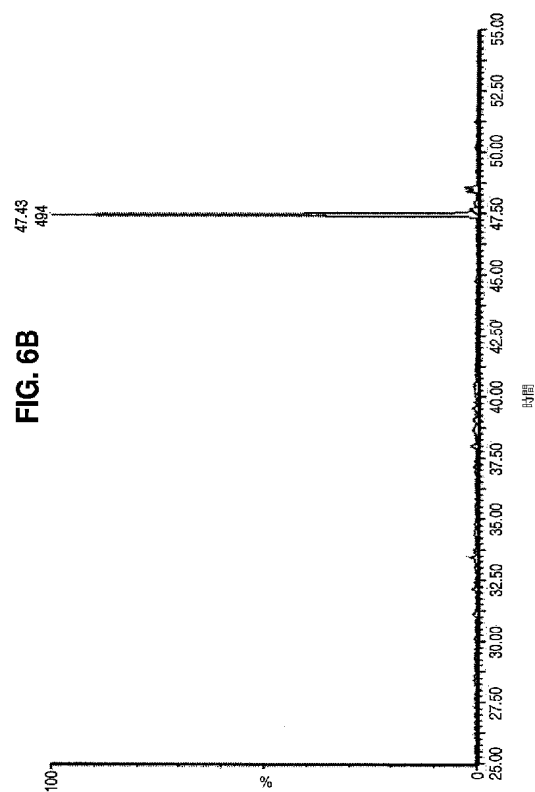
【 図 5 B 】



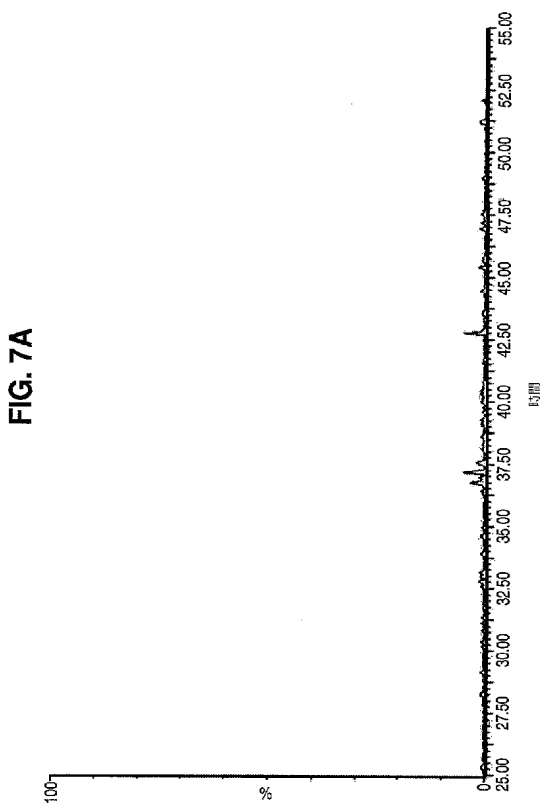
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

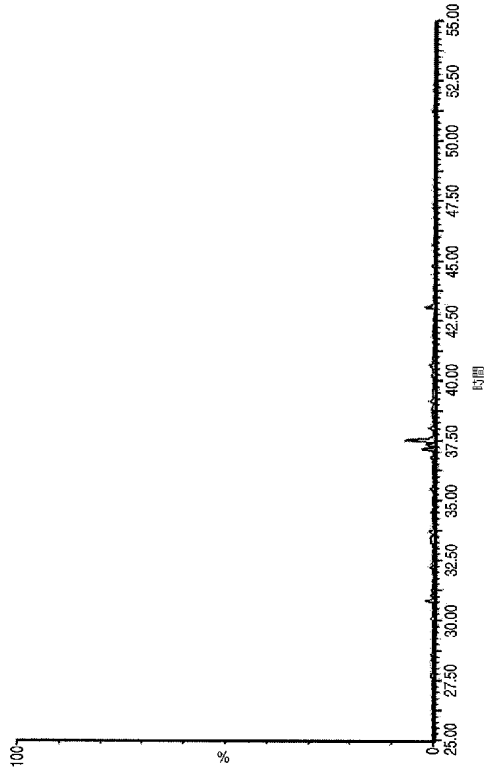


【 図 7 A 】



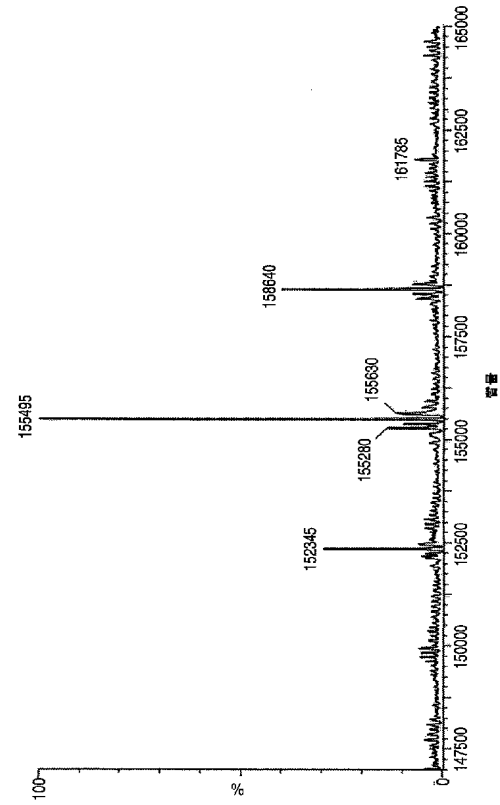
【 図 7 B 】

FIG. 7B



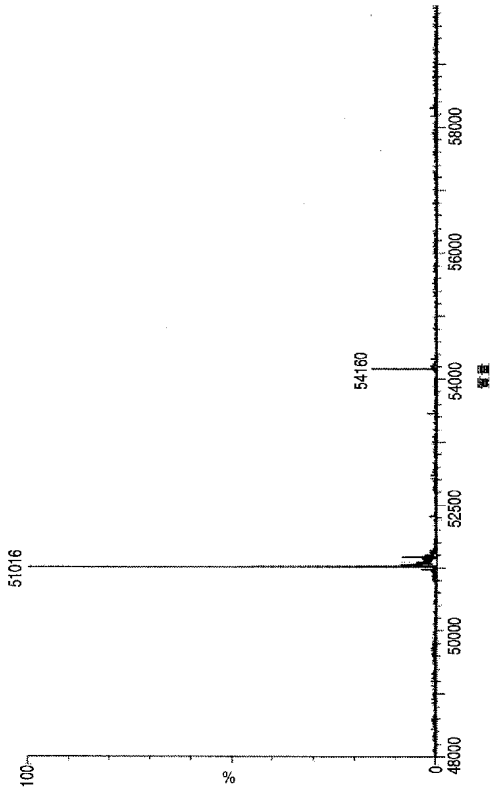
【 図 8 】

FIG. 8



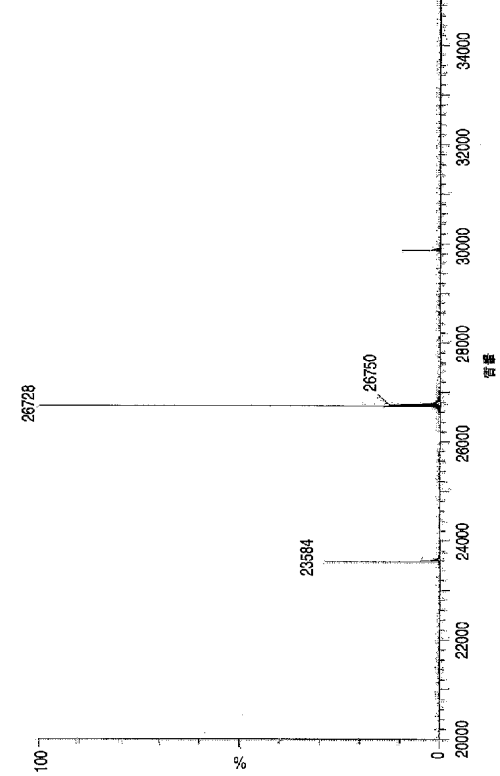
【 図 9 A 】

FIG. 9A

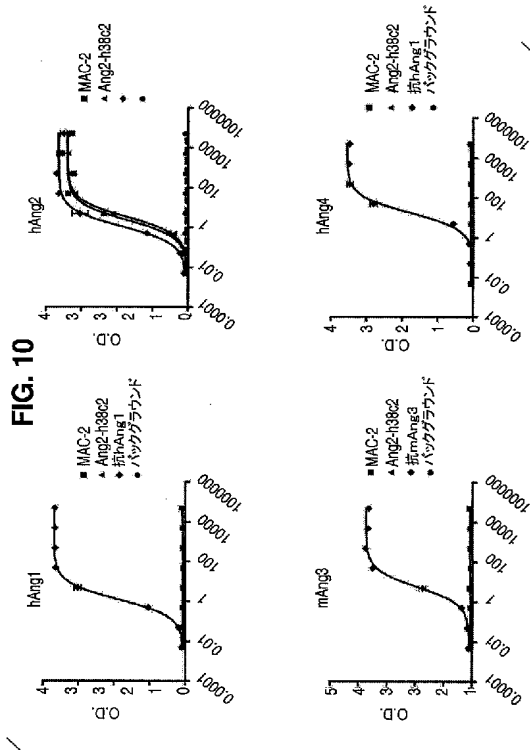


【 図 9 B 】

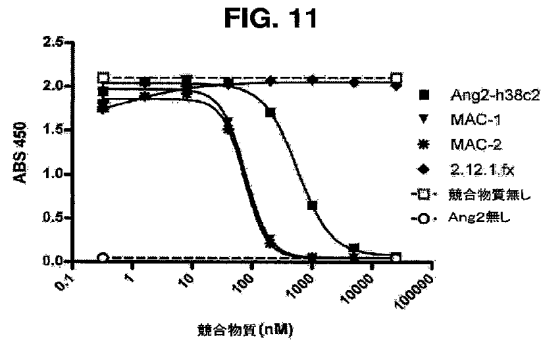
FIG. 9B



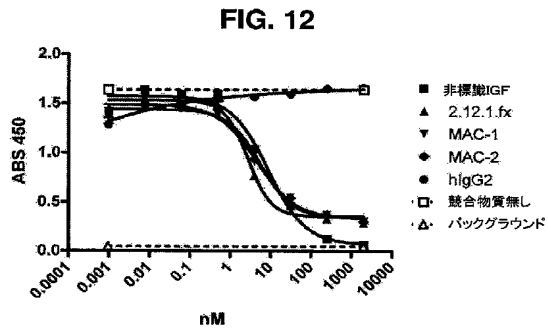
【図 10】



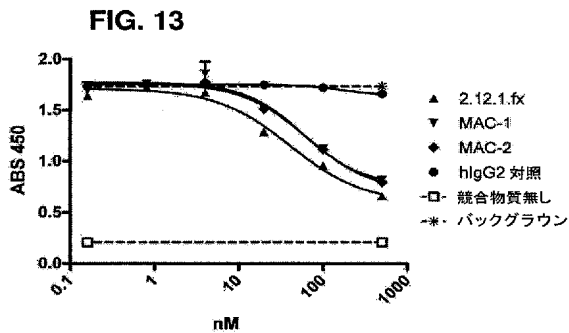
【図 11】



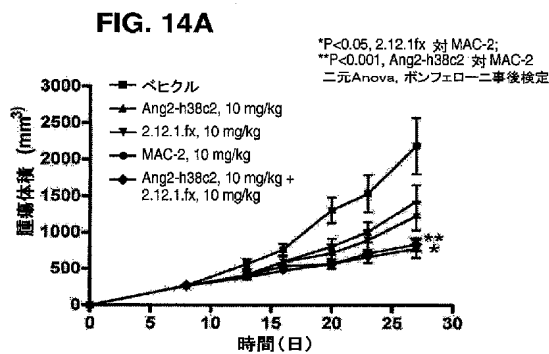
【図 12】



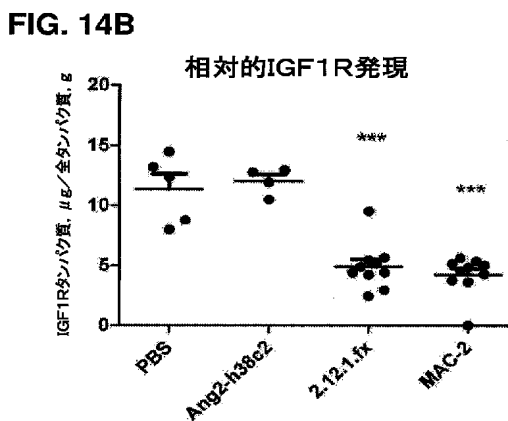
【図 13】



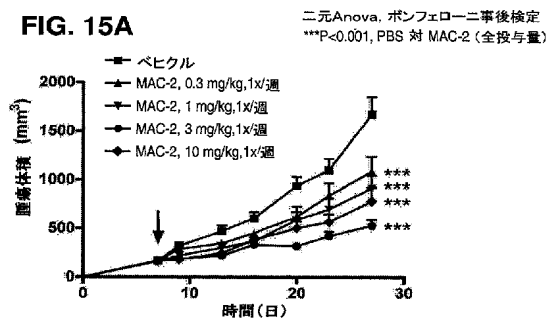
【図 14 A】



【図 14 B】

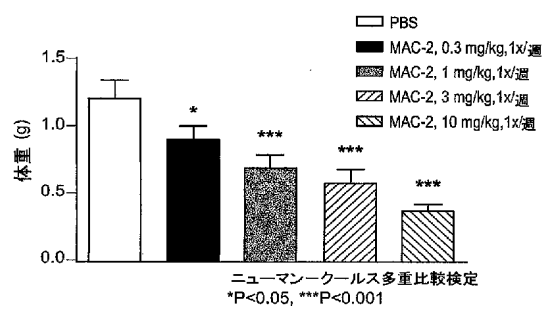


【図 15 A】



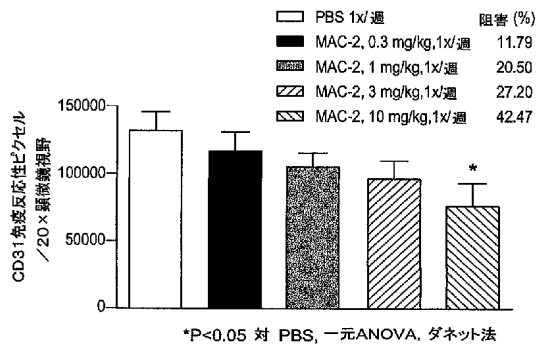
【図 15 B】

FIG. 15B



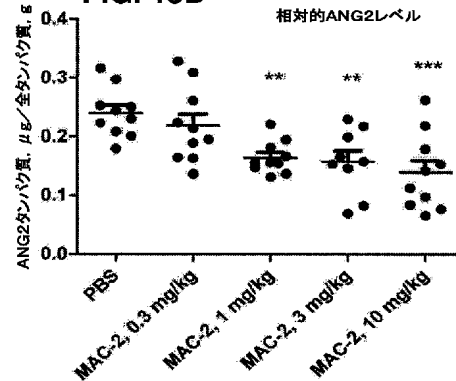
【図 15 C】

FIG. 15C



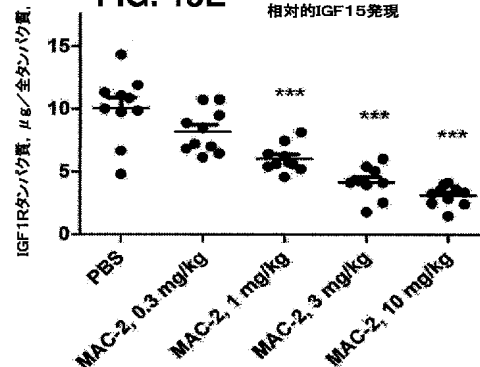
【図 15 D】

FIG. 15D



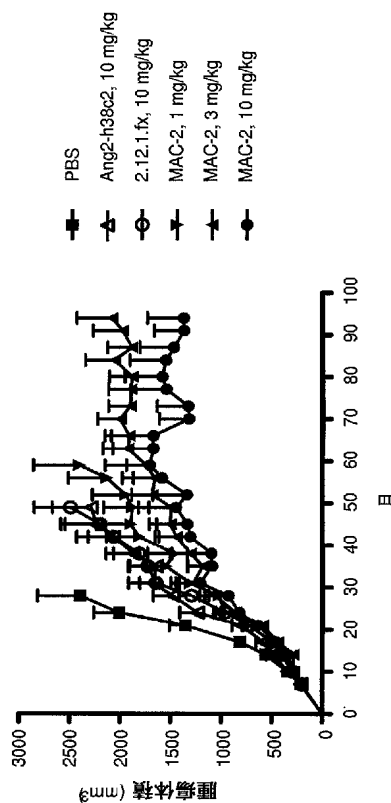
【図 15 E】

FIG. 15E



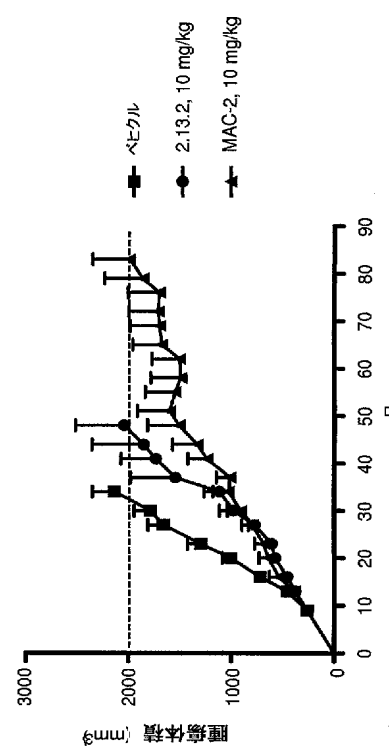
【図 16 A】

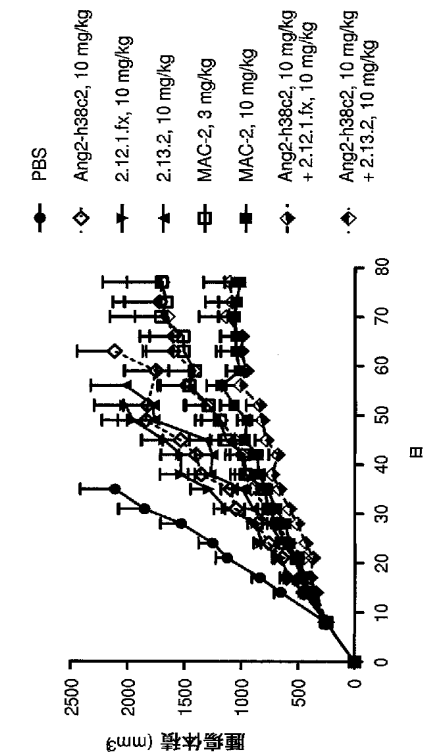
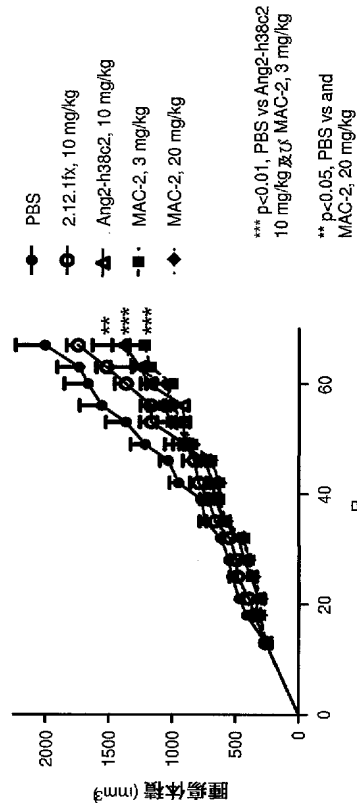
FIG. 16A



【図 16 B】

FIG. 16B



[illegible]

mCkL	--ADAPTAIVZIF PPSBOLITG CASVUCELJAN EYFEDINUKW X-DGSEFRONC- VIANSTETDQDS
mCkL	--TVAAPSVZIF PRBDOLKGS IASVCLJLAN EPXKAQVM KVDN--LAGEN SOEVSFEODS
mCkL	GOFKAAPSIVLIF PPSBBLQAN KAT-VCLISD EYPSAVTVAM XADSENVRAAG--VETTIPSKQ
mCkL	KOSTYNMGSI LITUDKEVER -HNSVCBEATH KYGSEPIVAKS FNNENC
mCkL	KOSTYVLASTI LT-SADVPEK -HKVIAEWTH OGLSEFWITS ENRCEC
mCkL	SNNKYAASY SHIPEOW-K SHRSYSOVIETH EG-ST-VENT VAFTIC

【 配 列 表 】

2013534535000001. app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/053092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 C07K16/28 ADD. A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/056346 A2 (COVX TECHNOLOGIES IRELAND LTD [IE]; BRADSHAW CURT [US]; BHAT ABHIJIT []) 15 May 2008 (2008-05-15) cited in the application page 170; examples 1, 27 pages 182-187	1-80
Y	WO 2009/136352 A1 (COVX TECHNOLOGIES IRELAND LTD [IE]; DOPPALAPUDI VENKATA RAMANA [US]; L) 12 November 2009 (2009-11-12) page 140; examples 12-16 ----- -/--	1-80
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 November 2011		Date of mailing of the international search report 06/12/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Domingues, Helena

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/053092

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HUANG HANHUA ET AL: "Angiopoietin-2 antagonistic CovX-Body™ inhibits tumor growth and reduces microvessel density", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 48, 1 April 2007 (2007-04-01), page 509, XP001536926, ISSN: 0197-016X the whole document</p> <p>-----</p>	1-80
Y	<p>Rosen et al.: "First-in-human dose-escalation safety and PK trial of a novel intravenous humanized monoclonal CovX body inhibiting angiopoietin 2. Abstract 2524", Internet Journal of Clinical Oncology, vol. 28, no. 15 20 May 2010 (2010-05-20), XP002663786, Retrieved from the Internet: URL:http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/28/15_suppl/2524?sid=e726c48d-a861-4011-b449-b0758a4956ba [retrieved on 2011-11-17] the whole document</p> <p>-----</p>	1-80
Y,P	<p>V. R. DOPPALAPUDI ET AL: "Chemical generation of bispecific antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 52, 28 December 2010 (2010-12-28), pages 22611-22616, XP55003821, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1016478108 the whole document</p> <p>-----</p>	1-80
Y,P	<p>HUANG HANHUA ET AL: "Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth.", CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 1 MAR 2011 LNKD-PUBMED:21233403, vol. 17, no. 5, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 1001-1011, XP002663787, ISSN: 1078-0432 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/053092

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HERBST ROY S ET AL: "Safety, pharmacokinetics, and antitumor activity of AMG 386, a selective angiopoietin inhibitor, in adult patients with advanced solid tumors", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 27, no. 21, 20 July 2009 (2009-07-20), pages 3557-3565, XP002613992, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2008.19.6683 the whole document -----	1-80
A,P	HUANG HANHUA ET AL: "Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy.", NATURE REVIEWS. CANCER AUG 2010 LNKD-PUBMED:20651738, vol. 10, no. 8, August 2010 (2010-08), pages 575-585, XP002663788, ISSN: 1474-1768 the whole document -----	1-80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/053092

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008056346 A2	15-05-2008	AT 520712 T	15-09-2011
		AU 2007318912 A1	15-05-2008
		CA 2669207 A1	15-05-2008
		CN 101611053 A	23-12-2009
		DK 2089425 T3	10-10-2011
		EP 2089425 A2	19-08-2009
		EP 2368908 A2	28-09-2011
		JP 2010509315 A	25-03-2010
		KR 20090090331 A	25-08-2009
		US 2008166364 A1	10-07-2008
		WO 2008056346 A2	15-05-2008

WO 2009136352 A1	12-11-2009	AR 077522 A1	07-09-2011
		AU 2009245324 A1	12-11-2009
		CA 2722474 A1	12-11-2009
		CN 102164616 A	24-08-2011
		EP 2285415 A1	23-02-2011
		JP 2011522794 A	04-08-2011
		KR 20110004471 A	13-01-2011
		TW 201006496 A	16-02-2010
		US 2010003267 A1	07-01-2010
		WO 2009136352 A1	12-11-2009

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/42 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 47/48 (2006. 01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/34 (2006. 01)	A 6 1 K 47/48	
	A 6 1 K 47/34	

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

(74) 代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72) 発明者 バト , アディジット・スレシュ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 1 , サンディエゴ , ジュディシャル・ドライブ 9 3 8
1 , スイート 2 0 0 , コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド

(72) 発明者 ブラッドショー , カート・ウィリアム

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 7 , サンディエゴ , パープル・セージ 7 9 8 0

(72) 発明者 ローラン , オリヴィエ・アレクサンドル

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 1 , サンディエゴ , ジュディシャル・ドライブ 9 3 8
1 , スイート 2 0 0 , コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド

(72) 発明者 リー , アリス

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 1 , サンディエゴ , ジュディシャル・ドライブ 9 3 8
1 , スイート 2 0 0 , コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド

(72) 発明者 プレストン , リチャード・ライアン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 1 , サンディエゴ , ジュディシャル・ドライブ 9 3 8
1 , スイート 2 0 0 , コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド

(72) 発明者 タメルティ , デーヴィッド

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 1 , サンディエゴ , ジュディシャル・ドライブ 9 3 8
1 , スイート 2 0 0 , コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド

(72) 発明者 ウッド , ローレン・ダイアン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 1 , サンディエゴ , ジュディシャル・ドライブ 9 3 8
1 , スイート 2 0 0 , コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド

(72) 発明者 ユ , ウェイ・ホン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 1 , サンディエゴ , ジュディシャル・ドライブ 9 3 8
1 , スイート 2 0 0 , コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC27 CC29 CC41 EE23 EE41 EE59 FF31 FF63 FF70

4C085 AA13 AA14 CC23 CC31 CC32 DD59 EE01

4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 DA75 EA20 FA41 FA50

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-534906

(P2013-534906A)

(43) 公表日 平成25年9月9日(2013. 9. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/605 (2006. 01)	C 0 7 K 14/605 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/26 (2006. 01)	A 6 1 K 37/28	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006. 01)	A 6 1 K 47/48	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/04 (2006. 01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/06 (2006. 01)	A 6 1 P 3/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 303 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-510240 (P2013-510240)	(71) 出願人	507277642
(86) (22) 出願日	平成23年5月10日 (2011. 5. 10)		インディアナ ユニバーシティー リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月11日 (2013. 1. 11)		INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/035913		アメリカ合衆国・インディアナ州 46202・インディアナポリス・10ストリート 351 ウェスト
(87) 国際公開番号	W02011/143209		
(87) 国際公開日	平成23年11月17日 (2011. 11. 17)	(74) 代理人	110000176
(31) 優先権主張番号	61/334, 435		一色国際特許業務法人
(32) 優先日	平成22年5月13日 (2010. 5. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/432, 077		
(32) 優先日	平成23年1月12日 (2011. 1. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 核内ホルモン受容体の活性を示すグルカゴンスーパーファミリーのペプチド

(57) 【要約】

本明細書で提供されるのは、核内ホルモン受容体に作用できるNHRリガンドに結合したグルカゴンスーパーファミリーのペプチドである。また、本明細書で提供されるのは、本発明の結合体の薬学的組成物およびキットである。さらに、本明細書で提供されるのは、たとえば、本発明の結合体を投与することを含む、糖尿病および肥満といった代謝障害などの疾患を治療する方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造 Q - L - Y を有する化合物。

(式中、Q はグルカゴンスーパーファミリーのペプチドであり、

Y は、 EC_{50} が約 $1 \mu M$ またはそれ未満で核内ホルモン受容体を活性化し、分子量が最大約 1000 ダルトンである NHR リガンドであり、

L は結合基または結合である。)

【請求項 2】

Q は、GLP - 1 受容体に対する活性が、天然の GLP - 1 の少なくとも 0.1 % である、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 3】

Q は、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの少なくとも 0.1 % である、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

Q は、GIP 受容体に対する活性が、天然の GIP の少なくとも 0.1 % である、請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 5】

Q は、GLP - 1 受容体に対する EC_{50} が、前記核内ホルモン受容体に対する Y の EC_{50} の 10 倍以内である、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

20

【請求項 6】

Q は、グルカゴン受容体に対する EC_{50} が、前記核内ホルモン受容体に対する Y の EC_{50} の 10 倍以内である、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 7】

Q は、GIP 受容体に対する EC_{50} が、前記核内ホルモン受容体に対する Y の EC_{50} の 10 倍以内である、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 8】

Y は、I 型または II 型の核内ホルモン受容体に対して作用する NHR リガンドである、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 9】

Y は、エストロゲン受容体、糖質コルチコイド受容体、鉱質コルチコイド受容体、プロゲステロン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、レチノイン酸受容体、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体、肝臓 X 受容体、ファルネソイド X 受容体、ビタミン D 受容体、RAR 関連オーファン受容体、プレグナン X 受容体からなる群から選択される核内ホルモン受容体に対して作用する NHR リガンドである、請求項 8 に記載の化合物。

30

【請求項 10】

Y は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、糖質コルチコイド受容体または RAR 関連オーファン受容体を活性化する NHR リガンドである、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】

Y は、エストロゲン受容体を活性化する NHR リガンドである、請求項 10 に記載の化合物。

40

【請求項 12】

Y は、脂肪酸およびこれらの誘導体、胆汁酸およびこれらの誘導体、コレステロールおよびこれらの誘導体、ステロイドおよびこれらの誘導体からなる群から選択される、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 13】

Y は、エストラジオールおよびこれらの誘導体、エストロンおよびこれらの誘導体、テストステロンおよびこれらの誘導体、コルチゾールおよびこれらの誘導体からなる群から選択される、請求項 12 に記載の化合物。

【請求項 14】

50

Lはin vivoで安定である、上記請求項のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項15】

Lはin vivoで加水分解可能である、上記請求項のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項16】

Lはin vivoで準安定である、上記請求項のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項17】

Lは、エーテル部分またはアミド部分を含む、請求項14に記載の化合物。

【請求項18】

Lは、エステル部分を含む、請求項15に記載の化合物。

【請求項19】

Lは、酸感受性部分、還元感受性部分または酵素感受性部分を含む、請求項16に記載の化合物。

10

【請求項20】

Lは、ヒドラゾン部分、ジスルフィド部分またはカテブシン切断可能な部分を含む、請求項19に記載の化合物。

【請求項21】

Qは、天然のグルカゴン（配列番号1601）の12番目から29番目のアミノ酸に対応するアミノ酸の α 螺旋構造を保持する天然のグルカゴンと少なくとも50%同一のアミノ酸配列を含む、上記請求項のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項22】

Qは、天然のGLP-1（配列番号1603）の12番目から29番目のアミノ酸に対応するアミノ酸の α 螺旋構造を保持する天然のGLP-1と少なくとも50%同一のアミノ酸配列を含む、上記請求項のいずれか1項に記載の化合物。

20

【請求項23】

Qは、1～3個のアミノ酸修飾を有するアミノ酸配列 $X_1 - X_2 - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{Thr} - \text{Phe} - \text{Thr} - \text{Ser} - \text{Asp} - \text{Tyr} - \text{Ser} - \text{Lys} - \text{Tyr} - \text{Leu} - \text{Asp} - \text{Ser} - \text{Arg} - \text{Arg} - \text{Ala} - \text{Gln} - \text{Asp} - \text{Phe} - \text{Val} - \text{Gln} - \text{Trp} - \text{Leu} - \text{Met} - \text{Z}$ （配列番号839）を含み、

（a） X_1 および/または X_2 は、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）による切断に対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する、（配列番号1601に対して）非天然のアミノ酸であり、

30

（b）Zは、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{Asn} - \text{COOH}$ 、 $\text{Asn} - \text{Thr} - \text{COOH}$ 、 $\text{W} - \text{COOH}$ からなる群から選択され、ここで、Wは1～2個のアミノ酸またはGPS SGAPP Sであり、

（c）Qは、

（i）i番目およびi+4番目におけるアミノ酸の側鎖間のラクタム架橋（iは12、16、20または24である）、

（ii）グルカゴンペプチドの16番目、20番目、21番目、24番目における1個、2個、3個またはすべてのアミノ酸が、 α 、 α -二置換アミノ酸で置換されていること、

40

からなる群から選択される修飾を有し、

Qは、グルカゴンアゴニスト活性を示す、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項24】

Qは、配列番号1601のアミノ酸配列を含み、かつ、

（a）

（i）29番目のThrから電荷を持つアミノ酸への置換、

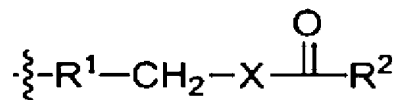
（ii）29番目のThrから、Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、

（iii）29番目でのAsp、GluまたはLysへの置換、

（iv）29番目でのGluへの置換、

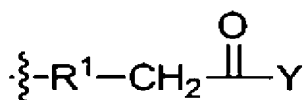
50

- (v) 29番目の後ろに電荷を持つ1～3個のアミノ酸の挿入、
 (vi) 29番目の後ろにGluまたはLysの挿入、
 (vii) 29番目の後ろにGly-LysまたはLys-Lysの挿入、
 (viii) 3番目のグルタミンから、以下の構造I、IIまたはIIIの側鎖を有するアミノ酸への置換、



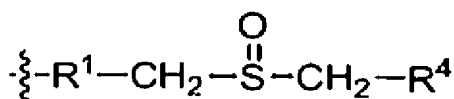
構造I

10



構造II

20



構造III

(式中、 R^1 は $\text{C}_0 \sim 3$ アルキルまたは $\text{C}_0 \sim 3$ ヘテロアルキルであり、 R^2 は NHR^4 または $\text{C}_1 \sim 3$ アルキルであり、 R^3 は $\text{C}_1 \sim 3$ アルキルであり、 R^4 はHまたは $\text{C}_1 \sim 3$ アルキルであり、Xは、NH、OまたはSであり、Yは、 NHR^4 、 SR^3 または OR^3 である)

30

- (ix) これらの組み合わせ
 からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸修飾と、
 (b) 16番目のSerからThr、GluまたはAibへの置換および
 (i) 1番目のヒスチジンからジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する非天然のアミノ酸への置換、
 (ii) 2番目のSerからジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する非天然のアミノ酸への置換、
 (iii) 7番目のThrからIle、AbuまたはValへの置換、
 (iv) 20番目のグルタミンからSer、Thr、Ala、Aib、ArgまたはLysへの置換、
 (v) 27番目のMetからLeuまたはNleへの置換、
 (vi) 28番目～29番目のアミノ酸の欠失、
 (vii) 29番目のアミノ酸の欠失、
 (viii) C末端へのアミノ酸配列GPSSGAPPPSの付加、
 (ix) C末端へのアミノ酸配列GPSSGAPPPSXの付加(Xは任意のアミノ酸である)

40

- (x) これらの組み合わせ

50

からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸修飾と、を有し、

Qは、グルカゴンゴニスト活性を示す、請求項23に記載の化合物。

【請求項25】

Qは、以下の修飾すなわち、

(a) G I P アゴニスト活性を与える、1番目のアミノ酸修飾、

(b)

(i) i 番目および i + 4 番目におけるアミノ酸の側鎖間のラクタム架橋または j 番目および j + 3 番目におけるアミノ酸の側鎖間のラクタム架橋、(i は 12、13、16、17、20 または 24 であり、j は 17 である)、

(ii) 類縁体の 16 番目、20 番目、21 番目、24 番目における 1 個、2 個、3 個またはすべてのアミノ酸が、 α , α -二置換アミノ酸で置換されていること、
からなる群から選択される修飾、

10

(c) 1 ~ 10 個の追加のアミノ酸修飾、

を有する配列番号 1601 のグルカゴン関連ペプチドを含み、

Qは、G I P 受容体に対する活性を示す、請求項1 ~ 22 のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項26】

前記 1 ~ 10 個の追加のアミノ酸修飾は、

(i) 2 番目のセリンから D - S e r、A l a、D - A l a、G l y、N - メチルセリン、A i b、V a l または ϵ - アミノ - N - 酪酸への置換、

20

(ii) 16 番目のセリンから G l u、G l n、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、T h r、G l y または A i b への置換、

(iii) 20 番目のグルタミンから S e r、T h r、A l a、L y s、シトルリン、A r g、O r n または A i b への置換、

(iv) 27 番目のメチオニンから L e u への置換、

(v) 28 番目のアルギニンから A l a への置換、

(vi) 29 番目のスレオニンから G l y への置換、

(vii) 2 番目、5 番目、9 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、15 番目、16 番目、17 番目、18 番目、20 番目、21 番目、24 番目、27 番目、28 番目、29 番目のいずれかにおける保存的な置換、

30

(viii) C 末端への 1 ~ 21 個のアミノ酸の付加、

(ix) C 末端へのアミノ酸配列 GPSSGAPPPS の付加、

(x) C 末端へのアミノ酸配列 GPSSGAPPPSX の付加 (X は任意のアミノ酸である)、

(xi) C 末端のカルボキシ基からアミドエステルまたはカルボン酸エステルへの置換、

(xii) これらの組み合わせ

からなる群から選択される、請求項25に記載の化合物。

【請求項27】

Qは、アミノ酸配列 $X_1 - X_2 - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - X_3 - S e r - X_4 - T y r - L e u - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - A l a - X_9 - X_{10} - P h e - X_{11} - X_{12} - T r p - L e u - X_{13} - X_{14} - X_{15}$ (配列番号 55) またはその類縁体を含み、前記類縁体は、1 番目、2 番目、3 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、13 番目、14 番目、17 番目、18 番目、19 番目、21 番目、25 番目から選択される 1 ~ 3 個のアミノ酸修飾が、配列番号 55 とは異なり、

40

(a) X_1 は、H i s、D - H i s、(D e s - アミノ) H i s、ヒドロキシルヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモ - H i s または α , α -ジメチルイミダゾール酢酸 (D M I A)、N - メチル H i s、 α -メチル H i s またはイミダゾール酢酸であり、

(b) X_2 は、S e r、D - S e r、A l a、D - A l a、V a l、G l y、N - メチル S e r、アミノイソ酪酸 (A i b) または N - メチル A l a であり、

(c) X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{14} は、個々に、任意のアミノ酸であり

50

、

(d) X_6 は、Ser、Glu、Gln、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸であり、

(e) X_7 は、Arg、Gln、Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンであり、

(f) X_8 は、Arg、Ala、Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンであり、

(g) X_9 は、Gln、Lys、Arg、Ornまたはシトルリンであり、

(h) X_{12} は、Ala、Gln、Glu、Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンであり、

10

(i) X_{13} は、Met、LeuまたはNleであり、

(j) X_{15} は、Thr、Gly、Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンであり、

Qは、任意に、以下の修飾すなわち、

(a) 28番目～29番目のアミノ酸の欠失、

(b) 29番目のアミノ酸の欠失、

(c) C末端へのアミノ酸配列 GPSSGAPPPS の付加、

(d) C末端へのアミノ酸配列 GPSSGAPPPSX の付加 (X は任意のアミノ酸である)、

(e) これらの組み合わせ

のうちの1つを有する、請求項1～22のいずれか1項に記載の化合物。

20

【請求項28】

Qは、配列番号1601とは10個のアミノ酸修飾だけが異なるアミノ酸配列を含み、

(a) 16番目、20番目、21番目および/または24番目の1個または2個以上のアミノ酸からAibへの置換、

(b) ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対する感受性を低減する、1番目および/または2番目のアミノ酸修飾を有し、

任意に、以下の修飾すなわち、

(a) 28番目および29番目のアミノ酸の欠失、

(b) 29番目のアミノ酸の欠失、

(c) C末端へのアミノ酸配列 GPSSGAPPPS の付加、

30

(d) C末端へのアミノ酸配列 GPSSGAPPPSX の付加 (X は任意のアミノ酸である)、

(e) C末端のカルボキシ基からアミドエステルまたはカルボン酸エステルへの置換のうちの1個または2個以上を有し、

Qは、GLP-1アゴニスト活性およびグルカゴンアゴニスト活性を示す、請求項1～22のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項29】

L-Yは、QのN末端、C末端またはアミノ酸側鎖に共有結合している、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項30】

L-Yは、天然のグルカゴン (配列番号1601) の10番目、30番目、37番目、38番目、39番目、40番目、41番目、42番目または43番目に対応するQのアミノ酸側鎖に結合している、請求項26に記載の化合物。

40

【請求項31】

L-Yは、天然のグルカゴン (配列番号1601) を含む配列の10番目および/または40番目に対応するQのアミノ酸側鎖に結合している、請求項27に記載の化合物。

【請求項32】

構造A-Bを有する、上記請求項のいずれかに記載の化合物のプロドラッグであって、式中、

Aは、アミノ酸またはヒドロキシ酸であり、

Bは、Bのカルボキシル部分とQのアミンとの間のアミド結合を介してQに結合してい

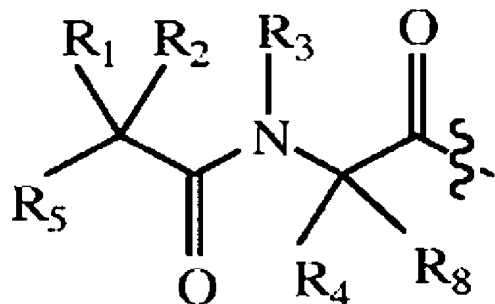
50

る N - アルキル化されたアミノ酸であり、

A、B または A - B が結合している Q のアミノ酸は、コードされていないアミノ酸であり、Q から A - B が化学的に切断される半減期 ($t_{1/2}$) が P B S 中にて生理的条件下で少なくとも約 1 時間から約 1 週間である、プロドラッグ。

【請求項 33】

A - B は以下の構造を有する、請求項 32 に記載の化合物。



I

10

(式中

(a) R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^8 は独立に、H、C1 ~ C18 アルキル、C2 ~ C18 アルケニル、(C1 ~ C18 アルキル)OH、(C1 ~ C18 アルキル)SH、(C2 ~ C3 アルキル)SCH₃、(C1 ~ C4 アルキル)CONH₂、(C1 ~ C4 アルキル)COOH、(C1 ~ C4 アルキル)NH₂、(C1 ~ C4 アルキル)NHC(NH₂⁺)NH₂、(C0 ~ C4 アルキル)(C3 ~ C6 シクロアルキル)、(C0 ~ C4 アルキル)(C2 ~ C5 複素環)、(C0 ~ C4 アルキル)(C6 ~ C10 アリール) R^7 、(C1 ~ C4 アルキル)(C3 ~ C9 ヘテロアリール)、C1 ~ C12 アルキル(W1)C1 ~ C12 アルキルからなる群から選択され、W1 は、N、S、O からなる群から選択されるヘテロ原子であるか、または

20

(ii) R^1 および R^2 は、これらが結合している原子と一緒にあって、C3 ~ C12 シクロアルキルまたはアリールを形成するか、または

30

(iii) R^4 および R^8 は、これらが結合している原子と一緒にあって、C3 ~ C6 シクロアルキルを形成し、

(b) R^3 は、C1 ~ C18 アルキル、(C1 ~ C18 アルキル)OH、(C1 ~ C18 アルキル)NH₂、(C1 ~ C18 アルキル)SH、(C0 ~ C4 アルキル)(C3 ~ C6 シクロアルキル)、(C0 ~ C4 アルキル)(C2 ~ C5 複素環)、(C0 ~ C4 アルキル)(C6 ~ C10 アリール) R^7 、(C1 ~ C4 アルキル)(C3 ~ C9 ヘテロアリール)からなる群から選択されるか、または R^4 および R^8 は、これらが結合している原子と一緒にあって、4 員環、5 員環または 6 員環の複素環を形成し、

(c) R^5 は、NHR⁶ または OH であり、

(d) R^6 は、H、C1 ~ C8 アルキルであるか、または R^6 および R^2 は、これらが結合している原子と一緒にあって、4 員環、5 員環または 6 員環の複素環を形成し、

40

(e) R^7 は、H および OH からなる群から選択される。)

【請求項 34】

アルキルアミン、アミド、エーテル、エステル、チオエーテルまたはチオエステル結合を介してアシル基またはアルキル基に共有結合している Q のアミノ酸側鎖をさらに含み、前記アシル基またはアルキル基が天然のアミノ酸に対して非天然である、上記請求項のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 35】

前記アシル基またはアルキル基が結合している前記アミノ酸は、天然のグルカゴンを含む配列の 10 番目、20 番目、24 番目、30 番目、37 番目、38 番目、39 番目、4

50

0 番目、4 1 番目、3 2 番目または4 3 番目の位置にあるか、またはC 末端アミノ酸である、請求項 3 4 に記載の化合物。

【請求項 3 6】

前記アシル基またはアルキル基が結合している前記アミノ酸は、天然のグルカゴンを含む配列の 1 0 番目および / または 4 0 番目に対応する位置にある、請求項 3 5 に記載の化合物。

【請求項 3 7】

前記アシル基または前記アルキル基は、スパーサーを介して前記アミノ酸側鎖に結合している、請求項 3 6 に記載の化合物。

【請求項 3 8】

前記スパーサーは、酸性アミノ酸または酸性ジペプチドである、請求項 3 7 に記載の化合物。

【請求項 3 9】

Q は、1 個または2 個以上の異種部分に共有結合している、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 4 0】

前記 1 個または2 個以上の異種部分は、ペプチド、ポリペプチド、核酸分子、抗体またはその断片、ポリマー、量子ドット、低分子、トキシン、診断薬、上記の任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 3 9 に記載の化合物。

【請求項 4 1】

Q は、配列番号 1 ~ 5 6 4、5 6 6 ~ 5 7 0、5 7 3 ~ 5 7 5、5 7 7、5 7 9 ~ 5 8 0、5 8 5 ~ 6 1 2、6 1 6、6 1 8 ~ 6 3 2、6 3 4 ~ 6 4 2、6 4 7、6 5 7 ~ 6 9 2、6 9 4 ~ 6 9 5、7 1 5 ~ 7 1 8、7 2 2、7 2 4 ~ 7 2 5、7 2 9、7 3 1 ~ 7 6 0、8 0 1 ~ 8 7 8、8 8 3 ~ 9 1 9、1 0 0 1 ~ 1 2 7 5、1 3 0 1 ~ 1 3 7 1、1 4 0 1 ~ 1 5 1 8、1 6 0 1 ~ 1 6 5 0 からなる群から選択される、上記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 4 2】

上記請求項のいずれかに記載の化合物を含む、ダイマーまたはマルチマー。

【請求項 4 3】

上記請求項のいずれかに記載の化合物、請求項 4 2 に記載のダイマーまたはマルチマーまたはこれらの組み合わせと、薬学的に許容されるキャリアとを含む、薬学的組成物。

【請求項 4 4】

患者における疾患または病状を治療するための方法であって、前記疾患または病状を治療するのに有効な量で、請求項 4 3 に記載の薬学的組成物を前記患者に投与することを含み、前記疾患または病状は、メタボリックシンドローム、糖尿病、肥満、脂肪肝、神経変性疾患からなる群から選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

電子的に提出する資料の援用

2 0 1 1 年 4 月 2 9 日に作成した、ファイル名「44822B_SeqListing」のコンピュータ読取り可能なアミノ酸配列リスト(8 8 9 , 7 2 3 バイトの A S C I I (テキスト形式)) を、本明細書と同時に提出し、その内容全体を本明細書に援用する。

【0 0 0 2】

関連出願へのクロスリファレンス

本出願は、2 0 1 0 年 5 月 1 3 日にファイルされた、米国仮特許出願第 6 1 / 3 3 4 , 4 3 5 号および 2 0 1 1 年 1 月 1 2 日にファイルされた同第 6 1 / 4 3 2 , 0 7 7 号の優先権の利益を主張するものである。この仮特許出願の開示内容全体を、本明細書に明示的に援用する。

【0 0 0 3】

10

20

30

40

50

本発明は、核内ホルモン受容体に対して作用できる核内ホルモン受容体リガンドに結合する、グルカゴンスーパーファミリーのペプチドを提供するものである。

【背景技術】

【0004】

核内ホルモン受容体タンパク質は、特定のDNA配列に結合すると、細胞核内での転写のオン・オフスイッチとして働くリガンド活性化タンパク質の類である。これらのスイッチは、皮膚、骨、脳の挙動中心の発生と分化ならびに、再生可能な組織の連続的な調節を制御する。

【0005】

ステロイド、ステロール、レチノイド、甲状腺ホルモン、ビタミンDなどの核内ホルモン受容体リガンドは、核内ホルモン受容体を活性化するよう機能する。ホルモンと受容体との相互作用が起こると、それが引き金となって受容体の立体構造の変化が生じ、遺伝子発現の上方制御につながる。リガンドと核内ホルモン受容体との相互作用によって活性化される細胞のシグナル伝達のレベルは、結合に利用できるリガンドおよび受容体の数やリガンドと受容体との間の結合親和性によって決まる。核内ホルモン受容体に結合する多くのリガンドおよび対応する類縁体は、たとえば、パーキンソン病(NURR1)、睡眠障害(RZR β)、関節炎および小脳性運動失調症(ROR α)、中枢神経系障害(NOR-1、Rev-ErbA β 、T1x、NGFI-B β 、HZF-2 α 、COUP-TF α 、COUP-TF β 、COUR-TF γ 、NUR77)、高コレステロール血症(LXR α 、COR)、肥満(Rev-ErbA α)、糖尿病(HNF4 α)、免疫障害(TOR) 10
(MB67 α 、SHP、FXR、SF-1、LXR β)、不妊症および避妊(GCNF、TR2-11 α , β 、TR4、ER α , β 、ERR α , β)を治療するための医薬として用いられている。

【0006】

プレプログルカゴンは、158アミノ酸からなる前駆体ポリペプチドであり、異なる組織でプロセシングされ、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、グルカゴン様ペプチド-2(GLP-2)、オキシントモジュリン(OM)などの多数の異なるプレグルカゴン由来ペプチドを生成する。これらのペプチドは、グルコースホメオスタシス、インスリン分泌、胃排出、腸管形成ならびに、食物摂取の調節などのさまざまな生理的機能に関与している。グルカゴンが、プレプログルカゴンの33番目から61番目のアミノ酸に対応する29アミノ酸からなるペプチドであるのに対し、GLP-1は、プレプログルカゴンの72番目から108番目のアミノ酸に対応する37アミノ酸からなるペプチドとして形成される。GLP-1(7-36)アミドまたはGLP-1(7-37)酸は、GLP-1の生物学的に活性の形態であり、GLP-1受容体に対して実質的に同等の活性を示す。

【0007】

グルカゴンは、重篤な低血糖症の緊急治療に用いられている。オキシントモジュリンは、食欲を抑制し、体重を減らす薬理的機能を有することが報告されている。GLP-1およびGLP-1受容体アゴニストは、II型糖尿病の治療薬として用いられている。エキセンディン-4は、GLP-1に構造が似ており、グルカゴンおよびGLP-1同様にインスリンの放出量を増す、アメリカドクトカゲの唾液に含まれるペプチドである。

【0008】

胃抑制ポリペプチド(GIP)も、グルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチドであることが知られており、セクレチンファミリーのホルモンのメンバーである。GIPは、GIP遺伝子にコードされる153アミノ酸のプロタンパク質から誘導され、生物学的に活性な42アミノ酸のペプチドとして体内を循環する。GIP遺伝子は、小腸ならびに唾液腺で発現される、胃酸分泌に対する弱い阻害因子である。GIPは、胃での阻害作用に加えて、グルコースが存在すると、生理的用量で投与されたときに膵島 β 細胞によるインスリンの放出を増す。GIPは、膵臓インスリンの放出を刺激し、グルコースホメオスタシスの維持に生理的な役割を果たすことのできる、腸内因子として機能すると考えられて 50

いる。

【0009】

オステオカルシンは、骨および象牙質に見られる非コラーゲン性タンパク質である。これは骨芽細胞から分泌され、石灰化とカルシウムイオンホメオスタシスに何らかの役割を果たすと考えられている。オステオカルシンは、体内でホルモンとして機能し、膵臓のβ細胞に作用してさらにインスリンを放出させ、同時に、インスリン感受性を上昇させるアディポネクチンホルモンを脂肪細胞に放出させることも報告されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本明細書で提供されるのは、核内ホルモン受容体リガンド（「NHRリガンド」）に結合した、グルカゴンスーパーファミリーのペプチドである。これらの複数の活性を有する結合体は、多岐にわたる疾患の治療に有用である。

【0011】

本発明のグルカゴンスーパーファミリーのペプチド結合体は、式Q-L-Yで表すことが可能なものである（式中、Qはグルカゴンスーパーファミリーのペプチドであり、YはNHRリガンドであり、Lは結合基または結合である）。

【0012】

いくつかの実施形態におけるグルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）は、グルカゴン受容体に対するアゴニスト活性、GLP-1受容体に対するアゴニスト活性、GIP受容体に対するアゴニスト活性、グルカゴン受容体およびGLP-1受容体に対するコアゴニスト活性、グルカゴン受容体およびGIP受容体に対するコアゴニスト活性、GLP-1受容体およびGIP受容体に対するコアゴニスト活性またはグルカゴン受容体、GIP受容体およびGLP-1受容体に対するトリアゴニスト活性を示すグルカゴン関連ペプチドであってもよい。いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体、GLP-1受容体またはGIP受容体に対するアンタゴニスト活性を示す。グルカゴン受容体、GLP-1受容体またはGIP受容体に対するグルカゴン関連ペプチドの活性は、本明細書に記載のいずれの教示内容に準じるものであってもよい。いくつかの具体的な実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの少なくとも0.1%、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の少なくとも0.1%あるいは、GIP受容体に対する活性が天然のGIPの少なくとも0.1%である。

【0013】

NHRリガンド（Y）は、全体または一部がペプチドではなく、本明細書に記載のいずれかの教示内容に準じる活性で、核内ホルモン受容体に対して作用する。いくつかの実施形態では、NHRリガンドは、EC₅₀またはIC₅₀が約1mMまたはそれ未満または100μMまたはそれ未満または10μMまたはそれ未満または1μMまたはそれ未満である。いくつかの実施形態では、NHRリガンドは、分子量が、最大約5000ダルトンまたは最大約2000ダルトンまたは最大約1000ダルトンまたは最大約500ダルトンである。このNHRリガンドは、本明細書に記載のどの核内ホルモン受容体にも作用するものであってもよいし、あるいは、本明細書に記載のどの構造を持つものであってもよい。

【0014】

いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対するEC₅₀（またはIC₅₀）が、核内ホルモン受容体に対するNHRリガンドのEC₅₀またはIC₅₀の約100倍以内または約75倍以内または約50倍以内または約40倍以内、約30倍以内、約25倍以内、約20倍以内、約15倍以内、約10倍以内または約5倍以内である。いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体に対するEC₅₀（またはIC₅₀）が、核内ホルモン受容体に対するNHRリガンドのEC₅₀またはIC₅₀の約100倍以内または約75倍以内または約50倍以内または

10

20

30

40

50

約40倍以内、約30倍以内、約25倍以内、約20倍以内、約15倍以内、約10倍以内または約5倍以内である。いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、GIP受容体に対するEC₅₀（またはIC₅₀）が、核内ホルモン受容体に対するNHRリガンドのEC₅₀またはIC₅₀の約100倍以内または約75倍以内または約50倍以内または約40倍以内、約30倍以内、約25倍以内、約20倍以内、約15倍以内、約10倍以内または約5倍以内である。

【0015】

本発明のいくつかの態様では、Q-L-Yのプロドラッグが提供され、ここで、このプロドラッグは、Qの活性部位にアミド結合を介して共有結合しているジペプチドプロドラッグ要素（A-B）を有する。あとから生理的条件下かつ酵素活性のない状態でジペプチドを除去すると、Q-L-Y結合体に対する活性が完全に回復する。

10

【0016】

本発明のいくつかの態様では、Q-L-Y結合体と、薬学的に許容されるキャリアとを含む薬学的組成物も提供される。

【0017】

本発明の他の態様では、患者の疾患または病状を治療するために、本明細書に記載の治療有効量のQ-L-Y結合体を投与するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、疾患または病状は、メタボリックシンドローム、糖尿病、肥満、脂肪肝、神経変性疾患からなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

20

【0018】

【図1】さまざまなグルカゴンスーパーファミリーのペプチドまたはその関連断片のアミノ酸配列のアライメントを示す。図示のアミノ酸配列は、GHRH（配列番号1619）、PHI（配列番号1622）、VIP（配列番号1620）、PACAP-27（配列番号1621）、エキセンディン-4（配列番号1618）、GLP-1（配列番号1603）、グルカゴン（配列番号1601）、オキシントモジュリン（配列番号1606）、GIP（配列番号1607）、GLP-2（配列番号1608）、セクレチン（配列番号1624）である。このアライメントは、グルカゴンのアミノ酸の位置が、どうすれば他のグルカゴンスーパーファミリーのペプチドのアミノ酸の位置に対応し得るかを示している。

30

【図2a】図2は、db/dbマウスにおいて、図示のGLP-1結合体を投与して生じた、体重の変化と血中グルコース濃度に対する影響を示すものであり、ここでは、高用量のGLP-1（Aib²A²²CexK⁴⁰）/エストロゲン（17-エステル）結合体を投与したマウスのほうが、GLP-1を単独で投与したマウスよりも体重の減り方が若干大きかったが、溶媒の場合と同等であることを示している。

【図2b】図2は、db/dbマウスにおいて、図示のGLP-1結合体を投与して生じた、体重の変化と血中グルコース濃度に対する影響を示すものであり、ここでは、高用量のGLP-1（Aib²A²²CexK⁴⁰）/エストロゲン（17-エステル）結合体を投与したマウスで、0日目から14日目までの間に血中グルコース濃度の下がり方が最も大きかったことを示し、体重の変化とは関係なく、グルコースを改善する機能が高まっていることがわかる。

40

【図2c】図2は、db/dbマウスにおいて、図示のGLP-1結合体を投与して生じた、体重の変化と血中グルコース濃度に対する影響を示すものであり、ここでは、高用量のGLP-1（Aib²A²²CexK⁴⁰）/エストロゲン（17-エステル）結合体を投与したマウスで、0日目から14日目までの間に血中グルコース濃度の下がり方が最も大きかったことを示し、体重の変化とは関係なく、グルコースを改善する機能が高まっていることがわかる。

【図3a】図3は、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示のGLP-1結合体の投与が、血糖、体重、体脂肪量、除脂肪体重に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、21日目におけるipGTT試験の結果を示している。

50

【図 3 b】図 3 は、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血糖、体重、体脂肪量、除脂肪体重に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が体重の変化に対しておよぼす影響を示している。高用量の G L P - 1 (A i b ² A ² ² C e x K ⁴ ⁰) / エストロゲン (1 7 - エステル) 結合体を投与したマウスで、体重および体脂肪量の減り方が最も大きく、除脂肪体重の変化量が最も小さかった。

【図 3 c】図 3 は、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血糖、体重、体脂肪量、除脂肪体重に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が体脂肪量の変化に対しておよぼす影響を示している。高用量の G L P - 1 (A i b ² A ² ² C e x K ⁴ ⁰) / エストロゲン (1 7 - エステル) 結合体を投与したマウスで、体重および体脂肪量の減り方が最も大きく、除脂肪体重の変化量が最も小さかった。

10

【図 3 d】図 3 は、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血糖、体重、体脂肪量、除脂肪体重に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が除脂肪体重の変化に対しておよぼす影響を示している。高用量の G L P - 1 (A i b ² A ² ² C e x K ⁴ ⁰) / エストロゲン (1 7 - エステル) 結合体を投与したマウスで、体重および体脂肪量の減り方が最も大きく、除脂肪体重の変化量が最も小さかった。

【図 3 e】図 3 は、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血糖、体重、体脂肪量、除脂肪体重に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血糖の変化に対しておよぼす影響を示している。高用量の G L P - 1 (A i b ² A ² ² C e x K ⁴ ⁰) / エストロゲン (1 7 - エステル) 結合体を投与したマウスで、0 日目から 1 4 日目までの間に血中グルコース濃度の下がり方が最も大きかった。これらの結果から、A 2 2 を基にした G L P - 1 のアゴニストにエストロゲンを付加すると、用量依存性の有効性も増強されることがわかる。

20

【図 4 a】図 4 は、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血中グルコース濃度、体重の変化、体脂肪量の変化、血糖の変化に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、腹腔グルコース耐性試験で図示の G L P - 1 結合体の投与が、一日量で 1 4 日間経過後の食餌で誘導した肥満マウスの血中グルコース濃度に対しておよぼす影響を示している。

30

【図 4 b】図 4 は、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血中グルコース濃度、体重の変化、体脂肪量の変化、血糖の変化に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、図示の G L P - 1 結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化に対しておよぼす影響を示している。高用量の G L P - 1 / エストロゲン結合体を投与したマウスで、総体重の減り方が最も大きかった。

【図 4 c】図 4 は、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血中グルコース濃度、体重の変化、体脂肪量の変化、血糖の変化に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、図示の G L P - 1 結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体脂肪量の変化に対しておよぼす影響を示している。体脂肪量は、溶媒処理動物に比して、高用量のエストロゲンエーテル結合体のほうが減少した。

40

【図 4 d】図 4 は、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血中グルコース濃度、体重の変化、体脂肪量の変化、血糖の変化に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、食餌で誘導した肥満マウスにおいて、図示の G L P - 1 結合体の投与が、血糖の変化に対しておよぼす影響を示している。高用量で、いずれかの G L P - 1 (A i b ² E ¹ ⁶ C e x K ⁴ ⁰) / エストロゲン結合体を投与したマウスのほうが、G L P - 1 (A i b ² E ¹ ⁶ C e x K ⁴ ⁰) を単独で投与したマウスよりも、0 日目から 2 1 日目までの間の血中グルコース濃度の変化が大きかった。

【図 5 a】図 5 は、図示の G L P - 1 結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化および血糖の変化に対しておよぼす影響を示す。図 5 a に示すように、高用量の G L P - 1 / エストロゲン結合体を投与したマウスで、体重の減り方が最も大きかった。

50

【図5b】図5は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化および血糖の変化に対しておよぼす影響を示す。図5bに示すように、高用量または低用量のGLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)を投与したマウスで、高用量のGLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) / エストロゲン (3-エーテル) 同様に、血糖の変化が最も大きかった。

【図6a】図6は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、体脂肪量、血糖の変化に対しておよぼす影響を示す。図6aに示すように、エストロゲン結合体を投与したマウスで、総体重の減り方が最も大きかった。

【図6b】図6は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、体脂肪量、血糖の変化に対しておよぼす影響を示す。図6bに示すように、体脂肪量の分析結果は、体重の合計減少量の点で比較的一定であった。

【図6c】図6は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、体脂肪量、血糖の変化に対しておよぼす影響を示す。図6cに示すように、GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) / エストロゲン (3-エーテル) 結合体またはGLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) / エストロゲン (17-エステル) 結合体を投与したマウスで、0日目から7日目までの間に、血中グルコース濃度の変化が最も大きかった。

【図7a】図7は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化および血糖に対しておよぼす影響を示す。図7aに示すように、GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) / エストロゲン結合体を投与したマウスで、7日間の期間にわたって総体重の減り方が最も大きかった。

【図7b】図7は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化および血糖に対しておよぼす影響を示す。図7bに示すように、GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) / エストロゲン結合体を投与したマウスで、7日間の期間にわたって血中グルコース濃度の減り方が最も大きかった。A22またはd-アミノ酸含有ペプチドのどちらも、GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) / エストロゲン結合体よりも、かなり低下の度合いが大きかった。また、GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) のエストロゲン結合体は、明らかに、同一ペプチドの非エストロゲン形態よりも効果的であった。

【図8a】図8は、図示のGLP-1結合体を投与して生じた、体重、血糖、体脂肪量の変化に対する影響を示すものである。d-アミノ酸含有ペプチドは、明らかに、l-アミノ酸含有ペプチドよりも、あらゆる測定値で劣っていた。ここでは、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化に対しておよぼす影響を示している。これらの用量のペプチドでは、エストロゲンの有無を問わず体重の低下に見た目の差はほとんどなかった。

【図8b】図8は、図示のGLP-1結合体を投与して生じた、体重、血糖、体脂肪量の変化に対する影響を示すものであり、ここでは、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの血糖の変化に対しておよぼす影響を示している。GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) / エストロゲン (3-エステル) 結合体を投与したマウスで、0日目から7日目までの間に、in vivoでの血中グルコース濃度の変化が最も大きく、同一のペプチドではあるがエストロゲンなしで投与した動物とはかけ離れていた。このことから、体重の違いとは関係なく、血糖が直接改善されていることがわかる。

【図8c】図8は、図示のGLP-1結合体を投与して生じた、体重、血糖、体脂肪量の変化に対する影響を示すものであり、ここでは、図示のGLP-1結合体を投与して生じた、体脂肪量の変化に対する影響を示している。

【図9a】図9は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、体脂肪量、血糖の変化に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、対照のl含有アミノ酸よりもd-アミノ酸含有GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体を高用量で投与したマウスのほうが、体重の減り方が大きかったことを示している。

【図9b】図9は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重

の変化、体脂肪量、血糖の変化に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、対照の1含有アミノ酸よりもd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体を高用量で投与したマウスのほうが、体脂肪量が少なかったことを示している。

【図9c】9は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、体脂肪量、血糖の変化に対しておよぼす影響を示すものである。d-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体では、0日目から7日目までの間に、明らかに用量依存性のグルコース低下が認められ、GLP-1を単独で投与したマウスと比して、最高用量でこれが増強された。

【図10a】図10は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化および血中グルコース濃度の変化に対しておよぼす影響を示すものであり、マウスに、エストロゲンが安定なアミドまたはエステルとして共有結合しているd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン結合体(in vivoで不安定になる)を投与した。ここでは、不安定なエステル結合体で処理した動物で、総体重の減り方が最も大きかったことを示している。

10

【図10b】図10は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化および血中グルコース濃度の変化に対しておよぼす影響を示すものであり、マウスに、エストロゲンが安定なアミドまたはエステルとして共有結合しているd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン結合体(in vivoで不安定になる)を投与した。ここでは、d-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲンエステル結合体を投与したマウスのほうが、0日目から7日目までの間に、これに匹敵するが安定したエストロゲン結合体を有するd-アミノ酸含有ペプチドを投与したマウスよりも血中グルコース濃度の変化が大きかった。

20

【図11a】図11は、GLP-1受容体およびエストロゲン受容体に対する図示の結合体の活性を示すものであり、活性かつ準安定のGLP-1/エストロゲン結合体が、GLP-1受容体に対して等しく活性であったことを示している。

【図11b】図11は、GLP-1受容体およびエストロゲン受容体に対する図示の結合体の活性を示すものであり、活性かつ準安定のGLP-1/エストロゲン結合体が、エストロゲン受容体に対してさまざまな活性を持っていたことを示している。

【図12a】図12は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、食物摂取量、血糖、肝臓重量、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、不活性かつエストロゲン不安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体を投与したマウスで、体重の減り方が最も大きく、高用量のほうがその影響は顕著であったことを示している。

30

【図12b】図12は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、食物摂取量、血糖、肝臓重量、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、不活性かつエストロゲン不安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体を投与したマウスのほうが、不活性なd-アミノ酸含有GLP-1単独またはエストロゲン安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスよりも、食餌の量が有意に少なく、高用量のほうがその影響が顕著であったことを示している。

40

【図12c】図12は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、食物摂取量、血糖、肝臓重量、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、高用量のエストロゲン不安定かつ不活性なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体が、溶媒処理動物よりも血中グルコース濃度を下げることが示している。

【図12d】図12は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、食物摂取量、血糖、肝臓重量、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、エストロゲン不安定かつ不活性なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスで、エストロゲン安定かつ不活性なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスよりも

50

微量であるが肝臓重量の低下が認められたことを示している。

【図12e】図12は、図示のGLP-1結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化、食物摂取量、血糖、肝臓重量、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、不活性かつエストロゲン不安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体を投与したマウスで、不活性なGLP-1単独または不活性かつエストロゲン安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスよりも、子宮重量が有意に大きく増加したことを示している。

【図13a】図13は、図示のGLP-1結合体の投与が、卵巢を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、食物摂取量、血中グルコース濃度、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、活性かつエストロゲン安定なGLP-1アゴニスト/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスのほうが、活性なGLP-1アゴニスト単独、不活性かつエストロゲン不安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体または不活性かつエストロゲン安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスよりも、体重の減り方が大きかったことを示している。

10

【図13b】図13は、図示のGLP-1結合体の投与が、卵巢を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、食物摂取量、血中グルコース濃度、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、GLP-1アゴニスト、不活性かつエストロゲン不安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体および活性かつエストロゲン安定なGLP-1アゴニスト/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスで、体脂肪量が減少したことを示している。

20

【図13c】図13は、図示のGLP-1結合体の投与が、卵巢を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、食物摂取量、血中グルコース濃度、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、活性かつエストロゲン安定なGLP-1アゴニスト/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスのほうが、活性なGLP-1アゴニスト単独、不活性かつエストロゲン不安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体または不活性かつエストロゲン安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスよりも、食物摂取量が少なかったことを示している。

【図13d】図13は、図示のGLP-1結合体の投与が、卵巢を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、食物摂取量、血中グルコース濃度、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、不活性かつエストロゲン不安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体または不活性かつエストロゲン安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体または活性かつエストロゲン安定なGLP-1アゴニスト/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスのほうが、溶媒を投与したマウスを投与したマウスよりも、血中グルコース濃度の低下が大きかったことを示している。不活性かつエストロゲン安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体では、血中グルコース濃度の低下は認められなかった。

30

【図13e】図13は、図示のGLP-1結合体の投与が、卵巢を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、食物摂取量、血中グルコース濃度、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、不活性かつエストロゲン不安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体を投与したマウスのほうが、GLP-1を単独で投与したマウス、不活性かつエストロゲン安定なd-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体または活性かつエストロゲン安定なGLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体を投与したマウスよりも、子宮重量が有意に大きく増加したことを示している。

40

【図14a】図14は、図示のGLP-1結合体の投与が、卵巢を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、血糖、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、準安定GLP-1アゴニスト/エストロゲン結合体を投与したマウスのほうが、活性なG

50

ＬＰ－１アゴニスト単独または活性かつエストロゲン不安定なＧＬＰ－１アゴニスト／エストロン（３－エステル）結合体（図１４ａおよび１４ｂ）を投与したマウスよりも、体重および体脂肪量の減り方が大きかったことを示している。準安定酵素感受および酸感受性結合体、ＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（１７－カテプシン）およびＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（１７－ヒドラゾン）を投与したマウスはそれぞれ、最初は体重が大きく減ったが、準安定チオール還元感受性結合体、ＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（１７－カルバメートジスルフィド）を投与したマウスで、全体としての体重の減り方が最も大きかった。

【図１４ｂ】図１４は、図示のＧＬＰ－１結合体の投与が、卵巣を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、血糖、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、準安定ＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン結合体を投与したマウスのほうが、活性なＧＬＰ－１アゴニスト単独または活性かつエストロゲン不安定なＧＬＰ－１アゴニスト／エストロン（３－エステル）結合体（図１４ａおよび１４ｂ）を投与したマウスよりも、体重および体脂肪量の減り方が大きかったことを示している。準安定酵素感受および酸感受性結合体、ＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（１７－カテプシン）およびＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（１７－ヒドラゾン）を投与したマウスはそれぞれ、最初は体重が大きく減ったが、準安定チオール還元感受性結合体、ＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（１７－カルバメートジスルフィド）を投与したマウスで、全体としての体重の減り方が最も大きかった。

10

【図１４ｃ】図１４は、図示のＧＬＰ－１結合体の投与が、卵巣を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、血糖、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、準安定なチオール還元性および酸感受性結合体、ＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（１７－カルバメートジスルフィド）およびＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（１７－ヒドラゾン）を投与したマウスではそれぞれ、エストロゲン不安定なＧＬＰ－１アゴニスト／エストロン（３－エステル）結合体よりも血中グルコース濃度の下がり方が大きかったことを示している。

20

【図１４ｄ】図１４は、図示のＧＬＰ－１結合体の投与が、卵巣を摘出したマウスの体重の変化、体脂肪量、血糖、子宮重量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、エストロゲン不安定なＧＬＰ－１／エストロン（３－エステル）結合体を投与したマウスのほうが、３種類の準安定ＧＬＰ－１／エストロゲン結合体のうちのどれを投与したマウスよりも、子宮重量の増え方が有意に大きかったことを示している。

30

【図１５ａ】図１５は、図示のＧＬＰ－１結合体の投与が、体重の変化および累積の食物摂取量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、活性かつエストロゲン安定なＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（３－エーテル）結合体を投与したマウスのほうが、活性なＧＬＰ－１アゴニスト単独または活性かつエストロゲン不安定なＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（３－エステル）結合体を投与したマウスよりも、体重の減り方が有意に大きかったことを示している。

【図１５ｂ】図１５は、図示のＧＬＰ－１結合体の投与が、体重の変化および累積の食物摂取量に対しておよぼす影響を示すものであり、ここでは、活性かつエストロゲン安定なＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（３－エーテル）結合体を投与したマウスのほうが、活性なＧＬＰ－１アゴニスト単独または活性かつエストロゲン不安定なＧＬＰ－１アゴニスト／エストロゲン（３－エステル）結合体を投与したマウスよりも、食物摂取量が有意に少なかったことを示している。

40

【図１６ａ】３７℃でヒト血漿中における図示のＧＬＰ－１／エストロゲン結合体の安定性を示すＨＰＬＣプロファイルを示している。エストロゲン安定なＧＬＰ－１／エストロゲン（３－エーテル）結合体では、７２時間にわたってエストロゲンの放出は見られなかったが、エストロゲン不安定なＧＬＰ－１／エストロゲン（３－エステル）結合体では、３時間後に相当なエストロゲン放出が認められ、６時間以内に完全なエストロゲン放出が認められた。

【図１６ｂ】３７℃でヒト血漿中における図示のＧＬＰ－１／エストロゲン結合体の安定

50

性を示す HPLC プロファイルを示している。エストロゲン安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体では、72 時間にわたってエストロゲンの放出は見られなかったが、エストロゲン不安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体では、3 時間後に相当なエストロゲン放出が認められ、6 時間以内に完全なエストロゲン放出が認められた。

【図 16c】37℃でヒト血漿中における図示の GLP-1 / エストロゲン結合体の安定性を示す HPLC プロファイルを示している。エストロゲン安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体では、72 時間にわたってエストロゲンの放出は見られなかったが、エストロゲン不安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体では、3 時間後に相当なエストロゲン放出が認められ、6 時間以内に完全なエストロゲン放出が認められた。

10

【図 16d】37℃でヒト血漿中における図示の GLP-1 / エストロゲン結合体の安定性を示す HPLC プロファイルを示している。エストロゲン安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体では、72 時間にわたってエストロゲンの放出は見られなかったが、エストロゲン不安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体では、3 時間後に相当なエストロゲン放出が認められ、6 時間以内に完全なエストロゲン放出が認められた。

【図 16e】37℃でヒト血漿中における図示の GLP-1 / エストロゲン結合体の安定性を示す HPLC プロファイルを示している。エストロゲン安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体では、72 時間にわたってエストロゲンの放出は見られなかったが、エストロゲン不安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体では、3 時間後に相当なエストロゲン放出が認められ、6 時間以内に完全なエストロゲン放出が認められた。

20

【図 17a】図示の結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化率、累積の食物摂取量、血中グルコース濃度に対しておよぼす影響を示している。

【図 17b】図示の結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化率、累積の食物摂取量、血中グルコース濃度に対しておよぼす影響を示している。

【図 17c】図示の結合体の投与が、食餌で誘導した肥満マウスの体重の変化率、累積の食物摂取量、血中グルコース濃度に対しておよぼす影響を示している。

【図 18a】図示の結合体の投与が、食餌で誘導した肥満野生型マウス、エストロゲン受容体β ノックアウト (ERβ KO) マウス、エストロゲン受容体α ノックアウト (ERα KO) マウスの体重の変化率、累積の食物摂取量、血中グルコース濃度に対しておよぼす影響を示している。

30

【図 18b】図示の結合体の投与が、食餌で誘導した肥満野生型マウス、エストロゲン受容体β ノックアウト (ERβ KO) マウス、エストロゲン受容体α ノックアウト (ERα KO) マウスの体重の変化率、累積の食物摂取量、血中グルコース濃度に対しておよぼす影響を示している。

【図 18c】図示の結合体の投与が、食餌で誘導した肥満野生型マウス、エストロゲン受容体β ノックアウト (ERβ KO) マウス、エストロゲン受容体α ノックアウト (ERα KO) マウスの体重の変化率、累積の食物摂取量、血中グルコース濃度に対しておよぼす影響を示している。

40

【図 19】図示の GLP-1 結合体が、血中グルコース濃度に対しておよぼす経時的な影響を示している。GLP-1 アゴニストを投与したマウスで、48 時間で (溶媒を除いて) 血糖の低下作用が最も小さかったのに対し、エストロゲン安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスは、48 時間で血糖の低下作用が最も大きかった。

【発明を実施するための形態】

【0019】

定義

本発明について説明し、権利請求するにあたり、以下に示す定義に従って次のような技

50

術用語を使用する。

【 0 0 2 0 】

本明細書で使用する場合、「約」という表現は、記載された値または値の範囲よりも 10 パーセント以内で大きいまたは小さいことを意味するが、この広めに定義された値においてのみ、値または値の範囲を示すことを意図するものではない。「約」という表現を直前に伴う値または値の範囲はいずれも、表記されている値そのものまたは値の範囲そのものの実施形態を包含することをもた、意図している。

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用する場合、「薬学的に許容されるキャリア」という表現は、リン酸緩衝生理食塩水、水、水中油滴型エマルジョンまたは油中水滴型エマルジョンなどのエマルジ
10
ョンならびに、さまざまなタイプの保湿剤といった、標準的な薬学的キャリアを含む。また、この表現は、ヒトをはじめとする動物での用途向けに米国連邦政府の規制当局によって承認された薬剤または米国薬局方に記載された薬剤も包含する。

【 0 0 2 2 】

本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される塩」という表現は、親化合物の生物学的活性を保持し、かつ、生物学的にまたはそれ以外に望ましくない点のない化合物の塩を示す。本明細書に開示する化合物の多くは、アミノ基および / またはカルボキシ基またはこれらに類する基が存在することで、酸性塩および / または塩基性塩を形成可能である。

【 0 0 2 3 】

薬学的に許容される塩基付加塩は、無機塩基および有機塩基から調製可能なものである。無機塩基から誘導される塩としては、単なる一例として、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩があげられる。有機塩基から誘導される塩としては、第 1 級アミンの塩、第 2 級アミンの塩、第 3 級アミンの塩があげられるが、これらに限定されるものではない。薬学的に許容される酸付加塩を、無機酸および有機酸から調製してもよい。無機酸から誘導される塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などがあげられる。有機酸から誘導される塩としては、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p - トルエン - スルホン酸、サリチル酸などがあげられる。
20

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用する場合、「治療する」という表現は、特定の障害または状態の予防法あるいは、特定の障害または状態に関連する症状の軽減および / またはこれらの症状を予防または解消することを含む。たとえば、本明細書で使用する場合、「糖尿病を治療する」という表現は、概して、血中グルコース濃度を正常なレベルになる方向で変化させることを示し、個々の状況に応じて血中グルコース濃度を上昇させるか低下させることを含む場合もある。
30

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用する場合、グルカゴンペプチドの「有効」量または「治療有効量」とは、無毒であるが、望ましい効果を得るのに十分なペプチドの量を示す。たとえば、ひとつの望ましい効果として、低血糖症を予防または治療できることがある。それは、たとえば、血中グルコース濃度の上昇などを基準に判断できる。本開示に記載のグルカゴンペプチドでの別の望ましい効果としては、高血糖症を治療できること、あるいは、体重減少を誘導 / 体重増加を防止できること、あるいは、体重増加を防止または低減できること、あるいは、体脂肪分布を正常化できることがある。なお、たとえば、高血糖症が治療されているかどうかは、血中グルコース濃度が正常値に近づくよう変化することなどを基準に判断でき、体重減少が誘導されているかや体重増加が防止されているかは、体重の減少などを基準に判断できる。「有効な」量は、個人の年齢や全身状態、投与モードなどに応じて、治療対象者ごとに変わってくる。このため、常に正確な「有効量」を規定できるわけではない。しかしながら、個々の症例における適切な「有効」量については、当業者がルーチンな実験を用いて判断できる。
40
50

【0026】

「非経口」という用語は、消化管を経由せず、皮下、筋肉内、脊髄内または静脈内など、他の何らかの経路によることを意味する。

【0027】

本明細書で使用する場合、「患者」という用語は、他に指定のないかぎり、飼いなされた温血脊椎動物（たとえば、家畜、ウマ、ネコ、イヌ、その他のペットを含むがこれらに限定されるものではない）、哺乳動物、ヒトを包含することを意図している。

【0028】

「単離された」という表現は、本明細書で使用する場合、それが本来の環境から取り出されていることを意味する。いくつかの実施形態では、組換え方法によって類縁体を作製し、その類縁体を宿主細胞から単離する。

10

【0029】

「精製された」という表現は、本明細書で使用する場合、ある分子または化合物が天然の環境または自然環境で通常一緒に存在する不純物を実質的に含まない形で、その分子または化合物を単離することに関し、元の組成物の他の成分から分離した結果、純度が増していることを意味する。「精製されたポリペプチド」という表現は、本明細書では、他の化合物から分離されているポリペプチドを説明するのに用いられる。ここで、他の化合物とは、核酸分子、脂質、炭水化物を含むがこれらに限定されるものではない。

【0030】

本明細書で使用する場合、「ペプチド」という用語は、2個または3個以上のアミノ酸で、一般には50個未満のアミノ酸からなる配列を包含し、ここで、アミノ酸は、天然のアミノ酸すなわちコードされたアミノ酸あるいは、非天然のアミノ酸すなわちコードされていないアミノ酸である。非天然のアミノ酸は、*in vivo*では天然に生じないが、本明細書に記載のペプチド構造に取り込むことは可能である。「コードされていない」とは、本明細書で使用する場合、以下の20種類のアミノ酸すなわち、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、TyrのいずれのL異性体でもないアミノ酸を示す。

20

【0031】

本明細書で使用する場合、「一部がペプチドではない」とは、分子の一部が、生物学的活性を有し、かつ、アミノ酸の配列を含まない化合物または置換基である分子を示す。

30

【0032】

本明細書で使用する場合、「ペプチドではない」とは、生物学的活性を有し、かつ、アミノ酸の配列を含まない分子を示す。

【0033】

本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、ポリマーの長さとは関係なく、アミノ酸のポリマーを示すのには、同義に用いられる用語である。一般に、ポリペプチドおよびタンパク質は、ポリマー長が「ペプチド」よりも長い。場合によっては、タンパク質は、互いに共有結合または非共有結合している2個以上のポリペプチド鎖を含む。

40

【0034】

本出願全体をとおして、特定のアミノ酸の位置を数字で参照する場合（28番目の位置など）はいずれも、天然のグルカゴン（配列番号1601）におけるその位置のアミノ酸またはその類縁体における対応するアミノ酸の位置を示す。たとえば、本明細書で「28番目の位置」といえば、配列番号1601の最初のアミノ酸が欠失したグルカゴンの類縁体であれば対応する27番目の位置を意味する。同様に、本明細書で「28番目の位置」といえば、配列番号1601のN末端より前に1個のアミノ酸が付加されたグルカゴンの類縁体であれば、対応する29番目の位置を意味する。

【0035】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸修飾」とは、(i)基準ペプチド（配列番号16

50

01、1603、1607など)のアミノ酸と異なるアミノ酸(天然のアミノ酸すなわちコードされたアミノ酸またはコードされていないアミノ酸すなわち非天然のアミノ酸)との置換すなわち入れ換え、(ii)基準ペプチド(配列番号1601、1603、1607など)に対する、アミノ酸(天然のアミノ酸すなわちコードされたアミノ酸またはコードされていないアミノ酸すなわち非天然のアミノ酸)の付加または(iii)基準ペプチド(配列番号1601、1603、1607など)からの1個または2個以上のアミノ酸の欠失を示す。

【0036】

いくつかの実施形態では、アミノ酸の置換すなわち入れ換えは、1番目、2番目、5番目、7番目、8番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目のうちの1箇所または2箇所以上におけるアミノ酸の保存的な置換など、保存的なアミノ酸置換である。本明細書で使用する場合、「保存的なアミノ酸置換」という表現は、1個のアミノ酸が、大きさ、電荷、疎水性、親水性および/または芳香族性などの特性の点で類似した別のアミノ酸と入れ換わることであり、以下の5群のうちの1つの範囲内での交換を含む。

10

I. 脂肪族、非極性またはわずかに極性の小さな残基

Ala、Ser、Thr、Pro、Gly

II. 極性を有し、負の電荷を持つ残基およびそのアミドおよびエステル

Asp、Asn、Glu、Gln、システイン酸およびホモシステイン酸

20

III. 極性を有し、正の電荷を持つ残基

His、Arg、Lys、オルニチン(Orn)

IV. 脂肪族で非極性の大きな残基

Met、Leu、Ile、Val、Cys、ノルロイシン(Nle)、ホモシステイン

V. 大きな芳香族残基

Phe、Tyr、Trp、アセチルフェニルアラニン

【0037】

いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、保存的なアミノ酸置換ではなく、たとえば非保存的なアミノ酸置換である。

30

【0038】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸」という用語は、アミノ官能基とカルボキシ官能基の両方を含む分子を包含し、ここでのアミノ基とカルボキシ基は同一の炭素(α 炭素)に結合している。 α 炭素は、任意に、1個または2個の別の有機置換基を有するものであってもよい。本開示の目的で、異性体の型を明記しない場合のアミノ酸の表示は、アミノ酸のL型またはD型あるいは、ラセミ混合物を包含することを意図している。しかしながら、アミノ酸を3文字コードで表記し、そこに上付の数字を含む(すなわち、Lys⁻¹)場合、その表示はアミノ酸の天然のL型を示すことを意図したものであるのに対し、D型については、3文字コードの前に半角のdと、上付の数字を含めて示してある(すなわち、dLys⁻¹)。

40

【0039】

本明細書で使用する場合、「ヒドロキシ酸」という用語は、 α 炭素のアミノ基をヒドロキシ基に入れ換える修飾がなされたアミノ酸を示す。

【0040】

本明細書で使用する場合、「電荷を持つアミノ酸」という表現は、生理的pHの水溶液中で負の電荷を持つ(すなわち、脱プロトン化された)または正の電荷を持つ(すなわち、プロトン化された)側鎖を有するアミノ酸を示す。たとえば、負の電荷を持つアミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸があげられるのに対し、正の電荷を持つアミノ酸としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンがあげられる。電荷を持つアミノ酸としては、20種類のコードされたアミノ酸ならびに、典型的ではないアミノ酸または非天然のアミノ酸すなわちコードされてい

50

ないアミノ酸のうち、電荷を持つアミノ酸があげられる。

【0041】

本明細書で使用する場合、「酸性アミノ酸」という用語は、第2の酸性部分（アミノ酸の α カルボン酸以外）を含むアミノ酸を示し、たとえば、側鎖のカルボン酸基またはスルホン酸基があげられる。

【0042】

本明細書で使用する場合、「アシル化された」アミノ酸は、それを製造する手段とは関係なく、天然のアミノ酸に対して非天然のアシル基を含むアミノ酸である。アシル化されたアミノ酸およびアシル化されたペプチドを製造する方法の例は、当分野で知られており、アミノ酸をアシル化した上でペプチドに含ませることや、ペプチド合成後にこのペプチドを化学的にアシル化することを含む。いくつかの実施形態では、アシル基が、ペプチドに、(i)血中半減期を延ばすこと、(ii)作用開始を遅らせること、(iii)作用時間を延ばすこと、(iv)DPP-IVなどのプロテアーゼに対する耐性を改善すること、(v)グルカゴンスーパーファミリーのペプチド受容体における作用を増強することのうちの1つまたは2つ以上をさせる。

【0043】

本明細書で使用する場合、「アルキル化された」アミノ酸は、それを製造する手段とは関係なく、天然のアミノ酸に対して非天然のアルキル基を含むアミノ酸である。アルキル化されたアミノ酸およびアルキル化されたペプチドを製造する方法の例は、当分野で知られており、アミノ酸をアルキル化した上でペプチドに含ませることや、ペプチド合成後にこのペプチドを化学的にアルキル化することを含む。特定の理論に拘泥することなく、ペプチドのアルキル化によって、ペプチドのアシル化と同一でないにしても似たような作用、たとえば血中半減期を延ばすこと、作用開始を遅らせること、作用時間を延ばすこと、DPP-IVなどのプロテアーゼに対する耐性を改善すること、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド受容体における作用を増強することなどが達成され则认为られている。

【0044】

n が1~18であり得る「 $C_1 \sim C_n$ アルキル」という表現は、本明細書で使用する場合、1個から指定数までの炭素原子を有する分岐状または直鎖状のアルキル基を表す。たとえば、 $C_1 \sim C_6$ アルキルは、炭素原子数が1~6の分岐状または直鎖状のアルキル基を表す。一般的な $C_1 \sim C_{18}$ アルキル基としては、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。任意に、アルキル基は、ヒドロキシ(OH)、ハロ、アリール、カルボキシル、チオ、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、アミノなどで置換可能である。

【0045】

n が1~18であり得る「 $C_0 \sim C_n$ アルキル」という表現は、本明細書で使用する場合、最大で18個の炭素原子を有する分岐状または直鎖状のアルキル基を表す。たとえば、「($C_0 \sim C_6$ アルキル)OH」という表現は、最大6個の炭素原子を有するアルキル置換基に結合しているヒドロキシ基である親部分(hydroxyl parent moiety)を表す(-OH、-CH₂OH、-C₂H₄OH、-C₃H₆OH、-C₄H₈OH、-C₅H₁₀OH、-C₆H₁₂OHなど)。

【0046】

n が2~18であり得る「 $C_2 \sim C_n$ アルケニル」という表現は、本明細書で使用する場合、2個から指定数までの炭素原子と、少なくとも1個の二重結合とを有する分岐状または直鎖状の不飽和基を表す。このような基の例としては、1-プロペニル、2-プロペニル(-CH₂-CH=CH₂)、1,3-ブタジエニル、(-CH=CHCH=CH₂)、1-ブテニル(-CH=CHCH₂CH₃)、ヘキセニル、ペンテニルなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。アルケニル基は、任意に、ヒドロキシ(OH)、ハロ、アリール、カルボキシル、チオ、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、アミノなどで置

10

20

30

40

50

換可能である。

【0047】

n が 2 ~ 18 であり得る「 $C_2 \sim C_n$ アルキニル」という表現は、2 個から n 個までの炭素原子と、少なくとも 1 個の三重結合とを有する分岐状または直鎖状の不飽和基を示す。このような基の例としては、1 - プロピニル、2 - プロピニル、1 - ブチニル、2 - ブチニル、1 - ペンチニルなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。アルキニル基は、任意に、ヒドロキシ(OH)、ハロ、アリール、カルボキシル、チオ、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、アミノなどで置換可能である。

【0048】

本明細書で使用する場合、「アリール」という用語は、単環式または多環式(たとえば、二環式、三環式または四環式)の芳香族基を示す。アリール環(単数または複数)の大きさについては、存在する炭素の数で表示する。たとえば、「($C_1 \sim C_3$ アルキル)($C_6 \sim C_{10}$ アリール)」という表現は、 $C_1 \sim C_3$ のアルキル鎖を介して親部分(parent moiety)に結合している $C_6 \sim C_{10}$ のアリールを示す。他に示さなければ、アリール基は、たとえば、ハロ、アルキル、アルケニル、 OCF_3 、 NO_2 、CN、NC、OH、アルコキシ、アミノ、 CO_2H 、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C(O)O$ アルキル、アリール、ヘテロアリールから独立に選択される 1 個または 2 個以上、特に 1 個から 5 個の基で置換されていても、されていなくてもよい。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、クロロフェニル、インダニル、インデニル、メチルフェニル、メトキシフェニル、トリフルオロメチルフェニル、ニトロフェニル、2, 4 - メトキシクロロフェニルなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0049】

本明細書で使用する場合、「ヘテロアリール」という用語は、1 個または 2 個以上の芳香環を含み、この芳香環に窒素原子、酸素原子または硫黄原子を少なくとも 1 個含む単環式または多環式の環系を示す。ヘテロアリール環の大きさと、置換基または結合基の存在については、存在する炭素の数で表示する。たとえば、「($C_1 \sim C_6$ アルキル)($C_5 \sim C_6$ ヘテロアリール)」という表現は、 $C_1 \sim C_6$ のアルキル鎖を介して親部分に結合している $C_5 \sim C_6$ のヘテロアリールを示す。他に示さなければ、ヘテロアリール基は、たとえば、ハロ、アルキル、アルケニル、 OCF_3 、 NO_2 、CN、NC、OH、アルコキシ、アミノ、 CO_2H 、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C(O)O$ アルキル、アリール、ヘテロアリールから独立に選択される 1 個または 2 個以上、特に 1 個から 5 個の基で置換されていても、されていなくてもよい。ヘテロアリール基の例としては、チエニル、フリル、ピリジル、オキサゾリル、キノリル、チオフェニル、イソキノリル、インドリル、トリアジニル、トリアゾリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、イミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ピラジニル、ピリミジニル、チアゾリル、チアジアゾリルがあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0050】

本明細書で使用する場合、「ヘテロアルキル」という用語は、構造の骨格に、表記の数の炭素原子と、少なくとも 1 個のヘテロ原子とを含む直鎖状または分岐状の炭化水素を示す。本明細書の目的で適したヘテロ原子としては、N、S、O があげられるが、これらに限定されるものではない。ヘテロアルキル基は、任意に、ヒドロキシ(OH)、ハロ、アリール、カルボキシル、アミノなどで置換することも可能である。

【0051】

本明細書で使用する場合、「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素からなる群の 1 つまたは 2 つ以上の構成要素を示す。

【0052】

本明細書で使用する場合、「グルカゴン関連ペプチド」という用語は、グルカゴン受容体、GLP - 1 受容体、GLP - 2 受容体、GIP 受容体のうちの 1 個または 2 個以上に対して(アゴニストまたはアンタゴニストとしての)生物学的活性を有し、天然のグルカゴン、天然のオキシントモジュリン、天然のエキセンディン - 4、天然の GLP - 1、天

然の G L P - 2 または天然の G I P のうちの少なくとも 1 つとの配列同一性が少なくとも 40 % (45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % など) であるアミノ酸配列を含むペプチドを示す。他に述べなければ、(N H R リガンドの結合、結合部分の結合、親水性ポリマーの結合、アシル化またはアルキル化などについて) グルカゴン関連ペプチドにおけるアミノ酸の位置に言及する場合、天然グルカゴンのアミノ酸配列 (配列番号 1 6 0 1) に照らして対応する位置を示す。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用する場合、第 2 の受容体と比較した場合の第 1 の受容体に対する分子の「選択性」という表現は、第 2 の受容体に対する分子の EC_{50} を第 1 の受容体に対する分子の EC_{50} で割った比を示す。たとえば、第 1 の受容体に対する EC_{50} が 1 nM で、第 2 の受容体に対する EC_{50} が 100 nM の分子は、第 2 の受容体と比較した場合の第 1 の受容体に対する選択性が 100 倍である。

【 0 0 5 4 】

「同一性」という用語は、本明細書で使用する場合、2 つまたは 3 つ以上の配列間の類似性と関連している。同一性は、同一残基数を残基の総数で割り、その結果に 100 を掛けてパーセンテージを得ることで求められる。このため、完全に同じ配列の 2 つのコピーは同一性が 100 % であるのに対し、比較したときにアミノ酸の欠失、付加または置換のある 2 つの配列の同一性の度合いは、それよりも低くなる。BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al. (1993) J. Mol. Biol. 215:403-410) などのアルゴリズムを用いたものなどのいくつかのコンピュータプログラムを利用して配列の同一性を求められることは、当業者にはわかるであろう。

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用する場合、「グルカゴンスーパーファミリーのペプチド」という表現は、N 末端領域および C 末端領域における構造が関連する一群のペプチドを示す (たとえば、Sherwood et al., Endocrine Reviews 21: 619-670 (2000) を参照のこと)。この群に含まれるメンバーは、すべてのグルカゴン関連ペプチド、さらには成長ホルモン放出ホルモン (G H R H、配列番号 1 6 1 9)、血管作用性小腸ペプチド (V I P、配列番号 1 6 2 0)、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド 27 (P A C A P - 27、配列番号 1 6 2 1)、ペプチドヒスチジンイソロイシン (P H I、配列番号 1 6 4 2)、ペプチドヒスチジンメチオニン (P H M、配列番号 1 6 2 2)、セクレチン (配列番号 1 6 2 3) ならびに、天然のペプチドと比較した場合に最大 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 のアミノ酸修飾を有する類縁体、誘導体または結合体を含む。このようなペプチド (アゴニストまたはアンタゴニスト) は、グルカゴン受容体スーパーファミリーの受容体と相互作用する能力を保持していると好ましい。他に述べなければ、(N H R リガンドの結合、結合部分の結合、親水性ポリマーの結合、アシル化またはアルキル化などについて) グルカゴンスーパーファミリーのペプチドにおけるアミノ酸の位置に言及する場合、天然グルカゴンのアミノ酸配列 (配列番号 1 6 0 1) に照らして対応する位置を示す。代表的なグルカゴンスーパーファミリーのペプチドのアライメントに関しては、図 1 を参照のこと。

【 0 0 5 6 】

「グルカゴンアゴニストのペプチド」という表現は、グルカゴン受容体と結合し、グルカゴン受容体の下流シグナルを活性化する化合物を示す。しかしながら、この表現は、その化合物をグルカゴン受容体だけに対して活性を持つことに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、本開示内容におけるグルカゴンアゴニストのペプチドは、本明細書でさらに論じるように、他の受容体に対して別の活性を示すものであってもよい。グルカゴンアゴニストのペプチドは、たとえば、G L P - 1 受容体および / または G I P 受容体に対する活性 (アゴニスト活性など) を示すものであってもよい。また、「グルカゴンアゴニストのペプチド」という表現は、その化合物を、ペプチドだけに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、ペプチド以外の化合物も、この表現に包含される。したがって、いくつかの態様でのグルカゴンアゴニストのペプチドは、結合体のペプチ

ド（ヘテロダイマー、マルチマー、融合ペプチド）、化学的に誘導体化されたペプチド、ペプチドの薬学的な塩、擬似ペプチドなどである。

【0057】

「GLP-1 アゴニストのペプチド」という表現は、GLP-1 受容体と結合し、GLP-1 受容体の下流シグナルを活性化する化合物を示す。しかしながら、この表現は、その化合物を、GLP-1 受容体だけに対して活性を持つことに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、本開示内容における GLP-1 アゴニストのペプチドは、本明細書でさらに論じるように、他の受容体に対して別の活性を示すものであってもよい。GLP-1 アゴニストのペプチドは、たとえば、グルカゴン受容体および / または GIP 受容体に対する活性（アゴニスト活性など）を示すものであってもよい。また、「GLP-1 アゴニストのペプチド」という表現は、その化合物を、ペプチドだけに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、ペプチド以外の化合物も、この表現に包含される。したがって、いくつかの態様での GLP-1 アゴニストのペプチドは、結合体のペプチド（ヘテロダイマー、マルチマー、融合ペプチド）、化学的に誘導体化されたペプチド、ペプチドの薬学的な塩、擬似ペプチドなどである。

10

【0058】

「GIP アゴニストのペプチド」という表現は、GIP 受容体と結合し、GIP 受容体の下流シグナルを活性化する化合物を示す。しかしながら、この表現は、その化合物を、GIP 受容体だけに対して活性を持つことに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、本開示内容における GIP アゴニストのペプチドは、本明細書でさらに論じるように、他の受容体に対して別の活性を示すものであってもよい。GIP アゴニストのペプチドは、たとえば、GLP-1 受容体に対する活性（アゴニスト活性など）を示すものであってもよい。また、「GIP アゴニストのペプチド」という表現は、その化合物を、ペプチドだけに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、ペプチド以外の化合物も、この表現に包含される。したがって、いくつかの態様での GIP アゴニストのペプチドは、結合体のペプチド（ヘテロダイマー、マルチマー、融合ペプチド）、化学的に誘導体化されたペプチド、ペプチドの薬学的な塩、擬似ペプチドなどである。

20

【0059】

「グルカゴンアンタゴニストのペプチド」という表現は、グルカゴンの活性を低下させるまたはグルカゴンの機能を阻害する化合物を示す。たとえば、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の反応の少なくとも 60 % を阻害する（少なくとも 70 %、80 %、90 % またはさらに多くを阻害するなど）。具体的な実施形態では、濃度約 1 μ M のグルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の約 20 % 未満しかアゴニスト活性を示さない（約 10 % 未満または約 5 % 未満など）。この表現は、その化合物を、グルカゴン受容体だけに対して活性を有するものに限定するものとして解釈されるべきものではない。むしろ、本開示内容におけるグルカゴンアンタゴニストのペプチドは、グルカゴン受容体（部分的活性化作用など）または他の受容体に対する別の活性を示すものであってもよい。グルカゴンアンタゴニストのペプチドは、たとえば、GLP-1 受容体に対する活性（アゴニスト活性など）を示すものであってもよい。また、「グルカゴンアンタゴニストのペプチド」という表現は、その化合物を、ペプチドだけに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、ペプチド以外の化合物も、これらの表現に包含される。したがって、いくつかの態様では、グルカゴンアゴニストのペプチドは、結合体のペプチド、化学的に誘導体化されたペプチド、ペプチドの薬学的な塩、擬似ペプチドなどである。

30

40

【0060】

「GLP-1 アンタゴニストのペプチド」という表現は、GLP-1 の活性を低下させるまたは GLP-1 の機能を阻害する化合物を示す。たとえば、GLP-1 アンタゴニストは、GLP-1 受容体で GLP-1 が達成する最大限の反応の少なくとも 60 % を阻害する（少なくとも 70 %、80 %、90 % またはさらに多くを阻害するなど）。具体的な実施形態では、濃度約 1 μ M の GLP-1 アンタゴニストは、GLP-1 受容体で GLP

50

- 1 が達成する最大限の約 20 % 未満しかアゴニスト活性を示さない（約 10 % 未満または約 5 % 未満など）。この表現は、その化合物を、GLP-1 受容体だけに対して活性を有するものに限定するものとして解釈されるべきものではない。むしろ、本開示内容における GLP-1 アンタゴニストのペプチドは、GLP-1 受容体（部分的活性化作用など）または他の受容体に対する別の活性を示すものであってもよい。GLP-1 アンタゴニストのペプチドは、たとえば、グルカゴン受容体に対する活性（アゴニスト活性など）を示すものであってもよい。また、「GLP-1 アンタゴニストのペプチド」という表現は、その化合物を、ペプチドだけに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、ペプチド以外の化合物も、これらの表現に包含される。したがって、いくつかの態様では、GLP-1 アゴニストのペプチドが、結合体のペプチド、化学的に誘導体化されたペプチド、ペプチドの薬学的な塩、擬似ペプチドなどである。

10

【0061】

「GIP アンタゴニストのペプチド」という表現は、GIP の活性を低下させるまたは GIP-1 の機能を阻害する化合物を示す。たとえば、GIP アンタゴニストは、GIP 受容体で GIP が達成する最大限の反応の少なくとも 60 % を阻害する（少なくとも 70 %、80 %、90 % またはさらに多くを阻害するなど）。具体的な実施形態では、濃度約 1 μ M の GIP アンタゴニストは、GIP 受容体で GIP が達成する最大限の約 20 % 未満しかアゴニスト活性を示さない（約 10 % 未満または約 5 % 未満など）。この表現は、その化合物を、GIP 受容体だけに対して活性を有するものに限定するものとして解釈されるべきものではない。むしろ、本開示内容における GIP アンタゴニストのペプチドは、GIP 受容体（部分的活性化作用など）または他の受容体に対する別の活性を示すものであってもよい。GIP アンタゴニストのペプチドは、たとえば、グルカゴン受容体に対する活性（アゴニスト活性など）を示すものであってもよい。また、「GIP アンタゴニストのペプチド」という表現は、その化合物を、ペプチドだけに限定するものと解釈されるべきものではない。むしろ、ペプチド以外の化合物も、これらの表現に包含される。したがって、いくつかの態様では、GIP アゴニストのペプチドが、結合体のペプチド、化学的に誘導体化されたペプチド、ペプチドの薬学的な塩、擬似ペプチドなどである。

20

【0062】

本明細書で使用する場合、「グルカゴン類縁体」および「グルカゴンペプチド」という用語は、グルカゴン関連ペプチド受容体に対して上記の活性を有するグルカゴンの類縁体を示すのに同義に用いることが可能である。

30

【0063】

本明細書で使用する場合、「天然のグルカゴン」という用語は、配列番号 1601 の配列からなるペプチドを示す。

【0064】

本明細書で使用する場合、「天然の GLP-1」という用語は、GLP-1 (7-36) アミド（配列番号 1603）、GLP-1 (7-37) 酸（配列番号 1604）またはこれら 2 種類の化合物の混合物を示す一般的な用語である。

【0065】

本明細書で使用する場合、「天然の GIP」とは、配列番号 1607 からなるペプチドを示す。

40

【0066】

本明細書で使用する場合、分子の「グルカゴン活性」または「天然のグルカゴンと比較した場合の活性」とは、グルカゴン受容体に対する分子の EC_{50} を、グルカゴン受容体での天然のグルカゴンの EC_{50} で割った比を示す。

【0067】

本明細書で使用する場合、分子の「GLP-1 活性」または「天然の GLP-1 と比較した場合の活性」とは、GLP-1 受容体に対する分子の EC_{50} を、GLP-1 受容体に対する天然の GLP-1 の EC_{50} で割った比を示す。

【0068】

50

本明細書で使用する場合、分子の「G I P 活性」または「天然の G I P と比較した場合の活性」とは、G I P 受容体に対する分子の EC_{50} を、G I P 受容体に対する天然の G I P の EC_{50} で割った比を示す。

【0069】

本明細書で使用する場合、「N H R リガンド」とは、核内ホルモン受容体（N H R）に対する生物学的活性（アゴニストまたはアンタゴニストのいずれか）を有する疎水性物質または親油性物質を示す。N H R リガンドは、全体または一部がペプチドではない。いくつかの実施形態では、N H R リガンドは、N H R に結合してこれを活性化するアゴニストである。他の実施形態では、N H R リガンドは、アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、N H R リガンドは、天然のリガンドが活性部位に結合するのを完全にまたは部分的にブロックすることで作用するアンタゴニストである。他の実施形態では、N H R リガンドは、活性部位またはアロステリック部位に結合し、N H R の活性化を阻害するか、これを不活性化することで作用するアンタゴニストである。

10

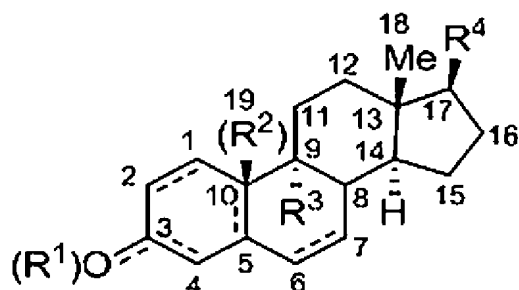
【0070】

本明細書で使用する場合、「核内ホルモン受容体」（N H R）とは、ときには他のコアクチベーターおよびコリプレッサーとともに、細胞核内の遺伝子発現を調節するリガンド活性化タンパク質を示す。

【0071】

本明細書で使用する場合、「ステロイドおよびこれらの誘導体」とは、式 A の構造を有する、天然または合成の化合物を示す。

20



式A

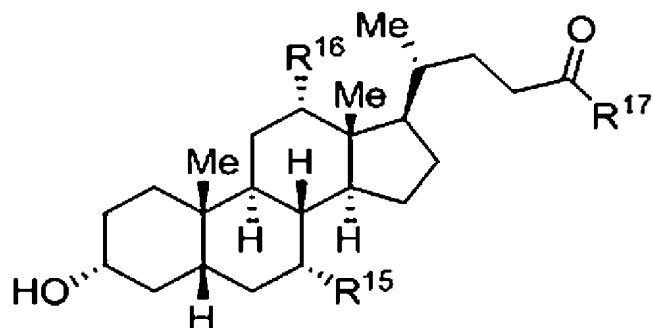
30

（式中、 R^1 および R^2 は、存在する場合には独立に、式 A の化合物が核内ホルモン受容体に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、 R^3 および R^4 は独立に、式 A の化合物が核内ホルモン受容体に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、点線は各々、任意の二重結合を表す。）式 A は、1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、11 位、12 位、14 位、15 位、16 位、17 位のうちの 1 箇所または 2 箇所以上に、1 個または 2 個以上の置換基をさらに有するものであってもよい。考えられている任意の置換基としては、OH、NH₂、ケトン、C₁ ~ C₁₈ アルキル基があげられるが、これらに限定されるものではない。ステロイドおよびこれらの誘導体の非限定的な具体例としては、コレステロール、コール酸 エストラジオール、テストステロン、ヒドロコルチゾンがあげられる。

40

【0072】

本明細書で使用する場合、「胆汁酸およびこれらの誘導体」とは、以下の式 M で表される、天然または合成の化合物を示す。



式M

10

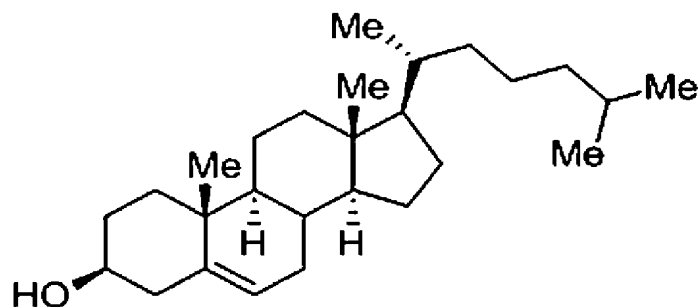
(式中、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} は各々独立に、式Mの化合物が核内ホルモン受容体に結合する際に、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分である。)いくつかの実施形態では、 R^{15} および R^{16} は各々独立に、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキルまたは($C_0 \sim C_8$ アルキル)OHであり、 R^{17} は、OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル)NH($C_1 \sim C_4$ アルキル)SO₃Hまたは($C_0 \sim C_8$ アルキル)NH($C_1 \sim C_4$ アルキル)COOHである。式Mは、1位、2位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、11位、12位、14位、15位、16位、17位のうちの1箇所または2箇所以上に、1個または2個以上の置換基をさらに含むものであってもよい。胆汁酸の非限定的な例として、コール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、ケノデオキシコール酸、タウロコール酸、グリココール酸があげられる。

20

【0073】

本明細書で使用する場合、「コレステロールおよびこれらの誘導体」とは、以下に示すようなコレステロールと同様の構造を有する、天然または合成の化合物を示す。

30



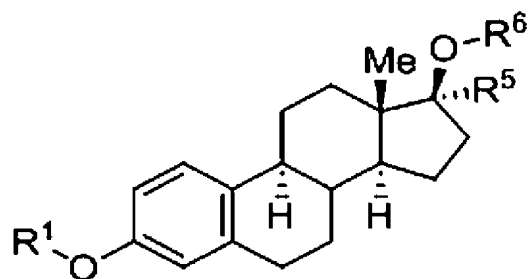
コレステロール

40

コレステロールの誘導体は、オキシステロール、たとえばヒドロキシコレステロール、24(S)-ヒドロキシコレステロール、27-ヒドロキシコレステロール、コレステン酸を含むものであってもよい。

【0074】

本明細書で使用する場合、「エストラジオールおよびこれらの誘導体」は、式Bで表される、天然または合成の化合物を示す。

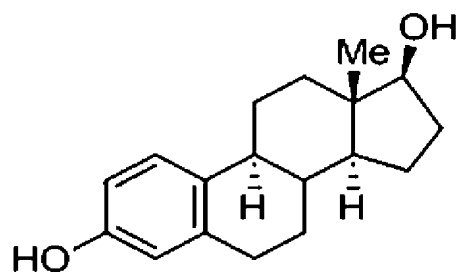


式B

10

(式中、 R^1 、 R^5 および R^6 は、式Bの化合物がエストロゲン受容体に結合する際に、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分である。)いくつかの実施形態では、式Bの構造は、たとえば、1位、2位、4位、6位、7位、8位、9位、11位、12位、14位、15位、16位、17位などの四環の1箇所または2箇所以上において、1個または2個以上の置換基で置換される。場合によっては、置換基は、6位にケトンを含む。

20



エストラジオール

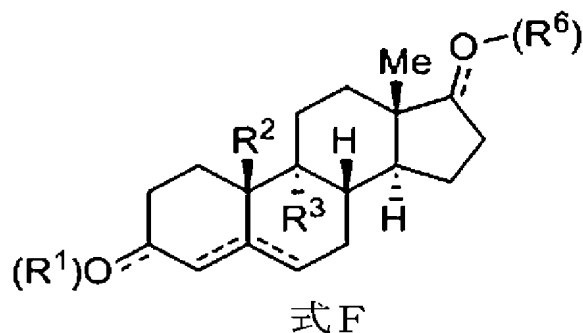
30

エストラジオールの誘導体の非限定的な具体例として、 β -エストラジオール17-アセテート、 β -エストラジオール17-シビオネート、 β -エストラジオール17-エナンテート、 β -エストラジオール17-バレレート、 β -エストラジオール3,17-ジアセテート、 β -エストラジオール3,17-ジプロピオネート、 β -エストラジオール3-ベンゾエート、 β -エストラジオール3-ベンゾエート17-n-ブチレート、 β -エストラジオール3-グリシジルエーテル、 β -エストラジオール3-メチルエーテル、 β -エストラジオール6-オン、 β -エストラジオール3-グリシジル、 β -エストラジオール6-オン6-(O-カルボキシメチルオキシム)、16-エピエストリオール、17-エピエストリオール、2-メトキシエストラジオール、4-メトキシエストラジオール、エストラジオール17-フェニルプロピオネートならびに、17 β -エストラジオール2-メチルエーテル、17 α -エチニルエストラジオール、メゲストロールアセテート、エストリオールがあげられる。

40

【0075】

本明細書で使用する場合、「テストステロンおよびこれらの誘導体」とは、式Fで表される、天然または合成の化合物を示す。



10

(式中、 R^1 (存在する場合)、 R^2 、 R^3 、 R^6 は各々独立に、式Fの化合物が核内ホルモン受容体に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、点線は各々、任意の二重結合を表す。ただし、任意の炭素-炭素二重結合のうち最大で1つが、5位に存在する。)いくつかの実施形態では、式Fの構造は、たとえば、1位、2位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、11位、12位、14位、15位、16位、17位など、四環の1箇所または2箇所以上において、1個または2個以上の置換基で置換される。テストステロンの誘導体の非限定的な具体例として、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、5-アンドロステンジオール、アンドロステロン、ジヒドロテストステロンがあげられる。

20

【0076】

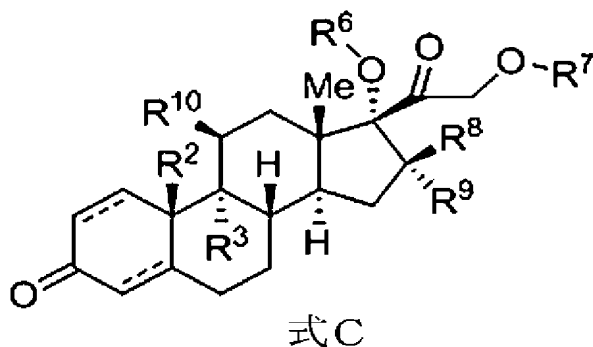
本明細書で使用する場合、「脂肪酸およびこれらの誘導体」とは、長く分岐状ではない $C_1 \sim C_{28}$ のアルキル部分または $C_2 \sim C_{28}$ のアルケニル部分を含むカルボン酸を示し、任意に1個または2個以上のハロ置換基を含み得るおよび/または任意に1個または2個以上のハロ以外の置換基を含み得る。いくつかの実施形態では、長く分岐状ではないアルキル部分またはアルケニル部分は、完全にハロ置換されていてもよい(すべての水素がハロ原子に置き換わっているなど)。1~5個の炭素原子を含む脂肪酸が、短鎖脂肪酸である。6~12個の炭素を含む脂肪酸が、中鎖脂肪酸である。13~22個の炭素原子を含む脂肪酸が、長鎖脂肪酸である。23~28個の炭素原子を含む脂肪酸が、超長鎖脂肪酸である。脂肪酸の非限定的な具体例としては、ギ酸、酢酸、n-カプロン酸、ヘプタン酸、カプリル酸、ノナン酸、カプリン酸、ウンデカン酸、ラウリン酸、トリデカン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、ヘプタデカン酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、アラキジン酸、ヘンエイコサン酸、ベヘン酸、トリコサン酸、ミード酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、エライジン酸、ペトロセリン酸、アラキドン酸、ジヒドロキシエイコサテトラエン酸(DiHETE)、オクタデシン酸、エイコサトリイン酸(eicosatriynoic acid)、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、ジホモリノレン酸、ドコサトリエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、アドレン酸があげられる。

30

40

【0077】

本明細書で使用する場合、「コルチゾールおよびこれらの誘導体」は、式Cで表される、天然または合成の化合物を示す。



10

(式中、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} は各々独立に、式Cの化合物が核内ホルモン受容体に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、点線は各々、任意の二重結合を表す。)いくつかの実施形態では、式Cの構造は、たとえば、1位、2位、4位、5位、6位、7位、8位、11位、12位、14位、15位など、四環の1箇所または2箇所以上において、1個または2個以上の置換基で置換される。コルチゾールの誘導体およびこれらの誘導体の非限定的な具体例として、コルチゾール、酢酸コルチゾン、ベクロメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、デキサメタゾンがあげられる。

20

【0078】

本明細書で使用する場合、「結合基」は、2つの別々のものを互いに結合する分子または分子群である。結合基が、2つのものの間に最適な間隔をもたせることもあるし、あるいは、2つのものを互いに分離できるようにする不安定な結合をさらに提供することもある。不安定な結合としては、加水分解可能な基、光切断可能な基、酸感受性部分、塩基感受性部分、酵素切断可能な基があげられる。

【0079】

本明細書で使用する場合、「プロドラッグ」という用語を、その完全な薬理作用を発揮する前に化学修飾がなされる化合物として定義する。

30

【0080】

本明細書で使用する場合、「ジペプチド」は、 α -アミノ酸または α -ヒドロキシ酸が、ペプチド結合を介して別のアミノ酸と結合した結果である。

【0081】

本明細書で使用する場合、「化学反応による開裂」という表現は、他に何ら断りがなければ、化学的共有結合の切断につながる非酵素的反応を包含する。

実施形態

【0082】

本開示は、NHRリガンドと結合しているグルカゴンスーパーファミリーのペプチドを提供するものである。いくつかの態様では、NHRリガンドは、代謝またはグルコースホメオスタシスに關与する核内ホルモン受容体に作用でき、ペプチド単独またはNHRリガンド単独の場合と比較して、結合体のほうが代謝またはグルコースホメオスタシスに対する生物学的効果が大きい。本発明の理論に拘泥することなく、NHRリガンドは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチドを、特定種類の細胞または組織を標的とするよう機能するものであってもよい。あるいは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチドは、NHRリガンドを標的とするか、または結合体を細胞内に入れる受容体にペプチドが結合することなどによって、その結合体の細胞内への輸送を促進するよう機能するものであってもよい。

40

【0083】

50

本発明のグルカゴンスーパーファミリーのペプチド結合体は、式 Q - L - Y で表すことが可能なものである（式中、Q はグルカゴンスーパーファミリーのペプチドであり、Y は N H R リガンドであり、L は結合基または結合である）。

【0084】

いくつかの実施形態におけるグルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）は、グルカゴン受容体に対するアゴニスト活性、G L P - 1 受容体に対するアゴニスト活性、G I P 受容体に対するアゴニスト活性、グルカゴン受容体および G L P - 1 受容体に対するコアゴニスト活性、グルカゴン受容体および G I P 受容体に対するコアゴニスト活性、G L P - 1 受容体および G I P 受容体に対するコアゴニスト活性またはグルカゴン受容体、G I P 受容体および G L P - 1 受容体に対するトリアゴニスト活性を示すグルカゴン関連ペプチドであってもよい。いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体、G L P - 1 受容体または G I P 受容体に対するアンタゴニスト活性を示す。

10

【0085】

いくつかの実施形態におけるグルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）は、グルカゴン関連ペプチド、成長ホルモン放出ホルモン（G H R H、配列番号 1 6 1 9）、血管作用性小腸ペプチド（V I P、配列番号 1 6 2 0）、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド 2 7（P A C A P - 2 7、配列番号 1 6 2 1）、ペプチドヒスチジンメチオニン（P H M、配列番号 1 6 2 2）またはセクレチン（配列番号 1 6 2 3）および／またはおよびこれらの類縁体、誘導体および結合体であってもよい。グルカゴンスーパーファミリーのペプチドは、N 末端のアミノ酸の相同性および／または C 末端領域の α 螺旋構造を含むがこれに限定されるものではない、共通の構造的な特徴を有するものであってもよい。機能し、N 末端は通常、受容体のシグナル伝達において機能すると考えられている。N 末端部分および C 末端領域における数個のアミノ酸は、1 番目のヒスチジン、4 番目のグリシン、6 番目のフェニルアラニン、2 2 番目のフェニルアラニン、2 3 番目のバリン、2 5 番目のスレオニン、2 6 番目のロイシンなどのグルカゴンスーパーファミリーのメンバー間で高度に保存され、これらの位置のアミノ酸が、アミノ酸側鎖で同一性、保存的な置換または類似性を示している。いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチド Q は、グルカゴン（配列番号 1 6 0 1）、オキシントモジュリン（配列番号 1 6 0 6）、エキセンディン - 4（配列番号 1 6 1 8）、グルカゴン様ペプチド - 1（G L P - 1）（アミノ酸 7 - 3 7、配列番号 1 6 0 3 および 1 6 0 4 として提供）、グルカゴン様ペプチド - 2（G L P - 2）（配列番号 1 6 0 8）、G I P（配列番号 1 6 0 7）または上記のものの類縁体、誘導体、結合体である。いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドとしての Q は、天然のペプチドの全長にわたって（あるいはグルカゴンに対応する位置全体にわたって（たとえば図 1 参照））、天然のグルカゴン、天然のオキシントモジュリン、天然のエキセンディン - 4、天然の（7 - 3 7）G L P - 1、天然の G L P - 2 または天然の G I P 対応する配列と少なくとも約 4 0 %、約 4 5 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 % または約 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）は、最大 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 のアミノ酸修飾を有する、天然のグルカゴン、天然のエキセンディン - 4、天然の（7 - 3 7）G L P - 1、天然の G L P - 2、天然の G H R H、天然の V I P、天然の P A C A P - 2 7、天然の P H M、天然のオキシントモジュリン、天然のセクレチンまたは天然の G I P のアミノ酸配列を含む。さらに別の実施形態では、Q は、2 つまたは 3 つ以上の天然のグルカゴン関連ペプチド配列のキメラであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Q が、1 2 番目から 2 9 番目のアミノ酸に対応するアミノ酸の α 螺旋構造を保持する、天然のグルカゴン（配列番号 1 6 0 1）と少なくとも約 5 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。

20

30

40

【0086】

関連の態様では、本発明は、式 Q - L - Y で表されるペプチド結合体を提供するものである（式中、Q は、グルカゴンスーパーファミリーのペプチドではなく、オステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体であり、Y は N H R

50

リガンドであり、Lは結合基または結合である)。いくつかの実施形態では、Qは、オステオカルシン(配列番号1644)あるいは、天然のペプチドの全長にわたって、天然のオステオカルシンと少なくとも約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%または約95%同一のアミノ酸配列を含む。Qは、天然のオステオカルシンと比べて、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のアミノ酸修飾を有する、オステオカルシンの類縁体あるいは、天然の短くされたオステオカルシンと比べて、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のアミノ酸修飾を有する、オステオカルシン(アミノ酸70-84など)の短くされた類縁体を含むものであってもよい。いくつかの実施形態では、Qは、カルシトニン(配列番号1645)あるいは、天然のペプチドの全長にわたって、天然のカルシトニンと少なくとも約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%または約95%同一のアミノ酸配列を含む。Qは、天然のカルシトニンと比べて、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のアミノ酸修飾を有する、カルシトニンの類縁体を含むものであってもよい。いくつかの実施形態では、Qは、アミリン(配列番号1646)あるいは、天然のペプチドの全長にわたって、天然のアミリンと少なくとも約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%または約95%同一のアミノ酸配列を含む。Qは、天然のアミリンと比べて、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のアミノ酸修飾を有する、アミリンの類縁体を含むものであってもよい。

10

20

NHRリガンド(Y)

【0087】

Q-L-Y結合体に関連する本開示内容において、Yは、表1に示す「核内ホルモン受容体スーパーファミリー」(NHRスーパーファミリー)またはそのクラスまたはサブグループのうちの1つを含む、核内ホルモン受容体に対して作用するリガンドである。このNHRスーパーファミリーは、遺伝子の転写を制御する、細胞内に見られる構造的に関連するタンパク質で構成される。これらのタンパク質として、リガンドが見つからないステロイドおよび甲状腺ホルモン、ビタミン、他の「オーファン」タンパク質の受容体も含む。核内ホルモン受容体は通常、C4型zinc finger DNA結合ドメイン(DBD)および/またはリガンド結合ドメイン(LBD)のうちの少なくとも1個を有する。DBDは標的遺伝子付近でDNAを結合するよう機能し、LBDは、その同族ホルモンに結合してこれに应答する。「伝統的な核内ホルモン受容体」は、DBDとLBD(エストロゲン受容体αなど)の両方を持つが、他の核内ホルモン受容体には、DBDだけ(Knirps、ORDなど)またはLBDだけ(Short Heterodimer Partner(SHP))しか持たないものもある。

30

【0088】

核内ホルモン受容体は、タイプI、タイプII、タイプIII、タイプIVという4つの機能的なクラスに分類することが可能なものである。タイプIの受容体(NR3群)に結合するリガンドは、受容体からの熱ショックタンパク質(HSP)の解離、受容体のホモダイマー化、細胞質から細胞核への移動、DNAの逆方向の繰り返し配列であるホルモン応答配列(HRE)を生じる。核受容体/DNA複合体は、他のタンパク質を動員し、これがHREの下流にあるDNAをメッセンジャーRNAに転写する。タイプIIの受容体(NR1群)は、核内で保持され、ヘテロダイマーとして、通常はレチノイドX受容体(RXR)が、DNAに結合する。タイプIIの核内ホルモン受容体は、コリプレッサータンパク質との間で複合体を形成することが多い。タイプIIの受容体に結合するリガンドは、コリプレッサーの解離とコアクチベータータンパク質の動員を引き起こす。さらにタンパク質が核受容体/DNA複合体に動員され、これがDNAをメッセンジャーRNAに転写する。タイプIIIの核内ホルモン受容体(NR2群)は、順方向の繰り返し配列であるHREのDNAにホモダイマーとして結合するオーファン受容体である。タイプIVの核内ホルモン受容体は、モノマーまたはダイマーとしてDNAに結合する。タイプI

40

50

V の受容体は、受容体の単一の DNA 結合ドメインが単一の HRE の半分の領域に結合するため、独特である。NHR リガンドは、タイプ I、タイプ II、タイプ III またはタイプ IV 核内ホルモン受容体の 1 個または 2 個以上に対して（たとえば、アゴニストまたはアンタゴニストとして）作用するリガンドであってもよい。

表 1. 核内ホルモン受容体スーパーファミリー

	核内ホルモン受容体	種	登録	内在性リガンド
NR1 群				
NR1A1	甲状腺ホルモン受容体 α (TR α)	ヒト	M24748	甲状腺ホルモン
NR1A2	甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)	ヒト	X04707	
NR1B1	レチノイン酸受容体 α (RAR α)	ヒト	X06538	ビタミン A および 関連化合物
NR1B2	レチノイン酸受容体 β (RAR β)	ヒト	Y00291	
NR1B3	レチノイン酸受容体 γ (RAR γ)	ヒト	M57707	
NR1C1	ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α (PPAR α)	ヒト	L02932	脂肪酸、 プロスタグランジン
NR1C2	ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 β/δ (PPAR β/δ)	ヒト	L07592	
NR1C3	ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR γ)	ヒト	L40904	
NR1D1	Rev-ErbA α	ヒト	M24898	ヘム
NR1D2	Rev-ErbA β	ヒト	L31785	
NR1F1	RAR 関連オーファン受容体 α (ROR α)	ヒト	U04897	コレステロール、 オールトランスレチ ノイン酸
NR1F2	RAR 関連オーファン受容体 β (ROR β)	ヒト	Y08639	
NR1F3	RAR 関連オーファン受容体 γ (ROR γ)	ヒト	U16997	
NR1H2	肝臓 X 受容体 β (LXR β)	ヒト	U07132	オキシステロール
NR1H3	肝臓 X 受容体 α (LXR α)	ヒト	U22622	
NR1H4	ファルネソイド X 受容体 (FXR)	ヒト	U68233	
NR1I1	ビタミン D 受容体 (VDR)	ヒト	J03258	ビタミン D
NR1I2	プレグナン X 受容体 (PXR)	ヒト	AF061056	外因性生体内物質 (デキサメタゾン、 リファンピシン)
NR1I3	構成的アンドロスタン受容体 α (CAR α)	ヒト	Z30425	アンドロスタン
NR2 群				
NR2A1	肝細胞核因子 4 α (HNF4 α)	ヒト	X76930	脂肪酸
NR2A3	肝細胞核因子 4 γ (HNF4 γ)	ヒト	Z49826	脂肪酸
NR2B1	レチノイド X 受容体 α (RXR α)	ヒト	X52773	レチノイド
NR2B2	レチノイド X 受容体 β (RXR β)	ヒト	M84820	
NR2B3	レチノイド X 受容体 γ (RXR γ)	ヒト	U38480	
NR2C1	精巣受容体 2 (TR2)	ヒト	M29960	
NR2C2	精巣受容体 4 (TR4)	ヒト	L27586	
NR2E1	キイロショウジョウバエ <i>tailless</i> 遺伝子のヒト ホモログ (TLX)	ヒト	Y13276	
NR2E3	視細胞特異的な核内受容体 (PNR)	ヒト	AF121129	

10

20

30

40

NR2F1	トリ卵白アルブミン上流プロモータ転写因子 I (COUP-TFI)	ヒト	X12795	
NR2F2	トリ卵白アルブミン上流プロモータ転写因子 II (COUP-TFII)	ヒト	M64497	
NR2F6	V-erAA-関連遺伝子(EAR2)	ヒト	X12794	
NR3 群				
NR3A1	エストロゲン受容体 α (ER α)	ヒト	P03372	エストロゲン
NR3A2	エストロゲン受容体 β (ER β)	ヒト	AB006590	
NR3B1	エストロゲン受容体関連 α (ERR α)	ヒト	X51416	
NR3B2	エストロゲン受容体関連 β (ERR β)	ヒト	AF094517	
NR3B3	エストロゲン受容体関連 γ (ERR γ)	ヒト	AF058291	
NR3C1	グルココルチコイド受容体(GR)	ヒト	X03225	コルチゾール
NR3C2	ミネラルコルチコイド受容体(MR)	ヒト	M16801	アルドステロン
NR3C3	プロゲステロン受容体(PR)	ヒト	M15716	プロゲステロン
NR3C4	アンドロゲン受容体(AR)	ヒト	M20132	テストステロン
NR4 群				
NR4A1	神経成長因子 IB α (NGFI-B α)	ヒト	L13740	
NR4A2	神経成長因子 IB β (NGFI-B β)	ヒト	X75918	
NR4A3	神経成長因子 IB γ (NGFI-B γ)	ヒト	D78579	
NR5 群				
NR5A1	ステロイド産生因子 1(SF1)	ヒト	U76388	
NR5A2	肝臓受容体ホモログ-1(LRH-1)	ヒト	U93553	
NR6 群				
NR6A1	生殖細胞核因子(GCNF)	ヒト	U64876	
NR0B サブグループ(LBD のみを有し、DBD なし)				
NR0B1	DAX1	ヒト	S74720	
NR0B2	Short Heterodimer Partner (SHP)	ヒト	L76571	

表のデータは Laudet and Gronemeyer "The Nuclear Receptor Facts Book," Academic Press から取得したものである。クラス ID は各メンバーの分類コードを示し、登録欄は NCBI GenBank ヌクレオチド・データベースのアクセッション番号を示す。

NHR リガンド (Y) の活性

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、Y の核内ホルモン受容体の活性化の EC_{50} (あるいは、アンタゴニストの場合、 IC_{50}) は、約 10 mM またはそれ未満または 1 mM (1000 μ M) またはそれ未満 (約 750 μ M またはそれ未満、約 500 μ M またはそれ未満、約 250 μ M またはそれ未満、約 100 μ M またはそれ未満、約 75 μ M またはそれ未満、約 50 μ M またはそれ未満、約 25 μ M またはそれ未満、約 10 μ M またはそれ未満、約 7.5 μ M またはそれ未満、約 6 μ M またはそれ未満、約 5 μ M またはそれ未満、約 4 μ M またはそれ未満、約 3 μ M またはそれ未満、約 2 μ M またはそれ未満または約 1 μ M またはそれ未満など) である。いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対する Y の EC_{50} または IC_{50} は、約 1000 nM またはそれ未満 (約 750 nM またはそれ未満、約 500 nM またはそれ未満、約 250 nM またはそれ未満、約 100 nM またはそ

れ未満、約 75 nM またはそれ未満、約 50 nM またはそれ未満、約 25 nM またはそれ未満、約 10 nM またはそれ未満、約 7.5 nM またはそれ未満、約 6 nM またはそれ未満、約 5 nM またはそれ未満、約 4 nM またはそれ未満、約 3 nM またはそれ未満、約 2 nM またはそれ未満または約 1 nM またはそれ未満など) である。いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対する Y の EC_{50} または IC_{50} は、ピコモルの範囲である。したがって、いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対する Y の EC_{50} または IC_{50} は、約 1000 pM またはそれ未満 (約 750 pM またはそれ未満、約 500 pM またはそれ未満、約 250 pM またはそれ未満、約 100 pM またはそれ未満、約 75 pM またはそれ未満、約 50 pM またはそれ未満、約 25 pM またはそれ未満、約 10 pM またはそれ未満、約 7.5 pM またはそれ未満、約 6 pM またはそれ未満、約 5 pM またはそれ未満、約 4 pM またはそれ未満、約 3 pM またはそれ未満、約 2 pM またはそれ未満または約 1 pM またはそれ未満など) である。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、Y は、核内ホルモン受容体に対する EC_{50} または IC_{50} が、約 0.001 pM またはそれより大きい、約 0.01 pM またはそれより大きいあるいは、約 0.1 pM またはそれより大きい。核内ホルモン受容体の活性化 (核内ホルモン受容体の活性) については、当分野で知られたアッセイによって、*in vitro* で測定可能である。たとえば、ホルモン応答性プロモーターの制御下にて、レポーター遺伝子 (β -ガラクトシダーゼをコードする lacZ など) を有する酵母細胞で受容体を発現させることで、核内ホルモン受容体に対する活性を測定可能である。よって、受容体に対して作用するリガンドの存在下、レポーター遺伝子が発現され、レポーター遺伝子産物の活性を (たとえば、最初は黄色だったクロロフェノールレッド- β -D-ガラクトピラノシド (CPRG) などの色素生成基質を分解して、吸収で測定できる赤色産物にするという、 β -ガラクトシダーゼの活性を測定することによって) 測定すればよい。たとえば、Jungbauer and Beck, J. Chromatog. B, 77: 167-178 (2002); Routledge and Sumpter, J. Biol. Chem. 272: 3280-3288 (1997); Liu et al., J. Biol. Chem., 274: 26654-26660 (1999) を参照のこと。核内ホルモン受容体に対する NHR リガンドの結合については、たとえば、蛍光偏光または放射性アッセイなどの当分野で知られた結合アッセイで判断できる。たとえば、Ranamorthy et al., 138(4): 1520-1527 (1997) を参照のこと。

20

30

【0091】

いくつかの実施形態では、天然の核内ホルモン (核内ホルモン活性) の場合と比較して、核内ホルモン受容体に対する Y の活性が、約 0.001 % またはそれよりも高い、約 0.01 % またはそれよりも高い、約 0.1 % またはそれよりも高い、約 0.5 % またはそれよりも高い、約 1 % またはそれよりも高い、約 5 % またはそれよりも高い、約 10 % またはそれよりも高い、約 20 % またはそれよりも高い、約 30 % またはそれよりも高い、約 40 % またはそれよりも高い、約 50 % またはそれよりも高い、約 60 % またはそれよりも高い、約 75 % またはそれよりも高い、約 100 % またはそれよりも高い、約 125 % またはそれよりも高い、約 150 % またはそれよりも高い、約 175 % またはそれよりも高い、約 200 % またはそれよりも高い、約 250 % またはそれよりも高い、約 300 % またはそれよりも高い、約 350 % またはそれよりも高い、約 400 % またはそれよりも高い、約 450 % またはそれよりも高いあるいは、約 500 % またはそれよりも高い。いくつかの実施形態では、天然の核内ホルモンの場合と比較して、核内ホルモン受容体に対する Y の活性が、約 5000 % またはそれ未満または約 10,000 % またはそれ未満。受容体の天然のリガンドと比較した場合の受容体に対する Y の活性については、天然のリガンドの EC_{50} に対する Y の EC_{50} の反比として計算する。いくつかの実施形態では、Y は、受容体の天然のリガンドである。

40

NHR リガンド (Y) の構造

【0092】

本発明の NHR リガンド (Y) は、一部または全体がペプチドではないもので、疎水性または親油性である。いくつかの実施形態では、NHR リガンドは、分子量が約 5000

50

ダルトンまたはそれ未満または約 4 0 0 0 ダルトンまたはそれ未満または約 3 0 0 0 ダルトンまたはそれ未満または約 2 0 0 0 ダルトンまたはそれ未満あるいは、約 1 7 5 0 ダルトンまたはそれ未満あるいは、約 1 5 0 0 ダルトンまたはそれ未満あるいは、約 1 2 5 0 ダルトンまたはそれ未満あるいは、約 1 0 0 0 ダルトンまたはそれ未満または約 7 5 0 ダルトンまたはそれ未満または約 5 0 0 ダルトンまたはそれ未満または約 2 5 0 ダルトンまたはそれ未満である。Y の構造は、本明細書に開示の教示内容に従うものであればよい。

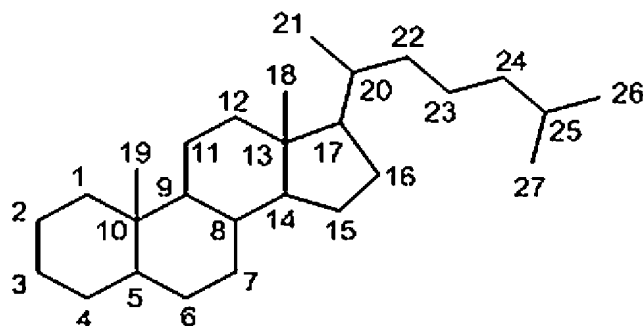
【0093】

本明細書に記載の実施形態では、Y は、Q または L と反応できる Y の任意の位置で、L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合する。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、結合の位置および手段を容易に判断できよう。

10

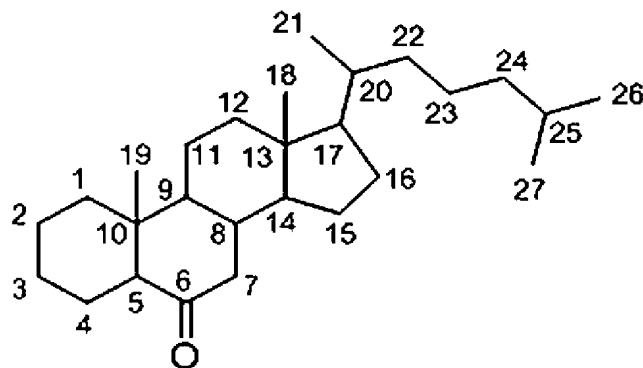
【0094】

Y が 1 つの 5 員環に結合した 3 つの 6 員環を有する四環性骨格またはそのバリエーション (ビタミン D 受容体で作用する Y など) を含む本明細書に記載のいずれの実施形態においても、骨格の炭素原子を以下に示すような位置番号で参照する



20

たとえば、6 位にケトン基を有する修飾は、以下の構造を示す。



30

タイプ I の核内ホルモン受容体で作用する NHR リガンド

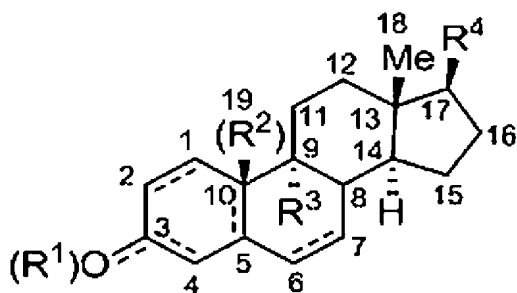
40

【0095】

本発明のいくつかの実施形態では、NHR リガンド (Y) は、タイプ I の核内ホルモン受容体で作用する。いくつかの実施形態では、Y は、リガンドがタイプ I の核内ホルモン受容体に結合する際にアゴニスト活性を与えるまたは促進する、どのような構造を持つものであってもよく、他の実施形態では、Y は、タイプ I の核内ホルモン受容体のアンタゴニストである。

【0096】

例示としての実施形態では、Y は、式 A に示すような構造を含む。



式A

10

(式中、 R^1 および R^2 は、存在する場合には独立に、式Aの化合物がタイプIの核内ホルモン受容体に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、 R^3 および R^4 は独立に、式Aの化合物がタイプIの核内ホルモン受容体に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、点線は各々、任意の二重結合を表す。) 式Aは、1位、2位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、11位、12位、14位、15位、16位、17位、18位、19位のうちの1箇所または2箇所以上に、1個または2個以上の置換基をさらに有するものであってもよい。考えられる任意の置換基としては、OH、 NH_2 、ケトン、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル基があげられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0097】

いくつかの実施形態では、Yが、式Aに示すような構造を含み、式中、

R^1 が存在し、水素、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリールまたは SO_3 であり、

30

R^2 が存在し、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル) SH、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$

40

50

$C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)OH$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)O$ アリール、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)O$ ヘテロアリール $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}H_2$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}$ アリール、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリール $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}C(O)OH$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)OH$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)NR^{2,4}H_2$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}(O)OH$ であり、

R³ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル) ハロ、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) SH、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)Oヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4}

2 4 H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2 4}(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2 4}(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2 4}(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニルまたは(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2 4}(O)OHであり、

R⁴ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル) ハロ、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) SH、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)Oヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O)OH であり、

R^{2,4} は、水素または C₁ ~ C₁₈ アルキルである。

【 0 0 9 8 】

いくつかの実施形態では、 Y が、式 A に示すような構造を含み、式中、

R¹ が存在し、水素、C₁ ~ C₇ アルキル、(C₀ ~ C₃ アルキル) C(O) C₁ ~ C₇ アルキル、(C₀ ~ C₃ アルキル) C(O) アリールまたはSO₃Hであり、

R² が存在し、水素、ハロ、OH または C₁ ~ C₇ アルキルであり、

R³ は、水素、ハロ、OHまたはC₁ ~ C₇ アルキルであり、

R⁴ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル)ハロ、C₁ ~ C₈ アルキル、C₂ ~ C₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)SH、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₂ ~ C₈ アルケ

ニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} C₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OC₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OC₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OC₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) Oヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) C₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) C₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) C₂ ~ C_{1 8} アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2 4} C₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2 4} C₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2 4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2 4} アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2 4} ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} C(O) C₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} C(O) C₂ ~ C₈ アルケニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} C(O) C₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} C(O) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) OC₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) OC₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) OC₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) NR^{2 4} C₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) NR^{2 4} C₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) NR^{2 4} C₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O) NR^{2 4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} (O) OC₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} (O) OC₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} (O) OC₂ ~ C₈ アルキニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2 4} (O) OHであり、

R^{2 4} は、水素または C₁ ~ C₇ アルキルである。

【0099】

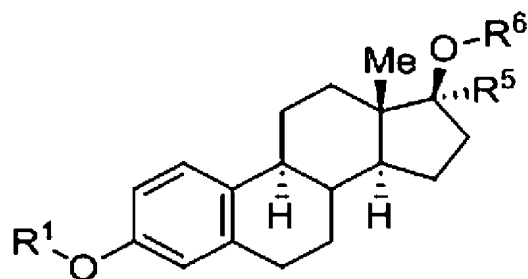
いくつかの実施形態では、R¹ は、水素、プロピオン酸、酢酸、安息香酸または硫酸であり、R² は水素またはメチルであり、R³ は水素またはメチルであり、R⁴ は、酢酸、シピオン酸、ヘミコハク酸、エナント酸またはプロピオン酸である。

【0100】

Yが式Aの構造を含む実施形態では、Yは、QまたはLと反応できる式Aの任意の位置で、L(Lが結合基である場合など)またはQ(Lが結合である場合など)に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、QまたはLに対する式Aでの結合位置と式Aの結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式Aが、式Aの1位、2位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位または20位のいずれかで、LまたはQに結合している。いくつかの実施形態では、式Aは、式Aの1位、3位、6位、7位、12位、10位、13位、16位、17位または19位で、LまたはQに結合している。

【0101】

いくつかの実施形態では、Yは、エストロゲン受容体(ER α 、ER β など)に対して作用する。いくつかの実施形態では、Yは、エストロゲン受容体に対して、アゴニスト活性を与えるまたは促進するものであり、他の実施形態では、Yは、ERのアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Yは、式Bの構造を持つものであってもよい。



式B

10

(式中、 R^1 、 R^5 、 R^6 は、式Bの化合物がエストロゲン受容体に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分である。)いくつかの実施形態では、式Bは、1位、2位、4位、6位、7位、8位、9位、11位、12位、14位、15位、16位のうちの1箇所または2箇所以上に、1個または2個以上の置換基(6位のケトンなど)をさらに有する。

【0102】

いくつかの実施形態では、Yが、式Bの構造を有する場合、式中、

20

R^1 は、水素、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、 $C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリールまたは SO_3H であり、

30

R^5 は、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) OH 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) SH 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C$

40

50

$C_2 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)NR^{2,4}H_2$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)NR^{2,4}$ アリール、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリール、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}C(O)OH$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})OC(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})OC(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})OC(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})OC(O)NR^{2,4}H_2$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}(O)OH$ ； $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)OH$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})OC(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})OC(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})C(O)NR^{2,4}H_2$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})NR^{2,4}C(O)OH$ であり、

R⁶ は、水素、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OH、C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) Oヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} ヘテロアリールまたはSO₃ Hであり、

R^{2,4} は、水素または C₁ ~ C₁₈ アルキルである。

【 0 1 0 3 】

いくつかの実施形態では、 Y が、式 B の構造を有し、式中、

R¹ は、水素、C₁ ~ C₇ アルキル；(C₀ ~ C₃ アルキル)C(O)C₁ ~ C₇ アルキル、(C₀ ~ C₃ アルキル)C(O)アリールまたはSO₃Hであり、

R⁵ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル) ハロ、C₁ ~ C₈ アルキル、C₂ ~ C₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C

$C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル) SH、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_2 \sim C_{1,8}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_8$ アルケニルまたは ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニルまたは ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OH$ であり、

10

20

30

R^6 は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_8$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、 $C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリールまたは ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリール であり、

40

$R^{2,4}$ は、水素または $C_1 \sim C_7$ アルキルである。

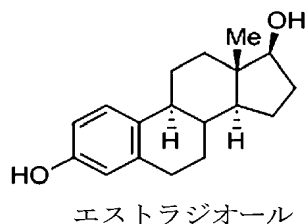
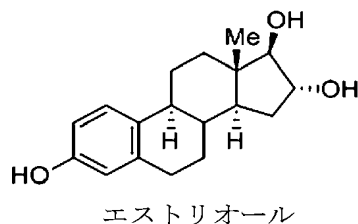
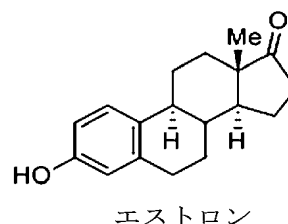
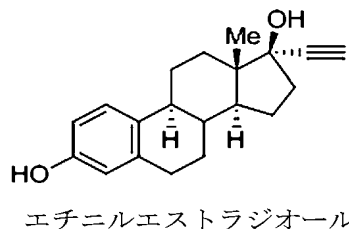
【0104】

たとえば、 R^1 は、水素、プロピオン酸、酢酸、安息香酸または硫酸であり、 R^5 は、水素、エチニル、ヒドロキシルであり、 R^6 は、酢酸、シピオン酸、ヘミコハク酸、エナント酸またはプロピオン酸である。

【0105】

50

式 B の化合物の非限定的な例として、 17β - エストラジオール、エストラジオールの修飾物、たとえば、 β - エストラジオール 17 - アセテート、 β - エストラジオール 17 - シピオネート、 β - エストラジオール 17 - エナンテート、 β - エストラジオール 17 - バレレート、 β - エストラジオール 3, 17 - ジアセテート、 β - エストラジオール 3, 17 - ジブプロピオネート、 β - エストラジオール 3 - ベンゾエート、 β - エストラジオール 3 - ベンゾエート 17 - n - ブチレート、 β - エストラジオール 3 - グリシジルエーテル、 β - エストラジオール 3 - メチルエーテル、 β - エストラジオール 6 - オン、 β - エストラジオール 3 - グリシジル、 β - エストラジオール 6 - オン 6 - (O - カルボキシメチルオキシム)、16 - エピエストリオール、17 - エピエストリオール、2 - メトキシエストラジオール、4 - メトキシエストラジオール、エストラジオール 17 - フェニルプロピオンネート、 17β - エストラジオール 2 - メチルエーテル、 17α - エチニルエストラジオール、メゲストロールアセテート、エストリオール、これらの誘導体があげられる。いくつかの実施形態では、カーボン 17 は、ケトン置換基を有し、 R^5 および R^6 は存在しない（エストロンなど）。上述した式 B の化合物のうちのいくつかを、以下にあげておく。

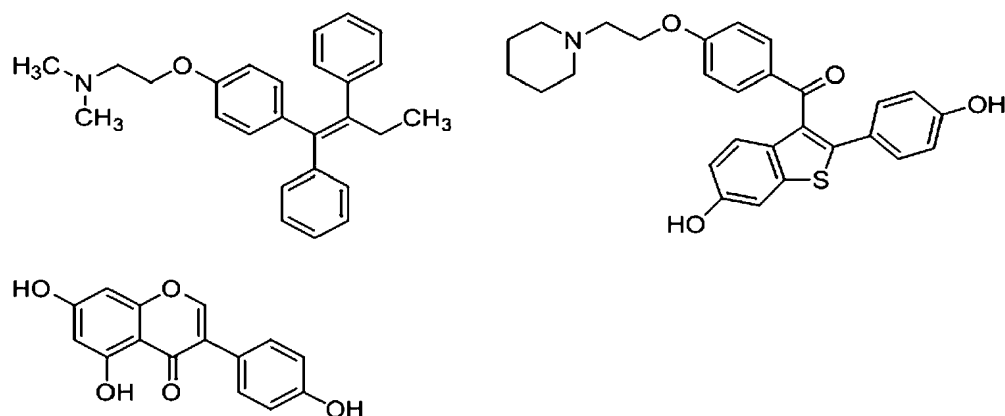


【0106】

Y が式 B の構造を有する実施形態では、Y は、Q または L と反応できる式 B の任意の位置で、L（L が結合基である場合など）または Q（L が結合である場合など）に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する式 B での結合位置と式 B の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式 B は、式 B の 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位または 20 位のいずれかで、L または Q に結合している。いくつかの実施形態では、式 B は、式 B の 3 位または 17 位で L または Q に結合している。

【0107】

他の実施形態では、Y は、エストロゲン受容体に対して作用するが、式 B には包含されない。エストロゲン受容体に対して作用する、式 B に包含されないリガンドの非限定的な例として、以下のものがあげられる。

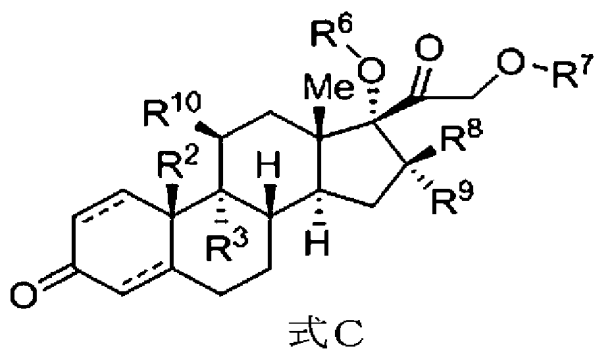


10

【0108】

いくつかの実施形態では、Yは、糖質コルチコイド受容体（GR）に対して作用する。
いくつかの実施形態では、Yは、GRに対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Yは、GRのアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Yは、式Cの構造を有する。

20



30

（式中、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} は各々独立に、式Cの化合物がGRに結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、点線は各々、任意の二重結合を表す。）いくつかの実施形態では、式Cは、1位、2位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、11位、12位、14位、15位（11位のヒドロキシルまたはケトンなど）のうちの1箇所または2箇所以上に、1個または2個以上の置換基をさらに有する。

【0109】

いくつかの実施形態では、Yが式Cの構造を有し、式中、

40

R^2 は、水素、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル）ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル）アリール、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル）ヘテロアリール（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル）OH、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル）SH、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $NR^{2,4}H_2$ 、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、（ $C_0 \sim C_8$ アルキル） $C(O)H$ 、（ $C_0 \sim C_8$ ア

50

ルキル) C (O) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) Oヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) NR^{2,4} アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) NR^{2,4} ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C (O) C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C (O) C₂ ~ C₈ アルケニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C (O) C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C (O) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC (O) NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O) OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O) OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O) OC₂ ~ C₁₈ アルキニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O) OHであり、

R³ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル)ハロ、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)SH、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)H、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)Oヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)

$C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニルまたは($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OH$ であり、

R^6 は、水素、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、 $C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリールまたは($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリールであり、

R^7 は、水素、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、 $C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリールまたは($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリールであり、

R^8 は、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリールであり、

R^9 は、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリールであり、

R^{10} は、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキルまたは($C_0 \sim C_8$ アルキル) OH であり、

$R^{2,4}$ は、水素または $C_1 \sim C_{18}$ アルキルである。

【0110】

いくつかの実施形態では、 Y は式 C の構造を有し、式中、

R^2 は、水素、ハロ、 OH または $C_1 \sim C_7$ アルキルであり、

R^3 は、水素、ハロ、 OH または $C_1 \sim C_7$ アルキルであり、

R^6 は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_8$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$

O) $C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、 $C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリール ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリールまたは ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリールであり、

10

R^7 は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_8$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) ヘテロアリール (C_0 アルキル) $C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、(C_0 アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルケニル、(C_0 アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、(C_0) $C(O)$ アリール、(C_0) $C(O)$ ヘテロアリール (C_0) $C(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、(C_0 アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、(C_0 アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニルまたは (C_0 アルキル) $C(O)OH$ であり、

R^8 は、水素または $C_1 \sim C_7$ アルキルであり、

R^9 は、水素または $C_1 \sim C_7$ アルキルであり、

20

R^{10} は、水素または OH であり、

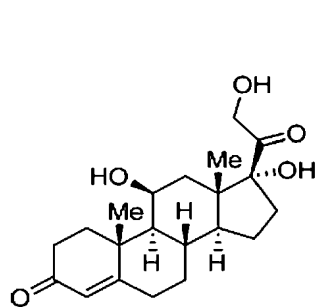
$R^{2,4}$ は、水素または $C_1 \sim C_7$ アルキルである。

【0111】

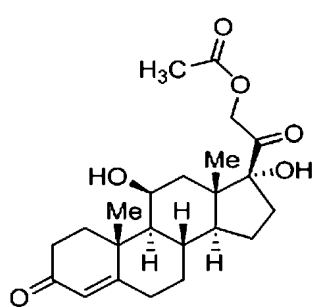
たとえば、 R^2 は水素またはメチルであり、 R^3 は、水素、フルオロ、クロロまたはメチルであり、 R^6 は、水素または $C(O)C_1 \sim C_7$ アルキルであり、 R^7 は、水素、 $C(O)CH_3$ または $C(O)CH_2CH_3$ であり、 R^8 は水素またはメチルであり、 R^9 は水素またはメチルであり、 R^{10} は、ヒドロキシルである。

【0112】

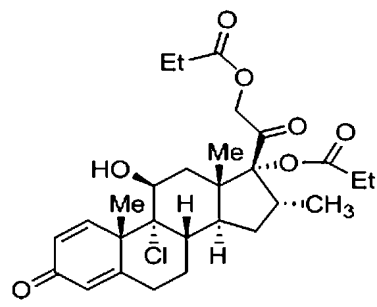
式 C の構造の非限定的な例として、およびこれらの誘導体があげられる。



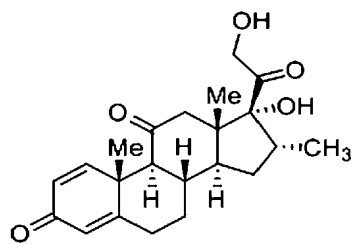
コルチゾール



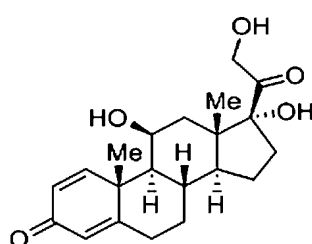
酢酸コルチゾン



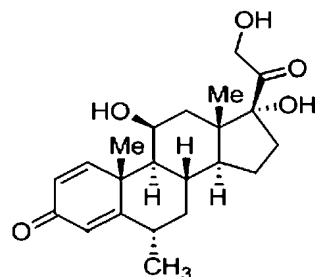
ベクロメタゾン



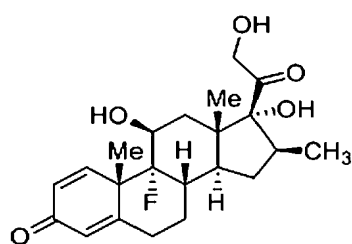
プレドニゾン



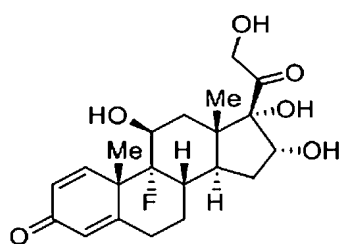
プレドニゾロン



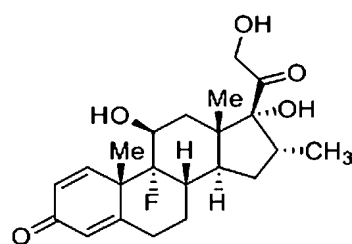
メチルプレドニゾロン



ベタメタゾン



トリアムシノロン



デキサメタゾン

10

20

30

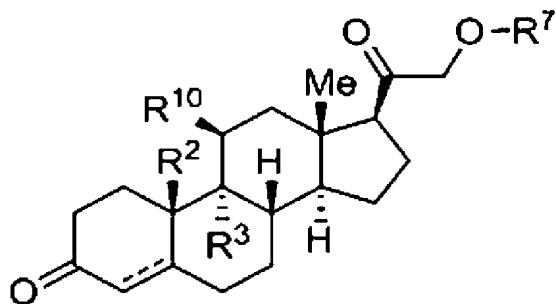
40

【 0 1 1 3 】

Y が式 C の構造を有する実施形態では、Y は、Q または L と反応できる式 C の任意の位置で、L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する式 C での結合位置と式 C の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式 C は、式 C の 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、22 位または 23 位のいずれかで位、L または Q に結合している。いくつかの実施形態では、式 C は、式 C の 3 位、10 位、16 位または 17 位で L または Q に結合している。

【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態では、Y は、鉱質コルチコイド受容体 (MR) に対して作用する。いくつかの実施形態では、Y は、MR に対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Y は、MR のアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Y は、式 D の構造を有する。



式D

10

(式中、 R^2 、 R^3 、 R^7 、 R^{10} は各々独立に、式Dの化合物がMRに結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、点線は、任意の二重結合を表す。いくつかの実施形態では、式Dは、1位、2位、4位、5位、6位、7位、8位、11位、12位、14位、15位、16位、17位のうちの1箇所または2箇所以上に、1個または2個以上の置換基をさらに有する。

【0115】

いくつかの実施形態では、Yが式Dの構造を有し、式中、

R^2 は、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC $_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル)SH、($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} C $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} C $_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} C $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} H $_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)C $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)C $_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)C $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)H、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)OC $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)OC $_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)OC $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)Oアリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)Oヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)C $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)C $_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)C $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)NR ^{2,4} C $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)NR ^{2,4} C $_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)NR ^{2,4} C $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)NR ^{2,4} H $_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)NR ^{2,4} アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル)C(O)NR ^{2,4} ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} C(O)C $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} C(O)C $_2 \sim C_{18}$ アルケニルまたは($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} C(O)C $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} C(O)OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)OC $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)OC $_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)OC $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)NR ^{2,4} C $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)NR ^{2,4} C $_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)NR ^{2,4} C $_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OC(O)NR ^{2,4} H $_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル)NR ^{2,4} (O)OC $_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C$

20

30

40

50

$8 \text{ アルキル)NR}^{2,4}(\text{O})\text{OC}_2 \sim \text{C}_{18}$ アルケニル、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_8 \text{ アルキル)NR}^{2,4}(\text{O})\text{OC}_2 \sim \text{C}_{18}$ アルキニルまたは $(\text{C}_0 \sim \text{C}_8 \text{ アルキル)NR}^{2,4}(\text{O})\text{OH}$ であり、

R³ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル) ハロ、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) SH、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)Oヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)NR^{2,4} ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC(O)NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} (O)OH であり、

R⁷ は、水素、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) O C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) O C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) O C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) OH、C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) Oヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} アリールまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) C(O) NR^{2,4} ヘテロアリールであり、

R^{10} は、水素、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})$ ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})$ OHであり、

R^{24} は、水素または $C_1 \sim C_{18}$ アルキルである。

【0116】

いくつかの実施形態では、Yが式Dの構造を有し、式中、

R^2 は、水素、ハロ、OHまたは $C_1 \sim C_7$ アルキルであり、

R^3 は、水素、ハロ、OHまたは $C_1 \sim C_7$ アルキルであり、

R^7 は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_8$ アルキニル、ヘテロアルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})$ アリール、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})$ ヘテロアリール、 $(C_0 \text{ アルキル})$ $C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \text{ アルキル})$ $C(O)C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \text{ アルキル})$ $C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、 (C_0) $C(O)$ アリール、 (C_0) $C(O)$ ヘテロアリール、 (C_0) $C(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \text{ アルキル})$ $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \text{ アルキル})$ $C(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニルまたは $(C_0 \text{ アルキル})$ $C(O)OH$ であり、

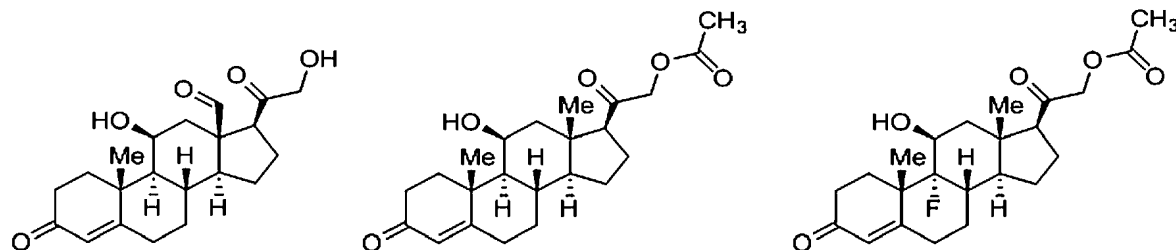
R^{10} は、水素またはOHであり、

R^{24} は、水素または $C_1 \sim C_7$ アルキルである。

【0117】

たとえば、 R^2 は水素またはメチルであり、 R^3 は、水素、フルオロ、クロロまたはメチルであり、 R^7 は、水素、 $C(O)CH_3$ または $C(O)CH_2CH_3$ であり、 R^{10} は、ヒドロキシルである。

式Dの化合物の非限定的な例として、以下の物質およびこれらの誘導体があげられる。



アルドステロン

酢酸デオキシコルチコステロン

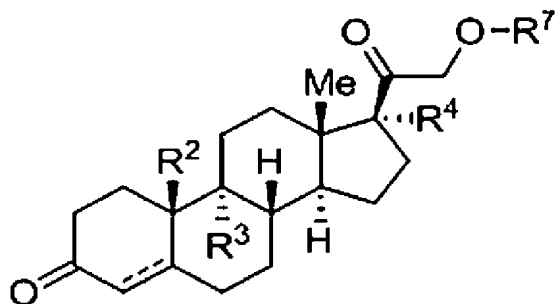
酢酸デオキシコルチコステロン

【0118】

Yが式Dの構造を有する実施形態では、Yは、QまたはLと反応できる式Dの任意の位置で、L（Lが結合基である場合など）またはQ（Lが結合である場合など）に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、QまたはLに対する式Dでの結合位置と式Dの結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式Dは、式Dの1位、2位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、22位、23位または24位で、LまたはQに結合している。いくつかの実施形態では、式Dは、式Dの3位、10位、13位または17位でLまたはQに結合している。

【0119】

いくつかの実施形態では、Yは、プロゲステロン受容体（PR）として作用する。いくつかの実施形態では、Yは、PRに対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Yは、PRのアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Yは、式Eの構造を有する。



式E

10

(式中、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^7 は各々独立に、式Eの化合物がPRに結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、点線は、任意の二重結合を表す。)いくつかの実施形態では、式Eは、1位、2位、4位、5位、6位、7位、8位、11位、12位、14位、15位、16位、17位(6位のメチル基など)のうちの1箇所または2箇所以上に、1個または2個以上の置換基をさらに有する。

【0120】

いくつかの実施形態では、Yが式Eの構造を有し、式中、

20

R^2 は、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル)SH、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}$ $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)O$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリール($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}$ $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}$ $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニルまたは($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}$ $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}$ $C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}$ $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C$

30

40

50

$8 \text{ アルキル)NR}^{2,4}(\text{O})\text{OC}_2 \sim \text{C}_{18}$ アルケニル、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_8 \text{ アルキル)NR}^{2,4}(\text{O})\text{OC}_2 \sim \text{C}_{18}$ アルキニルまたは $(\text{C}_0 \sim \text{C}_8 \text{ アルキル)NR}^{2,4}(\text{O})\text{OH}$ であり、

R^{2,4} は、水素または C₁ ~ C₁₈ アルキルであり、

R³ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル)ハロ、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)SH、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)H、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)Oヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニルまたは(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニルまたは(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}(O)OHであり、

R⁴ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル)ハロ、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ ア
ケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)アリール
(C₀ ~ C₈ アルキル)ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₁ ~ C₁₈ アルキ
、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂
C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)SH、(C
~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C
~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C
~ C₈ アルキル)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキ
、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)
(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)H、(C₀ ~ C₈ ア
ルキル)C(O)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)ヘテロアリール(C₀ ~ C
アルキル)C(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂
C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C

$C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリアル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリアル ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリアル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリアル ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C(O)C_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニルまたは ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C(O)C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OC_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OC_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニルまたは ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}(O)OH$ であり、

10

20

R^7 は、水素、 $C_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)アリアル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ヘテロアリアル ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリアル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリアル ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OH$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ アリアル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)O$ ヘテロアリアル ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ アリアルまたは ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリアルであり、

30

$R^{2,4}$ は、水素または $C_1 \sim C_1 \sim C_8$ アルキルである。

【0121】

いくつかの実施形態では、Yは式Eの構造を有し、式中、

R^2 は、水素、ハロ、OHまたは $C_1 \sim C_7$ アルキルであり、

R^3 は、水素、ハロ、OHまたは $C_1 \sim C_7$ アルキルであり、

R^4 は、水素、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ハロ、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_1 \sim C_8$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)アリアル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ヘテロアリアル ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $OC_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)OH、($C_0 \sim C_8$ アルキル)SH、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $NR^{2,4}H_2$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリアル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリアル ($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC$

40

50

$C_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)OH$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)O$ アリール、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)O$ ヘテロアリール $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}$ $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}$ H_2 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}$ アリール、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) C(O)NR^{2,4}$ ヘテロアリール $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}$ $C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}$ $C(O)C_2 \sim C_8$ アルケニルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}$ $C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}$ $C(O)OH$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)OH$ 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)NR^{2,4}$ $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)NR^{2,4}$ $C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) OC(O)NR^{2,4}$ H_2 、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}$ $(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}$ $(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}$ $(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニルまたは $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル}) NR^{2,4}$ $(O)OH$ であり、

10

20

R^7 は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_8$ アルキニル、ヘテロアルキル、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})$ アリール、 $(C_0 \sim C_8 \text{ アルキル})$ ヘテロアリール $(C_0 \text{ アルキル}) C(O)C_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \text{ アルキル}) C(O)C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \text{ アルキル}) C(O)C_2 \sim C_8$ アルキニル、 (C_0) $C(O)$ アリール、 (C_0) $C(O)$ ヘテロアリール (C_0) $C(O)OC_1 \sim C_8$ アルキル、 $(C_0 \text{ アルキル}) C(O)OC_2 \sim C_8$ アルケニル、 $(C_0 \text{ アルキル}) C(O)OC_2 \sim C_8$ アルキニルまたは $(C_0 \text{ アルキル}) C(O)OH$ であり、

$R^{2,4}$ は、水素または $C_1 \sim C_7$ アルキルである。

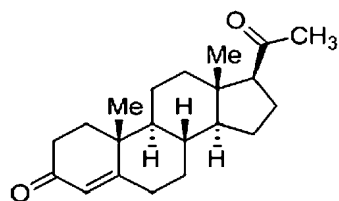
30

【0122】

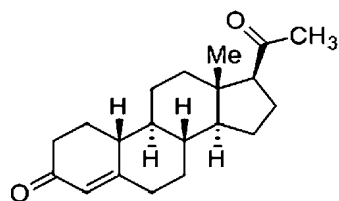
たとえば、 R^2 は水素またはメチルであり、 R^3 は水素またはメチルであり、 R^4 は、 $(C_1 \text{ アルキル}) C(O)C_1 \sim C_4$ アルキル、アセテート、シpioネート、ヘミスクシネート、エナンテートまたはプロピオネートであり、 R^7 は、水素、 $C(O)CH_3$ または $C(O)CH_2CH_3$ である。

【0123】

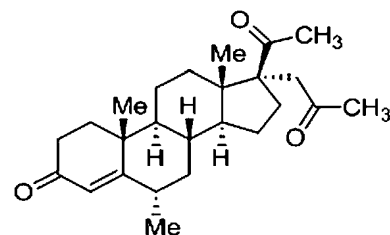
式 E の化合物の非限定的な例として、以下の物質およびこれらの誘導体があげられる。



プロゲステロン



19-ノルプロゲステロン



メドロキシプロゲステロン

40

【0124】

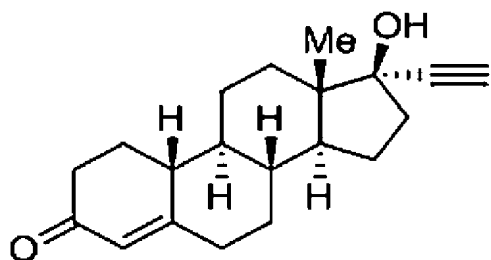
Y が式 E の構造を有する実施形態では、 Y は、 Q または L と反応できる式 E の任意の位置で、 L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、 Q または L に対する式 E での結合位置と式 E の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式 E は、式 E の 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位

50

、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、22位、23位または24位のいずれかで、LまたはQに結合している。いくつかの実施形態では、式Eは、式Eの3位または17位を介してLまたはQに結合している。

【0125】

他の実施形態では、Yは、プロゲステロン受容体に対して作用するが、式Eには含まれない。たとえば、Yは、以下の構造およびその類縁体を有するものであってもよい。



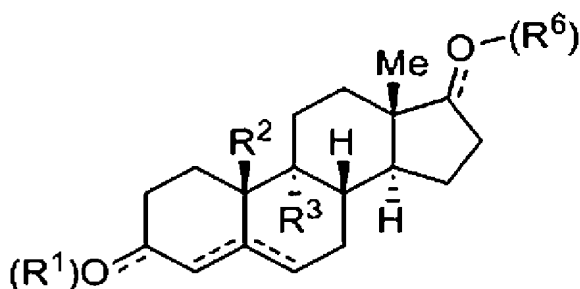
ノルエチンドロン

10

【0126】

いくつかの実施形態では、Yは、アンドロゲン受容体（AR）に対して作用する。いくつかの実施形態では、Yは、ARに対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Yは、ARのアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Yは、式Fの構造を有する。

20



式F

30

（式中、 R^1 （存在する場合）、 R^2 、 R^3 、 R^6 は各々独立に、式Fの化合物がARに結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、点線は各々、任意の二重結合を表す。ただし、任意の炭素-炭素二重結合のうち最大で1つが、5位に存在する。）いくつかの実施形態では、式Fは、1位、2位、4位、5位、6位、7位、8位、11位、12位、14位、15位、16位、17位のうちの1箇所または2箇所以上に、1個または2個以上の置換基をさらに有する。

40

【0127】

いくつかの実施形態では、Yが式Fの構造を有し、式中、

R^1 が存在し、水素、 $C_1 \sim C_{18}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、ヘテロアルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル)アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル)ヘテロアリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルケニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)C_2 \sim C_{18}$ アルキニル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)H$ 、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ アリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)$ ヘテロアリール、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_1 \sim C_{18}$ アルキル、($C_0 \sim C_8$ アルキル) $C(O)OC_2 \sim C_{18}$ アルケニ

50

ル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OH、C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)Oヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}ヘテロアリールまたはSO₃Hであり、

R² は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル)ハロ、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)SH、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)H、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)Oアリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)Oヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル)C(O)NR^{2,4}ヘテロアリール(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニルまたは(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}C(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)OH、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)OC(O)NR^{2,4}H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}(O)OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}(O)OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}(O)OC₂ ~ C₁₈ アルキニルまたは(C₀ ~ C₈ アルキル)NR^{2,4}(O)OHであり、

R³ は、水素、(C₀ ~ C₈ アルキル) ハロ、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) OC₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OC₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) OH、(C₀ ~ C₈ アルキル) SH、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) NR^{2,4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C(O)H、(C₀ ~ C₈ ア

ルキル) C (O) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) N R^{2 4} C (O) C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) N R^{2 4} C (O) C₂ ~ C₁₈ アルケニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) N R^{2 4} C (O) C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) N R^{2 4} C (O) O H、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) O C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) O C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) O C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) O H、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) N R^{2 4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) N R^{2 4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) N R^{2 4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) O C (O) N R^{2 4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) N R^{2 4} (O) O C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) N R^{2 4} (O) O C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) N R^{2 4} (O) O C₂ ~ C₁₈ アルキニルまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) N R^{2 4} (O) O H であり、

10

20

R⁶ は、水素、C₁ ~ C₁₈ アルキル、C₂ ~ C₁₈ アルケニル、C₂ ~ C₁₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O H、C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₁ ~ C₁₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₂ ~ C₁₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₂ ~ C₁₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} ヘテロアリールまたは S O₃ H であり、

30

R^{2 4} は、水素または C₁ ~ C₁₈ アルキルである。

【 0 1 2 8 】

いくつかの実施形態では、Y は式 E の構造を有し、式中、

40

R¹ は、水素、C₁ ~ C₇ アルキル；(C₀ ~ C₃ アルキル) C (O) C₁ ~ C₇ アルキル、(C₀ ~ C₃ アルキル) C (O) アリールまたは S O₃ H であり、

R² は、水素、ハロ、O H または C₁ ~ C₇ アルキルであり、

R³ は、水素、ハロ、O H または C₁ ~ C₇ アルキルであり、

R⁶ は、水素、C₁ ~ C₈ アルキル、C₂ ~ C₈ アルケニル、C₂ ~ C₈ アルキニル、ヘテロアルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) C₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) C₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) C₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) H、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₁ ~ C₈ ア

50

ルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O C₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O H、C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O アリール、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) O ヘテロアリール (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₁ ~ C₈ アルキル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₂ ~ C₈ アルケニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} C₂ ~ C₈ アルキニル、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} H₂、(C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} アリールまたは (C₀ ~ C₈ アルキル) C (O) N R^{2 4} ヘテロアリールであり、

R^{2 4} は、水素または C₁ ~ C₇ アルキルである。

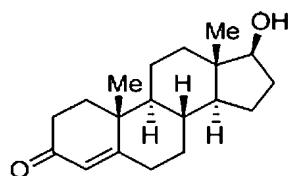
【0129】

10

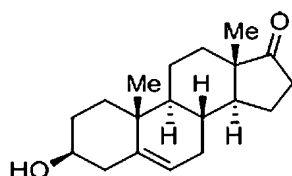
たとえば、R¹ は水素であるか存在せず、R² は水素またはメチルであり、R³ は水素またはメチルであり、R⁶ は H であるか存在しない。

【0130】

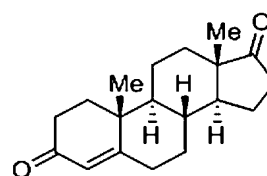
式 F の化合物の非限定的な例として、以下の物質およびこれらの誘導体があげられる。



テストステロン

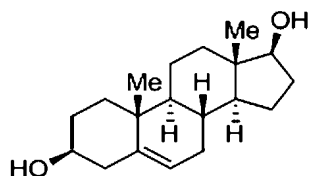


デヒドロエピアンドロステロン

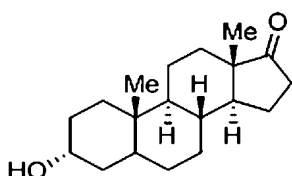


アンドロステンジオン

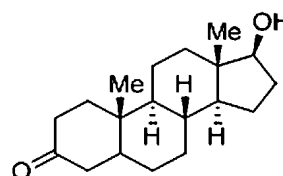
20



5-アンドロステンジオール



アンドロステロン



ジヒドロテストステロン

【0131】

30

Y が式 F の構造を有する実施形態では、Y は、Q または L と反応できる式 F の任意の位置で、L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する式 F での結合位置と式 F の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式 F は、式 F の 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位または 22 位のいずれかで、L または Q に結合している。いくつかの実施形態では、式 F は、式 F の 3 位または 17 位で L または Q に結合している。

【0132】

いくつかの実施形態では、タイプ I の核内ホルモン受容体に NHR リガンドが結合すると、タイプ I の核内ホルモン受容体を発現しているいくつかの細胞または組織で、アゴニスト活性 (またはアンタゴニスト活性) が生じる。

40

タイプ II の核内ホルモン受容体で作用する NHR リガンド

【0133】

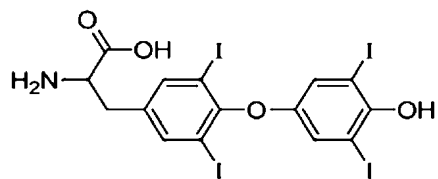
本発明のいくつかの実施形態では、NHR リガンド (Y) は、タイプ II の核内ホルモン受容体で作用する。いくつかの実施形態では、Y は、リガンドがタイプ II の核内ホルモン受容体に結合する際にアゴニスト活性を与えるまたは促進する、どのような構造を持つものであってもよく、他の実施形態では、Y は、タイプ II の核内ホルモン受容体のアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Y は、甲状腺ホルモン受容体 (TR)、レチノイン酸受容体 (RAR)、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR)、

50

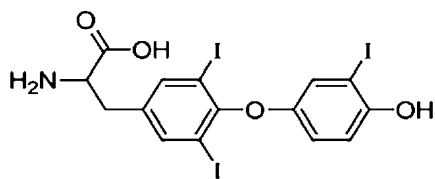
肝臓 X 受容体 (L X R)、ファルネソイド X 受容体 (F X R)、ビタミン D 受容体 (V D R) および / または プレグナン X 受容体 (P X R) に対して、アゴニスト (または アンタゴニスト) 活性を示す。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、Y は、甲状腺ホルモン受容体 (T R α 、T R β など) に対して作用する。いくつかの実施形態では、Y は、T R に対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Y は、T R のアンタゴニストである。Y の非限定的な例として、以下の化合物およびこれらの誘導体あげられる。



チロキシシン (T₄)



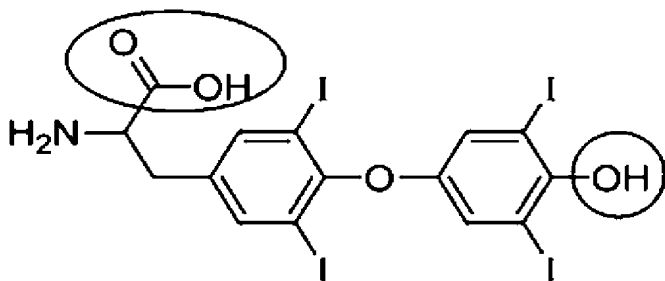
トリヨードチロキシシン (T₃)

10

【 0 1 3 5 】

Y が T R に対してアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を含む実施形態では、Y は、Q または L と反応できる Y の任意の位置で、L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する Y での結合位置と Y の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、Y は、Y の任意の位置を介して L または Q に結合している。いくつかの実施形態では、以下に示すように、Y は、カルボン酸部分またはアルコール部分を介して L または Q に結合している。

20



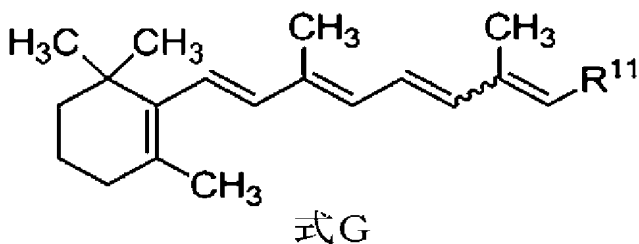
チロキシシン (T₄)

30

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態では、Y は、レチノイン酸受容体 (R A R α 、R A R β 、R A R γ など) に対して作用する。いくつかの実施形態では、Y は、R A R に対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Y は、R A R のアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Y は、式 G の構造を有する。

40



式G

(式中、R¹¹ は、式 G の化合物が R A R に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴ

50

ニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、

~~~~~

は、EまたはZの異性体の型を表す。）

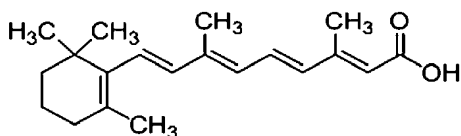
【0137】

いくつかの実施形態では、Yが式Gの構造を有し、式中、 $R^{11}$ は、 $C(O)OH$ 、 $CH_2OH$ または $C(O)H$ である。いくつかの実施形態では、Yが式Gの構造を有し、式中、 $R^{11}$ は、カルボン酸誘導体（塩化アシル、無水物、エステルなど）である。

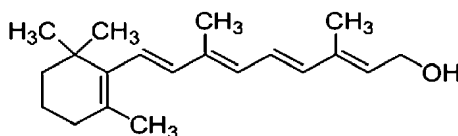
【0138】

式Gの化合物の非限定的な例として、以下の物質およびこれらの誘導体があげられる。

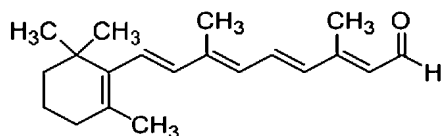
10



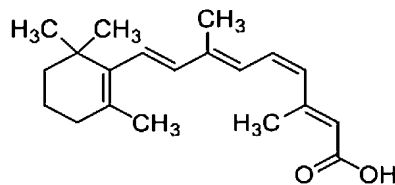
オールトランスレチノイン酸



レチノール



レチナール



11-シスレチノイン酸

20

【0139】

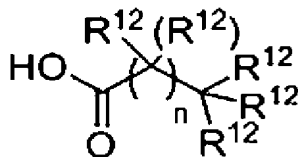
Yが式Gの構造を有する実施形態では、Yは、QまたはLと反応できる式Gの任意の位置で、L（Lが結合基である場合など）またはQ（Lが結合である場合など）に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、QまたはLに対するYでの結合位置とYの結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、Yは、Yの任意の位置を介してLまたはQに結合している。いくつかの実施形態では、式Gは、 $R^{11}$ でLまたはQに結合している。

30

【0140】

いくつかの実施形態では、Yは、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$  /  $\delta$ 、PPAR $\gamma$  など）に対して作用する。いくつかの実施形態では、Yは、PPARに対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Yは、PPARのアンタゴニストである。いくつかの実施形態では、Yは、式Hで表されるような、飽和または不飽和のハロゲン化または非ハロゲン化遊離脂肪酸（FFA）である。

40



式H

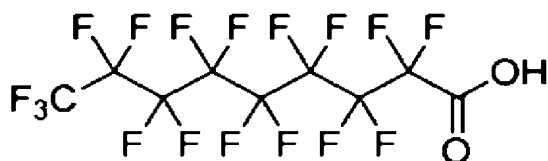
（式中、nは0～26であり、 $R^{12}$ は各々、存在する場合には独立に、式Hの化合物がPPARに結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分である。）

50

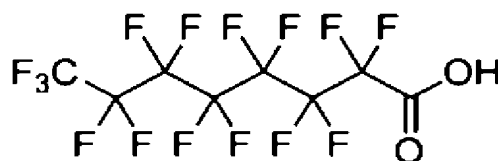
## 【0141】

いくつかの実施形態では、Yは式Hの構造を有し、式中、nは0～26であり、R<sup>1 2</sup>は各々、存在する場合には独立に、水素、C<sub>1</sub>～C<sub>7</sub>アルキルまたはハロゲンである。いくつかの実施形態では、式Bは、たとえば、ギ酸、酢酸、n-カプロン酸、ヘプタン酸、カプリル酸、ノナン酸、カプリン酸、ウンデカン酸、ラウリン酸、トリデカン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、ヘプタデカン酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、アラキジン酸、ヘンエイコサン酸、ベヘン酸、トリコサン酸、ペルフロオロノナン酸（以下参照）、ペルフロオロオクタン酸（以下参照）、これらの誘導体など、飽和脂肪酸である。いくつかの実施形態では、式Hは、たとえば、ミード酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、リノール酸、α-リノレン酸、エライジン酸、ペトロセリン酸、アラキドン酸、ジヒドロキシエイコサテトラエン酸（D i H E T E）、オクタデシン酸、エイコサトリイン酸（eicosatriynoic acid）、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、ジホモリノレン酸、ドコサトリエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、アドレン酸、これらの誘導体など、シス型またはトランス型の不飽和結合を有する。

10



ペルフロオロノナン酸



ペルフロオロオクタン酸

20

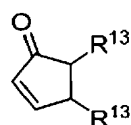
## 【0142】

Yが式Hの構造を有する実施形態では、Yは、QまたはLと反応できる式Hの任意の位置で、L（Lが結合基である場合など）またはQ（Lが結合である場合など）に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、QまたはLに対する式Hでの結合位置と式Hの結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式Hは、式Hの任意の位置でLまたはQに結合している。いくつかの実施形態では、式Hは、末端のカルボン酸部分を介してLまたはQに結合している。

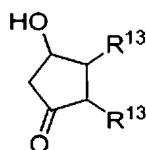
30

## 【0143】

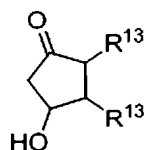
これらの実施形態のうちのいくつかにおいて、Yは、エイコサノイドである。具体的な実施形態では、Yは、プロスタグランジンまたはロイコトリエンである。例示としてのいくつかの実施形態では、Yは、式J1～J6に示すような構造を有するプロスタグランジンである。



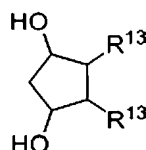
式J1



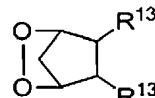
式J2



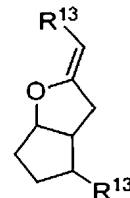
式J3



式J4



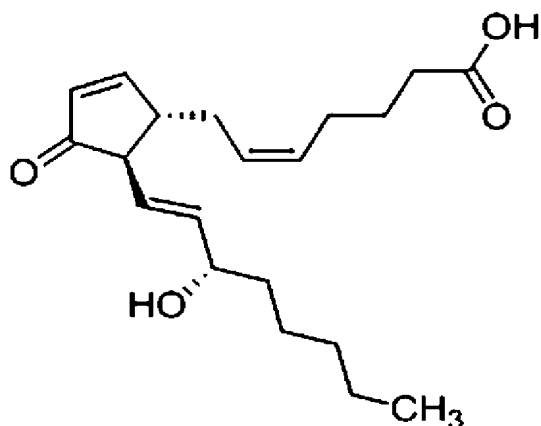
式J5



式J6

40

（式中、R<sup>1 3</sup>は各々独立に、式Jの化合物がPPARに結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分である（以下に示すようなPGJ2など））。



10

## 【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態では、Y が式 J 1 ~ J 6 のいずれかの構造を有する場合、 $R^{1\ 3}$  は各々独立に、 $C_7 \sim C_8$  アルキル、 $C_7 \sim C_8$  アルケニル、 $C_7 \sim C_8$  アルキニルまたはヘテロアルキルである。

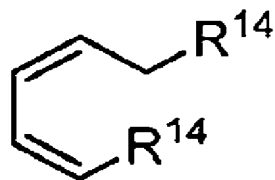
## 【 0 1 4 5 】

Y がエイコサノイドである実施形態では、Y は、Q または L と反応できるエイコサノイドの任意の位置で L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する Y での結合位置と Y の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、Y は、Y の任意の位置を介して L または Q に結合している。いくつかの実施形態では、エイコサノイドは、末端のカルボン酸部分または側鎖のアルコール部分を介して L または Q に結合している。

20

## 【 0 1 4 6 】

例示としてのいくつかの実施形態では、Y は、式 K で表されるような構造を有するロイコトリエンまたは式 K からの誘導体化である。

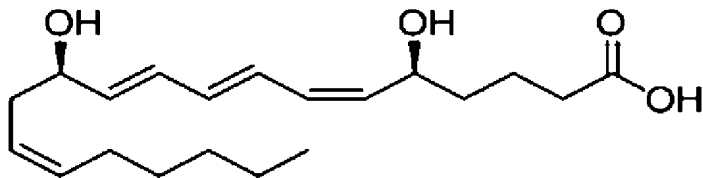


式K

30

(式中、 $R^{1\ 4}$  は各々独立に、式 K の化合物が P P A R に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分である(以下に示すようなロイコトリエン B 4 など)。

40



## 【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態では、Y が式 K の構造を有する場合、 $R^{1\ 4}$  は各々独立に、 $C_3 \sim C_{13}$  アルキル、 $C_3 \sim C_{13}$  アルケニル、 $C_3 \sim C_{13}$  アルキニルまたはヘテロアルキルである。

50



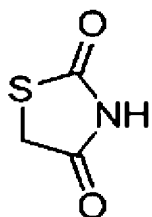
## 【 0 1 4 8 】

Y が式 K の構造を有する実施形態では、Y は、Q または L と反応できる式 K の任意の位置で L ( L が結合基である場合など ) または Q ( L が結合である場合など ) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する式 K での結合位置と式 K の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式 K は、式 K の任意の位置で L または Q に結合している。いくつかの実施形態では、式 K は、末端のカルボン酸部分または側鎖のアルコール部分を介して L または Q に結合している。

## 【 0 1 4 9 】

例示としてのいくつかの実施形態では、Y は、式 L で表される構造を有するチアゾリジンジオンである。

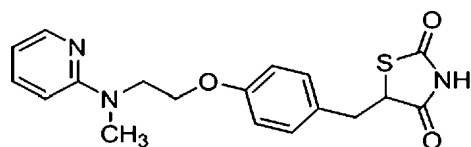
10



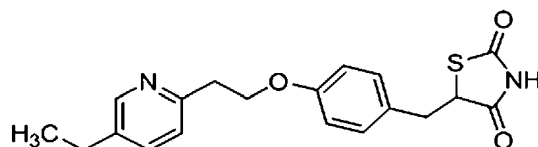
式 L

20

式 L の化合物の非限定的な例として、以下の物質およびこれらの誘導体があげられる。

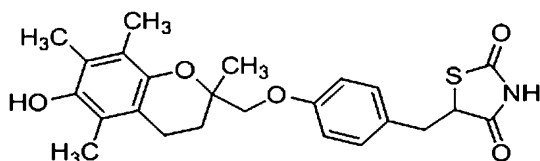


ロシグリタゾン



ピオグリタゾン

30



トログリタゾン

## 【 0 1 5 0 】

Y が式 L の構造を有する実施形態では、Y は、Q または L と反応できる式 L の任意の位置で L ( L が結合基である場合など ) または Q ( L が結合である場合など ) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する式 L での結合位置と式 L の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式 L は、たとえば、側鎖のアルコール部分または芳香族置換基を介するなど、式 L の任意の位置で L または Q に結合している。

40

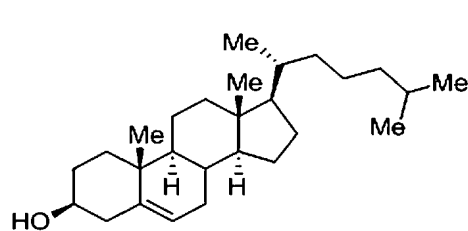
## 【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態では、Y は、RAR 関連オーファン受容体 ( ROR $\alpha$ 、ROR $\beta$ 、ROR $\gamma$  など ) に対して作用する。いくつかの実施形態では、Y は、ROR に対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Y は、ROR のアンタゴニストである。

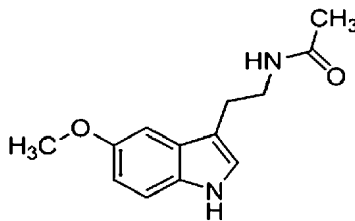
## 【 0 1 5 2 】

50

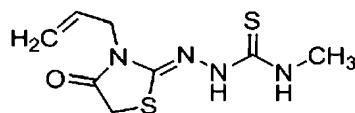
Y の非限定的な例として、以下の物質およびこれらの誘導体があげられる。



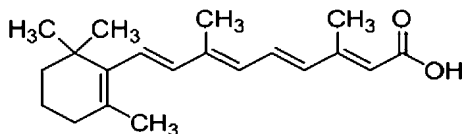
コレステロール



メラトニン



CGP 52608



オールトランスレチノイン酸

10

## 【 0 1 5 3 】

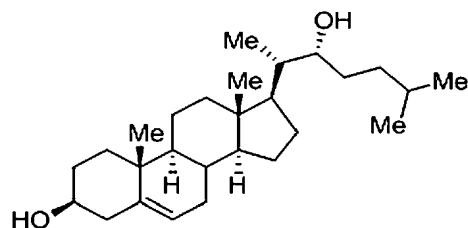
20

Y が R O R に対して作用する実施形態では、Y は、Q または L と反応できる Y の任意の位置で、L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する Y での結合位置と Y の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、Y は、たとえば、本明細書で上述した位置など、Y の任意の位置を介して L または Q に結合している。

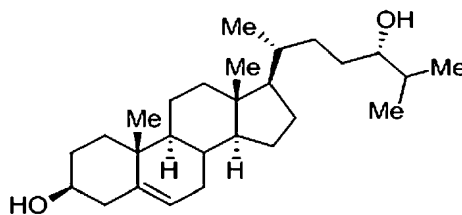
## 【 0 1 5 4 】

30

いくつかの実施形態では、Y は、肝臓 X 受容体 ( L X R  $\alpha$  、 L X R  $\beta$  ) に対して作用する。いくつかの実施形態では、Y は、L X R に対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Y は、L X R のアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Y は、オキシステロール (すなわち、コレステロールの酸素化された誘導体) である。これらの実施形態における Y の非限定的な例として、22 ( R ) - ヒドロキシコレステロール (以下参照)、24 ( S ) - ヒドロキシコレステロール (以下参照)、27 - ヒドロキシコレステロール、コレステレン酸、これらの誘導体があげられる。



22(R)-ヒドロキシコレステロール



24(S)-ヒドロキシコレステロール

40

## 【 0 1 5 5 】

Y が L X R に対して作用する実施形態では、Y は、Q または L と反応できる Y の任意の位置で、L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する Y での結合位置と Y の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、Y は、式 F の 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、22 位、23 位、24 位、25 位または 26 位のいずれかで L または Q に

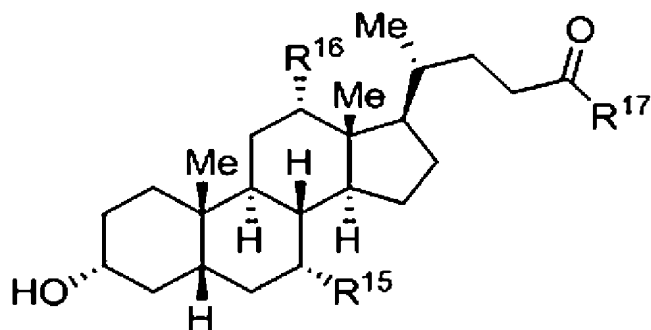
50

結合している。いくつかの実施形態では、式 F は、式 F の 3 位または 17 位で L または Q に結合している。

【 0 1 5 6 】

いくつかの実施形態では、Y は、ファルネソイド X 受容体 ( F X R ) に対して作用する。いくつかの実施形態では、Y は、F X R に対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Y は、F X R のアンタゴニストである。これらの実施形態のうちのいくつかでは、Y は胆汁酸である。例示としての実施形態では、Y は、式 M の構造を有する。

10



20

式M

( 式中、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$  は各々独立に、式 M の化合物が F X R に結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分である。 )

【 0 1 5 7 】

いくつかの実施形態では、Y が式 M の構造を有する場合、 $R^{15}$  および  $R^{16}$  は各々独立に、水素、(  $C_0 \sim C_8$  アルキル ) ハロ、 $C_1 \sim C_{18}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{18}$  アルキニル、ヘテロアルキルまたは (  $C_0 \sim C_8$  アルキル ) OH であり、 $R^{17}$  は、OH、(  $C_0 \sim C_8$  アルキル ) NH (  $C_1 \sim C_4$  アルキル )  $SO_3H$  または (  $C_0 \sim C_8$  アルキル ) NH (  $C_1 \sim C_4$  アルキル )  $COOH$  である。

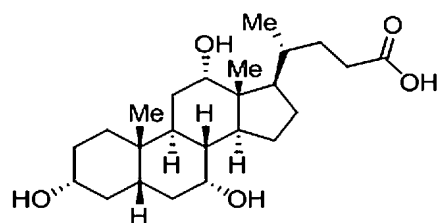
30

【 0 1 5 8 】

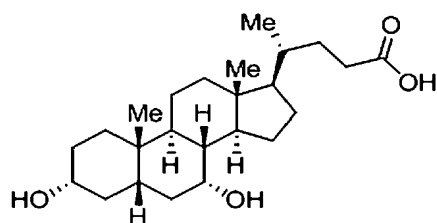
いくつかの実施形態では、Y が式 M の構造を有する場合、 $R^{15}$  および  $R^{16}$  は各々独立に、水素または OH であり、 $R^{17}$  は、OH、NH (  $C_1 \sim C_2$  アルキル )  $SO_3H$  または NH (  $C_1 \sim C_2$  アルキル )  $COOH$  である。

【 0 1 5 9 】

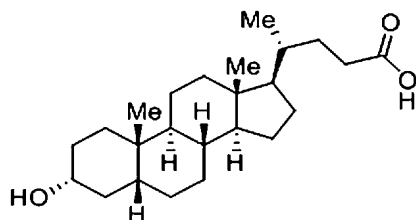
式 M の化合物の非限定的な例として、以下の物質およびこれらの誘導体があげられる。



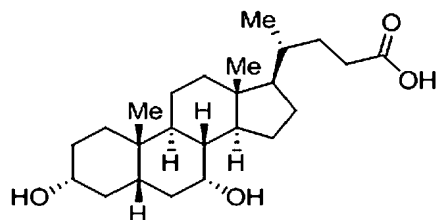
コール酸



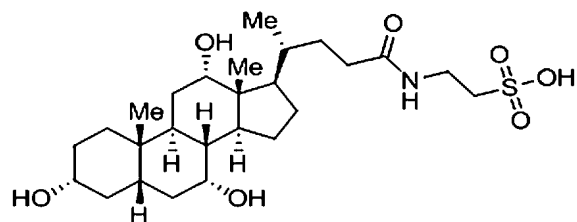
デオキシコール酸



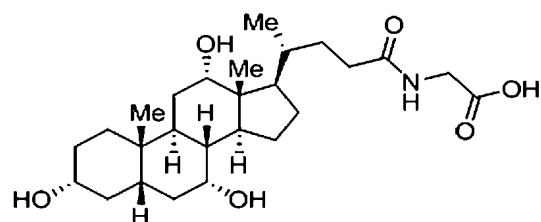
リトコール酸



ケノデオキシコール酸



タウロコール酸



グリココール酸

10

20

30

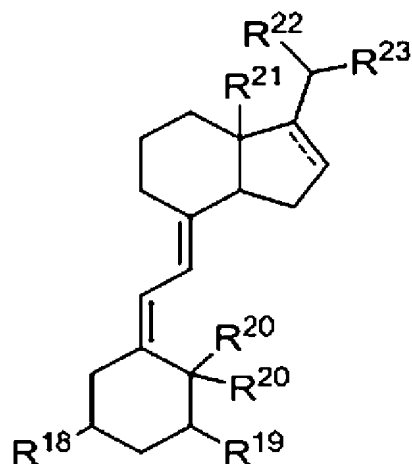
40

## 【 0 1 6 0 】

Y が式 M の構造を有する実施形態では、Y は、Q または L と反応できる式 M の任意の位置で、L (L が結合基である場合など) または Q (L が結合である場合など) に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、Q または L に対する式 M での結合位置と式 M の結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式 M は、式 M の 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、22 位、23 位、24 位または 25 位のいずれかで、L または Q に結合している。いくつかの実施形態では、式 M は、式 M の 3 位、7 位、12 位または 17 位で L または Q に結合している。

## 【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態では、Y は、ビタミン D 受容体 (VDR) に対して作用する。いくつかの実施形態では、Y は、VDR に対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Y は、VDR のアンタゴニストである。例示としての実施形態では、Y は、式 N の構造を有する。



式N

10

( 式中、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{20}$ 、 $R^{21}$ 、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$  は各々、式Nの化合物がVDRに結合する際にアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を与えるまたは促進する部分であり、たとえば、Bouillon et al., Endocrine Reviews, 16(2):200-257 (1995)に記載されたビタミンD化合物のうちのいずれかである。

20

## 【 0 1 6 2 】

Yが式Nの構造を有するいくつかの実施形態では、

$R^{18}$  および  $R^{19}$  は各々独立に、水素、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)ハロ、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)ヘテロアリールまたは( $C_0 \sim C_8$  アルキル)OHであり、

両方の  $R^{20}$  が水素であるか、両方の  $R^{20}$  が一緒になって、 $=CH_2$  を形成し、

$R^{21}$  および  $R^{22}$  は各々独立に、 $C_1 \sim C_4$  アルキルであり、

$R^{23}$  は、 $C_4 \sim C_{18}$  アルキル、 $C_4 \sim C_{18}$  アルケニル、 $C_4 \sim C_{18}$  アルキニル、ヘテロアルキル、( $C_4 \sim C_{18}$  アルキル)アリール、( $C_4 \sim C_{18}$  アルキル)ヘテロアリール( $C_0 \sim C_8$  アルキル)OC $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルケニル)OC $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルキニル)OC $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)OC $_2 \sim C_{18}$  アルケニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)OC $_2 \sim C_{18}$  アルキニル、( $C_6 \sim C_{18}$  アルキル)OH、( $C_6 \sim C_{18}$  アルキル)SH、( $C_6 \sim C_{18}$  アルケニル)OH、( $C_6 \sim C_{18}$  アルキニル)OH、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)NR $^{24}$  C $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルキニル)NR $^{24}$  C $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)NR $^{24}$  C $_2 \sim C_{18}$  アルケニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)NR $^{24}$  C $_2 \sim C_{18}$  アルキニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)C $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)C $_2 \sim C_{18}$  アルケニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)C $_2 \sim C_{18}$  アルキニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)H、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)アリール、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)ヘテロアリール( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)OC $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)OC $_2 \sim C_{18}$  アルケニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)OC $_2 \sim C_{18}$  アルキニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)OH、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)Oアリール、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)Oヘテロアリール( $C_0 \sim C_8$  アルキル)OC(O)C $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)OC(O)C $_2 \sim C_{18}$  アルケニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)OC(O)C $_2 \sim C_{18}$  アルキニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)NR $^{24}$  C $_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)NR $^{24}$  C $_2 \sim C_{18}$  アルケニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)NR $^{24}$  C $_2 \sim C_{18}$  アルキニル、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)NR $^{24}$  H $_2$ 、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)NR $^{24}$  アリール、( $C_0 \sim C_8$  アルキル)C(O)NR $^{24}$  ヘテロアリール( $C_0 \sim C_8$  アルキル)NR $^{24}$  C(O)C $_1 \sim C_{18}$  アルキル

30

40

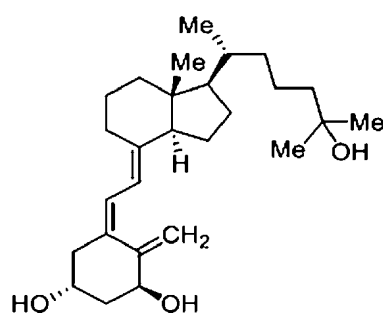
50

、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)NR<sup>2 4</sup>C(O)C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルケニルまたは(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)NR<sup>2 4</sup>C(O)C<sub>2</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルキニル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)NR<sup>2 4</sup>C(O)OH、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)OC(O)OC<sub>1</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルキル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)OC(O)OC<sub>2</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルケニル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)OC(O)OC<sub>2</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルキニル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)OC(O)OH、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)OC(O)NR<sup>2 4</sup>C<sub>1</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルキル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)OC(O)NR<sup>2 4</sup>C<sub>2</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルケニル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)OC(O)NR<sup>2 4</sup>C<sub>2</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルキニル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)OC(O)NR<sup>2 4</sup>H<sub>2</sub>、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)NR<sup>2 4</sup>(O)OC<sub>1</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルキル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)NR<sup>2 4</sup>(O)OC<sub>2</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルケニル、(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)NR<sup>2 4</sup>(O)OC<sub>2</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルキニルまたは(C<sub>0</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)NR<sup>2 4</sup>(O)OHであり、  
R<sup>2 4</sup>は、水素またはC<sub>1</sub> ~ C<sub>1 8</sub> アルキルである。

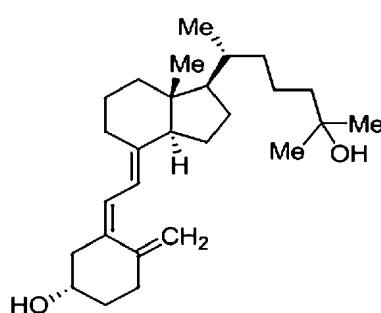
10

## 【0163】

式Nの化合物の非限定的な例として、以下の物質およびこれらの誘導体があげられる。



カルシトリオール

25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>

20

## 【0164】

Yが式Nの構造を有する実施形態では、Yは、QまたはLと反応できる式Nの任意の位置で、L(Lが結合基である場合など)またはQ(Lが結合である場合など)に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、QまたはLに対する式Nでの結合位置と式Nの結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、式Nは、式Nの1位、2位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、22位、23位、24位、25位または26位のうちのいずれかで位、LまたはQに結合している。いくつかの実施形態では、式Nは、式Nの1位、3位、19位または25位でLまたはQに結合している。

30

## 【0165】

いくつかの実施形態では、Yは、プレグナンX受容体(PXR)に対して作用する。いくつかの実施形態では、Yは、PXRに対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Yは、PXRのアンタゴニストである。いくつかの実施形態では、Yは、ステロイド、抗菌薬、抗真菌薬、胆汁酸、ハイパーフォリンまたはハーブ化合物である。例示としての実施形態では、Yは、デキサメタゾンおよびリファンピシンなど、CYP3A4を誘導できる化合物である。YがPXRに対して作用する構造を有する実施形態では、Yは、QまたはLと反応できるYの任意の位置で、L(Lが結合基である場合など)またはQ(Lが結合である場合など)に結合している。当業者であれば、一般的な知識と本明細書にて提供する開示内容とに鑑みて、QまたはLに対するYでの結合位置とYの結合手段とを容易に判断できよう。いくつかの実施形態では、Yは、Yの任意の位置でLまたはQに結合している。

40

NHRリガンド(Y)の修飾

50

## 【0166】

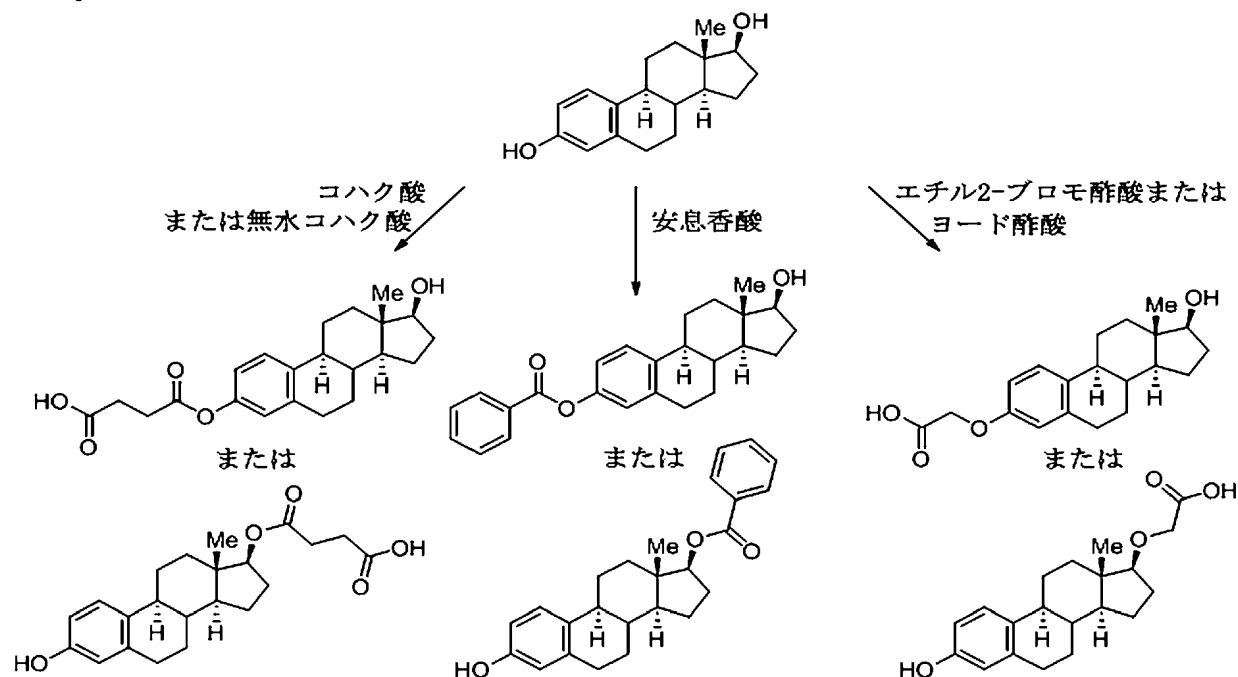
いくつかの実施形態では、NHRリガンドは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド(Q)または結合基(L)と反応できる反応性部分を含むように、誘導体化されるか、そうでなければ化学的に修飾される。本明細書に記載の実施形態では、Yは、QまたはLと反応できるYの任意の位置で誘導体化される。Yでの誘導体化の位置は、当業者には自明であり、使用するNHRリガンドのタイプと、所望の活性とに左右される。たとえば、Yが、3つの6員環が1つの5員環に結合した四環骨格の構造またはそのバリエーションを有する実施形態では、Yは、1位、2位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、22位、23位、24位または25位のいずれでも誘導体化可能である。他の誘導体位置は、本明細書で上述した通りであってもよい。

10

## 【0167】

当業者に知られた薬剤または本明細書に記載の薬剤を用いて、NHRリガンドを誘導体化することが可能である(結合基のセクションとQおよび/またはYの化学修飾のサブセクションなどを参照のこと)。たとえば、コハク酸、無水コハク酸、安息香酸、2-プロモ酢酸エチルまたはヨード酢酸を用いてエストラジオールを誘導体化し、以下に示すエストラジオールの誘導体を形成することができる。この誘導体は、QまたはLに結合可能である。

20



30

## 【0168】

同様に、上述したNHRリガンドはいずれも、当分野で知られた方法によって誘導体化可能なものである。また、誘導体化されたリガンドには市販されているものもあり、Sigma-Aldrichなどの化学企業から購入可能である。

40

グルカゴンスーパーファミリーのペプチド(Q)

## 【0169】

本明細書に記載のQ-L-Y結合体では、Qは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチドである。グルカゴンスーパーファミリーのペプチドとは、N末端領域および/またはC末端領域の構造が関連したペプチドの群を示す(たとえば、Sherwood et al., Endocrine Reviews 21: 619-670 (2000)を参照のこと)。C末端は通常、受容体の結合において機能し、N末端は通常、受容体のシグナル伝達において機能すると考えられている。N末端領域およびC末端領域における数個のアミノ酸は、グルカゴンスーパーファミリーのメンバー間で高度に保存されている。これらの保存されたアミノ酸のうちのいくつかには、

50

1 番目のヒスチジン、4 番目のグリシン、6 番目のフェニルアラニン、22 番目のフェニルアラニン、23 番目のバリン、25 番目のスレオニン、26 番目のロイシンがあり、これらの位置のアミノ酸が、そのアミノ酸側鎖の構造で同一性、保存的な置換または類似性を示している。

【0170】

グルカゴンスーパーファミリーのペプチドは、グルカゴン関連ペプチド、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH、配列番号1619）、血管作用性小腸ペプチド（VIP、配列番号1620）、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド27（PACAP-27、配列番号1621）、ペプチドヒスチジンイソロイシン（PHI；配列番号1542）、ペプチドヒスチジンメチオニン（PHM、配列番号1622）、セクレチン（配列番号1623）および/またはこれらの類縁体、誘導体または結合体を含む。いくつかの実施形態では、Qは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のアミノ酸修飾を有する、天然のグルカゴン、天然のエキセンディン-4、天然のGLP-1（7-37）、天然のGLP-2、天然のGHRH、天然のVIP、天然のPACAP-27、天然のPHM、天然のオキシントモジュリン、天然のセクレチンまたは天然のGIPのアミノ酸配列を有する。

10

【0171】

本発明のいくつかの態様では、Qは、たとえば、グルカゴン（配列番号1601）、オキシントモジュリン（配列番号1606）、エキセンディン-4（配列番号1618）、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）（配列番号1603として提供される7番目から36番目のアミノ酸；7番目から37番目のアミノ酸は、配列番号1604として提供される）、グルカゴン様ペプチド-2（GLP-2、配列番号1608）、胃抑制ペプチド（GIP、配列番号1607）またはこれらの類縁体、誘導体および結合体などのグルカゴン関連ペプチドである。グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体、GLP-1受容体、GLP-2受容体、GIP受容体のうちの1個または2個以上に対して（アゴニストまたはアンタゴニストとしての）生物学的活性を有し、天然のグルカゴン、天然のオキシントモジュリン、天然のエキセンディン-4、天然のGLP-1（7-37）、天然のGLP-2または天然のGIPのうちの少なくとも1つとのアミノ酸配列の配列同一性が、ペプチドの長さ全体にわたって（あるいはグルカゴンに対応する位置全体にわたって、たとえば図1を参照のこと）、少なくとも20%（25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%など）である。

20

30

【0172】

グルカゴン受容体またはGLP-1受容体またはGIP受容体のうちの1個または2個以上に対する生物学的活性（アゴニストまたはアンタゴニストとしての）を有するペプチドなど、グルカゴン関連ペプチドの活性で分類された可能性のあるすべてのサブセットならびに、天然のGLP-1の長さ全体で天然のGLP-1との配列同一性が少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%であるアミノ酸配列を含むものなど、表記の天然ペプチドそれぞれに対する配列同一性で分類された可能性のあるサブセットが考えられていることを、理解されたい。本発明のいくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体アゴニスト活性、GLP-1受容体アゴニスト活性、GIP受容体アゴニスト活性、グルカゴン受容体/GLP-1受容体コアゴニスト活性、グルカゴン受容体/GIP受容体コアゴニスト活性、GLP-1受容体/GIP受容体コアゴニスト活性、グルカゴン受容体/GLP-1受容体/GIP受容体トリアゴニスト活性、グルカゴン受容体アンタゴニスト活性またはグルカゴン受容体アンタゴニスト/GLP-1受容体アゴニスト活性を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、ペプチドは、分子のC末端側の半分における $\alpha$ 螺旋構造を保持している。いくつかの実施形態では、ペプチドは、グルカゴンの3番目の位置あるいは、GLP-1（7-37）の7番目、10番目、12番目、13番目、15番目または17番目の位置など、受容体との相互作用

40

50



用またはシグナル伝達に関与する位置を保持している。したがって、グルカゴン関連ペプチドは、クラス1、クラス2、クラス3、クラス4および/またはクラス5のペプチドであってもよく、その各々について本明細書でさらに説明する。

【0173】

また、Qは、当分野で知られたグルカゴンスーパーファミリーのペプチドであってもよく、このうちいくつかを、非限定的な例によって本明細書に開示する。多岐にわたるGLP-1類縁体が当分野で知られており、本発明によるグルカゴン関連ペプチドである。たとえば、国際特許出願公開第WO2008023050号、同第WO2007030519号、同第WO2005058954号、同第WO2003011892号、同第WO2007046834号、同第WO2006134340号、同第WO2006124529号、同第WO2004022004号、同第WO2003018516号、同第WO2007124461号を参照のこと（GLP-1類縁体または誘導体の配列または式が開示されている文献についてはいずれも、その全体を本明細書に援用する）。いずれの実施形態でも、Qは、国際特許出願公開第WO2007/056362号、同第WO2008/086086号、同第WO2009/155527号、同第WO2008/101017号、同第WO2009/155258号、同第WO2009/058662号、同第WO2009/058734号、同第WO2009/099763号、同第WO2010/011439号、国際特許出願第US09/68745号、米国特許出願第61/187,578号（それぞれ全体を本明細書に援用する）に開示されたグルカゴン関連ペプチドであってもよい。特定の実施形態では、Qは、本明細書で詳細に説明するような、クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドである。本明細書に記載のいずれの実施形態においても、Qは、配列番号1~760、801~919、1001~1275、1301~1371、1401~1518、1601~1650のいずれかである。いくつかの実施形態では、Qは、配列番号1647~1650のいずれかである。

10

20

グルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）の活性

グルカゴン受容体に対する活性

【0174】

いくつかの実施形態では、Qは、グルカゴン受容体の活性化での $EC_{50}$ （またはグルカゴン受容体の拮抗作用での $IC_{50}$ ）が、約10mMまたはそれ未満あるいは、約1mM（1000 $\mu$ M）またはそれ未満（約750 $\mu$ Mまたはそれ未満、約500 $\mu$ Mまたはそれ未満、約250 $\mu$ Mまたはそれ未満、約100 $\mu$ Mまたはそれ未満、約75 $\mu$ Mまたはそれ未満、約50 $\mu$ Mまたはそれ未満、約25 $\mu$ Mまたはそれ未満、約10 $\mu$ Mまたはそれ未満、約7.5 $\mu$ Mまたはそれ未満、約6 $\mu$ Mまたはそれ未満、約5 $\mu$ Mまたはそれ未満、約4 $\mu$ Mまたはそれ未満、約3 $\mu$ Mまたはそれ未満、約2 $\mu$ Mまたはそれ未満または約1 $\mu$ Mまたはそれ未満など）である。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQの $EC_{50}$ または $IC_{50}$ は、約1000nMまたはそれ未満（約750nMまたはそれ未満、約500nMまたはそれ未満、約250nMまたはそれ未満、約100nMまたはそれ未満、約75nMまたはそれ未満、約50nMまたはそれ未満、約25nMまたはそれ未満、約10nMまたはそれ未満、約7.5nMまたはそれ未満、約6nMまたはそれ未満、約5nMまたはそれ未満、約4nMまたはそれ未満、約3nMまたはそれ未満、約2nMまたはそれ未満または約1nMまたはそれ未満など）である。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQの $EC_{50}$ または $IC_{50}$ は、ピコモルの範囲である。したがって、いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQの $EC_{50}$ または $IC_{50}$ は、約1000pMまたはそれ未満（約750pMまたはそれ未満、約500pMまたはそれ未満、約250pMまたはそれ未満、約100pMまたはそれ未満、約75pMまたはそれ未満、約50pMまたはそれ未満、約25pMまたはそれ未満、約10pMまたはそれ未満、約7.5pMまたはそれ未満、約6pMまたはそれ未満、約5pMまたはそれ未満、約4pMまたはそれ未満、約3pMまたはそれ未満、約2pMまたはそれ未満または約1pMまたはそれ未満など）である。

30

40

50

## 【0175】

いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQの $EC_{50}$ または $IC_{50}$ は、約0.001 pMまたはそれより大きい、約0.01 pMまたはそれより大きいあるいは、約0.1 pMまたはそれより大きい。グルカゴン受容体の活性化（グルカゴン受容体の活性）は、グルカゴン受容体を過剰発現するHEK293細胞において、cAMP誘導を測定するin vitroのアッセイによって測定することができる。たとえば、実施例2で記載したように、グルカゴン受容体をコードするDNAと、cAMP応答配列に結合させたルシフェラーゼ遺伝子とをコトランスフェクトしたHEK293細胞をアッセイすればよい。

## 【0176】

いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQの活性は、天然のグルカゴン（グルカゴン活性）の場合と比較して、約0.001%またはそれよりも高い、約0.01%またはそれよりも高い、約0.1%またはそれよりも高い、約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高い、約20%またはそれよりも高い、約30%またはそれよりも高い、約40%またはそれよりも高い、約50%またはそれよりも高い、約60%またはそれよりも高い、約75%またはそれよりも高い、約100%またはそれよりも高い、約125%またはそれよりも高い、約150%またはそれよりも高い、約175%またはそれよりも高い、約200%またはそれよりも高い、約250%またはそれよりも高い、約300%またはそれよりも高い、約350%またはそれよりも高い、約400%またはそれよりも高い、約450%またはそれよりも高いあるいは、約500%またはそれよりも高い。いくつかの実施形態では、Qは、天然のグルカゴンの場合と比較して、グルカゴン受容体に対する活性は、約5000%またはそれ未満あるいは、約10,000%またはそれ未満である。受容体の天然のリガンドと比較した場合の受容体に対するQの活性については、天然のリガンドに対するQの $EC_{50}$ の反比として計算する。

## 【0177】

いくつかの実施形態では、Qは、グルカゴン受容体に対してのみ十分な活性を示し、GLP-1受容体またはGIP受容体に対しては、ほとんど活性を示さないか、まったく活性を示さない。いくつかの実施形態では、Qは、「純粋なグルカゴン受容体アゴニスト」であるとみなされるか、「グルカゴン/GLP-1受容体コアゴニスト」または「グルカゴン/GIP受容体コアゴニスト」であるとみなされない。いくつかの実施形態では、Qは、本明細書に記載のグルカゴン受容体に対して任意のレベルの活性を示すが、GLP-1受容体またはGIP受容体に対する活性のほうが実質的に低い。いくつかの実施形態では、Qは、GLP-1受容体に対する $EC_{50}$ が、グルカゴン受容体に対する $EC_{50}$ と比較して、100倍またはそれより大きい。いくつかの実施形態では、Qは、GIP受容体に対する $EC_{50}$ が、グルカゴン受容体に対する $EC_{50}$ と比較して、100倍またはそれより大きい。

GLP-1受容体に対する活性

## 【0178】

いくつかの実施形態では、Qは、GLP-1受容体の活性化での $EC_{50}$ （またはGLP-1受容体の拮抗作用での $IC_{GLP-1}$ ）が、約10 mMまたはそれ未満あるいは、約1 mM（1000  $\mu$ M）またはそれ未満（約750  $\mu$ Mまたはそれ未満、約500  $\mu$ Mまたはそれ未満、約250  $\mu$ Mまたはそれ未満、約100  $\mu$ Mまたはそれ未満、約75  $\mu$ Mまたはそれ未満、約50  $\mu$ Mまたはそれ未満、約25  $\mu$ Mまたはそれ未満、約10  $\mu$ Mまたはそれ未満、約7.5  $\mu$ Mまたはそれ未満、約6  $\mu$ Mまたはそれ未満、約5  $\mu$ Mまたはそれ未満、約4  $\mu$ Mまたはそれ未満、約3  $\mu$ Mまたはそれ未満、約2  $\mu$ Mまたはそれ未満または約1  $\mu$ Mまたはそれ未満など）である。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体の活性化に対するQの $EC_{50}$ または $IC_{50}$ は、約1000 nMまたはそれ未満（約750 nMまたはそれ未満、約500 nMまたはそれ未満、約250 nMまたはそれ未満、約100 nMまたはそれ未満、約75 nMまたはそれ未満、約50 nMまたはそれ未

10

20

30

40

50

満、約 25 nM またはそれ未満、約 10 nM またはそれ未満、約 7.5 nM またはそれ未満、約 6 nM またはそれ未満、約 5 nM またはそれ未満、約 4 nM またはそれ未満、約 3 nM またはそれ未満、約 2 nM またはそれ未満または約 1 nM またはそれ未満など）である。いくつかの実施形態では、GLP-1 受容体に対する Q の  $EC_{50}$  または  $IC_{50}$  は、ピコモルの範囲である。したがって、いくつかの実施形態では、GLP-1 受容体の活性化に対する Q の  $EC_{50}$  または  $IC_{50}$  は、約 1000 pM またはそれ未満（約 750 pM またはそれ未満、約 500 pM またはそれ未満、約 250 pM またはそれ未満、約 100 pM またはそれ未満、約 75 pM またはそれ未満、約 50 pM またはそれ未満、約 25 pM またはそれ未満、約 10 pM またはそれ未満、約 7.5 pM またはそれ未満、約 6 pM またはそれ未満、約 5 pM またはそれ未満、約 4 pM またはそれ未満、約 3 pM またはそれ未満、約 2 pM またはそれ未満または約 1 pM またはそれ未満など）である。

10

【0179】

いくつかの実施形態では、GLP-1 受容体に対する Q の  $EC_{50}$  または  $IC_{50}$  は、約 0.001 pM またはそれより大きい、約 0.01 pM またはそれより大きいあるいは、約 0.1 pM またはそれより大きい。GLP-1 受容体の活性化（GLP-1 受容体の活性）は、GLP-1 受容体を過剰発現する HEK293 細胞において、cAMP 誘導を測定する *in vitro* のアッセイによって測定することができる。たとえば、実施例 2 で記載したように、GLP-1 受容体をコードする DNA と、cAMP 応答配列に結合させたルシフェラーゼ遺伝子とをコトランスフェクトした HEK293 細胞をアッセイすればよい。

20

【0180】

いくつかの実施形態では、GLP-1 受容体に対する Q の活性は、天然の GLP-1（GLP-1 活性）の場合と比較して、約 0.001 % またはそれよりも高い、約 0.01 % またはそれよりも高い、約 0.1 % またはそれよりも高い、約 0.5 % またはそれよりも高い、約 1 % またはそれよりも高い、約 5 % またはそれよりも高い、約 10 % またはそれよりも高い、約 20 % またはそれよりも高い、約 30 % またはそれよりも高い、約 40 % またはそれよりも高い、約 50 % またはそれよりも高い、約 60 % またはそれよりも高い、約 75 % またはそれよりも高い、約 100 % またはそれよりも高い、約 125 % またはそれよりも高い、約 150 % またはそれよりも高い、約 175 % またはそれよりも高い、約 200 % またはそれよりも高い、約 250 % またはそれよりも高い、約 300 % またはそれよりも高い、約 350 % またはそれよりも高い、約 400 % またはそれよりも高い、約 450 % またはそれよりも高いあるいは、約 500 % またはそれよりも高い。いくつかの実施形態では、GLP-1 受容体に Q の対する活性は、天然の GLP-1（GLP-1 活性）の場合と比較して、約 5000 % またはそれ未満あるいは、約 10,000 % またはそれ未満である。

30

【0181】

いくつかの実施形態では、Q は、GLP-1 受容体に対してのみ十分な活性を示し、グルカゴン受容体または GIP 受容体に対しては、ほとんど活性を示さないか、まったく活性を示さない。いくつかの実施形態では、Q は、「純粋な GLP-1 受容体アゴニスト」であるとみなされるか、「グルカゴン / GLP-1 受容体コアゴニスト」または「GLP-1 / GIP コアゴニスト」であるとはみなされない。いくつかの実施形態では、Q は、本明細書に記載の GLP-1 受容体に対して任意のレベルの活性を示すが、グルカゴン受容体または GIP 受容体に対する活性のほうが実質的に低い。いくつかの実施形態では、Q は、グルカゴン受容体に対する  $EC_{50}$  が、GLP-1 受容体に対する  $EC_{50}$  と比較して、100 倍またはそれより大きい。いくつかの実施形態では、Q は、GIP 受容体に対する  $EC_{50}$  が、GLP-1 受容体に対する  $EC_{50}$  と比較して、100 倍またはそれより大きい。

40

GIP 受容体に対する活性

【0182】

いくつかの実施形態では、Q は、GIP 受容体の活性化での  $EC_{50}$ （または GIP 受

50

容体の拮抗作用での I C G I P ) が、約 1 0 m M またはそれ未満あるいは、約 1 m M ( 1 0 0 0  $\mu$  M ) またはそれ未満 ( 約 7 5 0  $\mu$  M またはそれ未満、約 5 0 0  $\mu$  M またはそれ未満、約 2 5 0  $\mu$  M またはそれ未満、約 1 0 0  $\mu$  M またはそれ未満、約 7 5  $\mu$  M またはそれ未満、約 5 0  $\mu$  M またはそれ未満、約 2 5  $\mu$  M またはそれ未満、約 1 0  $\mu$  M またはそれ未満、約 7 . 5  $\mu$  M またはそれ未満、約 6  $\mu$  M またはそれ未満、約 5  $\mu$  M またはそれ未満、約 4  $\mu$  M またはそれ未満、約 3  $\mu$  M またはそれ未満、約 2  $\mu$  M またはそれ未満または約 1  $\mu$  M またはそれ未満など ) である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対する Q の E C <sub>50</sub> または I C <sub>50</sub> は、1 0 0 0 n M 未満、9 0 0 n M 未満、8 0 0 n M 未満、7 0 0 n M 未満、6 0 0 n M 未満、5 0 0 n M 未満、4 0 0 n M 未満、3 0 0 n M 未満または 2 0 0 n M 未満である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対する Q の E C <sub>50</sub> または I C <sub>50</sub> は、約 1 0 0 n M またはそれ未満、たとえば、約 7 5 n M またはそれ未満、約 5 0 n M またはそれ未満、約 2 5 n M またはそれ未満、約 1 0 n M またはそれ未満、約 8 n M またはそれ未満、約 6 n M またはそれ未満、約 5 n M またはそれ未満、約 4 n M またはそれ未満、約 3 n M またはそれ未満、約 2 n M またはそれ未満あるいは、約 1 n M またはそれ未満である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体の活性化での Q の E C <sub>50</sub> または I C <sub>50</sub> は、ピコモルの範囲である。例示としての実施形態では、G I P 受容体に対する Q の E C <sub>50</sub> または I C <sub>50</sub> は、1 0 0 0 p M 未満、9 0 0 p M 未満、8 0 0 p M 未満、7 0 0 p M 未満、6 0 0 p M 未満、5 0 0 p M 未満、4 0 0 p M 未満、3 0 0 p M 未満、2 0 0 p M 未満である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対する Q の E C <sub>50</sub> または I C <sub>50</sub> は、約 1 0 0 p M またはそれ未満、たとえば、約 7 5 p M またはそれ未満、約 5 0 p M またはそれ未満、約 2 5 p M またはそれ未満、約 1 0 p M またはそれ未満、約 8 p M またはそれ未満、約 6 p M またはそれ未満、約 5 p M またはそれ未満、約 4 p M またはそれ未満、約 3 p M またはそれ未満、約 2 p M またはそれ未満あるいは、約 1 p M またはそれ未満である。受容体の活性化は、G I P 受容体を過剰発現する H E K 2 9 3 細胞において、c A M P 誘導を測定する *in vitro* のアッセイによって測定することができる。たとえば、実施例 2 で記載したように、受容体をコードする D N A と、c A M P 応答配列に結合させたルシフェラーゼ遺伝子とをコトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞をアッセイすればよい。

10

20

30

40

50

**【0183】**

本開示のいくつかの実施形態では、Q は、G I P 受容体に対する活性が、天然の G I P の場合と比較して、少なくともまたは約 0 . 1 % である。例示としての実施形態では、Q は、G I P 受容体に対する活性が、天然の G I P の場合と比較して、少なくともまたは約 0 . 2 %、少なくともまたは約 0 . 3 %、少なくともまたは約 0 . 4 %、少なくともまたは約 0 . 5 %、少なくともまたは約 0 . 6 %、少なくともまたは約 0 . 7 %、少なくともまたは約 0 . 8 %、少なくともまたは約 0 . 9 %、少なくともまたは約 1 %、少なくともまたは約 5 %、少なくともまたは約 1 0 %、少なくともまたは約 2 0 %、少なくともまたは約 3 0 %、少なくともまたは約 4 0 %、少なくともまたは約 5 0 %、少なくともまたは約 6 0 %、少なくともまたは約 7 0 %、少なくともまたは約 7 5 %、少なくともまたは約 8 0 %、少なくともまたは約 9 0 %、少なくともまたは約 9 5 % または少なくともまたは約 1 0 0 % である。

**【0184】**

本開示のいくつかの実施形態では、Q は、G I P 受容体に対する活性が、天然の G I P の場合よりも大きい。例示としての実施形態では、Q は、G I P 受容体に対する活性が、天然の G I P の場合と比較して、少なくともまたは約 1 0 1 %、少なくともまたは約 1 0 5 %、少なくともまたは約 1 1 0 %、少なくともまたは約 1 2 5 %、少なくともまたは約 1 5 0 %、少なくともまたは約 1 7 5 %、少なくともまたは約 2 0 0 %、少なくともまたは約 3 0 0 %、少なくともまたは約 4 0 0 %、少なくともまたは約 5 0 0 % あるいはこれよりさらに高い % である。いくつかの実施形態では、Q は、G I P 受容体に対する活性が、天然の G I P の場合と比較して、最大で 1 0 0 0 %、1 0 , 0 0 0 %、1 0 0 , 0 0 0 % または 1 , 0 0 0 , 0 0 0 % である。天然の G I P と比較した場合の G I P 受容体に対

するペプチドの活性については、G I P アゴニストのペプチド対天然の G I P の E C 5 0 の反比として計算する。

【 0 1 8 5 】

いくつかの実施形態では、Q は、G I P 受容体に対してのみ十分な活性を示し、グルカゴン受容体または G L P - 1 受容体に対しては、ほとんど活性を示さないか、まったく活性を示さない。いくつかの実施形態では、Q は、「純粋な G I P 受容体アゴニスト」であるとみなされるか、「グルカゴン / G I P 受容体コアゴニスト」または「G L P - 1 / G I P コアゴニスト」であるとはみなされない。いくつかの実施形態では、Q は、本明細書に記載の G I P 受容体に対して任意のレベルの活性を示すが、グルカゴン受容体または G L P - 1 受容体に対する活性のほうが実質的に低い。いくつかの実施形態では、Q は、グルカゴン受容体に対する E C 5 0 が、G I P 受容体に対する E C 5 0 よりも 1 0 0 倍またはそれより大きく、G L P - 1 受容体に対する E C 5 0 が、G I P 受容体に対する E C 5 0 よりも 1 0 0 倍またはそれより大きい。

10

G L P - 1 受容体およびグルカゴン受容体に対する活性

【 0 1 8 6 】

いくつかの実施形態では、Q は、G L P - 1 受容体およびグルカゴン受容体の両方に対して活性を示す（「グルカゴン / G L P - 1 受容体コアゴニスト」）。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対する Q の活性（E C 5 0 または相対活性など）は、G L P - 1 受容体に対する活性（E C 5 0 または相対活性など）と比較して、約 5 0 倍以内、約 4 0 倍以内、約 3 0 倍以内、約 2 0 倍以内、約 1 0 倍以内または約 5 倍以内で異なる（高いまたは低い）。いくつかの実施形態では、Q のグルカゴン活性は、その G L P - 1 活性と比較して、約 2 5 倍以内、約 2 0 倍以内、約 1 5 倍以内、約 1 0 倍以内または約 5 倍以内で異なる（高いまたは低い）。

20

【 0 1 8 7 】

いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対する Q の相対活性または E C 5 0 または活性を G L P - 1 受容体に対する Q の相対活性または E C 5 0 または活性で割った比は、X 未満であるか約 X であり、ここで、X は、1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 から選択される。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対する Q の E C 5 0 または活性または相対活性を G L P - 1 受容体に対する Q の E C 5 0 または活性または相対活性で割った比は、約 1 から 5 未満（約 4、約 3、約 2、約 1 など）である。いくつかの実施形態では、Q の G L P - 1 活性に対する Q のグルカゴン活性の比が、Z 未満であるか約 Z であり、ここで、Z は、1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0、5 から選択される。いくつかの実施形態では、Q の G L P - 1 活性に対する Q のグルカゴン活性の比は、5 未満（約 4、約 3、約 2、約 1 など）である。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対する Q の E C 5 0 は、G L P - 1 受容体に対する E C 5 0 よりも 2 倍 ~ 1 0 倍（2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍など）大きい。

30

【 0 1 8 8 】

いくつかの実施形態では、G L P - 1 受容体に対する Q の相対活性または活性または E C 5 0 をグルカゴン受容体に対するグルカゴン類縁体の相対活性または活性または E C 5 0 で割った比は、V 未満であるか約 V であり、ここで、V は、1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 から選択される。いくつかの実施形態では、G L P - 1 受容体に対する Q の E C 5 0 または活性または相対活性をグルカゴン受容体に対する Q の E C 5 0 または活性または相対活性で割った比は、5 未満（約 4、約 3、約 2、約 1 など）である。いくつかの実施形態では、Q のグルカゴン活性に対する Q の G L P - 1 活性の比は、W 未満であるか約 W であり、ここで、W は、1 0 0、7 5、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0、1 5、1 0、5 から選択される。いくつかの実施形態では、Q のグルカゴン活性に対する Q の G L P - 1 活性の比は、5 未満（約 4、約 3、約 2、約 1 など）である。いくつかの実施形態では、Q の G L P - 1 受容体に対する E C 5 0 は、グルカゴン受容体に対する E C 5 0 よりも約 2 ~ 約 1 0 倍（2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍

40

50

、8倍、9倍、10倍など)大きい。

【0189】

いくつかの実施形態では、Qは、GLP-1受容体に対する活性(GLP-1活性)が、天然のGLP-1の少なくとも0.1%(約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいはさらに高いなど)であり、グルカゴン受容体に対する活性(グルカゴン活性)が、天然のグルカゴンの少なくとも0.1%(約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいはさらに高いなど)である。

【0190】

Qの、GLP-1受容体に対するグルカゴン受容体の選択性は、グルカゴン/GLP-1活性の相対比(天然のグルカゴンの場合と比較したグルカゴン受容体に対するQの活性を、天然のGLP-1の場合と比較したGLP-1受容体に対する類縁体の活性で割ったもの)で説明できる。たとえば、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの60%であり、かつ、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の60%であるQは、グルカゴン/GLP-1活性の比が1:1である。グルカゴン/GLP-1活性の比の例として、約1:1、約1.5:1、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1または約10:1あるいは、約1:10、約1:9、約1:8、約1:7、約1:6、約1:5、約1:4、約1:3、約1:2または約1:1.5があげられる。一例として、グルカゴン/GLP-1活性の比が10:1であるということは、GLP-1受容体の選択性に対してグルカゴン受容体の選択性が10倍であることを示す。同様に、GLP-1/グルカゴン活性の比が10:1であるということは、グルカゴン受容体の選択性に対してGLP-1受容体の選択性が10倍であることを示す。

【0191】

いくつかの実施形態では、Qは、グルカゴン受容体およびGLP-1受容体に対して十分な活性を示すが、GIP受容体に対しては、ほとんど活性を示さないか、まったく活性を示さない。いくつかの実施形態では、Qは、本明細書に記載のグルカゴン受容体およびGLP-1受容体に対して任意のレベルの活性を示すが、GIP受容体に対する活性のほうを実質的に低い。いくつかの実施形態では、Qは、GIP受容体に対するEC<sub>50</sub>が、グルカゴン受容体に対するEC<sub>50</sub>およびGLP-1受容体に対するEC<sub>50</sub>と比較して、100倍またはそれより大きい。

GLP-1受容体およびGIP受容体に対する活性

【0192】

いくつかの実施形態では、Qは、GLP-1受容体およびGIP受容体の両方に対して活性を示す(「GIP/GLP-1受容体コアゴニスト」)。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQの活性(EC<sub>50</sub>または相対活性など)は、GLP-1受容体に対する活性(EC<sub>50</sub>または相対活性など)と比較して、約50倍以内、約40倍以内、約30倍以内、約20倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる(高いまたは低い)。いくつかの実施形態では、QのGIP活性は、そのGLP-1活性と比較して、約25倍以内、約20倍以内、約15倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる(高いまたは低い)。

【0193】

いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQの相対活性またはEC<sub>50</sub>または活性をGLP-1受容体に対するQの相対活性またはEC<sub>50</sub>または活性で割った比は、X未満であるか約Xであり、ここで、Xは、100、75、60、50、40、30、20、15、10または5から選択される。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性をGLP-1受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性で割った比は、約1から5未満(約4、約3、約2、約1など)である。いくつかの実施形態では、QのGLP-1活性と比較した場合のQのGIP活性の比

10

20

30

40

50

は、Z未満であるか約Zであり、ここで、Zは、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5から選択される。いくつかの実施形態では、QのGLP-1活性と比較した場合のQのGIP活性の比は、5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQのEC<sub>50</sub>は、GLP-1受容体に対するEC<sub>50</sub>よりも2倍～10倍（2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍など）大きい。

#### 【0194】

いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するQの相対活性または活性またはEC<sub>50</sub>をGIP受容体に対するQの相対活性または活性またはEC<sub>50</sub>で割った比は、V未満であるか約Vであり、ここで、Vは、100、75、60、50、40、30、20、15、10または5から選択される。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性をGIP受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性で割った比は、5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、QのGIP活性と比較した場合のQのGLP-1活性の比、W未満であるか約Wであり、ここで、Wは、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5から選択される。いくつかの実施形態では、QのGIP活性と比較した場合のQのGLP-1活性の比は、5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するQのEC<sub>50</sub>は、GIP受容体に対するEC<sub>50</sub>よりも約2～約10倍（2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍など）大きい。

#### 【0195】

いくつかの実施形態では、Qは、GLP-1受容体に対する活性（GLP-1活性）が、天然のGLP-1の少なくとも0.1%（約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいはさらに高いなど）であり、GIP受容体に対する活性（GIP活性）が天然のGIPの少なくとも0.1%（約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど）である。

#### 【0196】

Qの、GLP-1受容体に対するGIP受容体の選択性は、GIP/GLP-1活性の相対比（天然のGIPの場合と比較したGIP受容体に対するQの活性を天然のGLP-1の場合と比較したGLP-1受容体に対する類縁体の活性で割ったもの）で説明できる。たとえば、GIP受容体に対する活性が天然のGIPの60%であり、かつ、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の60%であるQは、GIP/GLP-1活性の比が1:1である。GIP/GLP-1活性の比の例として、約1:1、約1.5:1、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1または約10:1あるいは、約1:10、約1:9、約1:8、約1:7、約1:6、約1:5、約1:4、約1:3、約1:2または約1:1.5があげられる。一例として、GIP/GLP-1活性の比が10:1であるということは、GLP-1受容体の選択性に対してGIP受容体の選択性が10倍であることを示す。同様に、GLP-1/GIP活性の比が10:1であるということは、GIP受容体の選択性に対してGLP-1受容体の選択性が10倍であることを示す。

グルカゴン受容体およびGIP受容体に対する活性

#### 【0197】

いくつかの実施形態では、Qは、グルカゴン受容体およびGIP受容体の両方に対して活性を示す（「GIP/グルカゴン受容体コアゴニスト」）。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQの活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）は、グルカゴン受容体に対する活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）と比較して、約50倍以内、約40倍以内、約30倍以内、約20倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる（高いまたは低い）。いくつかの実施形態では、QのGIP活性は、そのグルカゴン活性と比較して、約2

5 倍以内、約 20 倍以内、約 15 倍以内、約 10 倍以内または約 5 倍以内で異なる（高いまたは低い）。

【0198】

いくつかの実施形態では、GIP 受容体に対する Q の相対活性または  $EC_{50}$  または活性をグルカゴン受容体に対する Q の相対活性または  $EC_{50}$  または活性で割った比は、X 未満であるか約 X であり、ここで、X は、100、75、60、50、40、30、20、15、10 または 5 から選択される。いくつかの実施形態では、GIP 受容体に対する Q の  $EC_{50}$  または活性または相対活性をグルカゴン受容体に対する Q の  $EC_{50}$  または活性または相対活性で割った比は、約 1 から 5 未満（約 4、約 3、約 2、約 1 など）である。いくつかの実施形態では、Q のグルカゴン活性と比較した場合の Q の GIP 活性の比は、Z 未満であるか約 Z であり、ここで、Z は、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5 から選択される。いくつかの実施形態では、Q のグルカゴン活性と比較した場合の Q の GIP 活性の比は、5 未満（約 4、約 3、約 2、約 1 など）である。いくつかの実施形態では、GIP 受容体に対する Q の  $EC_{50}$  は、グルカゴン受容体に対する  $EC_{50}$  よりも 2 倍～10 倍（2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍など）大きい。

10

【0199】

いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対する Q の相対活性または活性または  $EC_{50}$  を GIP 受容体に対する Q の相対活性または活性または  $EC_{50}$  で割った比は、V 未満であるか約 V であり、ここで、V は、100、75、60、50、40、30、20、15、10 または 5 から選択される。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対する Q の  $EC_{50}$  または活性または相対活性を GIP 受容体に対する Q の  $EC_{50}$  または活性または相対活性で割った比は、5 未満（約 4、約 3、約 2、約 1 など）である。いくつかの実施形態では、Q のグルカゴン活性と Q の GIP 活性との比は、W 未満であるか約 W であり、ここで、W は、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5 から選択される。いくつかの実施形態では、Q のグルカゴン活性と Q の GIP 活性との比は、5 未満（約 4、約 3、約 2、約 1 など）である。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対する Q の  $EC_{50}$  は、GIP 受容体に対する  $EC_{50}$  よりも約 2～約 10 倍（2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍など）大きい。

20

【0200】

いくつかの実施形態では、Q は、グルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの活性（グルカゴン活性）の少なくとも 0.1%（約 0.5% またはそれよりも高い、約 1% またはそれよりも高い、約 5% またはそれよりも高い、約 10% またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど）を示し、GIP 受容体に対する天然の GIP の活性（GIP 活性）の少なくとも 0.1%（約 0.5% またはそれよりも高い、約 1% またはそれよりも高い、約 5% またはそれよりも高い、約 10% またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど）を示す。

30

【0201】

Q の、グルカゴン受容体に対する GIP 受容体の選択性は、GIP / グルカゴン活性の相対比（天然の GIP の場合と比較した GIP 受容体に対する Q の活性を、天然のグルカゴンの場合と比較したグルカゴン受容体に対する類縁体の活性で割ったもの）で説明できる。たとえば、GIP 受容体に対する活性が天然の GIP の 60% であり、かつ、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの 60% である Q は、GIP / グルカゴン活性の比が 1 : 1 である。GIP / グルカゴン活性の比の例として、約 1 : 1、約 1.5 : 1、約 2 : 1、約 3 : 1、約 4 : 1、約 5 : 1、約 6 : 1、約 7 : 1、約 8 : 1、約 9 : 1 または約 10 : 1 あるいは、約 1 : 10、約 1 : 9、約 1 : 8、約 1 : 7、約 1 : 6、約 1 : 5、約 1 : 4、約 1 : 3、約 1 : 2 または約 1 : 1.5 があげられる。一例として、GIP / グルカゴン活性の比が 10 : 1 であるということは、グルカゴン受容体の選択性に対して GIP 受容体の選択性が 10 倍であることを示す。同様に、グルカゴン / GIP 活性の比が 10 : 1 であるということは、GIP 受容体の選択性に対してグルカゴン受

40

50



容体の選択性が10倍であることを示す。

グルカゴン受容体、GLP-1受容体およびGIP受容体に対する活性

【0202】

いくつかの実施形態では、Qは、グルカゴン受容体、GLP-1受容体、GIP受容体の3つすべてに対して活性を示す（「グルカゴン/GLP-1/GIP受容体トリアゴニスト」）。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQの活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）は、GLP-1受容体およびGIP受容体の両方に対する活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）と比較して、約100倍以内、約75倍以内、約60倍以内、50倍以内、約40倍以内、約30倍以内、約20倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる（高いまたは低い）。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するQの活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）は、グルカゴン受容体およびGIP受容体の両方に対する活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）と比較して、約100倍以内、約75倍以内、約60倍以内、50倍以内、約40倍以内、約30倍以内、約20倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる（高いまたは低い）。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQの活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）は、グルカゴン受容体およびGLP-1受容体の両方に対する活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）と比較して、約100倍以内、約75倍以内、約60倍以内、50倍以内、約40倍以内、約30倍以内、約20倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる（高いまたは低い）。この何倍異なるかという差を、上述のように、グルカゴン/GLP-1またはGLP-1/GIPまたはグルカゴン/GLP-1の比として表現することも可能である。

10

20

グルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）の構造

【0203】

本明細書に記載のグルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）は、天然のヒトグルカゴンのアミノ酸配列（配列番号1601）、天然のヒトGLP-1のアミノ酸配列（配列番号1603または1604）または天然のヒトGIPのアミノ酸配列（配列番号1607）に基づくアミノ酸配列を有するものであってもよい。

天然のヒトグルカゴンに基づいて

【0204】

本発明のいくつかの態様では、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）は、天然のヒトグルカゴン（配列番号1601）のアミノ酸配列に基づくアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、Qは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、場合によっては16個または17個以上（17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個など）のアミノ酸修飾を有する、配列番号1601の修飾されたアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、Qは、天然のヒトグルカゴン配列（配列番号1601）と比較して、合計で1個、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大8個、最大9個または最大10個のアミノ酸修飾を有する。いくつかの実施形態では、修飾は、本明細書に記載の任意のものであり、たとえば、1番目、2番目、3番目、7番目、10番目、12番目、15番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、23番目、24番目、27番目、28番目、29番目のうちの1箇所または2箇所以上でのアミノ酸のアシル化、アルキル化、PEG化、C末端での短縮、置換などである。

30

40

【0205】

いくつかの実施形態では、Qは、天然のヒトグルカゴンのアミノ酸配列（配列番号1601）との配列同一性が少なくとも25%であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、Qは、配列番号1601との配列同一性が少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%であるか、90%を上回るアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、上述した配列同一性（%）を有するQのアミノ酸配列は、Qの全長アミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、上述した配列同一性（%）を有するQの

50

アミノ酸配列は、Qのアミノ酸配列の一部のみである。いくつかの実施形態では、Qは、配列番号1601の少なくとも5個の連続したアミノ酸（少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個のアミノ酸など）からなる基準アミノ酸配列との配列同一性が約A%またはそれよりも高いアミノ酸配列を有し、ここで、基準アミノ酸配列は、配列番号1601のC番目のアミノ酸から始まって配列番号1601のD番目のアミノ酸で終わり、この場合のAは、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99であり、Cは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27または28であり、Dは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29である。Aが90%であり、CとDが1と27または6と27または8と27または10と27または12と27または16と27であるものを含むがこれらに限定されるものではない、上述のパラメーターの考えられるあらゆる組み合わせが想定される。

10

天然のヒトGLP-1に基づいて

【0206】

本発明のいくつかの態様では、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）は、天然のヒトGLP-1（配列番号1603）のアミノ酸配列に基づくアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、Qは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、場合によっては16個または17個以上（17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個など）のアミノ酸修飾を有する、配列番号1603の修飾されたアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、Qは、天然のヒトGLP-1配列（配列番号1603）と比較して、合計で1個、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大8個、最大9個または最大10個のアミノ酸修飾を有する。いくつかの実施形態では、修飾は、本明細書に記載の任意のものであり、たとえば、1番目、2番目、3番目、7番目、10番目、12番目、15番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、23番目、24番目、27番目、28番目、29番目のうちの1箇所または2箇所以上でのアミノ酸のアシル化、アルキル化、PEG化、C末端での短縮、置換などである。

20

30

【0207】

いくつかの実施形態では、Qは、天然のヒトGLP-1のアミノ酸配列（配列番号1603）との配列同一性が少なくとも25%であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、Qは、配列番号1603との配列同一性が少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%であるか、90%を上回るアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、上述した配列同一性（%）を有するQのアミノ酸配列は、Qの全長アミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、上述した配列同一性（%）を有するQのアミノ酸配列は、Qのアミノ酸配列の一部のみである。いくつかの実施形態では、Qは、配列番号1603の少なくとも5個の連続したアミノ酸（少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個のアミノ酸など）からなる基準アミノ酸配列との配列同一性が約A%またはそれよりも高いアミノ酸配列を有し、ここで、基準アミノ酸配列は、配列番号1603のC番目のアミノ酸から始まって配列番号1603のD番目のアミノ酸で終わり、この場合のAは、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99であり、Cは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27または28であり、Dは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、

40

50

26、27、28または29である。Aが90%であり、CとDが1と27または6と27または8と27または10と27または12と27または16と27であるものを含むがこれらに限定されるものではない、上述のパラメーターの考えられるあらゆる組み合わせが想定される。

天然のヒトGIPに基づいて

【0208】

本開示のいくつかの実施形態では、Qは、天然のヒトGIPの類縁体であり、そのアミノ酸配列を本明細書では配列番号1607として提供する。したがって、いくつかの実施形態では、Qは、配列番号1607のアミノ酸配列に基づくアミノ酸配列を有するが、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、場合によっては16個または17個以上（17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個など）のアミノ酸修飾で修飾されている。いくつかの実施形態では、Qは、天然のヒトGIP配列（配列番号1607）と比較して、合計で1個、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大8個、最大9個または最大10個のアミノ酸修飾を有する。いくつかの実施形態では、修飾は、本明細書に記載の任意のものであり、たとえば、1番目、2番目、3番目、7番目、10番目、12番目、15番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、23番目、24番目、27番目、28番目、29番目のうちの1箇所または2箇所以上でのアミノ酸のアシル化、アルキル化、PEG化、C末端での短縮、置換などである。GIP受容体アゴニストの例は、当分野で知られている。たとえば、Irwin et al., J Pharm and Expt Ther 314(3): 1187-1194 (2005); Salhanick et al., Bioorg Med Chem Lett 15(18): 4114-4117 (2005); Green et al., Diabetes 7(5): 595-604 (2005); O'Harte et al., J Endocrinol 165(3): 639-648 (2000); O'Harte et al., Diabetologia 45(9): 1281-1291 (2002); Gault et al., Biochem J 367 (Pt 3): 913-920 (2002); Gault et al., J Endocrinol 176: 133-141 (2003); Irwin et al., Diabetes Obes Metab. 11(6): 603-610 (epub 2009)を参照のこと。

【0209】

いくつかの実施形態では、Qは、天然のヒトGIPのアミノ酸配列（配列番号1607）との配列同一性が少なくとも25%であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、Qは、配列番号1607との配列同一性が少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%であるか、90%を上回るアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、上述した配列同一性（%）を有するQのアミノ酸配列は、Qの全長アミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、上述した配列同一性（%）を有するQのアミノ酸配列は、Qのアミノ酸配列の一部のみである。いくつかの実施形態では、Qは、配列番号1607の少なくとも5個の連続したアミノ酸（少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個のアミノ酸など）からなる基準アミノ酸配列との配列同一性が約A%またはそれよりも高いアミノ酸配列を有し、ここで、基準アミノ酸配列は、配列番号1607のC番目のアミノ酸から始まって配列番号1607のD番目のアミノ酸で終わり、この場合のAは、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99であり、Cは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27または28であり、Dは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29である。Aが90%であり、CとDが1と27または6と27または8と27または10と27または12と27または16と27であるものを含むがこれらに限定されるものではない、上述のパラメーターの考えられるあらゆる組み合わせが想定される。

修飾

10

20

30

40

50

## 【0210】

Qがグルカゴン関連ペプチドである場合、Qは、修飾がなされた天然のグルカゴンのアミノ酸配列（配列番号1601）を含むものであってもよい。例示としての実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴン配列と比較して、保存的な置換または非保存的な置換などの合計で1個、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大8個、最大9個または最大10個のアミノ酸修飾を有するものであってもよい。本明細書に記載の修飾および置換は、特定の態様において、Qの特定の位置でなされるものであり、ここで、位置の番号はグルカゴン（配列番号1601）の番号に対応する。いくつかの実施形態では、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目の任意の位置で、1個、2個、3個、4個または5個の非保存的な置換がなされ、これらの位置のいずれかで、さらに最大5個の保存的な置換がなされる。いくつかの実施形態では、1番目から16番目のアミノ酸の範囲内で、1個、2個または3個のアミノ酸修飾がなされ、17番目から26番目のアミノ酸の範囲内で、1個、2個または3個のアミノ酸修飾がなされる。いくつかの実施形態では、Qは、天然のグルカゴンの対応する位置に、少なくとも22個、23個、24個、25個、26個、27個または28個の天然アミノ酸を保持する（天然のグルカゴンと比較して、1～7個、1～5個または1～3個の修飾を有するなど）。

10

DPP-IV耐性

## 【0211】

いくつかの実施形態では、Qがグルカゴンスーパーファミリーペプチドである場合、Qは、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）による切断に対する感受性を低減するための修飾を、1番目または2番目に有する。特に、いくつかの実施形態では、Qの1番目の位置（図1に示すものから選択されるなど）は、D-ヒスチジン、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -ジメチルイミダゾール酢酸（DMA）、N-メチルヒスチジン、 $\alpha$ -メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸で置換される。特に、いくつかの実施形態では、Qの2番目の位置は、D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、アミノイソ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換される。いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドの2番目の位置はD-セリンではない。

20

30

3番目でのグルカゴン修飾

## 【0212】

本明細書に記載のクラス1～クラス3のグルカゴン関連ペプチドを（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）3番目で修飾し、グルカゴン受容体に対する活性を維持または増大させてもよい。

## 【0213】

Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、3番目のGlnをグルタミン類縁体で修飾することによって、グルカゴン受容体に対する活性を維持または増強してもよい。たとえば、3番目にグルタミン類縁体を有する、クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対して、天然のグルカゴン（配列番号1601）の約5%、約10%、約20%、約50%または約85%またはそれより高い活性を示すものであってもよい。いくつかの実施形態では、3番目にグルタミン類縁体を有する、クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対して、3番目の修飾されたアミノ酸以外はグルタミン類縁体を有するペプチドと同一のアミノ酸配列を有する対応のグルカゴンペプチドの約20%、約50%、約75%、約100%、約200%または約500%またはそれより高い活性を示すものであってもよい。いくつかの実施形態では、3番目にグルタミン類縁体を有する、クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドグルカゴン受容体に対する活性が増強しているが、その活性は、天然のグルカゴンまたは3番目の修飾されたアミノ酸以外はグルタミン類縁体を有するペプチドと同一のアミノ

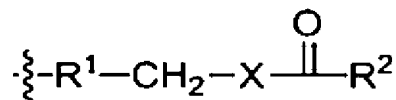
40

50

酸配列を有する対応のグルカゴン関連ペプチドの活性に対して最大で 1 0 0 0 %、1 0 , 0 0 0 %、1 0 0 , 0 0 0 % または 1 , 0 0 0 , 0 0 0 % になる。

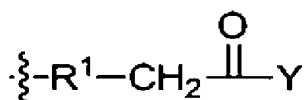
【 0 2 1 4 】

いくつかの実施形態では、グルタミン類縁体は、構造 I、I I または I I I の側鎖を有する天然または非天然のアミノ酸である。



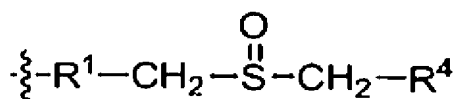
構造I

10



構造II

20



構造III

( 式中、 $R^1$  は、 $C_0 \sim 3$  アルキルまたは  $C_0 \sim 3$  ヘテロアルキルであり、 $R^2$  は、 $NH$   $R^4$  または  $C_1 \sim 3$  アルキルであり、 $R^3$  は、 $C_1 \sim 3$  アルキルであり、 $R^4$  は、 $H$  または  $C_1 \sim 3$  アルキルであり、 $X$  は、 $NH$ 、 $O$  または  $S$  であり、 $Y$  は、 $NHR^4$ 、 $SR^3$  または  $OR^3$  である。いくつかの実施形態では、 $X$  が  $NH$  であるか、あるいは、 $Y$  が  $NHR^4$  である。いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、 $C_0 \sim 2$  アルキルまたは  $C_1$  ヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^2$  は、 $NHR^4$  または  $C_1$  アルキルである。いくつかの実施形態では、 $R^4$  は、 $H$  または  $C^1$  アルキルである。 $Q$  が、クラス 1、クラス 2 またはクラス 3 のグルカゴン関連ペプチドである例示としての実施形態では、構造 I の側鎖を有するアミノ酸が提示され、式中、 $R^1$  は  $CH_2 - S$  であり、 $X$  は  $NH$  であり、 $R^2$  は、 $CH_3$  (アセトアミドメチル - システイン、 $C(Acm)$ ) である； $R^1$  は  $CH_2$  であり、 $X$  は  $NH$  であり、 $R^2$  は、 $CH_3$  (アセチルジアミノブタン酸、 $Dab(Ac)$ ) である； $R^1$  は、 $C_0$  アルキルであり、 $X$  は  $NH$  であり、 $R^2$  は  $NHR^4$  であり、 $R^4$  は、 $H$  (カルバモイルジアミノプロピオン酸、 $Dap(urea)$ ) である；または  $R^1$  は  $CH_2 - CH_2$  であり、 $X$  は  $NH$  であり、 $R^2$  は、 $CH_3$  (アセチルオルニチン、 $Orn(Ac)$ ) である。例示としての実施形態では、構造 I I の側鎖を有するアミノ酸が提示され、式中、 $R^1$  は  $CH_2$  であり、 $Y$  は  $NHR^4$  であり、 $R^4$  は、 $CH_3$  (メチルグルタミン、 $Q(Me)$ ) である；例示としての実施形態では、構造 I I I I の側鎖を有するアミノ酸が提示され、式中、 $R^1$  は  $CH_2$  であり、 $R^4$  は  $H$  (メチオニン - スルホキシド、 $M(O)$ ) である。具体的な実施形態では、3 番目のアミノ酸を、 $Dab(Ac)$  で置換する。

30

40

$Q$  のアシル化

50

## 【0215】

いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチド（クラス1のグルカゴン関連ペプチド、クラス2のグルカゴン関連ペプチド、クラス3のグルカゴン関連ペプチド、クラス4のグルカゴン関連ペプチド、クラス4のグルカゴン関連ペプチドまたはクラス5のグルカゴン関連ペプチドなど）であるQは、アシル基を含むように修飾される。アシル基は、ペプチドQのアミノ酸に直接的に共有結合してもよいし、Qのアミノ酸にスペーサーを介して間接的に共有結合してもよく、この場合、スペーサーは、Qのアミノ酸とアシル基との間に位置する。Qは、親水体が結合している同一のアミノ酸の位置でアシル化されていてもよいし、異なるアミノ酸の位置でアシル化されていてもよい。本明細書で説明するように、Qは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド（クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドを含む）またはオステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体であってもよい。たとえば、Qは、クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のうちの1つであってもよく、天然アミノ酸に対して非天然のアシル基を有するものであってもよい。アシル化は、Qの範囲内のどの位置でなされてもよい。Qがグルカゴン関連ペプチドである場合、アシル化されていないグルカゴン関連ペプチドの活性が、アシル化されても保持される限り、アシル化は、1番目から29番目の任意の位置、C末端の延長部分の範囲内にある位置またはC末端アミノ酸を含む、どの位置で起こってもよい。たとえば、アシル化されていないペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する場合、アシル化されたペプチドは、グルカゴンアゴニスト活性を保持する。また、たとえば、アシル化されていないペプチドがグルカゴンアンタゴニスト活性を有する場合、アシル化されたペプチドは、グルカゴンアンタゴニスト活性を保持する。たとえば、アシル化されていないペプチドがGLP-1アゴニスト活性を有する場合、アシル化されたペプチドは、GLP-1アゴニスト活性を保持する。非限定的な例として、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目でのアシル化があげられる。クラス1、クラス2、クラス3のグルカゴン関連ペプチドについては、アシル化は、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目、29番目、30番目、37番目、38番目、39番目、40番目、41番目、42番目または43番目のいずれかで起こり得る。グルカゴン関連ペプチド（クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5など）に関する他の非限定的な例として、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目でのアシル化およびグルカゴンペプチドのC末端領域の1箇所または2箇所以上、たとえば（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）24番目、28番目または29番目、C末端の延長部分の範囲内またはC末端（C末端でのCysの付加によるなど）でのPEG化があげられる。

## 【0216】

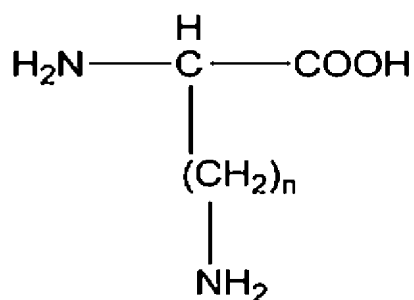
本発明の具体的な態様では、ペプチドQ（グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド、クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドあるいは、オステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体など）は、Qのアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシルまたはチオール直接的なアシル化によって、アシル基を含むように修飾される。いくつかの実施形態では、Qは、アミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシルまたはチオールを介して、直接的にアシル化される。いくつかの実施形態では、Qがグルカゴン関連ペプチドである場合、アシル化は、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目、20番目、24番目または29番目である。この点について、アシル化されたグルカゴン関連ペプチドは、配列番号1601のアミノ酸配列を有するものであってもよいし、あるいは、本明細書に記載されたアミノ酸修飾の1個または2個以上を有する修飾されたアミノ酸配列であって、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目、20番目、24番目、29番目のア

ミノ酸の少なくとも１つが、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはチオールを有するアミノ酸になるように修飾された配列であってもよい。本発明のいくつかの具体的な実施形態では、Qがグルカゴン関連ペプチドである場合、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）１０番目のアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシルまたはチオールを介して、Qの直接的なアシル化が起こる。

【 0 2 1 7 】

いくつかの実施形態では、側鎖のアミンを有するペプチドQ（グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド、クラス１、クラス２、クラス３、クラス４またはクラス５のグルカゴン関連ペプチドあるいは、オステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体など）のアミノ酸は、式Ⅰのアミノ酸である。

10



20

式中、n=1～4である

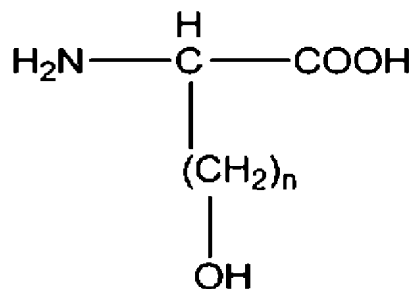
[式Ⅰ]

例示としてのいくつかの実施形態では、式Ⅰのアミノ酸は、nが４（L y s）またはnが３（O r n）のアミノ酸である。

【 0 2 1 8 】

30

他の実施形態では、側鎖にヒドロキシルを有するペプチドQのアミノ酸は、式Ⅱのアミノ酸である。



40

式中、n=1～4である

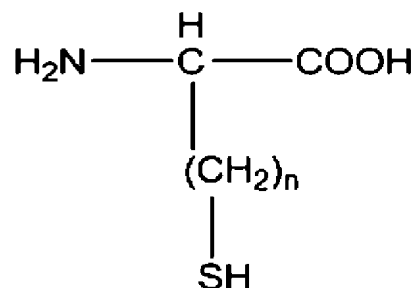
[式Ⅱ]

例示としてのいくつかの実施形態では、式Ⅱのアミノ酸は、nが１（S e r）のアミノ酸である。

50

【 0 2 1 9 】

さらに他の実施形態では、側鎖にチオールを有するペプチド Q のアミノ酸は、式 I I I のアミノ酸である。



10

式中、 $n=1\sim 4$ である

[式III]

例示としてのいくつかの実施形態では、式 I I I のアミノ酸は、 $n$  が 1 ( C y s ) のアミノ酸である。

20

【 0 2 2 0 】

さらに他の実施形態では、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはチオールを有するペプチド Q のアミノ酸は、式 I、式 I I または式 I I I のアミノ酸の  $\alpha$  炭素に結合した水素が第 2 の側鎖で置換されていること以外は、式 I、式 I I または式 I I I の同一の構造を有する二置換されたアミノ酸である。

【 0 2 2 1 】

本発明のいくつかの実施形態では、アシル化されたペプチド Q ( グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド、クラス 1、クラス 2、クラス 3、クラス 4 またはクラス 5 のグルカゴン関連ペプチドあるいは、オステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体など ) は、ペプチドとアシル基との間にスペーサーを含む。いくつかの実施形態では、Q は、スペーサーに共有結合し、これがアシル基に共有結合している。例示としてのいくつかの実施形態では、Q は、スペーサーのアミン、ヒドロキシルまたはチオールのアシル化によって、アシル基を含むように修飾される、このスペーサー ( Q がグルカゴン関連ペプチドである場合、たとえば、クラス 1、クラス 2、クラス 3、クラス 4 またはクラス 5 ) は、( 野生型グルカゴンのアミノ酸番号で ) 10 番目、20 番目、24 番目または 29 番目あるいは、グルカゴン関連ペプチドの C 末端アミノ酸で、アミノ酸の側鎖に結合している。スペーサーが結合しているペプチド Q のアミノ酸は、スペーサーとの結合を可能にする部分を有するものであれば、どのようなアミノ酸であってもよい。たとえば、側鎖に、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$  または  $-\text{COOH}$  を有するアミノ酸 ( L y s、O r n、S e r、A s p または G l u など ) が適している。側鎖に、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$  または  $-\text{COOH}$  を有するペプチド Q のアミノ酸 (  $\alpha$  - 置換アミノ酸または  $\alpha$  - 二置換アミノ酸など ) ( L y s、O r n、S e r、A s p または G l u など ) も適している。Q がグルカゴン関連ペプチド ( クラス 1、クラス 2、クラス 3、クラス 4 またはクラス 5 など ) であるいくつかの実施形態では、アシル化されたグルカゴン関連ペプチドは、配列番号 1601 のアミノ酸配列を有するものであってもよいし、あるいは、本明細書に記載されたアミノ酸修飾の 1 個または 2 個以上を有する修飾されたアミノ酸配列であって、( 野生型グルカゴンのアミノ酸番号で ) 10 番目、20 番目、24 番目、29 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つが、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはカルボキシルを有するアミノ酸になるように修飾された配列であってもよい。

30

40

50



## 【 0 2 2 2 】

いくつかの実施形態では、ペプチドQとアシル基との間のスペーサーは、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはチオールを有するアミノ酸であるか、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはチオールを有するアミノ酸を有するジペプチドまたはトリペプチドである。いくつかの実施形態では、アミノ酸スペーサーは、 $\gamma$  - G l uではない。いくつかの実施形態では、ジペプチドスペーサーは、 $\gamma$  - G l u -  $\gamma$  - G l uではない。

## 【 0 2 2 3 】

スペーサーのアミノ酸のアミン基を介してアシル化が起こる場合、このアシル化は、アミノ酸の $\alpha$ アミンまたは側鎖のアミンを介して起こり得る。 $\alpha$ アミンがアシル化されている例では、スペーサーのアミノ酸は、どのようなアミノ酸であってもよい。たとえば、スペーサーのアミノ酸は、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、T r p、M e t、P h e、T y rなどの疎水性のアミノ酸であってもよい。いくつかの実施形態では、スペーサーのアミノ酸は、たとえば、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、T r p、M e t、P h e、T y r、6 - アミノヘキサン酸、5 - アミノ吉草酸、7 - アミノヘプタン酸、8 - アミノオクタン酸などの疎水性のアミノ酸であってもよい。あるいは、スペーサーのアミノ酸は、A s pおよびG l uなどの酸性残基であってもよい。スペーサーのアミノ酸の側鎖のアミンがアシル化されている例では、スペーサーのアミノ酸は、式Iのアミノ酸（L y sまたはO r nなど）といった側鎖のアミンを有するアミノ酸である。この場合、ペプチドがジアシル化されるように、スペーサーのアミノ酸の $\alpha$ アミンと側鎖のアミンのどちらも、アシル化が可能である。本発明の実施形態は、このようなジアシル化された分子を含む。

10

20

## 【 0 2 2 4 】

スペーサーのアミノ酸のヒドロキシ基を介してアシル化が起こる場合、アミノ酸あるいは、ジペプチドまたはトリペプチドのアミノ酸のうちの1つは、式I Iのアミノ酸であってもよい。一例としての具体的な実施形態では、アミノ酸はS e rである。

## 【 0 2 2 5 】

スペーサーのアミノ酸のチオール基を介してアシル化が起こる場合、アミノ酸あるいは、ジペプチドまたはトリペプチドのアミノ酸のうちの1つは、式I I Iのアミノ酸であってもよい。一例としての具体的な実施形態では、アミノ酸はC y sである。

30

## 【 0 2 2 6 】

いくつかの実施形態では、スペーサーは、親水性の二官能性スペーサーであってもよい。具体的な実施形態では、スペーサーは、アミノポリ（アルキルオキシ）カルボキシレート（カルボキシル）を有する。この点について、スペーサーは、たとえば、 $\text{NH}_2$ （ $\text{CH}_2$   $\text{CH}_2$  O） $_n$ （ $\text{CH}_2$ ） $_m$  C O O Hを含むものであってもよく、式中、 $m$ は1～6の任意の整数であり、 $n$ は2～12の任意の整数である。その一例として、Peptides International, Inc.（Louisville, KY）から市販されている8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸がある。

## 【 0 2 2 7 】

いくつかの実施形態では、ペプチドQとアシル基との間のスペーサーは、親水性の二官能性スペーサーであってもよい。特定の実施形態では、親水性の二官能性スペーサーは、2個または3個以上の反応性基、たとえば、アミン、ヒドロキシル、チオール、カルボキシ基またはこれらの任意の組み合わせを有する。特定の実施形態では、親水性の二官能性スペーサーは、ヒドロキシ基とカルボキシレートとを有する。他の実施形態では、親水性の二官能性スペーサーは、アミン基とカルボキシレートとを有する。他の実施形態では、親水性の二官能性スペーサーは、チオール基とカルボキシレートとを有する。

40

## 【 0 2 2 8 】

いくつかの実施形態では、ペプチドQとアシル基との間のスペーサーは、疎水性の二官能性スペーサーである。疎水性の二官能性スペーサーは、当分野で知られている。たとえば、Bioconjugate Techniques、G. T. Hermanson（Academic Press, San Diego, CA, 1996）（その内容全体を本明細書に援用する）を参照のこと。特定の実施形態では、疎水性の二官能性スペーサーは、2個または3個以上の反応性基、たとえば、アミン、ヒドロキ

50

シル、チオール、カルボキシ基またはこれらの任意の組み合わせを有する。特定の実施形態では、疎水性の二官能性スペーサーは、ヒドロキシ基とカルボキシレートとを有する。他の実施形態では、疎水性の二官能性スペーサーは、アミン基とカルボキシレートとを有する。他の実施形態では、疎水性の二官能性スペーサーは、チオール基とカルボキシレートとを有する。カルボキシレートとヒドロキシ基またはチオール基とを有する好適な疎水性の二官能性スペーサーは、当分野で知られており、たとえば、8 - ヒドロキシオクタン酸および8 - メルカプトオクタン酸があげられる。

#### 【0229】

いくつかの実施形態では、二官能性スペーサーは、カルボキシレート基の間に、メチレン基の炭素原子を直鎖状に1 ~ 7個含むジカルボン酸ではない。いくつかの実施形態では、二官能性スペーサーは、カルボキシレート基の間にメチレン基の炭素原子を直鎖状に1 ~ 7個含むジカルボン酸である。

10

#### 【0230】

Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドである具体的な実施形態におけるスペーサー（アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性の二官能性スペーサーまたは疎水性の二官能性スペーサーなど）は、原子3 ~ 10個（たとえば原子6 ~ 10個（原子6個、原子7個、原子8個、原子9個または原子10個など））の長さである。Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドである一層具体的な実施形態では、スペーサーは、原子約3 ~ 約10個（原子6 ~ 10個など）の長さであり、アシル基は、スペーサーとアシル基とを合わせた全長が、原子14 ~ 28個、たとえば、原子約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個、約25個、約26個、約27個または約28個になるように、C12 ~ C18の脂肪族アシル基、たとえば、C14の脂肪族アシル基、C16の脂肪族アシル基である。Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、スペーサーとアシル基との長さは、原子17 ~ 28個（19 ~ 26個、19 ~ 21個など）の長さである。

20

#### 【0231】

Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドである特定の実施形態によれば、二官能性スペーサーは、原子3 ~ 10個の長さのアミノ酸骨格を有する合成のアミノ酸または天然のアミノ酸（本明細書に記載のものを含むが、これらに限定されるものではない）であってもよい（6 - アミノヘキサン酸、5 - アミノ吉草酸、7 - アミノヘプタン酸、8 - アミノオクタン酸など）。あるいは、クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドに結合しているスペーサーは、原子3 ~ 10個（原子6 ~ 10個など）の長さのペプチド骨格を有するジペプチドスペーサーまたはトリペプチドスペーサーであってもよい。クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドに結合しているジペプチドスペーサーまたはトリペプチドスペーサーのそれぞれのアミノ酸は、このジペプチドまたはトリペプチドの他のアミノ酸（単数または複数）と同一であっても異なってもよく、独立に、たとえば、天然のアミノ酸（Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr）の任意のD異性体またはL異性体あるいは、β - アラニン（β - Ala）、N - α - メチル - アラニン（Me - Ala）、アミノ酪酸（Abu）、α - アミノ酪酸（γ - Abu）、アミノヘキサン酸（ε - Ahx）、アミノイソ酪酸（Aib）、アミノメチルピロールカルボン酸、アミノピペリジンカルボン酸、アミノセリン（Ams）、アミノテトラヒドロピラン - 4 - カルボン酸、アルギニンN - メトキシ - N - メチルアミド、β - アスパラギン酸（β - Asp）、アゼチジンカルボン酸、3 - （2 - ベンゾチアゾリル）アラニン、α - tert - ブチルグリシン、2 - アミノ - 5 - ウレイド - n - 吉草酸（シトルリン、Cit）、β - シクロヘキシルアラニン（Cha）、アセトアミドメチル - システイン、ジアミノブタン酸（Dab）、ジアミノプロピオン酸（Dpr）、ジヒドロキシフェニルアラニン（DOPA）、ジメチルチアゾリジン（DMTA）、γ - グルタミン酸（γ - Glu）、ホモセリン（Hse）

30

40

50

、ヒドロキシプロリン (Hyp)、イソロイシン N - メトキシ - N - メチルアミド、メチル - イソロイシン (MeIle)、イソニペコチン酸 (Isn)、メチルロイシン (MeLeu)、メチルリジン、ジメチルリジン、トリメチルリジン、メタノプロリン、メチオニン - スルホキシド (Met(O))、メチオニン - スルホン (Met(O<sub>2</sub>))、ノルロイシン (Nle)、メチル - ノルロイシン (Me - Nle)、ノルバリン (Nva)、オルニチン (Orn)、パラアミノ安息香酸 (PABA)、ペニシラミン (Pen)、メチルフェニルアラニン (MePhe)、4 - クロロフェニルアラニン (Phe(4 - Cl))、4 - フロオロフェニルアラニン (Phe(4 - F))、4 - ニトロフェニルアラニン (Phe(4 - NO<sub>2</sub>))、4 - シアノフェニルアラニン (Phe(4 - CN))、フェニルグリシン (Phg)、ピペリジニルアラニン、ピペリジニルグリシン、3, 4 - デヒドロプロリン、ピロリジニルアラニン、サルコシン (Sar)、セレノシステイン (Sec)、O - ベンジル - ホスホセリン、4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 6 - メチルヘプタン酸 (Sta)、4 - アミノ - 5 - シクロヘキシル - 3 - ヒドロキシペンタン酸 (ACHPA)、4 - アミノ - 3 - ヒドロキシ - 5 - フェニルペンタン酸 (AHPPA)、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - イソキノリン - 3 - カルボン酸 (Tic)、テトラヒドロピラングリシン、チエニルアラニン (Thi)、O - ベンジル - ホスホチロシン、O - ホスホチロシン、メトキシチロシン、エトキシチロシン、O - (ビス - ジメチルアミノ - ホスホノ) - チロシン、硫酸チロシンテトラブチルアミン、メチル - バリン (MeVal)、1 - アミノ - 1 - シクロヘキサンカルボン酸 (Acx)、アミノ吉草酸、β - シクロプロピル - アラニン (Cpa)、プロパギルグリシン (Prg)、アリルグリシン (Alg)、2 - アミノ - 2 - シクロヘキシル - プロパン酸 (2 - Cha)、tert - ブチルグリシン (Tbg)、ビニルグリシン (Vg)、1 - アミノ - 1 - シクロプロパンカルボン酸 (Acp)、1 - アミノ - 1 - シクロペンタンカルボン酸 (Acpe)、アルキル化された 3 - メルカプトプロピオン酸、1 - アミノ - 1 - シクロブタンカルボン酸 (Acb) からなる群から選択される非天然のアミノ酸の D 異性体または L 異性体をはじめとする、天然および / または非天然のアミノ酸からなる群から選択可能である。

10

20

30

40

50

## 【0232】

Q がクラス 1、クラス 2 またはクラス 3 のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、スペーサーは、たとえば 1 個または 2 個以上の負の電荷を持つアミノ酸を有するなど、全体として負の電荷を有する。Q がクラス 1、クラス 2 またはクラス 3 のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、ジペプチドは、一般構造 A - B のジペプチドのいずれでもなく、1 この場合、A は、Gly、Gln、Ala、Arg、Asp、Asn、Ile、Leu、Val、Phe、Pro からなる群から選択され、B は、Lys、His、Trp からなる群から選択される。Q がクラス 1、クラス 2 またはクラス 3 のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、ジペプチドスペーサーは、Ala - Ala、β - Ala - β - Ala、Leu - Leu、Pro - Pro、γ - アミノ酪酸 - γ - アミノ酪酸、γ - Glu - γ - Glu からなる群から選択される。

## 【0233】

ペプチド Q は、長鎖アルカンのアシル化によってアシル基を含むように修飾されていてもよい。具体的な態様では、長鎖アルカンは、ペプチド Q のカルボキシ基またはその活性化形態と反応するアミン、ヒドロキシルまたはチオール基を有する (オクタデシルアミン、テトラデカノール、ヘキサデカンチオールなど)。Q のカルボキシ基またはその活性化形態は、Q のアミノ酸 (グルタミン酸、アスパラギン酸など) の側鎖の一部であってもよいし、ペプチド骨格の一部であってもよい。

## 【0234】

特定の実施形態では、ペプチド Q は、Q に結合しているスペーサーによる長鎖アルカンのアシル化によって、アシル基を含むように修飾される。具体的な態様では、長鎖アルカンは、スペーサーのカルボキシ基またはその活性化形態と反応するアミン、ヒドロキシルまたはチオール基を有する。カルボキシ基またはその活性化形態を有する好適なスペーサーを本明細書に記載し、一例として、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性の二

官能性スペーサー、疎水性の二官能性スペーサーなどの二官能性スペーサーがあげられる。

【0235】

本明細書で使用する場合、「カルボキシ基の活性化形態」という表現は、一般式  $R(C=O)X$  のカルボキシ基を示し、式中、 $X$  は脱離基であり、 $R$  は  $Q$  またはスペーサーである。たとえば、カルボキシ基の活性化形態としては、塩化アシル、無水物、エステルがあげられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、活性化したカルボキシ基は、 $N$ -ヒドロキシスクシンイミド( $NHS$ )脱離基を有するエステルである。

【0236】

長鎖アルカンがペプチド  $Q$  またはスペーサーによってアシル化される本発明の態様に関して、長鎖アルカンは、どのようなサイズであってもよく、どのような炭素鎖長であってもよい。長鎖アルカンは、直鎖状であっても分岐状であってもよい。特定の態様では、長鎖アルカンは、 $C4 \sim C30$  アルカンである。たとえば、長鎖アルカンは、 $C4$  アルカン、 $C6$  アルカン、 $C8$  アルカン、 $C10$  アルカン、 $C12$  アルカン、 $C14$  アルカン、 $C16$  アルカン、 $C18$  アルカン、 $C20$  アルカン、 $C22$  アルカン、 $C24$  アルカン、 $C26$  アルカン、 $C28$  アルカンまたは  $C30$  アルカンのいずれであってもよい。いくつかの実施形態では、長鎖アルカンは、 $C8 \sim C20$  アルカン、たとえば  $C14$  アルカン、 $C16$  アルカンまたは  $C18$  アルカンであってもよい。

【0237】

いくつかの実施形態では、 $Q$  のアミン、ヒドロキシルまたはチオール基は、コレステロール酸でアシル化される。具体的な実施形態では、ペプチドは、アルキル化されたデスアミノシステインスペーサー、すなわちアルキル化された 3-メルカプトプロピオン酸スペーサーを介して、コレステロール酸に結合している。

【0238】

アミン、ヒドロキシル、チオールによってペプチドをアシル化する好適な方法は、当分野で知られている。たとえば、Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 377-382 (1996); Shimohigashi and Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62 (1982); および Previero et al., Biochim Biophys Acta 263: 7-13 (1972) (ヒドロキシルでアシル化する方法); および San and Silviu, J Pept Res 66: 169-180 (2005) (チオールでアシル化する方法); Bioconjugate Chem "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., Pharmaceutical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol. 6, No: 2 pp. 171-176 (1989) を参照のこと。

【0239】

アシル化されたペプチド  $Q$  のアシル基は、どのような炭素鎖長であってもよいなど、どのようなサイズであってもよく、直鎖状であっても分岐状であってもよい。本発明のいくつかの具体的な実施形態では、アシル基は、 $C4 \sim C30$  脂肪酸である。たとえば、アシル基は、 $C4$  脂肪酸、 $C6$  脂肪酸、 $C8$  脂肪酸、 $C10$  脂肪酸、 $C12$  脂肪酸、 $C14$  脂肪酸、 $C16$  脂肪酸、 $C18$  脂肪酸、 $C20$  脂肪酸、 $C22$  脂肪酸、 $C24$  脂肪酸、 $C26$  脂肪酸、 $C28$  脂肪酸または  $C30$  脂肪酸のいずれであってもよい。いくつかの実施形態では、アシル基は、 $C8 \sim C20$  脂肪酸、たとえば、 $C14$  脂肪酸または  $C16$  脂肪酸である。

【0240】

別の実施形態では、アシル基は胆汁酸である。胆汁酸は、好適な胆汁酸であれば、どのようなものであってもよい。一例をあげると、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、コレステロール酸などであるが、これらに限定されるものではない。

【0241】

本明細書に記載のアシル化されたペプチド  $Q$  は、親水体を有するようにさらに修飾され

10

20

30

40

50

ていてもよい。いくつかの具体的な実施形態では、親水体は、ポリエチレングリコール（P E G）鎖を有するものであってもよい。親水体の取り込みについては、本明細書に記載の任意の方法など、好適な任意の手段で達成可能である。クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドに関するいくつかの実施形態では、アシル化されたグルカゴン関連ペプチドは、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目、20番目、24番目、29番目のアミノ酸の少なくとも1つがアシル基を有し、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）16番目、17番目、21番目、24番目または29番目、C末端の延長部分の範囲内にある位置にあるアミノ酸またはC末端のアミノ酸の少なくとも1つが、C y s、L y s、O r n、ホモシステインまたはA c - P h eになるように修飾され、アミノ酸の側鎖が親水体（P E Gなど）に共有結合している、本明細書に記載のあらゆる修飾を含む、配列番号1601を有するものであってもよい。クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドに関するいくつかの実施形態では、アシル基は、任意に、C y s、L y s、O r n、ホモシステインまたはA c - P h eを有するスペーサーを介して、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目に結合し、親水体は、24番目でC y s残基に取り込まれる。

10

#### 【0242】

あるいは、アシル化されたペプチド（Q）は、スペーサーを有するものであってもよく、この場合のスペーサーは、アシル化され、なおかつ親水体を含むように修飾される。好適なスペーサーの非限定的な例としては、C y s、L y s、O r n、ホモシステイン、A c - P h eからなる群から選択される1個または2個以上のアミノ酸を有するスペーサー

20

Qのアルキル化

#### 【0243】

いくつかの実施形態では、Qは、アルキル基を含むように修飾される。アルキル基は、ペプチドQのアミノ酸に直接的に共有結合してもよいし、Qのアミノ酸にスペーサーを介して間接的に共有結合してもよく、この場合、スペーサーは、Qのアミノ酸とアルキル基との間に位置する。アルキル基は、エーテル結合、チオエーテル結合またはアミノ結合などを介してQに結合していてもよい。Qは、親水体が結合している同一のアミノ酸の位置でアルキル化されていてもよいし、異なるアミノ酸の位置でアルキル化されていてもよい。本明細書で説明するように、Qは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド（クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドを含む）またはオステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体であってもよい。たとえば、Qは、クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドであってもよいし、天然のアミノ酸に対して非天然のアルキル基を有するものであってもよい。

30

#### 【0244】

アルキル化は、Qの範囲内のどの位置でなされてもよい。Qがグルカゴン関連ペプチドである場合、アルキル化は、グルカゴン受容体、G L P - 1受容体、G I P受容体または他のグルカゴン関連ペプチド受容体に対するアルキル化されていないペプチドのアゴニスト活性が、アルキル化されても保持される限り、1番目から29番目の任意の位置、C末端の延長部分の範囲内にある位置またはC末端アミノ酸を含む、どの位置で起こってもよい。いくつかの実施形態では、アルキル化されていないペプチドがグルカゴンアゴニスト活性を有する場合、アルキル化されたペプチドは、グルカゴンアゴニスト活性を保持する。いくつかの実施形態では、アルキル化されていないペプチドがG L P - 1アゴニスト活性を有する場合、アルキル化されたペプチドは、G L P - 1アゴニスト活性を保持する。非限定的な例として、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目でのアルキル化があげられる。クラス1、クラス2、クラス3のグルカゴン関連ペプチドについては、アルキル化は、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）5番目、7番目、10番目、11番目

40

50

、12番目、13番目、14番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目、29番目、30番目、37番目、38番目、39番目、40番目、41番目、42番目または43番目で起こり得る。グルカゴン関連ペプチド（クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5など）に関する他の非限定的な例として、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目でのアルキル化およびグルカゴン関連ペプチドのC末端領域の1箇所または2箇所以上、たとえば（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）24番目、28番目または29番目、C末端の延長部分の範囲内またはC末端（C末端でのCysの付加によるなど）でのPEG化があげられる。

#### 【0245】

本発明の具体的な態様では、ペプチドQ（グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド、クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドあるいは、オステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体など）は、Qのアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシルまたはチオール直接的なアルキル化によって、アルキル基を含むように修飾される。いくつかの実施形態では、Qは、アミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシルまたはチオールを介して、直接的にアルキル化される。いくつかの実施形態では、Qがグルカゴン関連ペプチドである場合、アルキル化は、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目、20番目、24番目または29番目である。この点について、アルキル化されたグルカゴン関連ペプチドは、配列番号1601のアミノ酸配列を有するものであってもよいし、あるいは、本明細書に記載されたアミノ酸修飾の1個または2個以上を有する修飾されたアミノ酸配列であって、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目、20番目、24番目、29番目のアミノ酸の少なくとも1つが、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはチオールを有するアミノ酸になるように修飾された配列であってもよい。本発明のいくつかの具体的な実施形態では、Qがグルカゴン関連ペプチドである場合、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目のアミノ酸の側鎖のアミン、ヒドロキシルまたはチオールを介して、Qの直接的なアルキル化が起こる。

#### 【0246】

いくつかの実施形態では、側鎖のアミンを有するペプチドQ（グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド、クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドあるいは、オステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体など）のアミノ酸は、式Iのアミノ酸である。例示としてのいくつかの実施形態では、式Iのアミノ酸は、nが4（Lys）またはnが3（Orn）のアミノ酸である。

#### 【0247】

他の実施形態では、側鎖にヒドロキシルを有するペプチドQのアミノ酸は、式IIのアミノ酸である。例示としてのいくつかの実施形態では、式IIのアミノ酸は、nが1（Ser）のアミノ酸である。

#### 【0248】

さらに他の実施形態では、側鎖にチオールを有するペプチドQのアミノ酸は、式IIIのアミノ酸である。例示としてのいくつかの実施形態では、式IIIのアミノ酸は、nが1（Cys）のアミノ酸である。

#### 【0249】

さらに他の実施形態では、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはチオールを有するペプチドQのアミノ酸は、式I、式IIまたは式IIIのアミノ酸の $\alpha$ 炭素に結合した水素が第2の側鎖で置換されていること以外は、式I、式IIまたは式IIIの同一の構造を有する二置換されたアミノ酸である。

#### 【0250】

本発明のいくつかの実施形態では、アルキル化されたペプチドQ（グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド、クラス1、クラス2、クラス3、クラ

10

20

30

40

50

ス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドあるいは、オステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体など）は、ペプチドとアルキル基との間にスペーサーを有する。いくつかの実施形態では、Qは、スペーサーに共有結合し、これがアルキル基に共有結合している。例示としてのいくつかの実施形態では、ペプチドQは、スペーサーのアミン、ヒドロキシルまたはチオールアルキル化によって、アルキル基を有するように修飾され、このスペーサー（Qがグルカゴン関連ペプチドである場合、たとえば、クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5）は、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）Qの10番目、20番目、24番目または29番目でアミノ酸の側鎖に結合している。スペーサーが結合しているペプチドQのアミノ酸は、スペーサーとの結合を可能にする部分を有するものであれば、どのようなアミノ酸であってもよい。10  
スペーサーが結合しているペプチドQのアミノ酸は、スペーサーとの結合を可能にする部分を有するものであれば、どのようなアミノ酸（ $\alpha$ -置換アミノ酸または $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換されたアミノ酸など）であってもよい。側鎖に、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ または $-\text{COOH}$ （Lys、Orn、Ser、AspまたはGluなど）を有するペプチドQのアミノ酸が適している。Qがグルカゴン関連ペプチド（クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5など）であるいくつかの実施形態では、アルキル化されたQは、配列番号1601のアミノ酸配列を有するものであってもよいし、あるいは、本明細書に記載されたアミノ酸修飾の1個または2個以上を有する修飾されたアミノ酸配列であって、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）10番目、20番目、24番目、29番目のアミノ酸の少なくとも1つが、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはカルボキシレート20  
を有するアミノ酸になるように修飾された配列であってもよい。

#### 【0251】

いくつかの実施形態では、ペプチドQとアルキル基との間のスペーサーは、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはチオールを有するアミノ酸あるいは、側鎖にアミン、ヒドロキシルまたはチオールを有するアミノ酸を有するジペプチドまたはトリペプチドである。いくつかの実施形態では、アミノ酸スペーサーは、 $\gamma$ -Gluではない。いくつかの実施形態では、ジペプチドスペーサーは、 $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Gluではない。

#### 【0252】

スペーサーのアミノ酸のアミン基を介してアルキル化が起こる場合、このアルキル化は、アミノ酸の $\alpha$ アミンまたは側鎖のアミンを介して起こり得る。 $\alpha$ アミンがアルキル化されている例では、スペーサーのアミノ酸は、どのようなアミノ酸であってもよい。たとえば、スペーサーのアミノ酸は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyrなどの疎水性のアミノ酸であってもよい。あるいは、スペーサーのアミノ酸は、AspおよびGluなどの酸性残基であってもよい。例示としての実施形態では、スペーサーのアミノ酸は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Trp、Met、Phe、Tyr、6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノオクタン酸などの疎水性のアミノ酸であってもよい。あるいは、スペーサーのアミノ酸は、アルキル化が酸性残基の $\alpha$ アミンで起こるかぎりにおいて、AspおよびGluなどの酸性残基であってもよい。スペーサーのアミノ酸の側鎖のアミンがアルキル化されている例では、スペーサーのアミノ酸は、式Iのアミノ酸（LysまたはOrnなど）40  
といった側鎖のアミンを有するアミノ酸である。この場合、ペプチドがジアルキル化されるように、スペーサーのアミノ酸の $\alpha$ アミンと側鎖のアミンのどちらも、アルキル化が可能である。本発明の実施形態は、このようなジアルキル化された分子を含む。

#### 【0253】

スペーサーのアミノ酸のヒドロキシ基を介してアルキル化が起こる場合、スペーサーのアミノ酸またはアミノ酸のうちの1つは、式IIのアミノ酸であってもよい。一例としての具体的な実施形態では、アミノ酸はSerである。

#### 【0254】

スペーサーのアミノ酸のチオール基を介してアルキル化が起こる場合、スペーサーのアミノ酸またはアミノ酸のうちの1つは、式IIIのアミノ酸であってもよい。一例として

10

20

30

40

50

の具体的な実施形態では、アミノ酸はCysである。

【0255】

いくつかの実施形態では、スペーサーは、親水性の二官能性スペーサーであってもよい。具体的な実施形態では、スペーサーは、アミノポリ(アルキルオキシ)カルボキシレートとを有する。この点について、スペーサーは、たとえば、 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ を含むものであってもよく、式中、 $m$ は1~6の任意の整数であり、 $n$ は2~12の任意の整数である。その一例として、Peptides International, Inc. (Louisville, KY) から市販されている8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸がある。

【0256】

いくつかの実施形態では、ペプチドQとアルキル基との間のスペーサーは、親水性の二官能性スペーサーである。特定の実施形態では、親水性の二官能性スペーサーは、2個または3個以上の反応性基、たとえば、アミン、ヒドロキシル、チオール、カルボキシ基またはこれらの任意の組み合わせを有する。特定の実施形態では、親水性の二官能性スペーサーは、ヒドロキシ基とカルボキシレートとを有する。他の実施形態では、親水性の二官能性スペーサーは、アミン基とカルボキシレートとを有する。他の実施形態では、親水性の二官能性スペーサーは、チオール基とカルボキシレートとを有する。

【0257】

いくつかの実施形態では、ペプチドQとアルキル基との間のスペーサーは、疎水性の二官能性スペーサーである。特定の実施形態では、疎水性の二官能性スペーサーは、2個または3個以上の反応性基、たとえば、アミン、ヒドロキシル、チオール、カルボキシ基またはこれらの任意の組み合わせを有する。特定の実施形態では、疎水性の二官能性スペーサーは、ヒドロキシ基とカルボキシレートとを有する。他の実施形態では、疎水性の二官能性スペーサーは、アミン基とカルボキシレートとを有する。他の実施形態では、疎水性の二官能性スペーサーは、チオール基とカルボキシレートとを有する。カルボキシレートとヒドロキシ基またはチオール基とを有する好適な疎水性の二官能性スペーサーは、当分野で知られており、たとえば、8-ヒドロキシオクタン酸および8-メルカプトオクタン酸があげられる。

【0258】

Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドである具体的な実施形態におけるスペーサー(アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性の二官能性スペーサーまたは疎水性の二官能性スペーサーなど)は、原子3~10個(たとえば原子6~10個(原子6個、原子7個、原子8個、原子9個または原子10個など))の長さである。一層具体的な実施形態では、クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドに結合しているスペーサーは、原子約3~約10個(原子6~10個など)の長さであり、アルキルは、スペーサーとアルキル基とを合わせた全長が、原子14~28個、たとえば、原子約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個、約25個、約26個、約27個または約28個になるように、C12~C18のアルキル基、たとえば、C14アルキル基、C16アルキル基である。Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、スペーサーとアルキルとの長さは、原子17~28個(19~26個、19~21個など)の長さである。

【0259】

Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドである特定の上述した実施形態では、二官能性スペーサーは、原子3~10個の長さのアミノ酸骨格を有する合成のアミノ酸または非天然のアミノ酸であってもよい(6-アミノヘキサン酸、5-アミノ吉草酸、7-アミノヘプタン酸、8-アミノオクタン酸など)。あるいは、クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドに結合しているスペーサーは、原子3~10個(原子6~10個など)の長さのペプチド骨格を有するジペプチドスペーサーまたはトリペプチドスペーサーであってもよい。クラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドに結合しているジペプチドスペーサーまたはトリペプチドスペーサ

10

20

30

40

50



ーは、たとえば、本明細書にて教示する任意のアミノ酸をはじめとする、天然および/または非天然のアミノ酸からなるものであってもよい。Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、スペーサーは、たとえば1個または2個以上の負の電荷を持つアミノ酸を有するなど、全体として負の電荷を有する。Qがクラス1、クラス2またはクラス3のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、ジペプチドスペーサーは、Ala-Ala、 $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 $\gamma$ -アミノ酪酸- $\gamma$ -アミノ酪酸、 $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Gluからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ジペプチドスペーサーは、 $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Gluではない。

**【0260】**

アミン、ヒドロキシル、チオールを用いてペプチドをアルキル化する好適な方法は、当分野で知られている。たとえば、ウィリアムソンエーテル合成を使用して、グルカゴン関連ペプチドとアルキル基との間にエーテル結合を形成してもよい。また、ペプチドとハロゲン化アルキルとの求核置換反応では、エーテル結合、チオエーテル結合またはアミノ結合のいずれでも得ることができる。

**【0261】**

アルキル化されたペプチドQのアルキル基は、どのような炭素鎖長であってもよいなど、どのようなサイズであってもよく、直鎖状であっても分岐状であってもよい。本発明のいくつかの実施形態では、アルキル基は、C4~C30アルキルである。たとえば、アルキル基は、C4アルキル、C6アルキル、C8アルキル、C10アルキル、C12アルキル、C14アルキル、C16アルキル、C18アルキル、C20アルキル、C22アルキル、C24アルキル、C26アルキル、C28アルキルまたはC30アルキルのいずれであってもよい。いくつかの実施形態では、アルキル基は、C8~C20アルキル、たとえば、C14アルキルまたはC16アルキルである。

**【0262】**

いくつかの具体的な実施形態では、アルキル基は、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、タウロコール酸、グリココール酸、コレステロール酸などの胆汁酸のステロイド部分を有する。

**【0263】**

本発明のいくつかの実施形態では、ペプチドQは、求核基である長鎖アルカンでQと反応させることによってアルキル基を含むように修飾され、この場合のQは、求核置換に適した脱離基を有する。具体的な態様では、長鎖アルカンの求核基は、アミン、ヒドロキシルまたはチオール基（オクタデシルアミン、テトラデカノール、ヘキサデカンチオールなど）であってもよい。Qの脱離基は、アミノ酸の側鎖の一部であってもよいし、ペプチド骨格の一部であってもよい。好適な脱離基としては、たとえば、N-ヒドロキシスクシンイミド、ハロゲン、スルホン酸エステルがあげられる。

**【0264】**

特定の実施形態では、ペプチドQは、求核基である長鎖アルカンで、Qに結合しているスペーサーと反応させることで、アルキル基を含むように修飾され、この場合のスペーサーは、脱離基を有する。具体的な態様では、長鎖アルカンは、アミン、ヒドロキシルまたはチオール基を有する。特定の実施形態では、脱離基を有するスペーサーは、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性の二官能性スペーサー、疎水性の二官能性スペーサー（好適な脱離基をさらに有する）など、本明細書で説明するどのようなスペーサーであってもよい。

**【0265】**

長鎖アルカンがペプチドQまたはスペーサーによってアルキル化された本発明の態様に関して、長鎖アルカンは、どのようなサイズであってもよく、どのような炭素鎖長であってもよい。長鎖アルカンは、直鎖状であっても分岐状であってもよい。特定の態様では、長鎖アルカンは、C4~C30アルカンである。たとえば、長鎖アルカンは、C4アルカン、C6アルカン、C8アルカン、C10アルカン、C12アルカン、C14アルカン、

10

20

30

40

50

C 1 6 アルカン、C 1 8 アルカン、C 2 0 アルカン、C 2 2 アルカン、C 2 4 アルカン、C 2 6 アルカン、C 2 8 アルカンまたはC 3 0 アルカンのいずれであってもよい。グルカゴン関連ペプチドが、クラス 1、クラス 2 またはクラス 3 のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、長鎖アルカンは、C 8 ~ C 2 0 アルカン、たとえばC 1 4 アルカン、C 1 6 アルカンまたはC 1 8 アルカンであってもよい。

【0266】

また、いくつかの実施形態では、Q とコレステロール部分との間で、アルキル化が起こり得る。たとえば、コレステロールのヒドロキシ基は、長鎖アルカンの脱離基を置換して、コレステロール - グルカゴンペプチド産物を形成することができる。

【0267】

本明細書に記載のアルキル化されたペプチド (Q) は、親水体を有するようにさらに修飾されていてもよい。いくつかの具体的な実施形態では、親水体は、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を有するものであってもよい。親水体の取り込みについては、本明細書に記載の任意の方法など、好適な任意の手段で達成可能である。クラス 1、クラス 2、クラス 3、クラス 4 またはクラス 5 のグルカゴン関連ペプチドに関するいくつかの実施形態では、アルキル化された Q は、配列番号 1601 を有するものであってもよいし、あるいは、本明細書に記載されたアミノ酸修飾の 1 個または 2 個以上を有する修飾されたアミノ酸配列であって、(野生型グルカゴンのアミノ酸番号で) 10 番目、20 番目、24 番目、29 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つがアルキル基を有し、16 番目、17 番目、21 番目、24 番目、29 番目、C 末端の延長部分の範囲内にある位置のアミノ酸または C 末端のアミノ酸の少なくとも 1 つが、Cys、Lys、Orn、ホモシステインまたは Ac - Phe になるように修飾され、アミノ酸の側鎖が親水体 (PEG など) に共有結合している配列であってもよい。クラス 1、クラス 2、クラス 3、クラス 4 またはクラス 5 のグルカゴン関連ペプチドに関するいくつかの実施形態では、アルキル基は、任意に、Cys、Lys、Orn、ホモシステインまたは Ac - Phe を有するスペーサーを介して (野生型グルカゴンのアミノ酸番号で) 10 番目に結合し、親水体は、24 番目で Cys 残基に取り込まれる。

【0268】

あるいは、アルキル化されたペプチド Q は、アルキル化され、なおかつ親水体を含むように修飾されたスペーサーを含むものであってもよい。好適なスペーサーの非限定的な例としては、Cys、Lys、Orn、ホモシステイン、Ac - Phe からなる群から選択される 1 個または 2 個以上のアミノ酸を有するスペーサーがあげられる。

$\alpha$  螺旋構造の安定化

【0269】

いくつかの実施形態では、2 つのアミノ酸側鎖間に分子内架橋を形成して、クラス 1、クラス 2、クラス 3、クラス 4 またはクラス 5 のグルカゴン関連ペプチド Q のカルボキシ末端部分 (野生型グルカゴンのアミノ酸番号で) 12 番目 ~ 29 番目のアミノ酸など) の三次元構造を安定させる。2 つのアミノ酸側鎖を、水素結合、塩結合の形成などのイオンの相互作用で、あるいは、共有結合によって、互いに結合することが可能である。

【0270】

いくつかの実施形態では、i 番目と i + 4 番目のアミノ酸など、アミノ酸を 3 個あけて離れた 2 つのアミノ酸の間に、分子内架橋を形成する。ここで、i は、野生型グルカゴンのアミノ酸番号で 12 ~ 25 の整数 (12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 など) である。特に、野生型グルカゴンのアミノ酸番号で、12 番目と 16 番目、16 番目と 20 番目、20 番目と 24 番目または 24 番目と 28 番目のアミノ酸の対 (i = 12、16、20 または 24 のアミノ酸の対) の側鎖は、互いに結合しているため、グルカゴンの  $\alpha$  螺旋を安定させる。あるいは、i は 17 であってもよい。

【0271】

i 番目のアミノ酸と i + 4 番目のアミノ酸とが分子内架橋によって結合しているいくつ

10

20

30

40

50

かの具体的な実施形態では、リンカーのサイズは、原子約 8 個または約 7 ~ 約 9 個である。

【0272】

他の実施形態では、j 番目と j + 3 番目のアミノ酸など、アミノ酸を 2 個あけて離れた 2 つのアミノ酸の間に、分子内架橋を形成する。ここで、j は、野生型グルカゴンのアミノ酸番号で 12 ~ 26 の整数 (12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26 など) である。いくつかの具体的な実施形態では、j は 17 である。

【0273】

j 番目のアミノ酸と j + 3 番目のアミノ酸とが分子内架橋によって結合しているいくつかの具体的な実施形態では、リンカーのサイズは、原子約 6 個または原子約 5 個 ~ 約 7 個である。

10

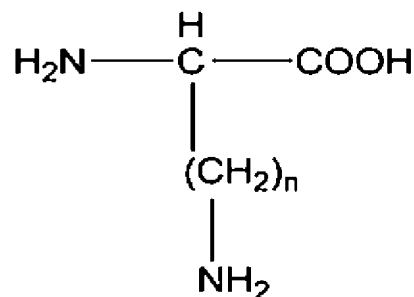
【0274】

さらに他の実施形態では、k 番目のアミノ酸と k + 7 番目のアミノ酸など、アミノ酸を 6 個あけて離れた 2 つのアミノ酸の間に、分子内架橋を形成する。ここで、k は、野生型グルカゴンのアミノ酸番号で 12 ~ 22 の整数 (12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 など) である。いくつかの具体的な実施形態では、k は 12、13 または 17 である。例示としての実施形態では、k は 17 である。

【0275】

共有結合して、6 個の原子からなる架橋した構造を形成できるアミノ酸対形成の例として、Orn と Asp、Glu と式 I のアミノ酸 (n は 2)、ホモグルタミン酸と式 I のアミノ酸 (n は 1) があげられ、式 I は以下のとおりである。

20



30

式中、n=1~4である

[式I]

【0276】

共有結合して、7 個の原子からなる架橋した構造を形成できるアミノ酸対形成の例として、Orn - Glu (ラクタム環) ; Lys - Asp (ラクタム) ; またはホモセリン - ホモグルタミン酸 (ラクトン) があげられる。8 個の原子からなるリンカーを形成できるアミノ酸対形成の例として、Lys - Glu (ラクタム) ; ホモリジン - Asp (ラクタム) ; Orn - ホモグルタミン酸 (ラクタム) ; 4 - アミノフェニルアラニン - Asp (ラクタム) ; または Tyr - Asp (ラクトン) があげられる。9 個の原子からなるリンカーを形成できるアミノ酸対形成の例として、ホモリジン - Glu (ラクタム) ; Lys - ホモグルタミン酸 (ラクタム) ; 4 - アミノフェニルアラニン - Glu (ラクタム) ; または Tyr - Glu (ラクトン) があげられる。これらのアミノ酸の側鎖はいずれも、α 螺旋の三次元構造が破壊されないかぎり、別の化学基でさらに置換されていてもよい。当業者であれば、同様のサイズと望ましい効果を持つ、安定させる構造を生成する化学的に修飾された誘導体をはじめとして、別の対形成または別のアミノ酸類縁体を想定するこ

40

50

とができる。たとえば、ホモシステイン - ホモシステインジスルフィド結合は原子 6 個の長さであるが、望ましい効果を得られるように、これをさらに修飾してもよい。共有結合がない場合ですら、上述したアミノ酸対形成または当業者が想定できる同様の対形成によって、塩結合の形成または水素結合の相互作用などの非共有結合で、 $\alpha$  螺旋の安定性を高めることができる。

#### 【0277】

ラクタム環のサイズは、アミノ酸側鎖の長さに応じて可変であり、いくつかの実施形態では、リジンアミノ酸の側鎖をグルタミン酸の側鎖に結合することで、ラクタムを形成する。(野生型グルカゴンのアミノ酸番号で)さらに他の例示としての実施形態は、任意にラクタム架橋を有する、以下の対形成を含む。12番目のGluと16番目のLys; 12番目の天然のLysと16番目のGlu; 16番目のGluと20番目のLys; 16番目のLysと20番目のGlu; 20番目のGluと24番目のLys; 20番目のLysと24番目のGlu; 24番目のGluと28番目のLys; 24番目のLysと28番目のGlu。あるいは、ラクタム環のアミド結合の順序を逆にしてもよい(ラクタム環を、12番目のリジンと16番目のグルタミン酸の側鎖間あるいは、12番目のグルタミン酸と16番目のリジンとの間に形成してもよいなど)。

10

#### 【0278】

ラクタム架橋以外の分子内架橋を利用して、Qの $\alpha$ 螺旋を安定させてもよい。いくつかの実施形態では、分子内架橋は、疎水性の架橋である。この場合、分子内架橋は、任意に、Qの $\alpha$ 螺旋の疎水性の側の一部である2つのアミノ酸の側鎖の間にある。たとえば、疎水結合によって結合したアミノ酸の1つが、(野生型グルカゴンのアミノ酸番号で)10番目、14番目、18番目のアミノ酸であってもよい。

20

#### 【0279】

具体的な一態様では、オレフィンメタセシスを使用して、全炭化水素架橋系でQの $\alpha$ 螺旋の1または2回転分を架橋させる。この場合のQは、さまざまな長さのオレフィン側鎖を持つ $\alpha$ -メチル化アミノ酸を有するものであってもよく、I番目および*i*+4番目または*i*+7番目で、RかSの立体異性を有するように構成されている。たとえば、オレフィン側は、 $(CH_2)_n$ を有するものであってもよく、式中、*n*は1~6の整数である。いくつかの実施形態では、原子8個の長さで架橋する場合、*n*は3である。このような分子内架橋を形成するための好適な方法は、従来技術において説明されている。たとえば、Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000)およびWalensky et al., Science 305: 1466-1470 (2004)を参照のこと。あるいは、Qは、螺旋の隣接する回転部分にあるO-アシルセリル残基を含むものであってもよく、この回転部分は、ルテニウム触媒を用いた閉環メタセシスによって架橋されている。このような架橋の工程は、たとえば、Blackwell et al., Angew. Chem., Int. Ed. 37: 3281-3284 (1998)に記載されている。

30

#### 【0280】

もうひとつの具体的な態様では、非天然のチオジアラミンアミノ酸であるランチオニンは、シスチンの擬似ペプチドとして広く使われてきたが、 $\alpha$ 螺旋の1つの回転を架橋するのに用いられる。ランチオニンを基にした環化の好適な方法は、当分野で知られている。たとえば、Matteucci et al., Tetrahedron Letters 45: 1399-1401 (2004); Mayer et al., J. Peptide Res. 51: 432-436 (1998); Polinsky et al., J. Med. Chem. 35: 4185-4194 (1992); Osapay et al., J. Med. Chem. 40: 2241-2251 (1997); Fukase et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 65: 2227-2240 (1992); Harpp et al., J. Org. Chem. 36: 73-80 (1971); Goodman and Shao, Pure Appl. Chem. 68: 1303-1308 (1996); Osapay and Goodman, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1599-1600 (1993)を参照のこと。

40

#### 【0281】

いくつかの実施形態では、*i*番目と*i*+7番目のGlu残基間を繋ぐ $\alpha$ ,  $\omega$ -ジアミノアルカン(1,4-ジアミノプロパンおよび1,5-ジアミノペンタンなど)を利用して、Qの $\alpha$ 螺旋を安定させる。このような繋ぎを用いると、ジアミノアルカンの繋ぎの長さ

50

に応じて、原子 9 個またはそれより長い架橋が形成される。このような繋ぎを用いて架橋したペプチドを生成する好適な方法は、従来技術において説明されている。たとえば、Phelan et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 455-460 (1997)を参照のこと。

【0282】

本発明のさらにもうひとつの実施形態では、ジスルフィド結合を利用して、Qの $\alpha$ 螺旋の1または2回転分を架橋させる。あるいは、一方または両方の硫黄原子がメチレン基で置換されて等配電子のマクロ環化が生じる修飾されたジスルフィド結合を利用して、Qの $\alpha$ 螺旋を安定させる。ジスルフィド結合または硫黄を基にした環化でペプチドを修飾する好適な方法は、たとえば、Jackson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 9391-9392 (1991)およびRudinger and Jost, Experientia 20: 570-571 (1964)に記載されている。

10

【0283】

さらにもうひとつの実施形態では、 $i$ 番目と $i+4$ 番目に位置する2つのHis残基またはHisとCysとの対で金属原子を結合することによって、Qの $\alpha$ 螺旋を安定させる。金属原子は、たとえば、Ru(III)、Cu(II)、Zn(II)またはCd(II)であってもよい。このような金属結合を基にした $\alpha$ 螺旋安定化方法は、当分野で知られている。たとえば、Andrews and Tabor, Tetrahedron 55: 11711-11743 (1999); Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 112: 1630-1632 (1990); Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 9063-9064 (1997)を参照のこと。

【0284】

Qの $\alpha$ 螺旋を、他のペプチド環化手段で安定させてもよく、この手段は、Davies, J. Peptide. Sci. 9: 471-501 (2003)に概説されている。 $\alpha$ 螺旋は、アミド結合、チオエーテル結合、チオエステル結合、尿素結合、カルバメート結合、スルホンアミド結合などを形成することで安定させることが可能なものである。たとえば、Cys残基の側鎖とC末端との間に、チオエステル結合を形成すればよい。あるいは、チオール(Cys)とカルボン酸(Asp、Gluなど)とを有するアミノ酸の側鎖によって、チオエステルを形成すればよい。もうひとつの方法では、スベリン酸(オクタン二酸)といったジカルボン酸などの架橋剤を用いることで、アミノ酸側鎖の2つの官能基間に、遊離アミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、これらの組み合わせなどの結合を導入してもよい。

20

【0285】

いくつかの実施形態によれば、Qの $\alpha$ 螺旋を、疎水性のアミノ酸を $i$ 番目と $i+4$ 番目に取り込むことで安定させる。たとえば、 $i$ はTyrであってもよく、 $i+4$ はValまたはLeuであってもよい； $i$ はPheであってもよく、 $i+4$ はCysまたはMetであってもよい； $i$ はCysであってもよく、 $i+4$ はMetであってもよい；または $i$ はPheであってもよく、 $i+4$ はIleであってもよい。本明細書の目的で、ここに示した $i$ 番目のアミノ酸を $i+4$ 番目におくことができる一方、 $i+4$ 番目のアミノ酸を $i$ 番目におけるという意味で、上記のアミノ酸対形成を逆にしてもよいことを理解されたい。

30

【0286】

Qがグルカゴン関連ペプチドである本発明の他の実施形態によれば、QのC末端領域(野生型グルカゴンのアミノ酸番号の番号付けで12番目から29番目のアミノ酸のあたり)で、1個または2個以上の $\alpha$ 螺旋を安定させるアミノ酸を(アミノ酸置換または挿入のいずれかによって)取り込んで、 $\alpha$ 螺旋を安定させる。具体的な実施形態では、 $\alpha$ 螺旋を安定させるアミノ酸は、アミノイソ酪酸(Aib)あるいは、メチル、エチル、プロピル、 $n$ -ブチルから選択される同一の基または異なる基で二置換されたアミノ酸またはシクロオクタンまたはシクロヘプタン(1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸など)で二置換されたアミノ酸を含むがこれらに限定されるものではない、 $\alpha, \alpha$ -二置換アミノ酸である。いくつかの実施形態では、グルカゴン関連ペプチドの16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目または29番目のうち1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ以上を、 $\alpha, \alpha$ -二置換アミノ酸で置換する。具体的な実施形態では、16番目、20番目、21番目、24番目のうち1つ、2つ、3つまたはすべてを、Aibで置換する。

40

50

## 結合体

## 【0287】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のペプチド(Q)は、ジスルフィド結合などによって、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、N-アシル化、環化されるあるいは、または塩(酸付加塩、塩基付加塩など)に変換されるおよび/または任意に二量体化、多量体化または重合または結合される。本明細書で説明するように、Qは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド(クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドを含む)またはオステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体であってもよい。

10

## 【0288】

本開示は、Q-L-YのQがさらに異種部分に結合している結合体も包含する。Qと異種部分との結合は、共有結合、非共有結合(静電相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、塩結合、疎水性相互作用など)または両方のタイプの結合によって実施すればよい。ピオチン-アビジン、リガンド/受容体、酵素/基質、核酸/核酸結合タンパク質、脂質/脂質結合タンパク質、細胞接着分子の結合相手あるいは、互いに親和性のある任意の結合相手またはそれらの断片をはじめとして、多岐にわたる非共有結合系を利用できる。いくつかの態様では、共有結合はペプチド結合である。異種部分に対するQの結合は、間接的であっても直接的な結合であってもよく、間接的な場合には、リンカーまたはスペーサーが関与してもよい。好適なリンカーおよびスペーサーは、当分野で知られており、「アシル化およびアルキル化」および「結合基」のセクションならびに、「Qおよび/またはLの化学修飾」のサブセクションにて本明細書に記載されたリンカーまたはスペーサーを含むが、これらに限定されるものではない

20

## 【0289】

本明細書で使用する場合、「異種部分」という用語は「結合体部分」という用語と同義であり、自己が結合するQとは異なる(化学的または生化学的、天然またはコードされていない)分子を示す。Qに結合できる結合体部分の例として、異種ペプチドまたはポリペプチド(血漿タンパク質などを含む)、ターゲットするための薬剤、免疫グロブリンまたはその一部(可変領域、CDRまたはFc領域など)、放射性同位元素、フルオロフォアまたは酵素標識などの診断用標識、水溶性ポリマーをはじめとするポリマーまたは他の治療薬または診断薬があげられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、Qおよび血漿タンパク質を含む結合体が提供され、ここで、血漿タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、フィブリノーゲン、グロブリンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、結合体の血漿タンパク質部分は、アルブミンまたはトランスフェリンである。いくつかの実施形態における結合体は、Qと、ポリペプチド、核酸分子、抗体またはその断片、ポリマー、量子ドット、低分子、トキシシン、診断薬、炭水化物、アミノ酸のうち1つまたは2つ以上を有する。

30

C末端の異種部分

## 【0290】

いくつかの実施形態では、Qに結合している異種部分は、Qとは異なるペプチドであり、結合体は、融合ペプチドまたはキメラペプチドである。Qがグルカゴンスーパーファミリーのペプチドであるいくつかの実施形態では、異種部分は、1~21個のアミノ酸からなるペプチドの延長部分である。Qがグルカゴン関連ペプチド(クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドなど)である具体的な実施形態では、延長部分は、QのC末端、たとえば29番目のアミノ酸に結合する。いくつかの実施形態では、延長部分は、配列番号1610(GPSSGAPPPS)、配列番号1611(GGPS SGAPPPS-CONH<sub>2</sub>)、配列番号1614(KRNRNNIA)、配列番号1643(KRNR)またはKGK KNDWKHNI TQ(配列番号1613)のアミノ酸配列を有する。具体的な態様では、このアミノ酸配列は、29番目のアミノ酸などのQのC末端のアミノ酸を介して結合している。いくつかの実施形態では、配列番号1610、1611、1613、1614、1643の

40

50

アミノ酸配列を、ペプチド結合によってペプチドの29番目のアミノ酸に結合する。いくつかの具体的な実施形態では、グルカゴン関連ペプチドの29番目のアミノ酸（クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドなど）はGlyであり、このGlyは、配列番号1610、1611、1613、1614、1643のアミノ酸配列のうちの1つに結合する。

ポリマーの異種部分

【0291】

いくつかの実施形態では、Qに結合している異種部分は、ポリマーである。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレンおよびこれらの誘導体（ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレートなど）、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルのポリマー（ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）など）、ポリビニルポリマー（ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリ（ビニルアセテート）、ポリビニルピロリドンなど）、ポリグリコライド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびこれらのコポリマー、セルロース（アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース、セルロース硫酸ナトリウム塩など）、ポリプロピレン、ポリエチレン（ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレンテレフタレート）など）、ポリスチレンからなる群から選択される。

【0292】

いくつかの態様では、ポリマーは、合成生分解性ポリマー（乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ酸無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド-コカプロラクトン）など）、天然の生分解性ポリマー（たとえば、アルギン酸および他の多糖類（デキストランおよびセルロースを含む）、コラーゲン、これらの化学的誘導体（置換、化学基の付加、たとえば、アルキル、アルキレン、ヒドロキシル化、酸化ならびに、当業者によって常法でなされる他の修飾）、アルブミンおよび他の親水性タンパク質（ゼインおよび他のプロラミンおよび疎水性タンパク質など））ならびにこれらのコポリマーまたは混合物を含む、生分解性ポリマーである。通常、これらの物質は、in vivoでの酵素による加水分解または水への曝露によって、あるいは表面が浸食されたり、内部まで一挙に浸食されたりすることで、分解される。

【0293】

いくつかの態様では、ポリマーは、H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587（その教示内容を本明細書に援用する）に記載された生浸食性ハイドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ酸無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸、キトサン、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）などの生付着性ポリマーである。

【0294】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、水溶性ポリマーまたは親水性ポリマーである。親水性ポリマーについては、本明細書の「親水性の異種部分」でさらに説明する。好適な

水溶性ポリマーは当分野で知られており、たとえば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC；Klucel）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC；Methocel）、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシプロピルブチルセルロース、ヒドロキシプロピルペンチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース（Ethocel）、ヒドロキシエチルセルロース、さまざまなアルキルセルロースおよびヒドロキシアルキルセルロース、さまざまなセルロースエーテル、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルシウムカルボキシメチルセルロース、酢酸ビニル/クロトン酸コポリマー、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、ヒドロキシメチルメタクリレート、メタクリル酸コポリマー、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、無水マレイン酸/メチルビニルエーテルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウムおよびポリアクリル酸カルシウム、ポリアクリル酸、酸性カルボキシポリマー、カルボキシポリメチレン、カルボキシビニルポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポリメチルビニルエーテルコ無水マレイン酸、カルボキシメチルアミド、カリウムメタクリレートジビニルベンゼンコポリマー、ポリオキシエチレングリコール、ポリエチレンオキシドならびに、これらの誘導体、塩および組み合わせがあげられる。

10

**【0295】**

具体的な実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）などをはじめとするポリアルキレングリコールである。

20

**【0296】**

いくつかの実施形態では、異種部分は炭水化物である。いくつかの実施形態では、炭水化物は、単糖（グルコース、ガラクトース、フルクトースなど）、二糖（スクロース、ラクトース、マルトースなど）、オリゴ糖（ラフィノース、スタキオースなど）、多糖（スターチ、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナンである。

**【0297】**

いくつかの実施形態では、異種部分は脂質である。いくつかの実施形態における脂質は、脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミン）、グリセロ脂質（一置換グリセロール、二置換グリセロール、三置換グリセロールなど）、グリセロリン脂質（ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなど）、スフィンゴ脂質（スフィンゴシン、セラミドなど）、ステロール脂質（ステロイド、コレステロールなど）、フェノール脂質、糖脂質またはポリケタイド、オイル、ワックス、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質である。

30

Fc融合異種部分

**【0298】**

上述したように、いくつかの実施形態では、Qは、免疫グロブリンまたはその一部（可変領域、CDRまたはFc領域など）に結合する（融合するなど）。本明細書で説明するように、Qは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド（クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドを含む）またはオステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体であってもよい。周知のタイプの免疫グロブリン（Ig）には、IgG、IgA、IgE、IgDまたはIgMがある。Fc領域は、Ig重鎖のC末端領域であって、再利用（半減期の延長になる）、抗体依存性細胞介在性細胞障害（ADCC）、補体依存性細胞障害（CDC）などの作用を行うFc受容体に結合する役割を担う。

40

**【0299】**

たとえば、いくつかの定義によれば、ヒトIgGの重鎖Fc領域は、重鎖の226番目のシステインからC末端までの範囲である。「ヒンジ領域」は通常、ヒトIgG1の216番目のグルタミン酸から230番目のプロリンまでの範囲である（他のIgGイソタイ

50



プのヒンジ領域については、システイン結合に関与するシステインをアラインすることで、I g G 1 配列とアラインすることができる)。I g G の F c 領域は、2つの定常ドメインであるC H 2 とC H 3 を有する。ヒトI g G のF c 領域のC H 2 ドメインは通常、231番目のアミノ酸から341番目のアミノ酸までの範囲である。ヒトI g G のF c 領域のC H 3 ドメインは通常、342番目～447番目のアミノ酸の範囲である。免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片または領域のアミノ酸番号の表記はいずれも、Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Mdに基づいている。関連の実施形態では、F c 領域は、C H 1 以外に、免疫グロブリン重鎖の1つまたは2つ以上の天然の定常領域または修飾された定常領域(I g G およびI g A のC H 2 領域およびC H 3 領域あるいは、I g E のC H 3 領域およびC H 4 領域)を有するものであってもよい。

10

#### 【0300】

好適な結合体部分は、F c R n 結合部位を含む免疫グロブリン配列の一部を有する。サルベージ受容体であるF c R n は、免疫グロブリンを再利用し、これを血液循環に戻す役割を担う。F c R n 受容体に結合するI g G のF c 部分の領域は、X線結晶解析に基づいて説明されている(Burmeister et al., 1994, Nature 372:379)。F c とF c R n との主な接触領域は、C H 2 とメインとC H 3 ドメインの接合部付近である。F c とF c R n との接点はいずれも、単一のI g 重鎖の範囲内にある。主要な接触部位は、C H 2 ドメインの248番目、250番目～257番目、272番目、285番目、288番目、290番目～291番目、308番目～311番目、314番目のアミノ酸残基およびC H 3 ドメインの385番目～387番目、428番目、433番目～436番目のアミノ酸残基を含む。

20

#### 【0301】

いくつかの結合体部分は、F c y R 結合部位(単数または複数)を有するものであってもよいし、そうでなくてもよい。F c y R は、A D C C およびC D C を担う。F c y R と直接接するF c 領域内の位置の例は、234番目～239番目のアミノ酸(ヒンジ領域内の下側)、265番目～269番目のアミノ酸(B / C ループ)、297番目～299番目のアミノ酸(C' / E ループ)、327番目～332番目のアミノ酸(F / G) ループである(Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000)。I g E のヒンジ領域内の下側は、F c R I 結合にも関与している(Henry, et al., Biochemistry 36, 15568-15578, 1997)。I g A 受容体結合に関与する残基が、Lewis et al., (J Immunol. 175:6694-701, 2005)に記載されている。I g E 受容体結合に関与するアミノ酸残基は、Sayers et al. (J Biol Chem 279(34):35320-5, 2004)に記載されている。

30

#### 【0302】

アミノ酸修飾を、免疫グロブリンのF c 領域に対して実施してもよい。このような変異したF c 領域は、F c 領域のC H 3 ドメイン(342番目～447番目の残基)での少なくとも1つのアミノ酸修飾および/またはF c 領域のC H 2 ドメイン(231番目～341番目の残基)での少なくとも1つのアミノ酸修飾を有する。F c R n に対する親和性を高めると考えられている変異として、T256A、T307A、E380A、N434A があげられる(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem 276:6591)。他の変異が、F c R n に対する親和性を有意に低下させることなく、F c y R I、F c y R I I A、F c y R I I B および/またはF c y R I I I A へのF c 領域の結合を低下させてもよい。たとえば、F c 領域の297番目のA s n をA l a または他のアミノ酸で置換すると、高度に保存されたN - グリコシル化部位がなくなり、F c 領域の半減期の延長を伴う免疫原性を低下させ、F c y R に対する結合を低下させるかもしれない(Routledge et al., 1995, Transplantation 60:847; Friend et al., 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al., 1995, J. Biol. Chem 276:6591)。F c y R への結合を低下させるI g G 1 の233番目～236番目のアミノ酸修飾がなされている(Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77およびArmour et al., 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613)。いくつかのアミノ酸置換例が、米国特許第7,355,008号および同第7,381,408号(各

40

50

々の全体を本明細書に援用する)に記載されている。

親水性の異種部分

### 【0303】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のQは、親水体に共有結合している。本明細書で説明するように、Qは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド、グルカゴン関連ペプチド(クラス1、クラス2、クラス3、クラス4またはクラス5のグルカゴン関連ペプチドを含む)またはオステオカルシン、カルシトニン、アミリンまたはその類縁体、誘導体または結合体であってもよい。親水体は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるのに用いられる任意の好適な条件下で、Qに結合可能である。標的化合物(アルデヒド基、アミノ基、エステル基、チオール基、 $\alpha$ -ハロアセチル基、マレイミド基またはヒドラジノ基など)の反応性基に、PEG部分(アルデヒド基、アミノ基、エステル基、チオール基、 $\alpha$ -ハロアセチル基、マレイミド基またはヒドラジノ基など)の反応性基を介して結合させる、アシル化、還元的アルキル化、マイケル付加、チオールアルキル化または他の化学選択的結合/ライゲーション方法をはじめとして、当分野で知られたどのような手段を用いてもよい。水溶性ポリマーを1つまたは2つ以上のタンパク質に結合するのに用いられる活性化基として、限定することなく、スルホン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート、アジリジン、オキシラン、5-ピリジル、 $\alpha$ -ハロゲン化アシル基( $\alpha$ -ヨード酢酸、 $\alpha$ -ブromo酢酸、 $\alpha$ -クロロ酢酸など)があげられる。還元的アルキル化によってペプチドに結合する場合、重合度を制御できるように、選択するポリマーは、単一の反応性アルデヒドを有するものでなければならない。たとえば、Kinstler et al., Adv. Drug. Delivery Rev. 54: 477-485 (2002); Roberts et al., Adv. Drug Delivery Rev. 54: 459-476 (2002); Zalipsky et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16: 157-182 (1995)を参照のこと。

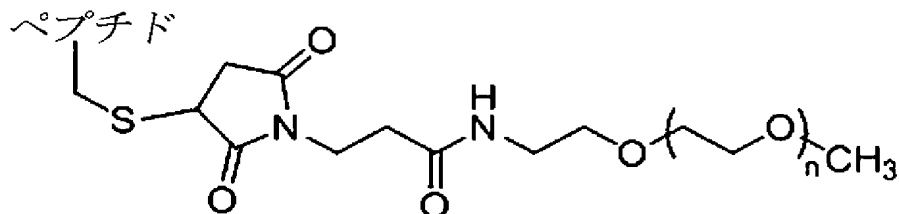
10

20

### 【0304】

親水体(水溶性ポリマー)をタンパク質に結合するのに用いられる他の活性化基として、 $\alpha$ -ハロゲン化アシル基( $\alpha$ -ヨード酢酸、 $\alpha$ -ブromo酢酸、 $\alpha$ -クロロ酢酸など)があげられる。具体的な態様では、チオールを有するペプチドのアミノ酸残基を、PEGなどの親水体で修飾する。いくつかの実施形態では、チオールを有するQのアミノ酸を、マイケル付加反応においてマレイミド活性化PEGで修飾し、以下に示すチオエーテル結合を有するPEG化ペプチドを得る。

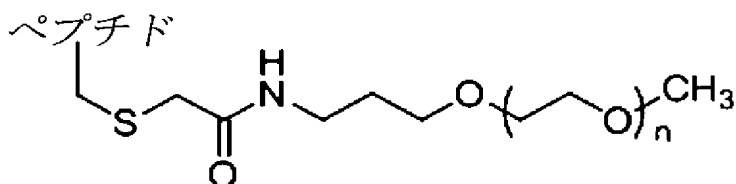
30



### 【0305】

いくつかの実施形態では、Qのアミノ酸のチオールを、求核置換反応においてハロアセチル活性化PEGで修飾し、以下に示すチオエーテル結合を有するPEG化ペプチドを得る。

40



### 【0306】

好適な親水体として、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール(POGなど)、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポ

50

リオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール（P O G）、ポリオキシアルキレン、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、モノメトキシ－ポリエチレングリコール、モノ－（C 1～C 10）アルコキシ－またはアリールオキシ－ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ポリアセタール、ポリビニルアルコール（P V A）、ポリビニルピロリドン、ポリ－1, 3－ジオキソラン、ポリ－1, 3, 6－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリ（ $\beta$ －アミノ酸）（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、ポリ（n－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー（P P G）および他のポリアルキレンオキシド、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、コロン酸または他の多糖ポリマー、Ficollまたはデキストランおよびこれらの混合物があげられる。デキストランは、 $\alpha$  1～6 結合によって優先的に結合するグルコースサブユニットの多糖ポリマーである。デキストランは、約 1 k D～約 100 k D あるいは、約 5、10、15 または 20 k D から約 20、30、40、50、60、70、80 または 90 k D など、多くの分子量範囲で入手可能である。

10

20

30

40

50

#### 【0307】

いくつかの実施形態によるポリエチレングリコール鎖などの親水体は、分子量が、約 500～約 40,000 ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、分子量が、約 500～約 5,000 ダルトンまたは約 1,000～約 5,000 ダルトンの範囲から選択される。もうひとつの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖などの親水体は、分子量が、約 10,000～約 20,000 ダルトンである。さらに他の例示としての実施形態では、ポリエチレングリコール鎖などの親水体は、分子量が約 20,000～約 40,000 ダルトンである。

#### 【0308】

直鎖状または分岐状の親水性ポリマーが考えられている。得られる結合体の調製物は、基本的に単分散であっても多分散であってもよく、ペプチド 1 つあたり約 0.5 個、0.7 個、1 個、1.2 個、1.5 個または 2 個のポリマー部分を有するものであってもよい。

#### 【0309】

いくつかの実施形態では、ペプチドの天然のアミノ酸を、親水体との架橋に適した側鎖を有するアミノ酸で置換し、ペプチドに対する親水体の結合を容易にする。アミノ酸の例として、C y s、L y s、O r n、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニン（A c - P h e）があげられる。他の実施形態では、親水基を含むように修飾されたアミノ酸を、C 末端でペプチドに付加する。

#### 【0310】

いくつかの実施形態では、結合体のペプチドを、ペプチドのアミノ酸の側鎖と親水体との間の共有結合によって、P E G などの親水体に結合する。Q がクラス 1、クラス 2、クラス 3、クラス 4 またはクラス 5 のグルカゴン関連ペプチドであるいくつかの実施形態では、16 番目、17 番目、21 番目、24 番目、29 番目、40 番目のアミノ酸の側鎖、C 末端の延長部分の範囲内にある位置あるいは、C 末端のアミノ酸またはこれらの位置の組み合わせを介して、親水体にペプチドを結合する。いくつかの態様では、親水体に共有結合しているアミノ酸（親水体を有するアミノ酸など）は、C y s、L y s、O r n、ホモシステインまたは A c - P h e であり、アミノ酸の側鎖が親水体（P E G など）に共有結合している。

r P E G の異種部分

#### 【0311】

いくつかの実施形態では、本発明の結合体は、国際特許出願公開第 W O 2009 / 023270 号および米国特許出願第 U S 2008 / 0286808 号に記載されているような、化学的 P E G（組換え P E G（r P E G）分子など）に類似の伸長した構造を形成できる補助ペプチドに融合した Q を有する。r P E G 分子は、ポリエチレングリコールでは

ない。いくつかの態様における r P E G 分子は、グリシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンまたはプロリンのうちの 1 個または 2 個以上を有するポリペプチドである。いくつかの態様では、r P E G は、ポリグリシン、ポリセリン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリアラニンまたはポリプロリンなどのホモポリマーである。他の実施形態では、r P E G は、poly ( G l y - S e r )、poly ( G l y - G l u )、poly ( G l y - A l a )、poly ( G l y - A s p )、poly ( G l y - P r o )、poly ( S e r - G l u ) など、2 つのアミノ酸の繰り返し構造を含む。いくつかの態様では、r P E G は、poly ( G l y - S e r - G l u ) など、3 つの異なるアミノ酸を含む。具体的な態様では、r P E G は、Q の半減期を長くする。いくつかの態様では、r P E G は、全体として正の電荷または全体として負の電荷を有する。いくつかの態様における r P E G には、二次構造が欠けている。いくつかの実施形態では、r P E G は、アミノ酸 10 個以上の長さであり、いくつかの実施形態では、アミノ酸約 40 ~ 約 50 個の長さである。いくつかの態様における補助ペプチドは、ペプチド結合またはプロテイナーゼ切断部位を介して本発明のペプチドの N 末端または C 末端に融合されるか、本発明のペプチドのループに挿入される。いくつかの態様における r P E G は、親和性タグを有するか、5 k D a よりも大きい P E G に結合する。いくつかの実施形態では、r P E G は、本発明の結合体の流体力学半径を大きくし、血清半減期を延ばし、プロテアーゼ耐性を高めるまたは溶解性を高め、いくつかの態様では、結合体の免疫原性を低下させる。

10

20

30

40

50

#### 【 0 3 1 2 】

ペプチドの標的にされるアミノ酸残基と、これらの標的にされるアミノ酸の選択された側鎖あるいは、N 末端または C 末端の残基と反応できる有機誘導体化剤とを反応させることで、Q を直接的な共有結合によって結合体部分に結合することが可能である。結合体部分またはペプチドの反応性基として、アルデヒド基、アミノ基、エステル基、チオール基、 $\alpha$  - ハロアセチル基、マレイミド基またはヒドラジノ基があげられる。誘導体化剤として、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル ( システイン残基を介した結合 )、N - ヒドロキシスクシンイミド ( リジン残基を介して )、グルタルアルデヒド、無水コハク酸または当分野で知られた他の薬剤があげられる。あるいは、多糖キャリアまたはポリペプチドキャリアなどの中間キャリアを使用して、結合体部分をペプチドに間接的に結合することも可能である。多糖キャリアの例として、アミノデキストランがあげられる。好適なポリペプチドキャリアの例として、結合させたキャリアに望ましい溶解特性を与えるための、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、これらのコポリマーならびに、これらのアミノ酸と他のアミノ酸、たとえばセリンの混合ポリマーがあげられる。

#### マルチマー

#### 【 0 3 1 3 】

クラス 1、クラス 2、クラス 3 のグルカゴン関連ペプチドに関して、Q は、リンカーを介して結合した少なくとも 2 つ、3 つまたは 4 つ以上のペプチドを含むダイマー、トリマーまたはさらに高次のマルチマーの一部であってもよく、ここで、少なくとも一方または両方のペプチドが、グルカゴン関連ペプチドである。ダイマーは、ホモダイマーであってもヘテロダイマーであってもよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、二官能性チオールクロスリンカーおよび二官能性アミнокロスリンカーからなる群から選択される。特定の実施形態では、リンカーは、P E G、たとえば、5 k D a の P E G、20 k D a の P E G である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ジスルフィド結合である。たとえば、ダイマーの各モノマーは、C y s 残基 ( 末端または末端以外の C y s など ) を含むものであってもよく、各 C y s 残基の硫黄原子は、ジスルフィド結合の形成に関与する。本発明のいくつかの態様では、末端のアミノ酸 ( N 末端または C 末端など )、末端以外のアミノ酸あるいは、少なくとも 1 個のモノマーの末端のアミノ酸と少なくとも 1 個の他のモノマーの末端以外のアミノ酸とを介して、モノマー同士が結合する。特定の態様では、モノマーは、N 末端のアミノ酸を介して結合する。いくつかの態様では、マルチマーのモノマ

ーは、各モノマーのC末端のアミノ酸が互いに結合する、「尾と尾」の向きで互いに結合している。結合体部分は、ダイマー、トリマーまたはさらに高次のマルチマーをはじめとして、本明細書に記載のどのグルカゴン関連ペプチドと共有結合していてもよい。

Qに対する異種部分の結合

【0314】

異種部分は、「結合基」のセクションおよび「Qおよび/またはYの化学修飾」のサブセクションで説明する架橋方法や結合方法に従って、ペプチド(Q)に結合している。

Qの生成方法

【0315】

本明細書に開示のペプチド(Q)は、標準的な合成方法、組換えDNA技術あるいは、ペプチドおよび融合タンパク質を調製する他の任意の方法で、調製できるものである。非天然のアミノ酸の中には標準的な組換えDNA技術では発現できないものもあるが、これらを調製するための技術は、当分野で知られている。非ペプチド部分を包含する本発明の化合物を、適切な場合は標準的なペプチド化学反応に加えて、標準的な有機化学反応で合成してもよい。

【0316】

本開示のペプチドは、当分野で知られた方法によって得られる。ペプチドを新たに合成する好適な方法は、たとえば、Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom 2005; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom 2000; 米国特許第5,449,752号に記載されている。

【0317】

また、本開示のペプチドが、コードされていないアミノ酸すなわち非天然のアミノ酸を含まない場合、標準的な組換え方法を使用して、そのペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸を使用して、ペプチドを組換え的に製造することが可能である。たとえば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; および Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照のこと。

【0318】

いくつかの実施形態では、本開示のペプチドは、単離されている。いくつかの実施形態では、本開示のペプチドは、精製されている。「純度」は相対的な表現であり、必ずしも、絶対値としての純度または絶対値としての濃縮または絶対値を選択したものとして解釈されるものではないことは、自明である。いくつかの態様では、純度は、少なくともまたは約50%であり、少なくともまたは約60%、少なくともまたは約70%、少なくともまたは約80%または少なくともまたは約90%(たとえば、少なくともまたは約91%、少なくともまたは約92%、少なくともまたは約93%、少なくともまたは約94%、少なくともまたは約95%、少なくともまたは約96%、少なくともまたは約97%、少なくともまたは約98%、少なくともまたは約99%または約100%である。

【0319】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、Synpep(Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp.(Gaithersburg, MD)およびMultiple Peptide Systems(San Diego, CA)などの企業によって、商業的に合成されている。この点において、ペプチドは、合成、組換え、単離および/または精製可能なものである。

【0320】

グルカゴン関連ペプチド(Q)のクラスについて、下記において詳細に説明する。クラス1、クラス2、クラス3、クラス4、クラス5のグルカゴン関連ペプチドに関して開示する各セクションでは、上記にて詳細に説明したQ-L-Y結合体のグルカゴン関連ペプチド部分(Q)の修飾について説明する。よって、グルカゴン関連ペプチドのクラスに関

して説明する構成要素は、上述したようなQ - L - Y結合体を生成するように後にさらに修飾されるQの構成要素である。

#### クラス1のグルカゴン関連ペプチド

##### 【0321】

特定の実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、クラス1のグルカゴン関連ペプチドであり、これは、本明細書および国際特許出願公開第WO2009/155257号(2009年12月23日公開)、同第WO2008/086086号(2008年7月17日公開)、同第WO2007/056362号(2007年5月18日公開)に記載されている(その内容全体を本明細書に援用する)。

##### 【0322】

クラス1のグルカゴン関連ペプチドに関する、以下のセクションに示す生物学的配列(配列番号801~915)は、国際特許出願公開第WO2009/155257号の配列番号1~115に対応する。

活性

##### 【0323】

クラス1のグルカゴンペプチドは、天然のグルカゴンペプチドに対するグルカゴン受容体の活性を保持する(配列番号801)。たとえば、グルカゴンペプチドは、天然のグルカゴンの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%または90%を保持できる(グルカゴンに対するグルカゴンペプチドのEC<sub>50</sub>の反比として算出され、たとえば、実施例2で概要を説明するアッセイを用いて、cAMPの産生を基準に判断できる)。いくつかの実施形態では、クラス1のグルカゴン関連ペプチドは、活性(activity)(本明細書では、「活性(potency)」という用語と同義に用いられる)が、グルカゴンと同一またはそれよりも高い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のグルカゴンペプチドは、天然のグルカゴンペプチドと比較して、活性が最大で約100%、約1000%、約10,000%、約100,000%または約1,000,000%である。

##### 【0324】

本明細書に記載のクラス1のグルカゴン関連ペプチドはいずれも、ヒトグルカゴン受容体に対するEC<sub>50</sub>が、実施例2に記載のアッセイなどを用いて、グルカゴン受容体を過剰発現するHEK293細胞においてcAMP誘導を試験すると、約100nM、約75nM、約50nM、約40nM、約30nM、約20nM、約10nM、約5nM、約1nMまたはそれ未満であってもよい。一般に、PEG化ペプチドは、PEG化されていないペプチドよりもEC<sub>50</sub>が高い。たとえば、本明細書に記載のクラス1のグルカゴン関連ペプチドは、PEG化されていないとき、グルカゴン受容体に対する活性が、グルカゴン受容体に対する天然のグルカゴン(配列番号801)の活性と比較して、少なくとも20%(少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、100%、150%、200%、400%、500%またはそれよりも高いなど)であり得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のクラス1のグルカゴン関連ペプチドは、親水体がない場合にはグルカゴン受容体に対して天然のグルカゴンの表記の活性(%)を示すが、親水体を有するときは、グルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの活性(%)が低下する。たとえば、本明細書に記載のクラス1のグルカゴン関連ペプチド、PEG化されているとき、は、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの活性と比較して、少なくとも2%(少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%または少なくとも10%など)であってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクラス1のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対して上述した活性のどれを示すものであってもよいが、最大で天然のグルカゴンの活性の1000%、10,000%、100,000%または1,000,000%である。

##### 【0325】

いくつかの実施形態では、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1 受容体に対する活性が、天然の GLP-1 の約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満または約 1 % 未満であるおよび / またはグルカゴン受容体に対する選択性が、GLP-1 受容体に対する選択性の約 5 倍より高い、約 10 倍より高いまたは約 15 倍より高い。たとえば、いくつかの実施形態では、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1 受容体に対する活性が、天然の GLP-1 の 5 % 未満であり、グルカゴン受容体に対する選択性が、GLP-1 受容体に対する選択性の 5 倍より高い。

溶解性の改善

【0326】

天然のグルカゴンは、特に生理的な pH で水溶液に対する溶解性が低く、時間が経過するにつれて凝集および沈殿しやすい。これとは対照的に、いくつかの実施形態におけるクラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、pH 6 ~ 8 または 6 ~ 9、たとえば pH 7 にて、25 °C で 24 時間後に、天然のグルカゴンと比較して、溶解性が少なくとも 2 倍、5 倍またはそれよりも高い。

10

【0327】

したがって、いくつかの実施形態では、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドを、His - Ser - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - Ser - Arg - Arg - Ala - Gln - Asp - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Met - Asn - Thr (配列番号 801) の野生型ペプチドに比して修飾して、天然のペプチドの生物学的活性を維持したまま、特に約 5.5 ~ 約 8.0 の範囲の pH で、水溶液に対するペプチドの溶解性を改善してある。

20

【0328】

たとえば、親水体をペプチドに結合することによって、本明細書に記載のクラス 1 のグルカゴン関連ペプチドの溶解性を、さらに改善することが可能である。このような基を導入すると、作用時間が長くなるが、これは血中半減期が延びることを基準に判断できるものである。親水体については、本明細書でさらに説明する。

電荷をもつ残基を用いた修飾

【0329】

いくつかの実施形態では、天然の電荷を持たないアミノ酸を、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸で置換するか、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に、電荷を持つアミノ酸を付加することによって、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドに電荷を付加して溶解性を改善する。

30

【0330】

いくつかの実施形態によれば、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、ペプチドが、アミノ酸置換および / または電荷を持つアミノ酸をペプチドの C 末端領域に導入する付加ならびに、いくつかの実施形態では、配列番号 801 の 27 番目より C 末端側の位置に導入する付加によって修飾されるという事実がゆえに、溶解性が改善されている。任意に、電荷を持つ、1 個、2 個または 3 個のアミノ酸を、C 末端領域内に導入してもよく、いくつかの実施形態では、27 番目より C 末端側に導入してもよい。いくつかの実施形態によれば、28 番目および / または 29 番目の天然のアミノ酸 (単数または複数) を、電荷を持つアミノ酸で置換および / または電荷を持つ 1 ~ 3 個のアミノ酸を、たとえば 27 番目の後、28 番目の後または 29 番目の後など、ペプチドの C 末端に付加する。例示としての実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうち、1 個、2 個、3 個またはすべてが、負の電荷を持つ。他の実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうち、1 個、2 個、3 個またはすべてが、正の電荷を持つ。

40

【0331】

一例としての具体的な実施形態では、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、以下の修飾のうち 1 つまたは 2 つを有するものであってもよい。28 番目の N から E への置換、2

50

8 番目の N から D への置換、29 番目の T から D への置換、29 番目の T から E への置換、27 番目、28 番目または 29 番目の後ろに E の挿入、27 番目、28 番目または 29 番目の後ろに D の挿入。たとえば、DE (28 番目と 29 番目)、EE (28 番目と 29 番目)、EE (29 番目と 30 番目)、EE (28 番目と 30 番目)、DE (28 番目と 30 番目)。

#### 【0332】

一例としての一実施形態によれば、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号 811 のアミノ酸配列あるいは、天然のグルカゴンと比較して 1 ~ 3 個のアミノ酸修飾 (本明細書ではグルカゴンアゴニストに関連して説明) をさらに有する類縁体のアミノ酸配列またはそのグルカゴンアゴニスト類縁体。配列番号 811 は、天然タンパク質の 28 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸で置換されている、修飾されたクラス 1 のグルカゴン関連ペプチドを表す。もうひとつの例示としての実施形態では、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、天然タンパク質の 28 番目のアスパラギン残基がグルタミン酸で置換されている、配列番号 838 のアミノ酸配列を有する。他の例示としての実施形態は、配列番号 824、825、826、833、835、836、837 のクラス 1 のグルカゴン関連ペプチドを含む。

10

#### 【0333】

28 番目および / または 29 番目の普通に生じるアミノ酸を、電荷を持つアミノ酸で置換することおよび / またはクラス 1 のグルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端に電荷を持つ 1 個または 2 個のアミノ酸を付加することで、生理的に関連する pH (すなわち、pH 約 6.5 ~ 約 7.5) での水溶液に対するグルカゴンペプチドの溶解性および水溶液中での安定性が、少なくとも 5 倍高まり、30 倍になるほど高まる。したがって、いくつかの実施形態でのクラス 1 のグルカゴンペプチドは、グルカゴン活性を保持し、25℃で 24 時間後に測定すると、約 5.5 ~ 約 8 の特定の pH、たとえば pH 7 で、天然のグルカゴンと比較して、少なくとも 2 倍、5 倍、10 倍、15 倍、25 倍、30 倍またはそれよりも高い溶解性を示す。

20

#### 【0334】

グルカゴン活性を保つことのできる、保存的な置換などの追加の修飾 (本明細書でさらに説明する) を、クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドに対してほどこしてもよい。

30

安定性の改善

#### 【0335】

クラス 1 のグルカゴンペプチドはいずれも、安定性が改善および / または分解が低減されることがあり、たとえば、25℃で 24 時間後にもとのペプチドの少なくとも 95% を保持する。本明細書に開示のクラス 1 のグルカゴン関連ペプチドはいずれも、5.5 ~ 8 の範囲内の pH で安定性が改善されることがあり、たとえば、25℃で 24 時間後に、もとのペプチドの少なくとも 75%、80%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% を保持する。いくつかの実施形態では、本発明のクラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、ペプチドの濃度の少なくとも 75% (少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、95% を超える、最大 100% など) または分解されたペプチドの約 25% 未満 (20% 未満、15% 未満、10% 未満、5% 未満、4% 未満、3% 未満、2% 未満、1% 未満、0% までなど) が、280 nm で紫外線 (UV) 検出器によって、約 1 週間または 2 週間以上 (約 2 週間、約 4 週間、約 1 か月、約 2 か月、約 4 か月、約 6 か月、約 8 か月、約 10 か月、約 12 か月など) 後に、少なくとも 20℃ (21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、少なくとも 27.5℃、少なくとも 30℃、少なくとも 35℃、少なくとも 40℃、少なくとも 50℃ など) かつ 100℃ 未満、85℃ 未満、75℃ 未満または 70℃ 未満の温度の溶液で検出可能であるように安定性が改善される。クラス 1 のグルカゴン関連ペプチドは、たとえば、活性の増大、血中半減期の延長、寿命の延長、沈殿または凝集の低減および / または分解の低減 (保管後に切断または化学修飾が生じるのを低減するなど) といった、ペプチドの薬学的特性を変化させる追加の修飾を有するものであってもよい。

40

50



## 【0336】

一例としてのさらに別の実施形態では、特に酸性バッファーまたはアルカリ性バッファーでの経時的なペプチドの分解を低減するように、配列番号801の15番目のアミノ酸を修飾することによって、上記のクラス1のグルカゴン関連ペプチドのいずれかをさらに修飾して安定性を改善してもよい。例示としての実施形態では、15番目のAspを、Glu、ホモグルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸で置換する。

## 【0337】

あるいは、配列番号801の16番目のアミノ酸を修飾することで、本明細書に記載のクラス1のグルカゴン関連ペプチドのいずれかをさらに修飾して安定性を改善してもよい。例示としての実施形態では、16番目のSerを、ThrまたはAlaで置換するか、グルカゴン受容体に対する活性を増強する、クラス1のグルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に記載のアミノ酸置換のいずれかのアミノ酸で置換する。このような修飾は、15番目のアスパラギン酸と16番目のセリンとの間のペプチド結合の切断を低減するものである。

## 【0338】

いくつかの実施形態では、2さまざまなアミノ酸位置での分解を低減するように、0番目、21番目、24番目または27番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所または4箇所すべてを修飾することによって、本明細書に記載のクラス1のグルカゴン関連ペプチドのいずれかをさらに修飾してもよい。例示としての実施形態は、20番目のGlnから、Ser、Thr、AlaまたはAlaへの置換、21番目のAspからGluへの置換、24番目のGlnからAlaまたはAlaへの置換、27番目のMetからLeuまたはLeuへの置換を含む。メチオニンを除去または置換すると、メチオニンの酸化による分解が低減される。GlnまたはAsnを除去または置換すると、GlnまたはAsnの脱アミド化による分解が低減される。Aspを除去または置換すると、Aspが脱水し、環状スクシンイミド中間体を形成した後、イソアスパラギン酸へ異性体化することで生じる分解が低減される。

増強された活性

## 【0339】

もうひとつの実施形態によれば、グルカゴン受容体に対する活性が増強された、天然のグルカゴン（配列番号801）の16番目にアミノ酸修飾を有するクラス1のグルカゴン関連ペプチドが提示される。非限定的な例として、このような増強された活性は、16番目の天然のセリンを、グルタミン酸で置換あるいは、原子4個の長さの側鎖を有する別の負の電荷を持つアミノ酸で置換あるいは、グルタミン、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸のうちの任意の1つで置換あるいは、少なくとも1個のヘテロ原子（N、O、S、Pなど）を含有し、原子約4個（または3個～5個）の長さの側鎖を有する電荷を持つアミノ酸で置換することによって、与えられるものである。16番目のセリンをグルタミン酸で置換すると、グルカゴン受容体に対するグルカゴン活性が、少なくとも2倍、4倍、5倍、最大10倍大きくなる。いくつかの実施形態では、クラス1のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する選択性を、GLP-1受容体に対し、たとえば、少なくとも5倍、10倍または15倍保持する。

DPP-IV耐性

## 【0340】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示のクラス1のグルカゴンペプチドを1番目または2番目でさらに修飾し、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対する感受性を低減する。特に、いくつかの実施形態では、クラス1のグルカゴン関連ペプチドの1番目および/または2番目を、本明細書に記載のDPP-IV耐性アミノ酸（単数または複数）で置換する。いくつかの実施形態では、類縁体ペプチドの2番目を、アミノイソ酪酸で置換する。いくつかの実施形態では、類縁体ペプチドの2番目を、D-セリン、D-アラニン、グリシン、N-メチルセリン、ε-アミノ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換する。もうひとつの実施形態では、クラス1のグルカゴン関連ペプチドの2番目を

、D - セリン、グリシン、アミノイソ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換する。いくつかの実施形態では、2 番目のアミノ酸はD - セリンではない。

【0341】

グルカゴンペプチドのC末端領域（アミノ酸12番目～29番目のあたり）におけるα螺旋構造を安定化することで、グルカゴンペプチドの1番目および/または2番目のアミノ酸の修飾時におけるグルカゴン活性の低下を回復することが可能である。α螺旋構造については、本明細書にてさらに説明するように、12番目～29番目のあたりでの共有結合または非共有結合の分子内架橋の形成（たとえば、「i」番目と「i + 4」番目のアミノ酸の側鎖間のラクタム架橋であって、この場合のiは12～25の整数である）、α螺旋を安定化するアミノ酸（α, α - 二置換アミノ酸など）でのアミノ酸の置換および/またはその挿入などによって、安定させることが可能である。

10

3 番目の修飾

【0342】

3 番目の天然のグルタミンから、酸性、塩基性または疎水性のアミノ酸への置換などの（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）3 番目のアミノ酸修飾によって、グルカゴン受容体の活性を低減してもよい。たとえば、3 番目をグルタミン酸、オルニチンまたはノルロイシンで置換すると、グルカゴン受容体の活性が実質的に低減または破壊される。

【0343】

3 番目のグルタミンを本明細書に記載のグルタミン類縁体で修飾することによって、グルカゴン受容体に対する活性を維持または増強してもよい。たとえば、グルカゴンアゴニストは、配列番号863、配列番号869、配列番号870、配列番号871、配列番号872、配列番号873、配列番号874のアミノ酸配列を含むものであってもよい。C末端のアミドおよびエステルによるGLP - 1活性の増強

20

【0344】

C末端のアミノ酸のカルボン酸を、アミドまたはエステルなどの電荷が中性の基で置換することによって、GLP - 1受容体に対する活性が増強される。逆に、ペプチドのC末端における天然のカルボン酸を保持すると、クラス1のグルカゴン関連ペプチドの、GLP - 1受容体に対するグルカゴン受容体の選択性が比較的高く維持される（約5倍より高い、約6倍より高い、約7倍より高い、約8倍より高い、約9倍より高い、約10倍より高い、約11倍より高い、約12倍より高い、約13倍より高い、約14倍より高い、約15倍より高い、約16倍より高い、約17倍より高い、約18倍より高い、約19倍または約20倍など）。

30

別の修飾と組み合わせ

【0345】

クラス1のグルカゴン関連ペプチドをさらに修飾してもよく、この修飾によって、溶解性および/または安定性および/またはグルカゴン活性が、さらに増大することがある。あるいは、クラス1のグルカゴン関連ペプチドは、溶解性または安定性に実質的に影響せず、グルカゴン活性を実質的に低下させない他の修飾を含むものであってもよい。例示としての実施形態では、クラス1のグルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴン配列と比較して、合計で最大11または最大12または最大13または最大14のアミノ酸修飾を有するものであってもよい。たとえば、保存的または非保存的な置換、付加または欠失を、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目のいずれで実施してもよい。

40

【0346】

クラス1のグルカゴン関連ペプチドの修飾の例として、以下のものがあげられるが、これらに限定されるものではない。

（a）少なくともグルカゴンアゴニストの部分活性を保持した状態での非保存的な置換、保存的な置換、付加または欠失、たとえば、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20

50

番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目のうちの1箇所または2箇所以上での保存的な置換、10番目のTyrからValまたはPheへの置換、12番目のLysからArgへの置換、これらの位置の1個または2個以上のアミノ酸からAlaへの置換、

(b) 少なくともグルカゴンアゴニストの部分活性を保持した状態での29番目および/または28番目ならびに、任意に27番目のアミノ酸の欠失、

(c) グルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸で置換することなどによる15番目のアスパラギン酸の修飾(この修飾が分解を低減することがある); または16番目のセリンの修飾、たとえば、スレオニン、Aib、グルタミン酸の置換による修飾あるいは、原子4個の長さの側鎖を有する別の負の電荷を持つアミノ酸への置換あるいは、グルタミン、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸のうちの任意の1つへの置換による修飾(この修飾も同様に、15番目のアスパラギン酸と16番目のセリンとの間の結合の切断による分解を低減することがある)、

(d) たとえば16番目、17番目、20番目、21番目、24番目、29番目、40番目またはC末端のアミノ酸における、本明細書に記載するような水溶性ポリマーであるポリエチレングリコールなどの親水体の付加(これによって、溶解性および/または半減期が増大することがある)、

(e) 酸化による分解を低減するための、ロイシンまたはノルロイシンで置換することなどによる27番目のメチオニンの修飾、

(f) Glnの脱アミド化によって起こる分解を低減するための、Ser、Thr、AlaまたはAibで置換することなどによる20番目または24番目のグルタミンの修飾、

(g) Aspが脱水し、環状スクシンイミド中間体を形成した後、イソアスパラギン酸へ異性体化することで生じる分解を低減するための、Gluで置換することなどによる21番目のAspの修飾、

(h) 任意に「i」番目と「i+4」番目との間のラクタム架橋などの分子内架橋(式中、iは、12、16、20、24など、12~25の整数である)との組み合わせで、DPP-IVによる切断に対する耐性を改善する、本明細書に記載するような1番目または2番目の修飾、

(i) 血中半減期を延ばすおよび/または作用時間を長くするおよび/または作用開始を遅らせることで、グルカゴン受容体および/またはGLP-1受容体に対する活性を増強することがある、本明細書に記載するようなグルカゴンペプチドのアシル化またはアルキル化(このアシル化またはアルキル化に、任意に、親水体の付加を組み合わせてもよく、これに加えて、あるいはこれに代えて、任意にGLP-1ペプチドに対する活性を選択的に低減する修飾、たとえば、7番目のThrから、ヒドロキシ基を欠いたアミノ酸、たとえば、AbuまたはIleへの置換などの7番目でのThrの修飾と組み合わせてもよい)、27番目のアミノ酸よりC末端側のアミノ酸の欠失(28番目と29番目のアミノ酸の一方または両方を欠失させ、アミノ酸27個または28個の長さのペプチドを得るなど)、

(j) 本明細書に記載するようなC末端の延長部分、

(k) 本明細書に記載するようなホモダイマー化またはヘテロダイマー化、

(a) から(k)の組み合わせ。

#### 【0347】

いくつかの実施形態では、クラス1のグルカゴン関連ペプチドの修飾の例として、A群から選択される少なくとも1つのアミノ酸修飾およびB群および/またはC群から選択される1つまたは2つ以上のアミノ酸修飾があげられる。

この場合のA群は、次のとおりである。

28番目のAsnから電荷を持つアミノ酸への置換、

28番目のAsnから、Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、

28番目でのA s n、A s pまたはG l uへの置換、  
28番目でのA s pへの置換、  
28番目でのG l uへの置換、  
29番目のT h rから電荷を持つアミノ酸への置換、  
29番目のT h rから、L y s、A r g、H i s、A s p、G l u、システイン酸、ホ  
モシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、  
29番目でのA s p、G l uまたはL y sへの置換、  
29番目でのG l uへの置換、  
29番目の後ろに電荷を持つ1～3個のアミノ酸の挿入、  
29番目の後ろにG l uまたはL y sの挿入、  
29番目の後ろにG l y - L y sまたはL y s - L y sの挿入、  
またはこれらの組み合わせ。

10

また、この場合のB群は、次のとおりである。

15番目のA s pからG l uへの置換、  
16番目のS e rからT h rまたはA i bへの置換、  
さらに、この場合のC群は、次のとおりである。  
1番目のヒスチジンからジペプチジルペプチダーゼI V (D P P - I V) による切断に  
対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する非天然のアミノ酸への置換、  
2番目のS e rからジペプチジルペプチダーゼI V (D P P - I V) による切断に対す  
るグルカゴンペプチドの感受性を低減する非天然のアミノ酸への置換、  
12番目のL y sからA r gへの置換、  
20番目のG l nからS e r、T h r、A l aまたはA i bへの置換、  
21番目のA s pからG l uへの置換、  
24番目のG l nからS e r、T h r、A l aまたはA i bへの置換、  
27番目のM e tからL e uまたはN l eへの置換、  
27～29番目のアミノ酸の欠失、  
28番目～29番目のアミノ酸の欠失、  
29番目のアミノ酸の欠失、  
またはこれらの組み合わせ。

20

#### 【0348】

30

例示としての実施形態では、12番目のL y sをA r gで置換する。他の例示としての  
実施形態では、29番目および/または28番目のアミノ酸ならびに、任意に27番目の  
アミノ酸が、欠失される。

#### 【0349】

いくつかの具体的な実施形態では、グルカゴンペプチドは、(a) D P P - I V耐性を  
与える、1番目および/または2番目のアミノ酸修飾、たとえば、1番目でのD M I Aへ  
の置換または2番目でのA i bへの置換、(b) 16番目と20番目など、12番目～2  
9番目の範囲内での分子内架橋あるいは、16番目、20番目、21番目、24番目のア  
ミノ酸の1つまたは2つ以上から、 $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸への置換、任意に(c) 24  
番目、29番目のC y sを介するか、またはC末端のアミノ酸における、P E Gなどの親  
水物への結合、任意に(d) M e tからN l eなどに置換する27番目のアミノ酸修飾、  
任意に(e) 分解を低減する、20番目、21番目および24番目のアミノ酸修飾ならび  
に、任意に(f) 配列番号820への結合を含む。グルカゴンペプチドが配列番号820  
に結合している場合、特定の実施形態における29番目のアミノ酸はT h rまたはG l y  
である。他の具体的な実施形態では、グルカゴンペプチドは、(a) A s p - G l u (2  
8番目と29番目) またはG l u - G l u (28番目と29番目) またはG l u - G l u  
(29番目と30番目) またはG l u - G l u (28番目と30番目) またはA s p - G  
l u (28番目と30番目) および任意に(b) S e rからT h rまたはA i bなどに置  
換する、16番目のアミノ酸修飾および任意に(c) M e tからN l eなどに置換する、  
27番目のアミノ酸修飾および任意に(d) 分解を低減させる、20番目、21番目およ

40

50

び24番目のアミノ酸修飾を有する。具体的な実施形態では、グルカゴンペプチドは、T16、A20、E21、A24、27番目のN1e、D28、E29である。

【0350】

いくつかの実施形態では、クラス1のグルカゴン関連ペプチドは、以下に示すアミノ酸配列を有する。

1～3個のアミノ酸修飾がなされた、X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z(配列番号839)

ここで、X1および/またはX2は、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する(または耐性を高める)非天然のアミノ酸であり、

この場合のZは、-COOH(天然のC末端カルボキシレート)、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH、Y-COOHからなる群から選択され、Yは、1～2個のアミノ酸であり、

ここで、分子内架橋、好ましくは共有結合によって、i番目のアミノ酸とi+4番目のアミノ酸の側鎖同士を結合し、ここで、iは、12、16、20または24である。

【0351】

いくつかの実施形態では、分子内架橋はラクタム架橋である。いくつかの実施形態では、配列番号839のi番目とi+4番目のアミノ酸は、LysとGlu、たとえば、16番目のグルタミン酸および20番目のリジンである。いくつかの実施形態では、X1は、D-His、N-メチルヒスチジン、α-メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジン、α, α-ジメチルイミダゾール酢酸(DMIA)からなる群から選択される。他の実施形態では、X2は、D-Ser、D-Ala、Gly、N-メチルセリン、Val、α-アミノイソ酪酸(Aib)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、16番目、17番目、20番目、21番目、24番目、29番目、40番目のアミノ酸、C末端の延長部分の範囲内またはC末端のアミノ酸のいずれかで、親水体に共有結合している。例示としての実施形態では、この親水体は、これらの位置のいずれかで、Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニン残基に共有結合している。親水体の例として、分子量約1,000ダルトン～約40,000ダルトンまたは約20,000ダルトン～約40,000ダルトンなどのポリエチレングリコール(PEG)があげられる。

【0352】

他の実施形態では、クラスIのグルカゴン関連ペプチドは、以下に示すアミノ酸配列を有する。

X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z(配列番号839)、

ここで、X1および/またはX2は、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)による切断に対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する(または耐性を高める)非天然のアミノ酸であり、

この場合のグルカゴンペプチドの16番目、20番目、21番目、24番目のうち1箇所、2箇所、3箇所、4箇所または5箇所以上が、α, α-二置換アミノ酸で置換され、

Zは、-COOH(天然のC末端カルボキシレート)、-Asn-COOH、Asn-Thr-COOH、Y-COOHからなる群から選択され、この場合のYは、1～2個のアミノ酸である。

【0353】

上記のクラス1のグルカゴン関連ペプチドまたは類縁体に対するさらに他のアミノ酸修飾の例として、任意に(任意にスペーサーを介して)アシル基またはアルキル基(このア

10

20

30

40

50

シル基またはアルキル基は、天然のアミノ酸に対して非天然である）に共有結合している側鎖を有するアミノ酸の置換または付加との組み合わせで、7番目のThrから、アミノ酪酸（Abu）、Ileなどのヒドロキシ基を欠いたアミノ酸への置換、12番目のLysからArgへの置換、15番目のAspからGluへの置換、16番目のSerからThrまたはAibへの置換、20番目のGlnからSer、Thr、AlaまたはAibへの置換、21番目のAspからGluへの置換、24番目のGlnから、Ser、Thr、AlaまたはAibへの置換、27番目のMetからLeuまたはNleへの置換、28番目のAsnから電荷を持つアミノ酸への置換、28番目のAsnから、Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、28番目でのAsn、AspまたはGluへの置換、28番目でのAspへの置換、28番目でのGluへの置換、29番目のThrから電荷を持つアミノ酸への置換、29番目のThrから、Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、29番目でのAsp、GluまたはLysへの置換、29番目でのGluへの置換、29番目の後ろに電荷を持つ1～3個のアミノ酸の挿入、30番目（すなわち、29番目の後ろ）でのGluまたはLysの挿入（任意に31番目にLysの挿入）、C末端に対する配列番号820の付加（任意に、29番目のアミノ酸はThrまたはGlyである）、親水体に共有結合しているアミノ酸の置換または付加またはこれらの組み合わせがあげられる。

10

## 【0354】

20

グルカゴン受容体の活性を増強し、グルカゴン受容体の部分活性を保持し、溶解性を改善し、安定性を高め、あるいは分解を低減する、クラス1のグルカゴンアゴニストに関連して上述した修飾については、クラス1のグルカゴンペプチドに、個々に適用してもよいし、組み合わせで適用してもよい。よって、グルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの活性の少なくとも20%を保持し、pH6～8または6～9（pH7など）にて、少なくとも1mg/mLの濃度で可溶であり、任意に、25℃で24時間後にもとのペプチドの少なくとも95%を保持する（たとえば、もとのペプチドの5%またはそれ未満しか分解または切断されない）、クラス1のグルカゴン関連ペプチドを調製可能である。あるいは、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの少なくとも約100%、約125%、約150%、約175%、約200%、約250%、約300%、約350%、約400%、約450%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%または約10倍であるかそれより高く、任意に、pH6～8または6～9（pH7など）にて、少なくとも1mg/mLの濃度で可溶であり、任意に、25℃で24時間後に、もとのペプチドの少なくとも95%を保持する（たとえば、もとのペプチドの5%またはそれ未満しか分解または切断されない）、高活性なクラス1のグルカゴンペプチドを調製可能である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクラス1のグルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性の上述した相対レベルの少なくともいずれかを示すものであればよいが、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの場合と比較して、最大で1,000%、5,000%または10,000%である。

30

クラス1のグルカゴン関連ペプチドの実施形態の例

40

## 【0355】

いくつかの実施形態によれば、28番目および/または29番目における天然のアミノ酸を、負の電荷を持つアミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸など）で置換し、任意に、負の電荷を持つアミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸など）を、ペプチドのカルボキシ末端に付加することによって、配列番号801の天然のグルカゴンペプチドを修飾する。別の実施形態では、29番目における天然のアミノ酸を、正の電荷を持つアミノ酸（リジン、アルギニンまたはヒスチジンなど）で置換し、任意に、1個または2個の正の電荷を持つアミノ酸（リジン、アルギニンまたはヒスチジンなど）を、ペプチドのカルボキシ末端に付加することによって、配列番号801の天然のグルカゴンペプチドを修飾する。いくつかの実施形態によれば、配列番号834のアミノ酸配列を有する、溶解

50

性と安定性が改善されたグルカゴン類縁体が提供されるが、ただし、28番目または29番目の少なくとも1個のアミノ酸が、酸性アミノ酸で置換されるおよび/または追加の酸性アミノ酸が、配列番号834のカルボキシ末端に付加される。いくつかの実施形態では、酸性アミノ酸は、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から独立に選択される。

【 0 3 5 6 】

いくつかの実施形態によれば、27番目、28番目または29番目のアミノ酸のうちの少なくとも1つが、非天然のアミノ酸残基で置換されている配列番号833のアミノ酸配列を有する、溶解性と安定性が改善されたグルカゴンアゴニストが提供される（すなわち、類縁体の27番目、28番目または29番目に存在する少なくとも1つのアミノ酸が、配列番号801の対応する位置に存在するアミノ酸とは異なる酸のアミノ酸である）。いくつかの実施形態によれば、配列番号833の配列を有するグルカゴンアゴニストが提供されるが、ただし、28番目のアミノ酸がアスパラギンであり、29番目のアミノ酸がスレオニンである場合、ペプチドは、このグルカゴンペプチドのカルボキシ末端に付加された、Lys、Arg、His、AspまたはGluからなる群から独立に選択される1～2個のアミノ酸をさらに含む。

【 0 3 5 7 】

親ペプチドの活性を少なくともいくらか維持しつつ、天然のグルカゴンペプチドの特定の位置を修飾可能であることが報告されている。したがって、本出願人は、配列番号 811 のペプチドの 2 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目、24 番目、27 番目、28 番目または 29 番目の位置にあるアミノ酸のうち 1 つまたは 2 つ以上を、天然のグルカゴンペプチドに存在するものとは異なるアミノ酸で置換して、それでもなお親のグルカゴンペプチドの増強された活性、生理的な pH の安定性、生物学的活性を保つことが可能であると予想している。たとえば、いくつかの実施形態によれば、天然のペプチドの 27 番目に存在するメチオニン残基をロイシンまたはノルロイシンに変更して、ペプチドの酸化による分解を防止する。

【 0 3 5 8 】

いくつかの実施形態では、配列番号 833 のグルカゴン類縁体であって、この類縁体の 1 番目、2 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目または 24 番目から選択される 1 ~ 6 個のアミノ酸が、配列番号 801 の対応するアミノ酸とは異なる、配列番号 833 のグルカゴン類縁体が提供される。もうひとつの実施形態によれば、配列番号 833 のグルカゴン類縁体であって、類縁体の 1 番目、2 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目または 24 番目から選択される 1 ~ 3 個のアミノ酸が、配列番号 801 の対応するアミノ酸とは異なる、配列番号 833 のグルカゴン類縁体が提供される。もうひとつの実施形態では、配列番号 807、配列番号 808 または配列番号 834 のグルカゴン類縁体であって、類縁体の 1 番目、2 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目または 24 番目から選択される 1 ~ 2 個のアミノ酸が、配列番号 801 の対応するアミノ酸とは異なる、配列番号 807、配列番号 808 または配列番号 834 のグルカゴン類縁体が提供され、別の実施形態では、これらの 1 ~ 2 個の異なるアミノ酸が、天然の配列（配列番号 801）に存在するアミノ酸と比較した場合に保存的なアミノ酸置換を表す。いくつかの実施形態では、2 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目、24 番目、27 番目または 29 番目から選択される位置に、1 つ、2 つまたは 3 つのアミノ酸置換をさらに有する、配列番号 811 または配列番号 813 のグルカゴンペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、2 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、2

0 番目、27 番目または 29 番目での置換は、保存的なアミノ酸置換である。

【0359】

いくつかの実施形態では、配列番号 801 の類縁体ペプチドを有するグルカゴンアゴニストが提供される。この類縁体は、セリン以外のアミノ酸を 2 番目に有すること、かつ、28 番目または 29 番目に天然のアミノ酸に代えて酸性アミノ酸を有すること、または配列番号 801 のペプチドのカルボキシ末端に付加された酸性アミノ酸を有することが、配列番号 801 とは異なる。いくつかの実施形態では、酸性アミノ酸は、アスパラギン酸またはグルタミン酸である。いくつかの実施形態では、2 番目の置換が親分子とは異なる、配列番号 809、配列番号 812、配列番号 813 または配列番号 832 のグルカゴン類縁体が提供される。特に、類縁体ペプチドの 2 番目は、D - セリン、アラニン、D - アラニン、グリシン、n - メチルセリン、アミノイソ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換されている。

10

【0360】

もうひとつの実施形態では、配列番号 801 の類縁体ペプチドを有するグルカゴンアゴニストが提供される。この類縁体は、ヒスチジン以外のアミノ酸を 1 番目に有すること、かつ、28 番目または 29 番目に天然のアミノ酸に代えて酸性アミノ酸を有するまたは配列番号 801 のペプチドのカルボキシ末端に付加された酸性アミノ酸を有することが、配列番号 801 とは異なる。いくつかの実施形態では、酸性アミノ酸は、アスパラギン酸またはグルタミン酸である。いくつかの実施形態では、1 番目の置換が親分子とは異なる、配列番号 809、配列番号 812、配列番号 813 または配列番号 832 のグルカゴン類縁体が提供される。特に、類縁体ペプチドの 1 番目は、DMI A、D - ヒスチジン、デアミノヒスチジン、ヒドロキシルヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸で置換されている。

20

【0361】

いくつかの実施形態によれば、修飾されたグルカゴンペプチドは、配列番号 809、配列番号 812、配列番号 813、配列番号 832 からなる群から選択される配列を有する。別の実施形態では、配列番号 809、配列番号 812、配列番号 813 または配列番号 832 の C 末端に付加される 1 ~ 2 個のアミノ酸をさらに有する、配列番号 809、配列番号 812、配列番号 813 または配列番号 832 の配列を有するグルカゴンペプチドが提供される。この場合、追加のアミノ酸は、L y s、A r g、H i s、A s p、G l u、システイン酸またはホモシステイン酸からなる群から独立に選択される。いくつかの実施形態では、カルボキシ末端に付加される追加のアミノ酸は、L y s、A r g、H i s、A s p または G l u からなる群から選択されるか、別の実施形態では、追加のアミノ酸は、A s p または G l u である。

30

【0362】

もうひとつの実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号 807 またはそのグルカゴンアゴニスト類縁体の配列を有する。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号 808、配列番号 810、配列番号 811、配列番号 812、配列番号 813 からなる群から選択される配列を有する。もうひとつの実施形態では、ペプチドは、配列番号 808、配列番号 810、配列番号 811 からなる群から選択される配列を有する。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、その C 末端に付加された、A s p および G l u からなる群から選択される追加のアミノ酸をさらに含む、配列番号 808、配列番号 810、配列番号 811 の配列を有する。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号 811 または配列番号 813 の配列を有し、別の実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号 811 の配列を有する。

40

【0363】

いくつかの実施形態によれば、

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - X a a - S e r - A r g - A r g - A l a  
- G l n - A s p - P h e - V a l - G l n - T r p - L e u - X a a - X a a - X a a

50



- R (配列番号 834)、  
NH<sub>2</sub> - His - Ser - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp  
- Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - Ser - Arg - Arg - Ala  
- Gln - Asp - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Met - Asp - Thr  
- R (配列番号 811)、  
NH<sub>2</sub> - His - Ser - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp  
- Tyr - Ser - Xaa - Tyr - Leu - Glu - Ser - Arg - Arg - Ala  
- Gln - Asp - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Met - Asp - Thr  
- R (配列番号 813)

からなる群から選択される修飾されたグルカゴンペプチドを有するグルカゴンアゴニストが提供される。

10

ここで、15番目のXaaは、Asp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸であり、28番目のXaaはAsnまたは酸性アミノ酸であり、29番目のXaaはThrまたは酸性アミノ酸であり、Rは、酸性アミノ酸、COOHまたはCONH<sub>2</sub>であり、ただし、28番目、29番目または30番目のうちの1箇所に、酸性の酸残基が存在する。いくつかの実施形態では、RはCOOHであり、別の実施形態では、RはCONH<sub>2</sub>である。

#### 【0364】

また、本開示は、グルカゴンペプチドの安定性と溶解性を高めるために、第2のペプチドをグルカゴンペプチドのC末端に融合させたグルカゴン融合ペプチドも包含する。特に、融合グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドNH<sub>2</sub> - His - Ser - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Xaa - Ser - Arg - Arg - Ala - Gln - Asp - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Xaa - Xaa - Xaa - R (配列番号 834) を有するグルカゴンアゴニスト類縁体を含むものであってもよく、ここで、Rは、酸性アミノ酸または結合およびグルカゴンペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸に結合する配列番号 820 (GPSSGAPPPS)、配列番号 821 (KRNRNNIA) または配列番号 822 (KRNR) のアミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号 833、配列番号 807 または配列番号 808 からなる群から選択され、さらに、そのカルボキシ末端のアミノ酸に結合している配列番号 820 (GPSSGAPPPS)、配列番号 821 (KRNRNNIA) または配列番号 822 (KRNR) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、グルカゴン融合ペプチドは、配列番号 802、配列番号 803、配列番号 804、配列番号 805、配列番号 806 またはそのグルカゴンアゴニスト類縁体を含み、さらに、その29番目のアミノ酸に結合した配列番号 820 (GPSSGAPPPS)、配列番号 821 (KRNRNNIA) または配列番号 822 (KRNR) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態によれば、融合ペプチドは、16番目、17番目、21番目、24番目、29番目、C末端の延長部分の範囲内またはC末端のアミノ酸で、アミノ酸に結合しているPEG鎖をさらに有し、この場合のPEG鎖は、500 ~ 40,000ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号 820 (GPSSGAPPPS)、配列番号 821 (KRNRNNIA) または配列番号 822 (KRNR) のアミノ酸配列は、ペプチド結合を介してグルカゴンペプチドの29番目のアミノ酸に結合する。いくつかの実施形態では、グルカゴン融合ペプチドのグルカゴンペプチド部分は、配列番号 810、配列番号 811、配列番号 813 からなる群から選択される配列を有する。いくつかの実施形態では、グルカゴン融合ペプチドのグルカゴンペプチド部分は、配列番号 811 または配列番号 813 の配列を有し、この場合のPEG鎖は、21番目、24番目、29番目、C末端の延長部分の範囲内またはC末端のアミノ酸に、それぞれ結合している。

20

30

40

#### 【0365】

もうひとつの実施形態では、融合ペプチドのグルカゴンペプチド配列は、配列番号 811 の配列を有し、さらに、その29番目のアミノ酸に結合した配列番号 820 (GPSSGAPPPS)、配列番号 821 (KRNRNNIA) または配列番号 822 (KRNR) のアミノ酸配列を有す

50

る。いくつかの実施形態では、グルカゴン融合ペプチドは、配列番号 8 2 4、配列番号 8 2 5、配列番号 8 2 6 からなる群から選択される配列を有する。一般に、本発明の融合ペプチドは、標準的なカルボン酸基を有する C 末端のアミノ酸を含む。しかしながら、C 末端のアミノ酸がカルボン酸に代えてアミドを有する、上記配列の類縁体も、実施形態として包含される。いくつかの実施形態によれば、融合グルカゴンペプチドは、配列番号 8 1 0、配列番号 8 1 1、配列番号 8 1 3 からなる群から選択され、さらに、その 2 9 番目のアミノ酸に結合している配列番号 8 2 3 (GPSSGAPPPS-CONH<sub>2</sub>) のアミノ酸配列を有する、グルカゴンアゴニスト類縁体を含む。

#### 【0366】

本発明のグルカゴンアゴニストをさらに修飾して、グルカゴンペプチドの生物学的活性を保ちつつ、水溶液に対するペプチドの溶解性および水溶液中での安定性を改善することが可能である。いくつかの実施形態によれば、配列番号 8 1 1 のペプチドまたはそのグルカゴンアゴニスト類縁体の 1 6 番目、1 7 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目、2 9 番目から選択される 1 箇所または 2 箇所以上に親水体を導入すると、その pH での溶解性及び安定性が改善し、グルカゴン類縁体が安定化することが予想される。特に、いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドの 2 1 番目および 2 4 番目に存在するアミノ酸の側鎖に共有結合している 1 個または 2 個以上の親水基を含むように、配列番号 8 1 0、配列番号 8 1 1、配列番号 8 1 3 または配列番号 8 3 2 のグルカゴンペプチドを修飾する。

#### 【0367】

いくつかの実施形態によれば、1 6 番目、1 7 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目および/または 2 9 番目での 1 つまたは 2 つ以上のアミノ酸置換を含むように、配列番号 8 1 1 のグルカゴンペプチドを修飾する。この場合、天然のアミノ酸を、PEG などをはじめとする親水体と架橋するのに適した側鎖を有するアミノ酸で置換する。この天然のペプチドについては、天然のアミノ酸で置換してもよいし、合成(非天然)のアミノ酸で置換してもよい。合成または非天然のアミノ酸は、*in vivo*では天然に生じないが、本明細書に記載のペプチド構造に取り込むことは可能である。

#### 【0368】

いくつかの実施形態では、天然の配列の 1 6 番目、1 7 番目、2 1 番目、2 4 番目、2 9 番目、C 末端の延長部分の範囲内または C 末端のアミノ酸のうちの少なくとも 1 箇所で、天然または合成のアミノ酸を含むように天然のグルカゴンペプチド配列が修飾された、配列番号 8 1 0、配列番号 8 1 1 または配列番号 8 1 3 のグルカゴンアゴニストが提供され、この場合の置換したアミノ酸は、親水体をさらに有する。いくつかの実施形態では、置換は 2 1 番目または 2 4 番目でなされ、別の実施形態では、親水体が PEG 鎖である。いくつかの実施形態では、配列番号 8 1 1 のグルカゴンペプチドを、少なくとも 1 個のシステイン残基で置換し、この場合のシステイン残基の側鎖を、マレイミド、ビニルスルホン、2 - ピリジルチオ、ハロアルキル、ハロアシルなどをはじめとするチオール反応性試薬でさらに修飾する。これらのチオール反応性試薬は、カルボキシ基、ケト基、ヒドロキシ基、エーテル基ならびに、ポリエチレングリコール単位などの他の親水体を含むものであってもよい。別の実施形態では、天然のグルカゴンペプチドをリジンで置換し、ポリエチレングリコールなどの親水体のアルデヒドまたはカルボン酸の活性エステル(スクシンイミド、無水物など)などのアミン反応性試薬を用いて、置換するリジン残基の側鎖をさらに修飾する。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号 8 1 4、配列番号 8 1 5、配列番号 8 1 6、配列番号 8 1 7、配列番号 8 1 8、配列番号 8 1 9 からなる群から選択される。

#### 【0369】

いくつかの実施形態によれば、PEG 化グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドに共有結合している 2 つまたは 3 つ以上のポリエチレングリコール鎖を有し、この場合のグルカゴン鎖の合計の分子量は、約 1,000 ~ 約 5,000 ダルトンである。いくつかの実施形態では、PEG 化グルカゴンアゴニストは、2 1 番目および 2 4 番目で PEG 鎖がアミノ酸残基に共有結合し、2 つの PEG 鎖の合算での分子量が約 1,000 ~ 約 5,0

10

20

30

40

50

00ダルトンである、配列番号806のペプチドを含む。もうひとつの実施形態では、PEG化グルカゴンアナログは、21番目および24番目でPEG鎖がアミノ酸残基に共有結合し、2つのPEG鎖の合算での分子量が約5,000～約20,000ダルトンである、配列番号806のペプチドを含む。

【0370】

ポリエチレングリコール鎖は、直鎖状であってもよいし、分岐状であってもよい。いくつかの実施形態によれば、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が、約500～約40,000ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の分子量は、約500～約5,000ダルトンの範囲から選択される。もうひとつの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、分子量が約20,000～約40,000ダルトンである。

10

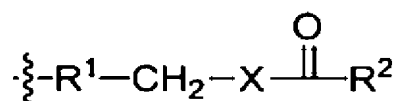
【0371】

共有結合または非共有結合の分子内架橋またはα螺旋を安定化するアミノ酸を、グルカゴンペプチドのC末端領域(12番目～29番目のアミノ酸)に含むように、上述したグルカゴンペプチドのいずれかを、さらに修飾してもよい。いくつかの実施形態によれば、グルカゴンペプチドは、16番目、20番目、21番目または24番目(またはこれらの組み合わせ)を、α,α-二置換アミノ酸、たとえばAibで置換するアミノ酸置換に加えて、上述した修飾のうちの1つまたは2つ以上を有する。もうひとつの実施形態によれば、グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドの16番目と20番目のアミノ酸の側鎖間での分子内架橋、たとえばラクタムに加えて、上述した修飾のうちの1つまたは2つ以上を有する。

20

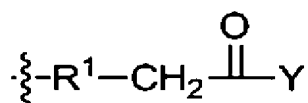
【0372】

いくつかの実施形態によれば、グルカゴンペプチドは、3番目のXaaが、構造I、IIまたはIIIの側鎖を有するアミノ酸である、配列番号877のアミノ酸配列を有する。



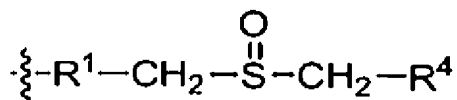
構造I

30



構造II

40



構造III

(式中、R<sup>1</sup>は、C<sub>0</sub>～<sub>3</sub>アルキルまたはC<sub>0</sub>～<sub>3</sub>ヘテロアルキルであり、R<sup>2</sup>は、NH

50

R<sup>4</sup> または C<sub>1</sub> - <sub>3</sub> アルキルであり、R<sup>3</sup> は、C<sub>1</sub> - <sub>3</sub> アルキルであり、R<sup>4</sup> は、H または C<sub>1</sub> - <sub>3</sub> アルキルであり、X は、NH、O または S であり、Y は、NHR<sup>4</sup>、SR<sup>3</sup> または OR<sup>3</sup> である。) いくつかの実施形態では、X が NH であるか、あるいは、Y が NHR<sup>4</sup> である。いくつかの実施形態では、R<sup>1</sup> は、C<sub>0</sub> - <sub>2</sub> アルキルまたは C<sub>1</sub> ヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、R<sup>2</sup> は、NHR<sup>4</sup> または C<sub>1</sub> アルキルである。いくつかの実施形態では、R<sup>4</sup> は、H または C<sub>1</sub> アルキルである。例示としての実施形態では、構造 I の側鎖を有するアミノ酸が提示され、式中、R<sup>1</sup> は CH<sub>2</sub> - S であり、X は NH であり、R<sup>2</sup> は、CH<sub>3</sub> (アセトアミドメチル - システイン、C (Ac m)) である; R<sup>1</sup> は CH<sub>2</sub> であり、X は NH であり、R<sup>2</sup> は、CH<sub>3</sub> (アセチルジアミノブタン酸、Dab (Ac)) である; R<sup>1</sup> は、C<sub>0</sub> アルキルであり、X は NH であり、R<sup>2</sup> は NHR<sup>4</sup> であり、R<sup>4</sup> は、H (カルバモイルジアミノプロピオン酸、Dap (urea)) である; または R<sup>1</sup> は CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> であり、X は NH であり、R<sup>2</sup> は、CH<sub>3</sub> (アセチルオルニチン、Orn (Ac)) である。例示としての実施形態では、構造 I I の側鎖を有するアミノ酸が提示され、式中、R<sup>1</sup> は CH<sub>2</sub> であり、Y は NHR<sup>4</sup> であり、R<sup>4</sup> は、CH<sub>3</sub> (メチルグルタミン、Q (Me)) である; 例示としての実施形態では、構造 I I I の側鎖を有するアミノ酸が提示され、式中、R<sup>1</sup> は CH<sub>2</sub> であり、R<sup>4</sup> は H (メチオニン - スルホキシド、M (O)) である。具体的な実施形態では、3 番目のアミノ酸を、Dab (Ac) で置換する。たとえば、グルカゴンアゴニストは、配列番号 863、配列番号 869、配列番号 871、配列番号 872、配列番号 873、配列番号 874 のアミノ酸配列を有するものであってもよい。

10

20

**【0373】**

特定の実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号 877 のグルカゴンペプチドの類縁体である。具体的な態様では、類縁体は、28 番目の Asn から電荷を持つアミノ酸への置換、28 番目の Asn から、Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、28 番目での Asn、Asp または Glu への置換、28 番目での Asp への置換、28 番目での Glu への置換、29 番目の Thr から電荷を持つアミノ酸への置換、29 番目の Thr から、Lys、Arg、His、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、29 番目での Asp、Glu または Lys への置換、29 番目での Glu への置換、29 番目の後ろに電荷を持つ 1 ~ 3 個のアミノ酸の挿入、29 番目の後ろに Glu または Lys の挿入、29 番目の後ろに Gly - Lys または Lys - Lys の挿入、これらの組み合わせを含むがこれらに限定されるものではない、本明細書に記載のアミノ酸修飾を有する。

30

**【0374】**

特定の実施形態では、配列番号 877 のグルカゴンペプチドの類縁体は、16 番目、20 番目、21 番目、24 番目のうちの 1 箇所、2 箇所、3 箇所またはすべてに、Aib などの α, α - 二置換アミノ酸を有する。

**【0375】**

特定の実施形態では、配列番号 877 のグルカゴンペプチドの類縁体は、以下のうちの 1 つまたは 2 つ以上を有する。1 番目のヒスチジンから、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP - IV) による切断に対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する非天然のアミノ酸への置換、2 番目の Ser から、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP - IV) による切断に対するグルカゴンペプチドの感受性を低減する非天然のアミノ酸への置換、7 番目の Thr から、ヒドロキシ基を欠いたアミノ酸、たとえば、Abu または Ile への置換、10 番目の Tyr から Phe または Val への置換、12 番目の Lys から Arg への置換、15 番目の Asp から Glu への置換、16 番目の Ser から Thr または Aib への置換、20 番目の Gln から Ala または Aib への置換、21 番目の Asp から Glu への置換、24 番目の Gln から Ala または Aib への置換、27 番目の Met から Leu または Nle への置換、27 ~ 29 番目のアミノ酸の欠失、28 番目 ~ 29 番目のアミノ酸の欠失、29 番目のアミノ酸の欠失、C 末端に対する、配列番号 820

40

50

のアミノ酸配列の付加（この場合、29番目のアミノ酸はTh rまたはG l yである）またはこれらの組み合わせ。

【0376】

具体的な実施形態によれば、グルカゴンペプチドは、配列番号862～867および869～874のいずれかのアミノ酸配列を有する。

【0377】

特定の実施形態では、配列番号877を有するグルカゴンペプチドの類縁体は、16番目、17番目、20番目、21番目、24番目、29番目またはC末端のアミノ酸のいずれかでアミノ酸に共有結合している、PEGなどの親水体を有する。

【0378】

特定の実施形態では、配列番号877を有するグルカゴンペプチドの類縁体は、任意にスペーサーを介してアシル基またはアルキル基に共有結合している側鎖を有するアミノ酸を有し、このアシル基またはアルキル基は、天然のアミノ酸に対して非天然である。いくつかの実施形態におけるアシル基は、C4～C30の脂肪族アシル基である。他の実施形態では、アルキル基は、C4～C30アルキルである。具体的な態様では、アシル基またはアルキル基は、10番目のアミノ酸の側鎖に共有結合している。いくつかの実施形態では、7番目のアミノ酸は、I l eまたはA b uである。

【0379】

グルカゴンアゴニストは、配列番号801～919のいずれかのアミノ酸配列を有し、さらに、グルカゴンアゴニスト活性を保持する修飾を、任意に最大1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ有するペプチドであってもよい。特定の実施形態では、グルカゴンアゴニストは、配列番号859～919のいずれかのアミノ酸を有する。

クラス2のグルカゴン関連ペプチド

【0380】

特定の実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、クラス2のグルカゴン関連ペプチドであり、これは、本明細書および国際特許出願公開第WO2010/011439号および米国特許出願第61/187,578号（2009年6月16日にファイル）に記載されている（その内容全体を本明細書に援用する）。

【0381】

クラス2のグルカゴン関連ペプチドに関する、以下のセクションに示す生物学的配列（配列番号1001～1262）は、国際特許出願公開第WO2010/011439号における配列番号1～262に対応する。クラス2のグルカゴン関連ペプチドに関する配列番号1263～1275は、米国特許出願第61/187,578号の配列番号657～669に対応する。

活性

【0382】

天然のグルカゴンは、G I P受容体を活性化せず、G L P - 1受容体に対する活性が通常は天然の - G L P - 1の約1%である。本明細書に記載の天然のグルカゴン配列に対する修飾によって、天然のグルカゴン（配列番号1001）の活性と同等またはそれよりも高いグルカゴン活性、天然のG I P（配列番号1004）の活性と同等またはそれよりも高いG I P活性および/または天然のG L P - 1の活性と同等またはそれよりも高いG L P - 1活性を示すことのできるクラス2のグルカゴン関連ペプチドが生成される。この点について、クラス2のグルカゴン関連ペプチドは、本明細書にてさらに説明するように、グルカゴン / G I Pコアゴニスト、グルカゴン / G I P / G L P - 1トリアゴニスト、G I P / G L P - 1コアゴニストまたはG I Pアゴニストグルカゴンペプチドのうちの1つであってもよい。

【0383】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクラス2のグルカゴン関連ペプチドは、G I P受容体の活性化の活性に対するE C<sub>50</sub>が、約100 n Mまたはそれ未満あるいは、約75 n M、約50 n M、約25 n M、約10 n M、約8 n M、約6 n M、約5 n M、約

10

20

30

40

50

4 nM、約 3 nM、約 2 nM または約 1 nM またはそれ未満である。いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体の活性化に対する  $EC_{50}$  が、約 100 nM またはそれ未満あるいは、約 75 nM、約 50 nM、約 25 nM、約 10 nM、約 8 nM、約 6 nM、約 5 nM、約 4 nM、約 3 nM、約 2 nM または約 1 nM またはそれ未満である。いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1 受容体の活性化に対する  $EC_{50}$  が、約 100 nM またはそれ未満あるいは、約 75 nM、約 50 nM、約 25 nM、約 10 nM、約 8 nM、約 6 nM、約 5 nM、約 4 nM、約 3 nM、約 2 nM または約 1 nM またはそれ未満である。受容体の活性化は、受容体を過剰発現する HEK293 細胞において、cAMP 誘導を測定する *in vitro* のアッセイによって測定することができる。たとえば、実施例 2 で記載したように、受容体をコードする DNA と、cAMP 応答配列に結合させたルシフェラーゼ遺伝子とをコトランスフェクトした HEK293 細胞をアッセイすればよい。

10

**【0384】**

いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、天然の GIP (GIP 活性) と比較して、GIP 受容体に対する活性が、少なくとも約 0.1%、約 0.2%、約 0.3%、約 0.4%、約 0.5%、約 0.6%、約 0.7%、約 0.8%、約 0.9%、約 1%、約 5%、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 75%、約 100%、約 125%、約 150%、約 175% または約 200% またはそれよりも高い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のグルカゴンペプチドは、天然の GIP と比較して、GIP 受容体に対する活性が最大で 1000%、10,000%、100,000% または 1,000,000% である。いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴン (グルカゴン活性) と比較して、グルカゴン受容体に対する活性が少なくとも約 1%、約 5%、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 75%、約 100%、約 125%、約 150%、約 175%、約 200%、約 250%、約 300%、約 350%、約 400%、約 450% または約 500% またはそれよりも高い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のグルカゴンペプチドは、天然のグルカゴンと比較して、グルカゴン受容体に対する活性が、最大で 1000%、10,000%、100,000% または 1,000,000% である。いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、天然の GLP-1 (GLP-1 活性) と比較して、GLP-1 受容体に対する活性が、少なくとも約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175% または 200% またはそれよりも高い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のグルカゴンペプチドは、天然の GLP-1 と比較して、GLP-1 受容体に対する活性が、最大で 1000%、10,000%、100,000% または 1,000,000% である。受容体の天然のリガンドと比較した場合の受容体に対するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの活性については、天然のリガンドの  $EC_{50}$  に対するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの  $EC_{50}$  の反比として計算する。

20

30

**【0385】**

いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体および GIP 受容体の両方に対して活性を示す (「グルカゴン/GIP コアゴニスト」)。これらのクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、GIP 受容体に対し、グルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの持つ選択性を失っている。いくつかの実施形態では、GIP 受容体に対するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの  $EC_{50}$  は、そのグルカゴン受容体に対する  $EC_{50}$  と比較して、約 50 倍未満、約 40 倍未満、約 30 倍未満または約 20 倍未満で異なる (高いまたは低い)。いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの GIP 活性は、そのグルカゴン活性と比較して、約 500 倍未満、約 450 倍未満、約 400 倍未満、約 350 倍未満、約 300 倍未満、約 250 倍未満、約 200 倍未満、約 150 倍未満、約 100 倍未満、約 75 倍未満、約 50 倍未満、約 25 倍未満、約 20 倍未満、約 15 倍未満、約 10 倍未満または約 5 倍未満で異なる (高いまたは低

40

50

い)。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの  $EC_{50}$  をグルカゴン受容体に対するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの  $EC_{50}$  で割った比は、約 100 未満、約 75 未満、約 60 未満、約 50 未満、約 40 未満、約 30 未満、約 20 未満、約 15 未満、約 10 未満または約 5 未満である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対する  $EC_{50}$  をグルカゴン受容体に対する  $EC_{50}$  で割った比は、約 1 または約 1 未満（約 0.01、約 0.013、約 0.0167、約 0.02、約 0.025、約 0.03、約 0.05、約 0.067、約 0.1、約 0.2 など）である。いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの G I P 活性をクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドのグルカゴン活性と比較した比は、約 500 未満、約 450 未満、約 400 未満、約 350 未満、約 300 未満、約 250 未満、約 200 未満、約 150 未満、約 100 未満、約 75 未満、約 60 未満、約 50 未満、約 40 未満、約 30 未満、約 20 未満、約 15 未満、約 10 未満または約 5 未満である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対する活性をグルカゴン受容体に対する活性で割った比は、約 1 または約 1 未満（約 0.01、約 0.013、約 0.0167、約 0.02、約 0.025、約 0.03、約 0.05、約 0.067、約 0.1、約 0.2 など）である。いくつかの実施形態では、7 番目のアミノ酸修飾、27 番目または 28 番目のアミノ酸までの C 末端でのアミノ酸（単数または複数）の欠失（アミノ酸 27 個または 28 個のペプチドを生じる）またはこれらの組み合わせなどによって、G L P - 1 活性が有意に低減または破壊される。

10

#### 【0386】

20

もうひとつの態様では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体、G I P 受容体、G L P - 1 受容体に対して活性を示す（「グルカゴン / G I P / G L P - 1 トリアゴニスト」）。これらのクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、G L P - 1 受容体と G I P 受容体の両方に対し、グルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの選択性を失っている。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの  $EC_{50}$  は、グルカゴンおよび G L P - 1 受容体に対するそれぞれの  $EC_{50}$  と比較して、約 50 倍未満、約 40 倍未満、約 30 倍未満または約 20 倍未満で異なる（高いまたは低い）。いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの G I P 活性は、そのグルカゴン活性および G L P - 1 活性と比較して、約 500 倍未満、約 450 倍未満、約 400 倍未満、約 350 倍未満、約 300 倍未満、約 250 倍未満、約 200 倍未満、約 150 倍未満、約 100 倍未満、約 75 倍未満、約 50 倍未満、約 25 倍未満、約 20 倍未満、約 15 倍未満、約 10 倍未満または約 5 倍未満で異なる（高いまたは低い）。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対するトリアゴニストの  $EC_{50}$  を G L P - 1 受容体に対するトリアゴニストの  $EC_{50}$  で割った比は、約 100 未満、約 75 未満、約 60 未満、約 50 未満、約 40 未満、約 30 未満、約 20 未満、約 15 未満、約 10 未満または約 5 未満である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対する  $EC_{50}$  を G L P - 1 受容体に対する  $EC_{50}$  で割った比は、約 1 または約 1 未満（約 0.01、約 0.013、約 0.0167、約 0.02、約 0.025、約 0.03、約 0.05、約 0.067、約 0.1、約 0.2 など）である。いくつかの実施形態では、トリアゴニストの G I P 活性をトリアゴニストの G L P - 1 活性と比較した比は、約 100 未満、約 75 未満、約 60 未満、約 50 未満、約 40 未満、約 30 未満、約 20 未満、約 15 未満、約 10 未満または約 5 未満である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対する活性を G L P - 1 受容体に対する活性で割った比は、約 1 または約 1 未満（約 0.01、約 0.013、約 0.0167、約 0.02、約 0.025、約 0.03、約 0.05、約 0.067、約 0.1、約 0.2 など）である。関連の実施形態では、G I P 受容体に対するトリアゴニストの  $EC_{50}$  をグルカゴン受容体に対するトリアゴニストの  $EC_{50}$  で割った比は、約 100 未満、約 75 未満、約 60 未満、約 50 未満、約 40 未満、約 30 未満、約 20 未満、約 15 未満、約 10 未満または約 5 未満である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対する  $EC_{50}$  をグルカゴン受容体に対する  $EC_{50}$  で割った比は、約 1 または約 1 未満（約 0.01、約 0.013、約 0.0167、約 0.02、約 0.025、約 0.03、約 0.05、約 0.067、約 0.1、約 0.2 など）である。

30

40

50

0.025、約0.03、約0.05、約0.067、約0.1、約0.2など)である。いくつかの実施形態では、トリアゴニストのGIP活性をトリアゴニストのグルカゴン活性と比較した比は、約500未満、約450未満、約400未満、約350未満、約300未満、約250未満、約200未満、約150未満、約100未満、約75未満、約60未満、約50未満、約40未満、約30未満、約20未満、約15未満、約10未満または約5未満である。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対する活性をグルカゴン受容体に対する活性で割った比は、約1または約1未満(約0.01、約0.013、約0.0167、約0.02、約0.025、約0.03、約0.05、約0.067、約0.1、約0.2など)である。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するトリアゴニストのEC<sub>50</sub>をグルカゴン受容体に対するトリアゴニストのEC<sub>50</sub>で割った比は、約100未満、約75未満、約60未満、約50未満、約40未満、約30未満、約20未満、約15未満、約10未満または約5未満である。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するEC<sub>50</sub>をグルカゴン受容体に対するEC<sub>50</sub>で割った比は、約1または約1未満(約0.01、約0.013、約0.0167、約0.02、約0.025、約0.03、約0.05、約0.067、約0.1、約0.2など)である。いくつかの実施形態では、トリアゴニストのGLP-1活性をトリアゴニストのグルカゴン活性と比較した比は、約100未満、約75未満、約60未満、約50未満、約40未満、約30未満、約20未満、約15未満、約10未満または約5未満である。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対する活性をグルカゴン受容体に対する活性で割った比は、約1または約1未満(約0.01、約0.013、約0.0167、約0.02、約0.025、約0.03、約0.05、約0.067、約0.1、約0.2など)である。

10

20

#### 【0387】

さらに別の態様では、クラス2のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体およびGIP受容体に対する活性を示すが、グルカゴン活性は、3番目のアミノ酸修飾などによって、有意に低減または破壊されている(「GIP/GLP-1コアゴニスト」)。たとえば、この位置を、酸性、塩基性または疎水性のアミノ酸(グルタミン酸、オルニチン、ノルロイシン)で置換すると、グルカゴン活性が低減される。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するグルカゴンペプチドのEC<sub>50</sub>は、そのGLP-1受容体に対するEC<sub>50</sub>と比較して、約50倍未満、約40倍未満、約30倍未満または約20倍未満で異なる(高いまたは低い)。いくつかの実施形態では、クラス2のグルカゴン関連ペプチドのGIP活性は、そのGLP-1活性と比較して、約25倍未満、約20倍未満、約15倍未満、約10倍未満または約5倍未満で異なる(高いまたは低い)。いくつかの実施形態では、これらのクラス2のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの約10%またはそれ未満、たとえば約1%~約10%あるいは、約0.1%~約10%あるいは、約0.1%を超えるが、約10%未満である。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するクラス2のグルカゴン関連ペプチドのEC<sub>50</sub>をGLP-1受容体に対するクラス2のグルカゴン関連ペプチドのEC<sub>50</sub>で割った比は、約100未満、約75未満、約60未満、約50未満、約40未満、約30未満、約20未満、約15未満、約10未満または約5未満で、1以上である。いくつかの実施形態では、クラス2のグルカゴン関連ペプチドのGIP活性をクラス2のグルカゴン関連ペプチドのGLP-1活性と比較した比は、約100未満、約75未満、約60未満、約50未満、約40未満、約30未満、約20未満、約15未満、約10未満または約5未満で、1以上である。

30

40

#### 【0388】

別の態様では、クラス2のグルカゴン関連ペプチドは、GIP受容体に対する活性を示し、グルカゴン活性およびGLP-1活性は、3番目でのGlu、7番目でのIleによるアミノ酸修飾などによって、有意に低減または破壊される(「GIPアゴニストグルカゴンペプチド」)。いくつかの実施形態では、これらのクラス2のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの約10%またはそれ未満、

50



たとえば約 1 % ~ 約 10 % あるいは、約 0.1 % ~ 約 10 % あるいは、約 0.1 % を超える、約 0.5 % を超えるまたは約 1 % を超えるが、約 1 % 未満、約 5 % 未満または約 10 % 未満である。いくつかの実施形態では、これらのクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1 受容体に対する活性が、天然の GLP-1 の約 10 % またはそれ未満、たとえば約 1 % ~ 約 10 % あるいは、約 0.1 % ~ 約 10 % あるいは、約 0.1 % を超える、約 0.5 % を超えるまたは約 1 % を超えるが、約 1 % 未満、約 5 % 未満または約 10 % 未満である。

#### 【0389】

いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドが PEG 化されていない場合、GIP 受容体の活性化に対するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの  $EC_{50}$  が、約 4 nM、約 2 nM、約 1 nM またはそれ未満であるか、あるいは、GIP 受容体に対する類縁体の活性が、天然の GIP の少なくとも約 1 %、約 2 %、約 3 %、約 4 % または約 5 % である。関連の実施形態では、PEG 化されていないクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1 受容体の活性化に対する  $EC_{50}$  が、約 4 nM、約 2 nM、約 1 nM またはそれ未満であるか、GLP-1 受容体に対する活性が、天然の GLP-1 の少なくとも約 1 %、約 2 %、約 3 %、約 4 % または約 5 % である。さらに他の関連の実施形態では、PEG 化されていないクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体の活性化に対する  $EC_{50}$  が、約 4 nM、約 2 nM、約 1 nM またはそれ未満であるか、あるいは、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの少なくとも約 5 %、約 10 %、約 15 % または約 20 % である。いくつかの実施形態では、PEG 化されていないクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの約 1 % 未満である。他の実施形態では、PEG 化されていないクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1 受容体に対する活性が、天然の GLP-1 の約 10 % 未満、約 5 % 未満または約 1 % 未満である。

#### 【0390】

クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドが PEG などの親水体に結合している実施形態では、1 つまたは 2 つ以上の受容体に対する相対  $EC_{50}$  が、さらに高くなる（約 10 倍高くなるなど）ことがある。たとえば、PEG 化した類縁体は、GIP 受容体の活性化に対する  $EC_{50}$  が約 10 nM またはそれ未満であるか、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドの GIP 受容体に対する活性が、天然の GIP の少なくとも約 0.1 %、約 0.2 %、約 0.3 %、約 0.4 % または約 0.5 % である。関連の実施形態では、PEG 化されたクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1 受容体の活性化に対する  $EC_{50}$  が約 10 nM またはそれ未満であるか、GLP-1 受容体に対する活性が、天然の GLP-1 の少なくとも約 0.1 %、約 0.2 %、約 0.3 %、約 0.4 % または約 0.5 % である。さらに他の関連の実施形態では、PEG 化されたクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体の活性化に対する  $EC_{50}$  が約 10 nM またはそれ未満であるか、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの少なくとも約 0.5 %、約 1 %、約 1.5 % または約 2 % である。いくつかの実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの約 1 % 未満である。他の実施形態では、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1 受容体に対する活性が、天然の GLP-1 の約 10 %、約 5 % または約 1 % である。

修飾

#### 【0391】

クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に開示する修飾によって、GIP 活性、グルカゴン活性および / または GLP-1 活性が高められたグルカゴンペプチドを生成するようグルカゴン（配列番号 1001）を操作することができる。クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に開示する他の修飾によって、得られるペプチドの半減期が延び、溶解性が高まり、あるいは、安定性が向上する。クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に開示するさらに他の修飾は、活性に対しては何ら影響しないか、所望の活性（単数または複数）を破壊することなく生成可能なものである。同一の

目的（G I P 活性を高めるなど）を果たすクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドに関する組み合わせを、個々に適用してもよいし、組み合わせで適用してもよい。特性を増強するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチド単体またはこれに関する一組の組み合わせを、個々に適用してもよいし、組み合わせで適用してもよく、たとえば G I P 活性および / または G L P - 1 活性を高めることを、半減期の延長と組み合わせてもよい。関連の実施形態では、アミノ酸修飾のうち 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つまたは 7 つ以上が、非保存的な置換、付加または欠失であってもよい。いくつかの実施形態では、アミノ酸修飾のうち 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つまたは 7 つ以上が、保存的な置換であってもよい。

G I P 性に影響する修飾

【 0 3 9 2 】

10

1 番目のアミノ酸修飾によって、G I P 受容体に対する活性が増強される。たとえば、1 番目のヒスチジンを、高分子芳香族アミノ酸、任意に、T y r、P h e、T r p、アミノフェニルアラニン、ニトロフェニルアラニン、クロロフェニルアラニン、スルホフェニルアラニン、4 - ピリジルアラニン、メチルチロシンまたは 3 - アミノチロシンで置換する。1 番目の T y r と 1 2 番目 ~ 2 9 番目のアミノ酸に対応する領域内での  $\alpha$  螺旋の安定化とを組み合わせると、G I P 受容体および G L P - 1 受容体ならびにグルカゴン受容体を活性化するクラス 2 のグルカゴン関連ペプチドが提供された。 $\alpha$  螺旋構造は、たとえば、共有結合または非共有結合の分子内架橋の形成あるいは、1 2 番目 ~ 2 9 番目あたりで、 $\alpha$  螺旋を安定化するアミノ酸（ $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸など）で置換するアミノ酸置換および / またはこれを挿入することによって安定化可能なものである。

20

【 0 3 9 3 】

2 7 番目および / または 2 8 のアミノ酸修飾、任意に 2 9 番目のアミノ酸修飾によって、G I P 受容体に対する活性が増強される。たとえば、2 7 番目の M e t を高分子脂肪族アミノ酸（任意に L e u ）に置換し、2 8 番目の A s n を低分子脂肪族アミノ酸（任意に A l a ）に置換し、2 9 番目の T h r を低分子脂肪族アミノ酸（任意に G l y ）に置換する。2 7 番目 ~ 2 9 番目を L A G に置換すると、これらの位置での G I P 活性が、天然の M N T 配列よりも高くなる。

【 0 3 9 4 】

1 2 番目のアミノ酸修飾によって、G I P 受容体に対する活性が増強される。たとえば、1 2 番目を高分子非極性脂肪族アミノ酸（任意に I l e ）に置換する。

30

【 0 3 9 5 】

1 7 番目および / または 1 8 番目のアミノ酸修飾によって、G I P 受容体に対する活性が増強される。たとえば、1 7 番目を極性残基（任意に G l n ）に置換し、1 8 番目を低分子脂肪族アミノ酸（任意に A l a ）に置換する。1 7 番目と 1 8 番目を Q A に置換すると、これらの位置での G I P 活性が、天然の R R 配列より高くなる。

【 0 3 9 6 】

1 2 番目から 2 9 番目のアミノ酸側鎖間での分子内架橋の形成を可能にする修飾によって、G I P 受容体に対する活性が増加する。たとえば、i 番目と i + 4 番目または j 番目と j + 3 番目または k 番目と k + 7 番目の 2 つのアミノ酸の側鎖間の共有結合によって、分子内架橋を形成してもよい。例示としての実施形態では、この架橋は、1 2 番目と 1 6 番目の間、1 6 番目と 2 0 番目の間、2 0 番目と 2 4 番目の間、2 4 番目と 2 8 番目の間または 1 7 番目と 2 0 番目の間である。他の実施形態では、これらの位置で、正の電荷を持つアミノ酸と負の電荷を持つアミノ酸との間に、塩結合などの非共有結合の相互作用を形成してもよい。

40

【 0 3 9 7 】

G I P 受容体の活性を高める上述した修飾を、個々に適用してもよいし、組み合わせで適用してもよい。G I P 受容体の活性を高める修飾の組み合わせを用いると、通常は、このような修飾のどれを単独で用いる場合よりも、G I P 活性が高くなる。

グルカゴン活性に影響する修飾

【 0 3 9 8 】

50

いくつかの実施形態では、天然のグルカゴン（配列番号 1 0 0 1）の 1 6 番目のアミノ酸修飾によって、グルカゴン活性が増強される。非限定的な例として、このような増強された活性は、1 6 番目の天然のセリンを、グルタミン酸で置換あるいは、原子 4 個の長さの側鎖を有する別の負の電荷を持つアミノ酸で置換あるいは、グルタミン、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸のうちの任意の 1 つで置換あるいは、少なくとも 1 個のヘテロ原子（N、O、S、P など）を含有し、原子約 4 個（または 3 個～5 個）の長さの側鎖を有する電荷を持つアミノ酸で置換することによって、与えられるものである。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対するもとの選択性を、GLP-1 受容体に対して保持する。

#### 【0399】

3 番目の天然のグルタミンから、酸性、塩基性または疎水性のアミノ酸への置換などの 3 番目のアミノ酸修飾によって、グルカゴン受容体の活性を低減してもよい。たとえば、3 番目をグルタミン酸、オルニチンまたはノルロイシンで置換すると、グルカゴン受容体の活性が実質的に低減または破壊される。

#### 【0400】

3 番目の Gln を本明細書に記載するようなグルタミン類縁体で修正することによって、グルカゴン受容体に対する活性を維持または増強してもよい。たとえば、グルカゴンアゴニストは、配列番号 1 2 4 3～1 2 4 8、1 2 5 0、1 2 5 1、1 2 5 3～1 2 5 6 のうち、どのアミノ酸配列を含むものであってもよい。

#### 【0401】

グルカゴンペプチドまたはその類縁体の C 末端領域（1 2 番目～2 9 番目のアミノ酸）の  $\alpha$  螺旋構造を安定化する修飾によって、1 番目と 2 番目のアミノ酸修飾によって低下したグルカゴン活性が回復される。たとえば、i 番目と i + 4 番目または j 番目と j + 3 番目または k 番目と k + 7 番目の 2 つのアミノ酸の側鎖間の共有結合によって、分子内架橋を形成してもよい。他の実施形態では、これらの位置で、正の電荷を持つアミノ酸と負の電荷を持つアミノ酸との間に、塩結合などの非共有結合の相互作用を形成してもよい。さらに他の実施形態では、所望の活性が保たれる位置で、この C 末端領域（アミノ酸 1 2 番目～2 9 番目）に、1 個または 2 個以上の  $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸を挿入または置換する。たとえば、1 6 番目、2 0 番目、2 1 番目または 2 4 番目のうちの 1 箇所、2 箇所、3 箇所またはすべてのアミノ酸を、Aib などの  $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸に置換する。

GLP-1 活性に影響する修飾

#### 【0402】

C 末端のアミノ酸のカルボン酸を、アミドまたはエステルなどの電荷が中性の基で置換することによって、GLP-1 受容体に対する活性が増強される。

#### 【0403】

また、本明細書にてさらに説明するように、たとえば 2 つのアミノ酸の側鎖間での分子内架橋の形成あるいは、 $\alpha$  螺旋を安定化するアミノ酸（ $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸など）を有する 1 2 番目～2 9 番目あたりでの、アミノ酸の置換および/または挿入によって、グルカゴンの C 末端領域（アミノ酸 1 2 番目～2 9 番目のあたり）における  $\alpha$  螺旋構造を安定化することで、GLP-1 受容体に対する活性も増強される。例示としての実施形態では、1 2 番目と 1 6 番目、1 3 番目と 1 7 番目、1 6 番目と 2 0 番目、1 7 番目と 2 1 番目、2 0 番目と 2 4 番目または 2 4 番目と 2 8 番目のアミノ酸の対の側鎖（i = 1 2、1 6、2 0 または 2 4 のアミノ酸の対）は、互いに結合しているため、グルカゴンの  $\alpha$  螺旋を安定させる。いくつかの実施形態では、架橋またはリンカーは、特に架橋が i 番目と i + 4 番目の間にある場合、原子約 8 個（または約 7 個～約 9 個）の長さである。いくつかの実施形態では、特に架橋が j 番目と j + 3 番目の間にある場合、架橋またはリンカーは、原子約 6 個（または約 5 個～約 7 個）の長さである。

#### 【0404】

いくつかの実施形態では、(a) 1 6 番目の天然のセリンを、グルタミン酸で置換あるいは、原子 4 個の長さの側鎖を有する別の負の電荷を持つアミノ酸で置換あるいは、グル

10

20

30

40

50

タミン、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸のうちの任意の1つで置換あるいは、少なくとも1個のヘテロ原子（N、O、S、Pなど）を含有し、原子約4個（または3個～5個）の長さの側鎖を有する電荷を持つアミノ酸で置換すること、（b）20番目の天然のグルタミンを、電荷を持つか水素結合でき、かつ、少なくとも原子約5個（または約4個～約6個）の長さの側鎖を有する別の親水性アミノ酸、たとえば、リジン、シトルリン、アルギニンまたはオルニチンで置換することによって、分子内架橋が形成される。16番目と20番目のこのようなアミノ酸の側鎖は、塩結合を形成可能であるか、共有結合可能である。いくつかの実施形態では、2つのアミノ酸が互いに結合して、ラクタム環が形成される。

#### 【0405】

10

いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドのC末端領域における $\alpha$ 螺旋構造の安定化は、ラクタム架橋以外の分子内架橋の形成によって達成される。たとえば、好適な共有結合方法は、オレフィンメタセシス、ランチオニンを基にした環化、ジスルフィド結合または修飾された硫黄含有架橋の形成、 $\alpha$ ,  $\omega$ -ジアミノアルカンでの繋ぎの使用、金属原子架橋の形成のうちの1つまたは2つ以上を含み、他のペプチド環化手段も $\alpha$ 螺旋の安定化に用いられる。

#### 【0406】

さらに他の実施形態では、所望の活性が保たれる位置で、このC末端領域（アミノ酸12番目～29番目）に、1個または2個以上の $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸を挿入または置換する。たとえば、16番目、20番目、21番目または24番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所またはすべてのアミノ酸を、Aibなどの $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸に置換する。

20

#### 【0407】

本明細書に記載するような20番目のアミノ酸修飾によって、GLP-1受容体に対する活性が高められる。

#### 【0408】

GPSSGAPPPS（配列番号1095）またはXGPSSGAPPPS（配列番号1096）をC末端に付加することによって、GLP-1受容体に対する活性が高められる。本明細書に記載するように、18番目、28番目または29番目のアミノ酸あるいは、18番目と29番目のアミノ酸を修飾することで、このような類縁体でのGLP-1活性を、さらに高めることが可能である。

30

#### 【0409】

10番目のアミノ酸を修飾して高分子芳香族アミノ酸残基（任意にTrp）にすることで、GLP-1活性が、さらに適度に高められる。

#### 【0410】

たとえば、本明細書に記載するような7番目のアミノ酸修飾によって、GLP-1受容体に対する活性が低下する。

#### 【0411】

18番目を天然のアルギニンからアラニンに置換することによって、GLP-1受容体に対する活性を、さらに増強することが可能である。

#### 【0412】

40

GLP-1受容体の活性を高める、クラス2のグルカゴン関連ペプチドに関して上述したいずれかの修飾を、個々に適用してもよいし、組み合わせで適用してもよい。GLP-1受容体の活性を高める修飾の組み合わせを用いると、通常は、このような修飾のどれを単独で用いる場合よりも、GLP-1活性が高くなる。たとえば、本発明は、16番目、20番目、C末端のカルボン酸基に修飾を有し、任意に、16番目と20番目のアミノ酸の間に共有結合を有するグルカゴンペプチド；16番目とC末端のカルボン酸基に修飾を有するグルカゴンペプチド；16番目と20番目に修飾を有し、任意に、16番目と20番目のアミノ酸の間に共有結合を有するグルカゴンペプチド；20番目とC末端のカルボン酸基に修飾を有するグルカゴンペプチドを提供するものである。

50

DPP-IV耐性を改善する修飾

## 【0413】

1 番目および / または 2 番目の修飾によって、ジペプチジルペプチダーゼ I V ( D P P I V ) による切断に対するペプチドの耐性を高めることが可能である。たとえば、1 番目および / または 2 番目を、本明細書に記載するような D P P - I V 耐性アミノ酸に置換してもよい。いくつかの実施形態では、2 番目のアミノ酸を N - メチルアラニンに置換する。

## 【0414】

2 番目 ( 2 番目の A i b など ) の修飾ならびに、場合によっては 1 番目 ( 1 番目の D M I A など ) の修飾によって、グルカゴン活性が、ときに大幅に低下することが観察された。驚くべきことに、本明細書に記載するように、グルカゴン ( アミノ酸 1 2 番目 ~ 2 9 番目のあたり ) の C 末端領域の  $\alpha$  螺旋構造を、たとえば 2 つのアミノ酸の側鎖間での共有結合の形成によって安定化することで、このグルカゴン活性の低下を回復可能である。いくつかの実施形態では、この共有結合は、「 i 」番目と「 i + 4 」番目のアミノ酸の間または「 j 」番目と「 j + 3 」番目のアミノ酸の間、たとえば、1 2 番目と 1 6 番目、1 6 番目と 2 0 番目、2 0 番目と 2 4 番目、2 4 番目と 2 8 番目または 1 7 番目と 2 0 番目のアミノ酸の間である。例示としての実施形態では、この共有結合は、1 6 番目のグルタミン酸と 2 0 番目のリジンとの間のラクタム架橋である。いくつかの実施形態では、この共有結合は、本明細書に記載するようなラクタム架橋以外の分子内架橋である。

10

分解を低減する修飾

## 【0415】

一例としてのさらに別の実施形態では、特に酸性バッファーまたはアルカリ性バッファーでの経時的なペプチドの分解を低減するように、配列番号 1 0 0 1 の 1 5 番目および / または 1 6 番目のアミノ酸を修飾することによって、クラス 2 のグルカゴン関連ペプチドのいずれかをさらに修飾して安定性を改善してもよい。このような修飾によって、1 5 番目のアスパラギン酸と 1 6 番目のセリンとの間のペプチド結合の切断が低減される。例示としての実施形態では、1 5 番目のアミノ酸修飾が欠失であるか、A s p からグルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸への置換である。他の例示としての実施形態では、1 6 番目のアミノ酸修飾が欠失であるか、S e r から T h r または A i b への置換である。他の例示としての実施形態では、1 6 番目の S e r をグルタミン酸に置換するか、原子 4 個の長さの側鎖を有する別の負の電荷を持つアミノ酸あるいは、グルタミン、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸のうちの任意の 1 つに置換する。

20

30

## 【0416】

いくつかの実施形態では、天然のペプチドの 2 7 番目に存在するメチオニン残基を、たとえば欠失または置換によって修飾する。このような修飾によって、ペプチドの酸化による分解が防止されることがある。いくつかの実施形態では、2 7 番目の M e t を、ロイシン、イソロイシンまたはノルロイシンに置換する。いくつかの具体的な実施形態では、2 7 番目の M e t をロイシンまたはノルロイシンに置換する。

## 【0417】

いくつかの実施形態では、2 0 番目および / または 2 4 番目のグルタミンを、たとえば欠失または置換によって修飾する。このような修飾によって、G l n の脱アミド化によって生じる分解を低減することができる。いくつかの実施形態では、2 0 番目および / または 2 4 番目のグルタミンを、S e r 、 T h r 、 A l a または A i b に置換する。いくつかの実施形態では、2 0 番目および / または 2 4 番目のグルタミンを、L y s 、 A r g 、 O r n またはシトルリンに置換する。

40

## 【0418】

いくつかの実施形態では、2 1 番目の A s p を、たとえば欠失または置換によって修飾する。このような修飾によって、A s p が脱水し、環状スクシンイミド中間体を形成した後、イソアスパラギン酸へ異性体化することで生じる分解を低減することができる。いくつかの実施形態では、2 1 番目を、G l u 、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸に

50

置換する。いくつかの具体的な実施形態では、21番目をGluで置換する。

$\alpha$  螺旋構造の安定化

【0419】

クラス2のグルカゴン関連ペプチドのC末端領域(アミノ酸12番目~29番目のあたり)での $\alpha$  螺旋構造の安定化によって、GLP-1活性および/またはGIP活性が増強され、1番目および/または2番目のアミノ酸修飾によって低下していたグルカゴン活性が回復する。 $\alpha$  螺旋構造は、たとえば、共有結合または非共有結合の分子内架橋の形成あるいは、12番目~29番目あたりで、 $\alpha$  螺旋を安定化するアミノ酸( $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸など)で置換するアミノ酸置換および/またはこれを挿入することによって安定化可能なものである。GIPアゴニストの $\alpha$  螺旋構造の安定化については、本明細書に記載するようにして達成すればよい。

10

アシル化およびアルキル化

【0420】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に開示のグルカゴンペプチドを、アシル基またはアルキル基、たとえば、本明細書に記載するような天然アミノ酸に対して非天然のアシル基またはアルキル基を含むように修飾する。アシル化またはアルキル化によって、グルカゴンペプチドの血中半減期を延ばすことが可能である。好都合なことに、アシル化またはアルキル化は、作用開始を遅らせるおよび/またはグルカゴン受容体および/またはGLP-1受容体での作用時間を延ばすおよび/またはDPP-IVなどのプロテアーゼに対する耐性を改善するおよび/または溶解性を改善する。グルカゴンペプチドのグルカゴン受容体および/またはGLP-1受容体および/またはGIP受容体に対する活性を、アシル化後も維持してもよい。いくつかの実施形態では、アシル化されたグルカゴンペプチドの活性は、グルカゴンペプチドのアシル化されていないものの活性に匹敵する。本明細書に記載するように、クラス2のグルカゴン関連ペプチドを、親水体が結合した同一のアミノ酸の位置でアシル化またはアルキル化してもよいし、異なるアミノ酸の位置でアシル化またはアルキル化してもよい。

20

【0421】

いくつかの実施形態では、本発明は、グルカゴンペプチドの10番目のアミノ酸に共有結合しているアシル基またはアルキル基を有するように修飾されたグルカゴンペプチドを提供するものである。グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドの10番目のアミノ酸とアシル基またはアルキル基との間に、スペーサーをさらに有するものであってもよい。いくつかの実施形態では、アシル基は、脂肪酸または胆汁酸あるいは、これらの塩、たとえば、C4~C30脂肪酸、C8~C24脂肪酸、コール酸、C4~C30アルキル、C8~C24アルキルあるいは、胆汁酸のステロイド部分を有するアルキルである。スペーサーは、アシル基またはアルキル基を結合するための好適な反応性基を有する部分であれば、どの部分であってもよい。例示としての実施形態では、スペーサーは、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性の二官能性または疎水性の二官能性スペーサーであってもよい。いくつかの実施形態では、スペーサーは、Trp、Glu、Asp、Cys、NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COOHを有するスペーサーからなる群から選択され、式中、mは1~6の任意の整数であり、nは2~12の任意の整数である。このようなアシル化グルカゴンペプチドされたまたはアルキル化されたグルカゴンペプチドは、親水体、任意にポリエチレングリコールをさらに含むものであってもよい。上記のグルカゴンペプチドはいずれも、2個のアシル基または2個のアルキル基またはこれらの組み合わせを有するものであってもよい。

30

40

結合体と融合体

【0422】

GIPアゴニストを、任意に共有結合を介して、また、任意にリンカーを介して、本明細書に記載するような結合体部分に結合することが可能である。

【0423】

他の実施形態では、第2のペプチドはXGPSSGAPPPS(配列番号1096)であり、ここ

50

で、Xは、20種類の一般的なアミノ酸、たとえば、グルタミン酸、アスパラギン酸またはグリシンから選択される。いくつかの実施形態では、Xは、そのアミノ酸の側鎖に共有結合している親水体をさらに有するCysなどのアミノ酸を表す。このようなC末端の延長部分は、溶解性を改善し、GIP活性またはGLP-1活性をも改善できることがある。グルカゴンペプチドがカルボキシ末端の延長部分をさらに有するいくつかの実施形態では、延長部分のカルボキシ末端のアミノ酸が、カルボン酸ではなくアミド基またはエステル基で終端する。

#### 【0424】

いくつかの実施形態では、たとえば、C末端の延長部分を有するグルカゴンペプチドにおいて、天然のグルカゴンペプチドの29番目のスレオニンをグリシンに置換する。たとえば、29番目をスレオニンからグリシンへと置換し、GPSSGAPPPS（配列番号1095）のC末端の延長部分を有するグルカゴンペプチドは、同一のC末端の延長部分を有するように修飾した天然のグルカゴンよりもGLP-1受容体に対する活性が4倍高い。このT29G置換を本明細書に開示の他の修飾と併用して、GLP-1受容体に対するグルカゴンペプチドの親和性を高めることが可能である。たとえば、T29G置換を、S16EおよびN20Kのアミノ酸置換と組み合わせ、任意に16番目と20番目との間のラクタム架橋も組み合わせ、さらに任意に、本明細書に記載するようなPEG鎖の付加も組み合わせることが可能である。

10

#### 【0425】

いくつかの実施形態では、C末端にアミノ酸を付加し、この追加のアミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンからなる群から選択される。

20

溶解性を高める修飾

#### 【0426】

もうひとつの実施形態では、好ましくは配列番号1001の27番目よりC末端側の位置でのアミノ酸置換および/または電荷を持つアミノ酸をペプチドのC末端領域に導入する付加によって、グルカゴンペプチドの溶解性を改善することが可能である。任意に、電荷を持つ、1個、2個または3個のアミノ酸を、C末端領域内、好ましくは27番目よりC末端側に導入してもよい。いくつかの実施形態では、28番目および/または29番目の天然のアミノ酸（単数または複数）を、1個または2つ個電荷を持つアミノ酸に置換するおよび/または別の実施形態では、電荷を持つ1～3個のアミノ酸をペプチドのC末端に付加する。例示としての実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうちの1個、2個またはすべてが、負の電荷を持つ。いくつかの実施形態では、負の電荷を持つ（酸性アミノ酸）は、アスパラギン酸またはグルタミン酸である。

30

#### 【0427】

保存的な置換などの追加の修飾をグルカゴンペプチドにほどこしてもよく、このような修飾をしても、依然としてGIP活性（かつ任意にGLP-1活性および/またはグルカゴン活性）を保持できる。

他の修飾

#### 【0428】

GIP活性を高めるまたは低下させ、グルカゴン受容体の活性を高めるまたは低下させ、GLP-1受容体の活性を高めるクラス2のペプチドに関して上述した修飾を、個々に適用してもよいし、組み合わせで適用してもよい。クラス2のグルカゴン関連ペプチドに関して上述したどの修飾も、クラス2のグルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に記載するような溶解性および/または安定性および/または作用時間の増大などの他の望ましい特性を与える、他の修飾と組み合わせることが可能である。あるいは、クラス2のグルカゴン関連ペプチドに関して上述したどの修飾も、溶解性または安定性または活性に実質的に影響しない、クラス2のグルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に記載の他の修飾と組み合わせることが可能である。修飾の例として以下のものがあげられるが、これらに限定されるものではない。

40

（A）1個、2個、3個または4個以上の電荷を持つアミノ酸（単数または複数）を、

50

天然のグルカゴンのC末端領域、好ましくは27番目よりC末端側の位置に導入することなどによる、溶解性の改善。このような電荷を持つアミノ酸は、28番目または29番目などで、天然のアミノ酸を電荷を持つアミノ酸で置換することあるいは、27番目、28番目または29番目の後などに、電荷を持つアミノ酸を付加することによって導入可能なものである。例示としての実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうち、1個、2個、3個またはすべてが、負の電荷を持つ。他の実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうち、1個、2個、3個またはすべてが、正の電荷を持つ。このような修飾によって、25℃で24時間後に測定すると、約5.5～約8の特定のpH、たとえばpH7で、天然のグルカゴンと比較して、溶解性が少なくとも2倍、5倍、10倍、15倍、25倍、30倍またはそれより高くなるなど、溶解性が高まる。

10

(B) ペプチドの16番目、17番目、20番目、21番目、24番目または29番目、C末端の延長部分の範囲内またはC末端のアミノ酸などで、本明細書に記載するようなポリエチレングリコール鎖などの親水体を付加することによる、溶解性および作用時間または血中半減期の増大。

(C) 本明細書に記載するようなグルカゴンペプチドのアシル化またはアルキル化による、溶解性の増大および/または作用時間または血中半減期の延長および/または作用開始を遅らせること。

(D) 本明細書に記載するような1番目または2番目におけるアミノ酸の修飾による、ジベプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)での切断に対する耐性を導入することによる、作用時間または血中半減期の延長。

20

(E) 欠失あるいは、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸への置換などの15番目のAspの修飾による、安定性の向上。このような修飾によって、25℃で24時間後に、もとのペプチドの少なくとも75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%、最大100%が保持されるなど、pH5.5～8の範囲内でのあるpHにおいて、分解または切断を低減することができる。このような修飾は、15番目のアスパラギン酸と16番目のセリンとの間のペプチド結合の切断を低減するものである。

(F) ThrまたはAlaへの置換など、16番目のSerの修飾による、安定性の向上。このような修飾によって、15番目のアスパラギン酸と16番目のセリンとの間のペプチド結合の切断も低減される。

30

(G) ロイシンまたはノルロイシンへの置換などによる、27番目のメチオニンの修飾による安定性の向上。このような修飾によって、酸化による分解を低減することができる。また、Ser、Thr、AlaまたはAlaへの置換など、20番目または24番目のGlnの修飾によって、安定性を向上させることも可能である。このような修飾によって、Glnの脱アミド化によって生じる分解を低減することができる。Gluへの置換など、21番目のAspの修飾によって安定性を向上させることが可能である。このような修飾によって、Aspが脱水し、環状スクシンイミド中間体を形成した後、イソアスパラギン酸へ異性体化することで生じる分解を低減することができる。

(H) 活性には実質的に影響しない非保存的なまたは保存的な置換、付加または欠失、たとえば、2番目、5番目、9番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、15番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目のうちの1箇所または2箇所以上における保存的な置換、これらの位置の1個または2個以上のアミノ酸からAlaへの置換、27番目、28番目または29番目のうちの1箇所または2箇所以上におけるアミノ酸の欠失あるいは、29番目のアミノ酸の欠失(任意に、C末端のカルボン酸基からC末端のアミドまたはエステルへの変更を組み合わせてもよい)、12番目のLysからArgへの置換、10番目のTyrからValまたはPheへの置換。

40

【0429】

GPSSGAPPPS(配列番号1095)をC末端に付加することで、PEG化後も活性が保たれる。

50



## 【0430】

天然のグルカゴンペプチドの位置には、親ペプチドの活性を少なくともいくらかは保ったままで修飾可能なものがある。したがって、本出願人は、2番目、5番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目にある1個または2個以上のアミノ酸を、天然のグルカゴンペプチドに存在するものとは異なるアミノ酸で置換し、それでもなおグルカゴン受容体に対する活性を保持できると予想している。

## 【0431】

いくつかの実施形態では、18番目を、Ala、SerまたはThrからなる群から選択されるアミノ酸に置換する。いくつかの実施形態では、20番目のアミノ酸を、Ser、Thr、Lys、Arg、Orn、シトルリンまたはIleに置換する。いくつかの実施形態では、21番目を、Glu、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸に置換する。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、16番目、17番目、18番目、20番目、21番目、23番目、24番目、27番目、28番目、29番目から選択される1～10個のアミノ酸修飾を有する。例示としての実施形態では、この修飾は、17番目のグルタミン、18番目のアラニン、21番目のグルタミン酸、23番目のイソロイシン、24番目のアラニン、27番目のバリン、29番目のグリシンからなる群から選択される1個または2個以上のアミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、17番目～26番目から選択される1～2個のアミノ酸が、親ペプチドと異なる。他の実施形態では、17番目～22番目から選択される1～2個のアミノ酸が、親ペプチドと異なる。さらに他の実施形態では、修飾は、17番目のグルタミン、18番目のアラニン、21番目のグルタミン酸、23番目のイソロイシン、24番目のアラニンである。

## 【0432】

いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドのカルボキシ末端に、1個または2個以上のアミノ酸を付加する。このアミノ酸は通常、20種類の一般的なアミノ酸から選択され、いくつかの実施形態では、このアミノ酸は、天然のアミノ酸のカルボン酸に代えてアミド基を有する。例示としての実施形態では、付加されるアミノ酸は、グルタミン酸およびアスパラギン酸およびグリシンからなる群から選択される。

活性を破壊しない他の修飾は、W10またはR20を含む。

## 【0433】

いくつかの実施形態では、1個または2個のアミノ酸残基でC末端を短縮することによって、本明細書に開示のクラス2のグルカゴン関連ペプチドを修飾するが、グルカゴン受容体、GLP-1受容体および/またはGIP受容体に対する同様の活性は保持されたままである。これに関して、29番目および/または28番目のアミノ酸を欠失させることが可能である。

例示としての実施形態

## 【0434】

本発明のいくつかの実施形態によれば、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号1001）の類縁体は、（a）GIPアゴニスト活性を与える、1番目のアミノ酸修飾、（b）類縁体のC末端領域（アミノ酸12番目～29番目）のα螺旋構造を安定化する修飾、（c）任意に、1～10個（1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個など）のさらに別のアミノ酸修飾を伴う、配列番号1001を有する。いくつかの実施形態では、類縁体は、本明細書に記載したGIP受容体に対する天然のGIPの活性あるいは、GIP受容体に対する他の任意の活性レベルの少なくとも約1%を示す。

## 【0435】

特定の実施形態では、α螺旋構造を安定化する修飾は、分子内架橋を提供または導入するものであり、たとえば、本明細書に記載したものなどの共有結合の分子内架橋を含む。いくつかの実施形態における共有結合の分子内架橋は、ラクタム架橋である。これらの実施形態の類縁体のラクタム架橋は、本明細書に記載するようなラクタム架橋であってもよ

い。たとえば、「 $\alpha$  螺旋構造の安定化」セクションのラクタム架橋についての教示内容を参照のこと。たとえば、ラクタム架橋は、 $i$  番目のアミノ酸と  $i + 4$  番目のアミノ酸の側鎖間あるいは、 $j$  番目のアミノ酸と  $j + 3$  番目のアミノ酸の側鎖間のものであってもよい（ $i$  は 12、13、16、17、20 または 24 であり、 $j$  は 17 である）。特定の実施形態では、ラクタム架橋は、16 番目と 20 番目のアミノ酸の間であっててもよく、この場合、16 番目および 20 番目のうちの一方のアミノ酸は Glu に置換され、16 番目と 20 番目の他方のアミノ酸は Lys に置換される。

【0436】

別の実施形態では、 $\alpha$  螺旋構造を安定化する修飾は、類縁体の 16 番目、20 番目、21 番目、24 番目における、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つの  $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸の導入である。いくつかの実施形態では、 $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸は Aib である。特定の態様では、 $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸（Aib など）は 20 番目にあり、16 番目のアミノ酸を、本明細書に記載の式 I V のアミノ酸などの正の電荷を持つアミノ酸に置換する。式 I V のアミノ酸は、ホモリジン、Lys、Orn または 2 , 4 - ジアミノ酪酸（Dab）であっててもよい。

10

【0437】

本発明の具体的な態様では、1 番目でのアミノ酸修飾は、His から、イミダゾール側鎖を欠いたアミノ酸（たとえば高分子芳香族アミノ酸（Tyr など））への置換である。

【0438】

特定の態様では、グルカゴンの類縁体は、27 番目、28 番目、29 番目のうちの 1 箇所、2 箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾である。たとえば、27 番目の Met を高分子脂肪族アミノ酸（任意に Leu）に置換可能であり、28 番目の Asn を低分子脂肪族アミノ酸（任意に Ala）に置換可能であり、29 番目の Thr を低分子脂肪族アミノ酸（任意に Gly）に置換可能であり、あるいは、上記の 2 つまたは 3 つを組み合わせてもよい。具体的な実施形態では、グルカゴンの類縁体は、27 番目の Leu、28 番目の Ala、29 番目の Gly または Thr を有する。

20

【0439】

本発明の特定の実施形態では、グルカゴンの類縁体は、29 番目のアミノ酸より C 末端側で 1 ~ 21 個のアミノ酸からなる延長部分を有する。延長部分は、配列番号 1095 または 1096 などのアミノ酸配列を有するものであってもよい。上記に加えてあるいは上記に代えて、グルカゴンの類縁体は、延長部分の 1 ~ 6 個のアミノ酸が正の電荷を持つアミノ酸である、延長部分を有するものであってもよい。正の電荷を持つアミノ酸は、Lys、ホモリジン、Orn、Dab を含むがこれらに限定されるものではない、式 I V のアミノ酸であっててもよい。

30

【0440】

いくつかの実施形態におけるグルカゴンの類縁体は、本明細書に記載するようにアシル化されたまたはアルキル化されている。たとえば、アシル基またはアルキル基は、本明細書にてさらに説明するように、類縁体の 10 番目または 40 番目でスペーサーを介してあるいは介さずに、グルカゴンの類縁体に結合していてもよい。上記に加えてあるいは上記に代えて、本明細書にてさらに説明するような親水体を含むように類縁体を修飾してもよい。さらに、いくつかの実施形態では、類縁体は、以下の修飾のうちのいずれか 1 つまたはそれらの組み合わせを有する。

40

（a）2 番目の Ser における、D - Ser、Ala、D - Ala、Gly、N - メチルセリン、Aib、Val または  $\alpha$  - アミノ - N - 酪酸との置換、

（b）10 番目の Tyr における、Trp、Lys、Orn、Glu、Phe または Val との置換、

（c）10 番目の Lys へのアシル基の結合、

（d）12 番目の Lys における、Arg または Ile との置換、

（e）16 番目の Ser における、Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイ

50

ン酸、T h r、G l yまたはA i bとの置換、

( f ) 17番目のA r gにおける、G l nとの置換、

( g ) 18番目のA r gにおける、A l a、S e r、T h rまたはG l yとの置換、

( h ) 20番目のG l nにおける、S e r、T h r、A l a、L y s、シトルリン、A r g、O r nまたはA i bとの置換、

( i ) 21番目のA s pにおける、G l u、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸との置換、

( j ) 23番目のV a lにおける、I l eとの置換、

( k ) 24番目のG l nにおける、A s n、S e r、T h r、A l aまたはA i bとの置換、

10

( l ) 2番目、5番目、9番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、15番目、16番目、8 19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目、29番目のいずれかにおける保存的な置換。

#### 【0441】

例示としての実施形態では、G I Pアゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号1001）の類縁体は、以下の修飾を有する。

( a ) G I Pアゴニスト活性を与える、1番目のアミノ酸修飾、

( b ) i番目とi + 4番目のアミノ酸の側鎖間またはj番目とj + 3番目のアミノ酸の側鎖間でのラクタム架橋（iは12、13、16、17、20または24であり、jは17である）、

20

( c ) 27番目、28番目および29番目のうちの1箇所、2箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾、たとえば、27番目および/または28番目におけるアミノ酸修飾、

( d ) 1 ~ 9個または1 ~ 6個のさらなるアミノ酸修飾、たとえば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個または9個のさらなるアミノ酸修飾、

かつ、G I P受容体の活性化に対する類縁体のE C 5 0は、約10 n Mまたはそれ未満である。

#### 【0442】

これらの実施形態の類縁体のラクタム架橋は、本明細書に記載するようなラクタム架橋であってもよい。たとえば、「α螺旋構造の安定化」セクションのラクタム架橋についての教示内容を参照のこと。たとえば、ラクタム架橋は、16番目と20番目のアミノ酸の間であってもよく、この場合、16番目および20番目のうちの一方のアミノ酸はG l uに置換され、16番目と20番目の他方のアミノ酸はL y sに置換される。

30

#### 【0443】

これらの実施形態によれば、類縁体は、たとえば、配列番号1005 ~ 1094のいずれかのアミノ酸配列を有するものであってもよい。

#### 【0444】

他の例示としての実施形態では、G I Pアゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号1001）の類縁体は、以下の修飾を有する。

( a ) G I Pアゴニスト活性を与える、1番目のアミノ酸修飾、

( b ) 類縁体の16番目、20番目、21番目、24番目における1個、2個、3個またはすべてのアミノ酸が、α, α - 二置換アミノ酸で置換されていること、

40

( c ) 27番目、28番目および29番目のうちの1箇所、2箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾、たとえば、27番目および/または28番目におけるアミノ酸修飾、

( d ) 1 ~ 9個または1 ~ 6個のさらなるアミノ酸修飾、たとえば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個または9個のさらなるアミノ酸修飾、

かつ、G I P受容体の活性化に対する類縁体のE C 5 0は、約10 n Mまたはそれ未満である。

#### 【0445】

これらの実施形態の類縁体のα, α - 二置換アミノ酸は、アミノイソ酪酸（A i b）あるいは、メチル、エチル、プロピル、n - ブチルから選択される同一の基または異なる基

50

で二置換されたアミノ酸またはシクロオクタンまたはシクロヘプタン（１－アミノシクロオクタン－１－カルボン酸など）で二置換されたアミノ酸を含むがこれらに限定されるものではない、どのような $\alpha, \alpha$ -二置換アミノ酸であってもよい。特定の実施形態では、 $\alpha, \alpha$ -二置換アミノ酸はA i bである。特定の実施形態では、２０番目のアミノ酸が、A i bなどの $\alpha, \alpha$ -二置換アミノ酸で置換されている。

【０４４６】

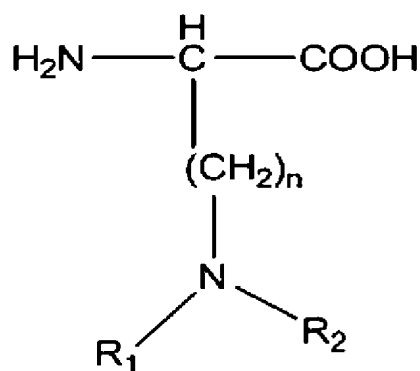
これらの実施形態によれば、類縁体は、たとえば、配列番号１０９９～１１４１、１１４４～１１６４、１１６６～１１６９、１１７３～１１７８のいずれのアミノ酸配列を含むものであってもよい。

【０４４７】

さらに他の例示としての実施形態では、G I Pアゴニスト活性を有するグルカゴン（配列番号１００１）の類縁体は、以下の修飾を有する。

- （ａ）G I Pアゴニスト活性を与える、１番目のアミノ酸修飾、
- （ｂ）１６番目のS e rにおける、式I Vのアミノ酸とのアミノ酸置換

10



[式IV]

20

30

（式中、 $n$ は、１～１６または１～１０または１～７または１～６または２～６であり、 $\text{R}_1$ および $\text{R}_2$ は各々独立に、 $\text{H}$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) $\text{OH}$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) $\text{NH}_2$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) $\text{SH}$ 、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) $(\text{C}_3 \sim \text{C}_6)$ シクロアルキル、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) $(\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 複素環)、 $(\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル) $(\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) $\text{R}_7$ 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル) $(\text{C}_3 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール)からなる群から選択され、式中、 $\text{R}_7$ は、 $\text{H}$ または $\text{OH}$ であり、式I Vのアミノ酸の側鎖は、遊離アミノ基を有する）、

（ｃ）２０番目におけるG l nから $\alpha, \alpha$ -二置換アミノ酸に置換するアミノ酸置換、

（ｄ）２７番目、２８番目および２９番目のうちの１箇所、２箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾、たとえば、２７番目および／または２８番目におけるアミノ酸修飾、

40

（ｅ）１～９個または１～６個のさらなるアミノ酸修飾、たとえば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個または９個のさらなるアミノ酸修飾、

かつ、G I P受容体の活性化に対する類縁体のE C 5 0は、約１０n Mまたはそれ未満である。

【０４４８】

これらの実施形態の類縁体の式I Vのアミノ酸は、式I Vのアミノ酸など、どのようなアミノ酸であってもよく、式中、 $n$ は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５または１６である。特定の実施形態では、 $n$ は、２、３、４または５であり、この場合、アミノ酸は、それぞれD a b、O r n、L y sまたはホモリジンである。

50

## 【0449】

これらの実施形態の類縁体の $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸は、アミノイソ酪酸(Aib)あるいは、メチル、エチル、プロピル、 $n$ -ブチルから選択される同一の基または異なる基で二置換されたアミノ酸またはシクロオクタンまたはシクロヘプタン(1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸など)で二置換されたアミノ酸を含むがこれらに限定されるものではない、どのような $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸であってもよい。特定の実施形態では、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸はAibである。

## 【0450】

これらの実施形態によれば、類縁体は、たとえば、配列番号1099~1165のいずれかのアミノ酸配列を含むものであってもよい。

10

## 【0451】

さらに他の例示としての実施形態では、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴン(配列番号1001)の類縁体は、

(a) GIPアゴニスト活性を与える、1番目のアミノ酸修飾と、

(b) 29番目のアミノ酸よりC末端側で約1~約21個のアミノ酸からなる延長部分(この場合、延長部分のアミノ酸の少なくとも1個がアシル化されたまたはアルキル化されている)と、を有し、

この場合、GIP受容体の活性化に対する類縁体のEC50は、約10nMまたはそれ未満である。

## 【0452】

いくつかの実施形態では、アシル化されたアミノ酸またはアルキル化されたアミノ酸は、式I、式IIまたは式IIIのアミノ酸である。一層具体的な実施形態では、式Iのアミノ酸は、Dab、Orn、Lysまたはホモリジンである。また、いくつかの実施形態では、約1~約21個のアミノ酸からなる延長部分は、GPSSGAPPPS(配列番号1095)またはXGPSSGAPPPS(配列番号1096)(Xは任意のアミノ酸である)またはGPSSGAPPPK(配列番号1170)またはXGPSSGAPPPK(配列番号1171)またはXGPSSGAPPPSK(配列番号1172)のアミノ酸配列を有し、ここで、Xは、Glyまたは低分子脂肪族アミノ酸または非極性アミノ酸またはわずかに極性のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、約1~約21個のアミノ酸は、配列番号1095、1096、1170、1171または1172と比較して、1個または2個以上の保存的な置換を含む配列を有するものであってもよい。いくつかの実施形態では、アシル化されたアミノ酸またはアルキル化されたアミノ酸は、C末端が伸長した類縁体の37番目、38番目、39番目、40番目、41番目、42番目または43番目にある。特定の実施形態では、アシル化されたアミノ酸またはアルキル化されたアミノ酸は、C末端が伸長した類縁体の40番目にある。

20

30

## 【0453】

いくつかの実施形態では、GIPアゴニスト活性を有する類縁体は、27番目、28番目および29番目のうちの1箇所、2箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾、たとえば、27番目および/または28番目のアミノ酸修飾を有する。

## 【0454】

上述した例示としての実施形態のいずれにおいても、GIPアゴニスト活性を与える、1番目のアミノ酸修飾は、Hisから、イミダゾール側鎖を欠いているアミノ酸への置換であってもよい。1番目のアミノ酸修飾は、たとえば、Hisから高分子芳香族アミノ酸への置換であってもよい。いくつかの実施形態では、高分子芳香族アミノ酸は、Tyrなどをはじめとして、本明細書に記載したうちのいずれであってもよい。

40

## 【0455】

特定の態様では、類縁体は、GIPアゴニスト活性を与える1番目にアミノ酸修飾を持たない。いくつかの態様では、1番目のアミノ酸は、高分子芳香族アミノ酸、たとえばTyrではない。いくつかの実施形態では、1番目のアミノ酸は、イミダゾール環、たとえば、His、Hisの類縁体を有するアミノ酸である。特定の実施形態では、類縁体は、国際特許出願公開第WO2010/011439号に開示されたいずれの化合物もはない

50

。特定の態様では、類縁体は、配列番号 1 2 6 3 ~ 1 2 7 5 のいずれかのアミノ酸配列を有する。

【 0 4 5 6 】

また、上記の例示としての実施形態に鑑みて、27番目、28番目および29番目のうちの1箇所、2箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾は、本明細書に記載のこれらの位置でのどのような修飾であってもよい。たとえば、27番目のMetを高分子脂肪族アミノ酸（任意にLeu）に置換可能であり、28番目のAsnを低分子脂肪族アミノ酸（任意にAla）に置換可能であるおよび/または29番目のThrを低分子脂肪族アミノ酸（任意にGly）に置換可能である。あるいは、類縁体は、このような27番目および/または28番目のアミノ酸修飾を有するものであってもよい。

10

【 0 4 5 7 】

上記の例示としての実施形態の類縁体は、1~9個または1~6個の追加のアミノ酸修飾、たとえば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個または9個のさらなるアミノ酸修飾、たとえば、GIP受容体、GLP-1受容体、グルカゴン受容体のいずれかに対する活性を高めるまたは低下させる、溶解性を改善する、作用時間または血中半減期を改善する、作用開始を遅らせるまたは安定性を高める、本明細書に記載のいずれかの修飾などを、さらに含むものであってもよい。類縁体は、たとえば、12番目のアミノ酸修飾、任意にIleへの置換および/または17番目および18番目のアミノ酸修飾、任意に17番目におけるQとの置換および18番目におけるAとの置換および/またはGPSS GAPPPS（配列番号1095）またはXGPSSGAPPPS（配列番号1096）あるいは、配列番号1095または1096と比較して1個または2個以上の保存的な置換を有する配列の、C末端への付加をさらに含むものであってもよい。類縁体は、以下の修飾のうちの1つまたは2つ以上を含むものであってもよい。

20

(i) 2番目のSerにおける、D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチルセリン、Aib、Valまたはα-アミノ-N-酪酸との置換、

(ii) 10番目のTyrにおける、Trp、Lys、Orn、Glu、PheまたはValとの置換、

(iii) 10番目のLysへのアシル基の結合、

(iv) 12番目のLysにおける、Argとの置換、

(v) 16番目のSerにおける、Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、GlyまたはAibとの置換、

30

(vi) 17番目のArgにおける、Glnとの置換、

(vii) 18番目のArgにおける、Ala、Ser、ThrまたはGlyとの置換、

(viii) 20番目のGlnにおける、Ala、Ser、Thr、Lys、シトルリン、Arg、OrnまたはAibとの置換、

(ix) 21番目のAspにおける、Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸との置換、

(x) 23番目のValにおける、Ileとの置換、

(xi) 24番目のGlnにおける、Asn、Ala、Ser、ThrまたはAibとの置換、

40

(xii) 2番目、5番目、9番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、15番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目、29番目のいずれかにおける保存的な置換。

【 0 4 5 8 】

いくつかの実施形態における類縁体は、修飾(i)から(xii)の組み合わせを有する。上記に代えてまたは上記に加えて、類縁体は、3番目のアミノ酸修飾（GlnからGluへのアミノ酸置換など）を有するものであってもよく、この場合、類縁体は、グルカゴン受容体に対する活性がグルカゴンの1%未満である。上記に代えてまたは上記に加えて、類縁体は、7番目にアミノ酸修飾（Thrから、ヒドロキシ基を欠いたアミノ酸、た

50

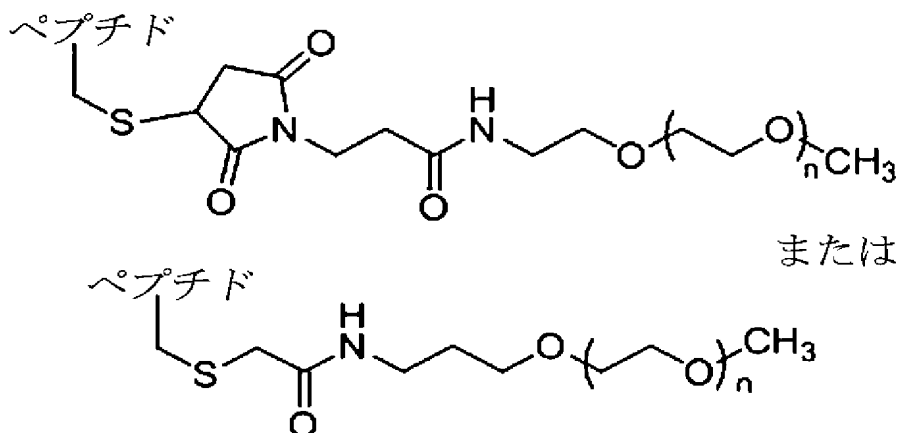
例えば、A b u または I l e へのアミノ酸置換など)を有するものであってもよく、この場合、類縁体は、G L P - 1 受容体に対する活性が G L P - 1 の約 1 0 % 未満である。

#### 【0459】

例示としての実施形態に関して、類縁体は、親水体と共有結合していてもよい。いくつかの実施形態では、類縁体は、アミノ酸の 1 6 番目、1 7 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目、2 9 番目、4 0 番目または C 末端のいずれかで親水体と共有結合している。特定の実施形態では、類縁体は、C 末端の延長部分(配列番号 1 0 9 5 のアミノ酸配列など)と、親水体が 4 0 番目で類縁体に共有結合するように親水体を有するアミノ酸の付加と、を有する。

#### 【0460】

いくつかの実施形態では、親水体は、類縁体の L y s、C y s、O r n、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンと共有結合している。L y s、C y s、O r n、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンは、グルカゴン配列(配列番号 1 0 0 1)に対して天然のアミノ酸であってもよいし、配列番号 1 0 0 1 の天然のアミノ酸を置換するアミノ酸であってもよい。親水体が C y s と結合しているいくつかの実施形態では、親水体への結合は、以下の構造を含み得る。



#### 【0461】

親水体を有する類縁体に関して、親水体は、本明細書に記載のどのようなものであってもよい。たとえば、「親水体の結合」セクションの教示内容を参照のこと。いくつかの実施形態では、親水体は、ポリエチレングリコール(P E G)である。特定の実施形態における P E G は、分子量が約 1, 0 0 0 ダルトン~約 4 0, 0 0 0 ダルトン、たとえば、約 2 0, 0 0 0 ダルトン~約 4 0, 0 0 0 ダルトンである。

#### 【0462】

例示としての実施形態に関して、類縁体は、側鎖がアシル基またはアルキル基(天然のアミノ酸に対して非天然のアシル基またはアルキル基など)に共有結合している、修飾されたアミノ酸を有するものであってもよい。アシル化された類縁体またはアルキル化された類縁体は、「アシル化およびアルキル化」のセクションで説明するアシル化されたペプチドまたはアルキル化されたペプチドに準じるものであってもよい。いくつかの実施形態では、アシル基は、たとえば、C 1 0 の脂肪族アシル基またはアルキル基、C 1 2 の脂肪族アシル基またはアルキル基、C 1 4 の脂肪族アシル基またはアルキル基、C 1 6 の脂肪族アシル基またはアルキル基、C 1 8 の脂肪族アシル基またはアルキル基、C 2 0 のアシル基またはアルキル基または C 2 2 のアシル基またはアルキル基など、C 4 から C 3 0 の脂肪族アシル基である。アシル基またはアルキル基は、1 0 番目または 4 0 番目のアミノ酸あるいは、C 末端のアミノ酸を含むがこれらに限定されるものではない、類縁体のアミノ酸に共有結合していてもよい。特定の実施形態では、類縁体は、アシル基またはアルキル基が 4 0 番目で類縁体に共有結合するような形で、C 末端の延長部分(配列番号 1 0 9 5 のアミノ酸配列など)と、アシル基またはアルキル基を有するアミノ酸の付加とを有す

る。いくつかの実施形態では、アシル基またはアルキル基は、式 I、式 II または式 III のアミノ酸、たとえば、Lys 残基の側鎖に共有結合している。アシル基またはアルキル基を、グルカゴン配列（配列番号 1001）に対して天然のアミノ酸に共有結合してもよいし、配列番号 1001 の配列あるいは配列番号 1001 の配列に続いて配列番号 1095 の配列（N 末端または C 末端で）に付加されるアミノ酸に結合してもよく、あるいは、天然のアミノ酸、たとえば、配列番号 1001 の 10 番目の Tyr を置換するアミノ酸に結合してもよい。

#### 【0463】

類縁体がアシル基またはアルキル基を有する上述した例示としての実施形態では、類縁体は、本明細書に記載するように、スペーサーを介してアシル基またはアルキル基と結合していてもよい。スペーサーは、たとえば、原子 3 ~ 10 個の長さであればよく、たとえば、アミノ酸（6 - アミノヘキサン酸、本明細書に記載の任意のアミノ酸など）、ジペプチド（Ala - Ala、 $\beta$ Ala -  $\beta$ Ala、Leu - Leu、Pro - Pro、 $\gamma$ -Glu -  $\gamma$ -Glu など）、トリペプチドまたは親水性または疎水性の二官能性スペーサーであってもよい。特定の態様では、スペーサーとアシル基またはアルキル基とを合わせた全長が、原子約 14 個 ~ 約 28 個の長さである。いくつかの実施形態では、アミノ酸スペーサーは、 $\gamma$ -Glu ではない。いくつかの実施形態では、ジペプチドスペーサーは、 $\gamma$ -Glu -  $\gamma$ -Glu ではない。

#### 【0464】

さらに別の例示としての実施形態では、GIP アゴニスト活性を有するグルカゴンの類縁体は、配列番号 1227、1228、1229 または 1230 のいずれかによるアミノ酸配列を有し、この配列はさらに、以下の修飾を有する。

（a）任意に、GIP アゴニスト活性を与える、1 番目のアミノ酸修飾、

（b）29 番目のアミノ酸より C 末端側で約 1 ~ 約 21 個のアミノ酸からなる延長部分（この場合、延長部分のアミノ酸の少なくとも 1 個がアシル化されたまたはアルキル化されている）、

（d）最大 6 個のさらなるアミノ酸修飾、

この場合、GIP 受容体の活性化に対する類縁体の EC50 は、約 10 nM またはそれ未満である。

#### 【0465】

いくつかの態様では、アシル化されたアミノ酸またはアルキル化されたアミノ酸は、式 I、式 II または式 III のアミノ酸である。一層具体的な実施形態では、式 I のアミノ酸は、Dab、Orn、Lys またはホモリジンである。また、いくつかの実施形態では、約 1 個から約 21 個のアミノ酸は、GPSSGAPPPS（配列番号 1095）または XGPSSGAPPPS（配列番号 1096）（X は任意のアミノ酸である）または GPSSGAPPPK（配列番号 1170）または XGPSSGAPPPK（配列番号 1171）または XGPSSGAPPPSK（配列番号 1172）のアミノ酸配列を有し、ここで、X は、Gly または低分子脂肪族アミノ酸または非極性アミノ酸またはわずかに極性のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、約 1 ~ 約 21 個のアミノ酸は、配列番号 1095、1096、1170、1171 または 1172 と比較して、1 個または 2 個以上の保存的な置換を含む配列を有するものであってもよい。いくつかの実施形態では、アシル化されたアミノ酸またはアルキル化されたアミノ酸は、C 末端が伸長した類縁体の 37 番目、38 番目、39 番目、40 番目、41 番目、42 番目または 43 番目にある。特定の態様では、アシル化されたアミノ酸またはアルキル化されたアミノ酸は、C 末端が伸長した類縁体の 40 番目にある。

#### 【0466】

上述した例示としての実施形態のいずれにおいても、GIP アゴニスト活性を与える 1 番目のアミノ酸は、イミダゾール側鎖を欠いているアミノ酸であってもよい。1 番目のアミノ酸は、たとえば、高分子芳香族アミノ酸であってもよい。いくつかの実施形態では、高分子芳香族アミノ酸は、Tyr などをはじめとして、本明細書に記載したうちのいずれであってもよい。

10

20

30

40

50



## 【0467】

上記の例示としての実施形態の類縁体は、たとえば、GIP受容体、GLP-1受容体、グルカゴン受容体のいずれかに対する活性を高めるまたは低下させる、溶解性を改善する、作用時間または血中半減期を改善する、作用開始を遅らせるまたは安定性を高める、本明細書に記載のいずれかの修飾などの、1～6個のさらなるアミノ酸修飾を含むものであってもよい。

## 【0468】

特定の態様では、上記の例示としての実施形態で説明したグルカゴン類縁体は、27番目、28番目および29番目のうちの1箇所、2箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾を有する。これらの位置での修飾は、これらの位置に関して本明細書で説明するいずれの修飾であってもよい。たとえば、配列番号1227、1228、1229または1230に関して、27番目を高分子脂肪族アミノ酸(Leu、Ileまたはノルロイシンなど)またはMetに置換することが可能であり、28番目を別の低分子脂肪族アミノ酸(GlyまたはAlaなど)またはAsnに置換することが可能であるおよび/または29番目を別の低分子脂肪族アミノ酸(AlaまたはGlyなど)またはThrに置換することが可能である。あるいは、類縁体は、このような27番目および/または28番目のアミノ酸修飾を有するものであってもよい。

## 【0469】

類縁体は、以下の追加の修飾のうち、1個または2個以上をさらに含むものであってもよい。

(i) 2番目のアミノ酸は、D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチルセリン、Aib、Valまたは $\alpha$ -アミノ-N-酪酸のうちのどれでもよく、

(ii) 10番目のアミノ酸は、Tyr、Trp、Lys、Orn、Glu、PheまたはValであり、

(iii) 10番目のLysに対するアシル基の結合、

(iv) 12番目のアミノ酸は、Ile、LysまたはArgであり、

(v) 16番目のアミノ酸は、Ser、Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、GlyまたはAibのうちのどの1つでもよく、

(vi) 17番目のアミノ酸は、GlnまたはArgであり、

(vii) 18番目のアミノ酸は、Ala、Arg、Ser、ThrまたはGlyのうちのどの1つでもよく、

(viii) 20番目のアミノ酸は、Ala、Ser、Thr、Lys、シトルリン、Arg、OrnまたはAibまたは他の $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸のうちのどの1つでもよく、

(ix) 21番目のアミノ酸は、Glu、Asp、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸のうちのどの1つでもよく、

(x) 23番目のアミノ酸は、ValまたはIleであり、

(xi) 24番目のアミノ酸は、Gln、Asn、Ala、Ser、ThrまたはAibのうちのどの1つでもよく、

(xii) 2番目、5番目、9番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、15番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目、29番目のいずれかにおける1個または2個以上の保存的な置換。

## 【0470】

いくつかの実施形態における類縁体は、修飾(i)から(xii)の組み合わせを有する。上記に代えてまたは上記に加えて、類縁体は、3番目のアミノ酸修飾(GlnからGluへのアミノ酸置換など)を有するものであってもよく、この場合、類縁体は、グルカゴン受容体に対する活性がグルカゴンの1%未満である。上記に代えてまたは上記に加えて、類縁体は、7番目にアミノ酸修飾(Thrから、ヒドロキシ基を欠いたアミノ酸、たとえば、AbuまたはIleへのアミノ酸置換など)を有するものであってもよく、この

場合、類縁体は、GLP-1受容体に対する活性がGLP-1の約10%未満である。

【0471】

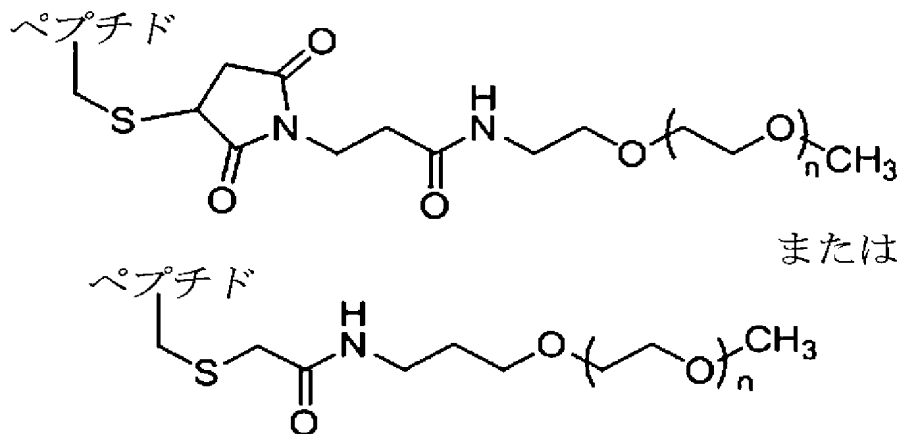
例示としての実施形態に関して、類縁体は、親水体と共有結合していてもよい。いくつかの実施形態では、類縁体は、アミノ酸の16番目、17番目、20番目、21番目、24番目、29番目、40番目またはC末端のいずれかで親水体と共有結合している。特定の実施形態では、類縁体の24番目に、親水体が共有結合している。

【0472】

いくつかの実施形態では、親水体は、類縁体のLys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンと共有結合している。Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチル-フェニルアラニンは、配列番号1001、1227、1228、1229または1230に対して天然のアミノ酸であってもよいし、置換されたアミノ酸であってもよい。親水体がCysに結合したいくつかの実施形態では、この結合は、以下の構造を有するものであってもよい。

10

20



【0473】

親水体を有する類縁体に関して、親水体は、本明細書に記載のどのようなものであってもよい。たとえば、「親水体の結合」セクションの教示内容を参照のこと。いくつかの実施形態では、親水体は、ポリエチレングリコール(PEG)である。特定の実施形態におけるPEGは、分子量が約1,000ダルトン~約40,000ダルトン、たとえば、約20,000ダルトン~約40,000ダルトンである。

30

【0474】

例示としての実施形態に関して、類縁体は、側鎖がアシル基またはアルキル基に共有結合しているC末端の延長部分内に、修飾されたアミノ酸を有するものであってもよい。アシル化された類縁体またはアルキル化された類縁体は、「アシル化およびアルキル化」のセクションで説明するアシル化されたペプチドまたはアルキル化されたペプチドに準じるものであってもよい。いくつかの実施形態では、アシル基は、たとえば、C10の脂肪族アシル基またはアルキル基、C12の脂肪族アシル基またはアルキル基、C14の脂肪族アシル基またはアルキル基、C16の脂肪族アシル基またはアルキル基、C18の脂肪族アシル基またはアルキル基、C20のアシル基またはアルキル基またはC22のアシル基またはアルキル基など、C4からC30の脂肪族アシル基である。アシル基またはアルキル基は、10番目または40番目のアミノ酸あるいは、C末端のアミノ酸を含むがこれらに限定されるものではない、類縁体のアミノ酸に共有結合していてもよい。いくつかの実施形態では、アシル基またはアルキル基は、式I、式IIまたは式IIIのアミノ酸、たとえば、Lys残基の側鎖に共有結合している。アシル基またはアルキル基は、配列番号1001、1227、1228、1229または1230に対して天然のアミノ酸に共有結合しているか、置換されたアミノ酸に結合していてもよい。アシル基またはアルキル基は、配列番号1095、1096、1171または1172に対して天然のアミノ酸に共有結合しているか、置換されたアミノ酸に結合していてもよい。

40

50

## 【0475】

類縁体がアシル基またはアルキル基を有する上述した例示としての実施形態では、類縁体は、本明細書に記載するように、スペーサーを介してアシル基またはアルキル基と結合していてもよい。スペーサーは、たとえば、原子3～10個の長さであればよく、たとえば、アミノ酸（6-アミノヘキサン酸、本明細書に記載の任意のアミノ酸など）、ジペプチド（Ala-Ala、βAla-βAla、Leu-Leu、Pro-Pro、γ-Glu-γ-Gluなど）、トリペプチドまたは親水性または疎水性の二官能性スペーサーであってもよい。特定の態様では、スペーサーとアシル基またはアルキル基とを合わせた全長が、原子約14個～約28個の長さである。いくつかの実施形態では、アミノ酸スペーサーは、γ-Gluではない。いくつかの実施形態では、ジペプチドスペーサーは、γ-Glu-γ-Gluではない。

10

## 【0476】

いくつかの極めて具体的な実施形態では、本発明の類縁体は、配列番号1099～1141、1144～1164、1166、1192～1207、1209～1221、1223からなる群から選択されるアミノ酸配列または配列番号1167～1169、1173～1178、1225からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

## 【0477】

さらに、本発明の類縁体の具体例は、表1～表3に示すものをいずれも含むが、これらに限定されるものではない。

## 【0478】

さらに別の例示としての実施形態では、GIPアゴニスト活性を有するグルカゴンの類縁体は、アシル基またはアルキル基（天然のアミノ酸に対して非天然のアシル基またはアルキル基など）を有し、ここで、アシル基またはアルキル基は、スペーサーに結合し、（i）スペーサーは、類縁体の10番目でアミノ酸の側鎖に結合している；または（ii）類縁体は、29番目のアミノ酸よりC末端側で1～21個のアミノ酸からなる延長部分を有し、スペーサーは、配列番号1001の37番目～43番目の1つに対応するアミノ酸の側鎖に結合し、この場合、GIP受容体の活性化に対する類縁体のEC50は、約10nMまたはそれ未満である。

20

## 【0479】

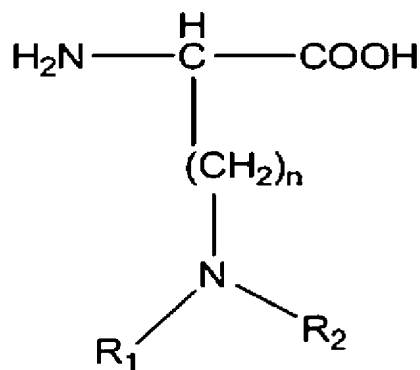
このような実施形態では、類縁体は、（i）GIPアゴニスト活性を与える、1番目のアミノ酸修飾、（ii）27番目、28番目および29番目のうちの1箇所、2箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾、（iii）以下のうちの少なくとも1つ

30

（A）類縁体は、i番目とi+4番目のアミノ酸の側鎖間またはj番目とj+3番目のアミノ酸の側鎖間でのラクタム架橋、（iは12、13、16、17、20または24であり、jは17である）を有し、

（B）類縁体の16番目、20番目、21番目、24番目における1個、2個、3個またはすべてのアミノ酸が、α,α-二置換アミノ酸で置換され、または

（C）類縁体は、（i）16番目のSerにおける、式IVのアミノ酸とのアミノ酸置換を有し、



[式IV]

10

式中、 $n$ は1～7であり、 $\text{R}_1$ および $\text{R}_2$ は各々独立に、 $\text{H}$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル、( $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) $\text{OH}$ 、( $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) $\text{NH}_2$ 、( $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ アルキル) $\text{SH}$ 、( $\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)( $\text{C}_3 \sim \text{C}_6$ )シクロアルキル、( $\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)( $\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 複素環)、( $\text{C}_0 \sim \text{C}_4$ アルキル)( $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール) $\text{R}_7$ 、( $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル)( $\text{C}_3 \sim \text{C}_9$ ヘテロアリール)からなる群から選択され、式中、 $\text{R}_7$ は、 $\text{H}$ または $\text{OH}$ であり、式IVのアミノ酸の側鎖は、遊離アミノ基を有する；および (ii) 20番目における $\text{Gln}$ から $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸に置換するアミノ酸置換、かつ、(iv) 最大6個のさらなるアミノ酸修飾を有する、配列番号1001のアミノ酸配列を有するものであってもよい。

20

## 【0480】

これらの実施形態の類縁体の $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸は、アミノイソ酪酸(Aib)あるいは、メチル、エチル、プロピル、 $n$ -ブチルから選択される同一の基または異なる基で二置換されたアミノ酸またはシクロオクタンまたはシクロヘプタン(1-アミノシクロオクタン-1-カルボン酸など)で二置換されたアミノ酸を含むがこれらに限定されるものではない、どのような $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸であってよい。特定の実施形態では、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸はAibである。

30

## 【0481】

これらの実施形態の類縁体の式IVのアミノ酸は、式IVのアミノ酸など、どのようなアミノ酸であってよく、式中、 $n$ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16である。特定の実施形態では、 $n$ は、2、3、4または5であり、この場合、アミノ酸は、それぞれDab、Orn、Lysまたはホモリジンである。

## 【0482】

上述した例示としての実施形態のいずれにおいても、GIPアゴニスト活性を与える、1番目のアミノ酸修飾は、Hisから、イミダゾール側鎖を欠いているアミノ酸への置換であってよい。1番目のアミノ酸修飾は、たとえば、Hisから高分子芳香族アミノ酸への置換であってよい。いくつかの実施形態では、高分子芳香族アミノ酸は、Tyrなどをはじめとして、本明細書に記載したうちのいずれであってよい。

40

## 【0483】

また、上記の例示としての実施形態に鑑みて、27番目、28番目および29番目のうちの1箇所、2箇所またはすべてにおけるアミノ酸修飾は、本明細書に記載のこれらの位置でのどのような修飾であってよい。たとえば、27番目のMetを高分子脂肪族アミノ酸(任意にLeu)に置換可能であり、28番目のAsnを低分子脂肪族アミノ酸(任意にAla)に置換可能であるおよび/または29番目のThrを低分子脂肪族アミノ酸

50

(任意に Gly) に置換可能である。あるいは、類縁体は、このような 27 番目および / または 28 番目のアミノ酸修飾を有するものであってもよい。

【0484】

上記の例示としての実施形態の類縁体は、1 ~ 9 個または 1 ~ 6 個の追加のアミノ酸修飾、たとえば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個または 9 個のさらなるアミノ酸修飾、たとえば、GIP 受容体、GLP-1 受容体、グルカゴン受容体のいずれかに対する活性を高めるまたは低下させる、溶解性を改善する、作用時間または血中半減期を改善する、作用開始を遅らせるまたは安定性を高める、本明細書に記載のいずれかの修飾などを、さらに含むものであってもよい。類縁体は、たとえば、12 番目のアミノ酸修飾、任意に Ile への置換および / または 17 番目および 18 番目のアミノ酸修飾、任意に 17 番目における Q との置換および 18 番目における A との置換および / または GPSS GAPPPS (配列番号 1095) または XGPSS GAPPPS (配列番号 1096) あるいは、配列番号 1095 または 1096 と比較して 1 個または 2 個以上の保存的な置換を有する配列の、C 末端への付加をさらに含むものであってもよい。類縁体は、以下の修飾のうちの 1 つまたは 2 つ以上を含むものであってもよい。

10

(i) 2 番目の Ser における、D-Ser、Ala、D-Ala、Gly、N-メチルセリン、Aib、Val または  $\alpha$ -アミノ-N-酪酸との置換、

(ii) 10 番目の Tyr における、Trp、Lys、Orn、Glu、Phe または Val との置換、

20

(iii) 10 番目の Lys へのアシル基の結合、

(iv) 12 番目の Lys における、Arg との置換、

(v) 16 番目の Ser における、Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、Thr、Gly または Aib との置換、

(vi) 17 番目の Arg における、Gln との置換、

(vii) 18 番目の Arg における、Ala、Ser、Thr または Gly との置換、

(viii) 20 番目の Gln における、Ala、Ser、Thr、Lys、シトルリン、Arg、Orn または Aib との置換、

(ix) 21 番目の Asp における、Glu、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸との置換、

30

(x) 23 番目の Val における、Ile との置換、

(xi) 24 番目の Gln における、Asn、Ala、Ser、Thr または Aib との置換、

(xii) 2 番目、5 番目、9 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、15 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目、24 番目、27 番目、28 番目、29 番目のいずれかにおける保存的な置換。

【0485】

いくつかの実施形態における類縁体は、修飾 (i) から (xii) の組み合わせを有する。上記に代えてまたは上記に加えて、類縁体は、3 番目のアミノ酸修飾 (Gln から Glu へのアミノ酸置換など) を有するものであってもよく、この場合、類縁体は、グルカゴン受容体に対する活性がグルカゴンの 1% 未満である。上記に代えてまたは上記に加えて、類縁体は、7 番目のアミノ酸修飾 (Thr から、ヒドロキシ基を欠いたアミノ酸、たとえば、Abu または Ile へのアミノ酸置換など)、27 個または 28 個のアミノ酸からなるペプチドが得られる、27 番目または 28 番目のアミノ酸より C 末端側でのアミノ酸 (単数または複数) の欠失またはこれらの組み合わせを有するものであってもよく、この場合、類縁体は、GLP-1 受容体に対する活性が GLP-1 の約 10% 未満である。

40

【0486】

例示としての実施形態に関して、類縁体は、親水体と共有結合していてもよい。いくつかの実施形態では、類縁体は、アミノ酸の 16 番目、17 番目、20 番目、21 番目、24 番目、29 番目、40 番目または C 末端のいずれかで親水体と共有結合している。特定

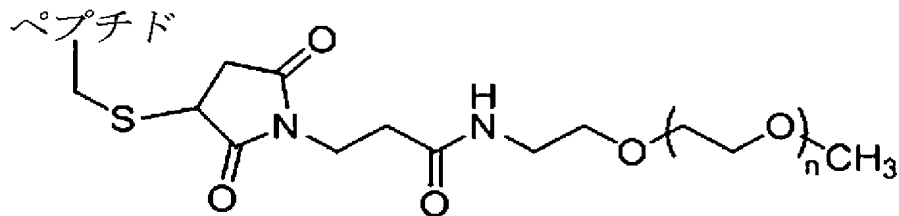
50

の実施形態では、類縁体は、C末端の延長部分（配列番号1095のアミノ酸配列など）と、親水体が40番目で類縁体に共有結合するように親水体を有するアミノ酸の付加と、を有する。

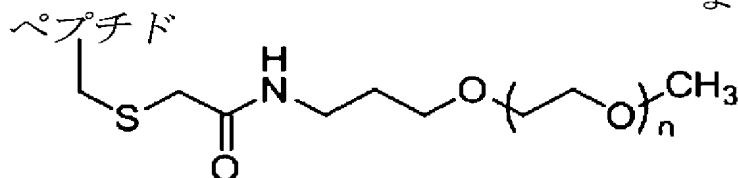
#### 【0487】

いくつかの実施形態では、親水体は、類縁体のLys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンと共有結合している。Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンは、グルカゴン配列（配列番号1001）に対して天然のアミノ酸であってもよいし、配列番号1001の天然のアミノ酸を置換するアミノ酸であってもよい。親水体がCysと結合しているいくつかの実施形態では、親水体への結合は、以下の構造を含み得る。

10



または



20

#### 【0488】

親水体を有する類縁体に関して、親水体は、本明細書に記載のどのようなものであってもよい。たとえば、「親水体の結合」セクションの教示内容を参照のこと。いくつかの実施形態では、親水体は、ポリエチレングリコール（PEG）である。特定の実施形態におけるPEGは、分子量が約1,000ダルトン～約40,000ダルトン、たとえば、約20,000ダルトン～約40,000ダルトンである。

#### 【0489】

類縁体が、スペーサーを介して類縁体と結合しているアシル基またはアルキル基を有する例示としての実施形態では、スペーサーは、本明細書に記載するような、どのようなスペーサーであってもよい。スペーサーは、たとえば、原子3～10個の長さであればよく、たとえば、アミノ酸（6-アミノヘキサン酸、本明細書に記載の任意のアミノ酸など）、ジペプチド（Ala-Ala、βAla-βAla、Leu-Leu、Pro-Pro、γ-Glu-γ-Gluなど）、トリペプチドまたは親水性または疎水性の二官能性スペーサーであってもよい。特定の態様では、スペーサーとアシル基またはアルキル基とを合わせた全長が、原子約14個～約28個の長さである。いくつかの実施形態では、アミノ酸スペーサーは、γ-Gluではない。いくつかの実施形態では、ジペプチドスペーサーは、γ-Glu-γ-Gluではない。

30

40

#### 【0490】

アシル基またはアルキル基は、天然のアミノ酸に対して非天然のアシル基またはアルキル基など、本明細書に記載するようなどのようなアシル基またはアルキル基であってもよい。いくつかの実施形態におけるアシル基またはアルキル基は、たとえば、C10の脂肪族アシル基またはアルキル基、C12の脂肪族アシル基またはアルキル基、C14の脂肪族アシル基またはアルキル基、C16の脂肪族アシル基またはアルキル基、C18の脂肪族アシル基またはアルキル基、C20のアシル基またはアルキル基あるいは、C22のアシル基またはアルキル基などのC4～C30の脂肪族アシル基またはC4～C30アルキル基である。具体的な実施形態では、アシル基は、C12～C18の脂肪族アシル基（C14またはC16の脂肪族アシル基など）である。

50

## 【0491】

いくつかの実施形態では、類縁体の29番目のアミノ酸よりC末端側で約1～約21個のアミノ酸からなる延長部分は、GPSSGAPPPS（配列番号1095）またはXGPSSGAPPPS（配列番号1096）（Xは任意のアミノ酸である）またはGPSSGAPPPK（配列番号1170）またはXGPSSGAPPPK（配列番号1171）またはXGPSSGAPPPSK（配列番号1172）のアミノ酸配列を有し、ここで、Xは、Glyまたは低分子脂肪族アミノ酸または非極性アミノ酸またはわずかに極性のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、約1～約21個のアミノ酸は、配列番号1095、1096、1170、1171または1172と比較して、1個または2個以上の保存的な置換を含む配列を有するものであってもよい。いくつかの実施形態では、アシル化されたアミノ酸またはアルキル化されたアミノ酸は、C末端が伸長した類縁体の37番目、38番目、39番目、40番目、41番目、42番目または43番目にある。特定の実施形態では、アシル化されたアミノ酸またはアルキル化されたアミノ酸は、C末端が伸長した類縁体の40番目にある。

10

## 【0492】

GIPアゴニストは、任意にGIPアゴニスト活性を保持する最大で1個、2個、3個、4個または5個のさらなる修飾を有する、配列番号1005～1094などのアミノ酸配列のいずれのアミノ酸配列を有するペプチドであってもよい。特定の実施形態では、GIPアゴニストは、配列番号1099～1275のいずれかのアミノ酸を有する。

クラス3のグルカゴン関連ペプチド

## 【0493】

特定の実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、本明細書ならびに、国際特許出願公開第WO2009/155258号、国際特許出願公開第WO2008/101017号および米国仮特許出願第61/288,248号（2009年12月18日にファイル）（これらの内容全体を本明細書に援用する）に記載のクラス3のグルカゴン関連ペプチドである。

20

## 【0494】

クラス3のグルカゴン関連ペプチドに関する、以下のセクションに示す生物学的配列（配列番号1～656）のいくつかは、国際特許出願公開第WO2009/155258号における配列番号1～656に対応する。

活性

30

## 【0495】

クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が高まったペプチドであってもよく、さらに他の実施形態では、生物物理学的安定性および/または水溶性が高まっている。また、いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体に対して、グルカゴン受容体に対する天然のグルカゴンの選択性を失っており、よって、これら2つの受容体のコアゴニストであることを示している。クラス3のグルカゴン関連ペプチド内の選択されたアミノ酸修飾によって、グルカゴン受容体に比してGLP-1受容体に対するペプチドの相対活性を制御することが可能である。よって、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体に比してグルカゴン受容体に対する活性のほうが高いグルカゴン/GLP-1コアゴニスト、両方の受容体に対する活性がほぼ等しいグルカゴン/GLP-1コアゴニストまたはグルカゴン受容体に比してGLP-1受容体に対する活性のほうが高いグルカゴン/GLP-1コアゴニストであり得る。後者のカテゴリのコアゴニストは、天然のGLP-1と同一またはこれよりも高い活性でGLP-1受容体を活性化する機能を保持したまま、グルカゴン受容体に対して活性をほとんど示さないかまったく示さないように操作可能なものである。これらのコアゴニストのいずれも、生物物理学的安定性および/または水溶性を高める修飾を含むものであってもよい。

40

## 【0496】

天然のGLP-1と比較して、GLP-1受容体に対して少なくとも約1%（少なくとも約1.5%、2%、5%、7%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、

50

75%、100%、125%、150%、175%を含む)から約200%のいずれかまたはそれより高い活性を有し、天然のグルカゴンと比較して、グルカゴン受容体に対して少なくとも約1%(約1.5%、2%、5%、7%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%を含む)から約500%のいずれかまたはそれよりも高い活性を有するグルカゴンペプチドを得られるように、クラス3のグルカゴン関連ペプチドを修飾することが可能である。天然のグルカゴンのアミノ酸配列は配列番号1であり、GLP-1(7-36)アミドのアミノ酸配列は配列番号52であり、GLP-1(7-37)酸のアミノ酸配列は配列番号50である。例示としての実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの少なくとも10%かつ、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の少なくとも50%あるいは、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの少なくとも40%かつ、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の少なくとも40%あるいは、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの少なくとも60%かつ、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の少なくとも60%であってもよい。

10

**【0497】**

クラス3のグルカゴン関連ペプチドの、GLP-1受容体に対するグルカゴン受容体の選択性は、グルカゴン/GLP-1活性の相対比(天然のグルカゴンの場合と比較したグルカゴン受容体に対するペプチドの活性を、天然のGLP-1の場合と比較したGLP-1受容体に対するペプチドの活性で割ったもの)で説明できる。たとえば、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの60%であり、かつ、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の60%であるクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン/GLP-1活性の比が1:1である。グルカゴン/GLP-1活性の比の例として、約1:1、約1.5:1、約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1または約10:1あるいは、約1:10、約1:9、約1:8、約1:7、約1:6、約1:5、約1:4、約1:3、約1:2または約1:1.5があげられる。一例として、グルカゴン/GLP-1活性の比が10:1であるということは、GLP-1受容体の選択性に対してグルカゴン受容体の選択性が10倍であることを示す。同様に、GLP-1/グルカゴン活性の比が10:1であるということは、グルカゴン受容体の選択性に対してGLP-1受容体の選択性が10倍であることを示す。

20

30

**【0498】**

いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が、約1%~約10%あるいは、約0.1%~約10%あるいは、約0.1%を上回るが約10%未満であるなど、天然のグルカゴンの約10%またはそれ未満である一方で、GLP-1受容体に対する活性はGLP-1の少なくとも20%である。たとえば、本明細書に記載の例示としてのクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、活性が天然のグルカゴンの約0.5%、約1%または約7%である一方で、GLP-1受容体に対する活性はGLP-1の少なくとも20%である。

**【0499】**

クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体またはGLP-1受容体またはその両方に対する活性が高まったまたは低下したグルカゴンペプチドであってもよい。クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1受容体に対し、グルカゴン受容体に対する選択性が変化したグルカゴンペプチドであってもよい。

40

**【0500】**

よって、本明細書にて開示するように、溶解性および/または安定性が改善された高活性なクラス3のグルカゴン関連ペプチドが提供される。例示としての高活性なクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの少なくとも約200%であり、任意に、6~8または6~9または7~9のpH(pH7など)にて、少なくとも1mg/mLの濃度で可溶であり、かつ、任意に、25℃で24時間後に、もとのペプチドの少なくとも95%を保持する(たとえば、もとのペプチドの5%ま

50



たはそれ未満しか分解または切断されない)。もうひとつの例として、例示としてのクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体およびGLP-1受容体の両方に対する活性が、約40%より高いまたは約60%より高く(約1:3~3:1または約1:2~2:1の比)、任意に、6~8または6~9または7~9のpH(pH7など)にて、少なくとも1mg/mLの濃度で可溶であり、任意に、25℃で24時間後に、もとのペプチドの少なくとも95%を保持する。もうひとつの例示としてのクラス3のグルカゴン関連ペプチドグルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの約175%またはそれより高く、かつ、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の約20%またはそれ未満であり、任意に、6~8または6~9または7~9のpH(pH7など)にて、少なくとも1mg/mLの濃度で可溶であり、任意に、25℃で24時間後に、もとのペプチドの少なくとも95%を保持する。さらにもうひとつの例示としてのクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの約10%またはそれ未満であり、かつ、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の少なくとも約20%であり、任意に、6~8または6~9または7~9のpH(pH7など)にて、少なくとも1mg/mLの濃度で可溶であり、任意に、25℃で24時間後に、もとのペプチドの少なくとも95%を保持する。さらにもうひとつの例示としてのクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの約10%またはそれ未満であるが、0.1%、0.5%または1%よりは高く、かつ、GLP-1受容体に対する活性が、天然のGLP-1の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%または100%またはそれよりも高く、任意に、6~8または6~9または7~9のpH(pH7など)にて、少なくとも1mg/mLの濃度で可溶であり、任意に、25℃で24時間後に、もとのペプチドの少なくとも95%を保持する。いくつかの実施形態では、このようなクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴンの対応する位置に、少なくとも22個、23個、24個、25個、26個、27個または28個の天然アミノ酸を保持する(天然のグルカゴンと比較して、1~7個、1~5個または1~3個の修飾を有するなど)。

10

20

グルカゴン活性に影響する修飾

#### 【0501】

天然のグルカゴン(配列番号1)の16番目のアミノ酸修飾によって、グルカゴン受容体に対する活性が高まる。いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体に対するペプチドの活性を増強するために、His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(配列番号1)の野生型ペプチドの修飾したグルカゴンアゴニストである。天然のグルカゴン(配列番号1)の普通に生じる16番目のセリンを、選択した酸性アミノ酸で置換し、cAMP合成を刺激する機能に関して、確立されたin vitroモデルでのアッセイでグルカゴンの活性を増強することが可能である(実施例2を参照のこと)。特に、この置換によって、グルカゴン受容体に対する類縁体の活性が、少なくとも2倍、4倍、5倍、最大で10倍増強される。また、この置換によって、GLP-1受容体に対する類縁体の活性が、天然のグルカゴンの少なくとも5倍、10倍または15倍に増強されるが、GLP-1受容体に対し、グルカゴン受容体に対する選択性は維持される。

30

40

#### 【0502】

非限定的な例として、このような増強された活性は、16番目の天然のセリンを、グルタミン酸で置換あるいは、原子4個の長さの側鎖を有する別の負の電荷を持つアミノ酸で置換あるいは、グルタミン、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸のうちの任意の1つで置換あるいは、少なくとも1個のヘテロ原子(N、O、S、Pなど)を含有し、原子約4個(または3個~5個)の長さの側鎖を有する電荷を持つアミノ酸で置換することによって、与えられるものである。いくつかの実施形態によれば、天然のグルカゴンの16番目のセリン残基を、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸

50

、スレオニンまたはグリシンからなる群から選択されるアミノ酸で置換する。いくつかの実施形態によれば、天然のグルカゴンの16番目のセリン残基を、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換し、いくつかの実施形態では、セリン残基をグルタミン酸で置換する。

#### 【0503】

いくつかの実施形態では、活性が増強されたクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7のペプチドあるいは、配列番号5のグルカゴンアゴニスト類縁体を有する。いくつかの実施形態によれば、グルカゴン受容体に対する活性が野生型グルカゴンに比して増強されたクラス3のグルカゴン関連ペプチドが提供され、この場合のペプチドは、配列番号7、配列番号8、配列番号9または配列番号10の配列を有し、このグルカゴンペプチドは、GLP-1受容体に対し、グルカゴン受容体に対するその選択性を保持する。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対する特異性が増強されたクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号8、配列番号9、配列番号10のペプチドまたはそのグルカゴンアゴニスト類縁体を有し、この場合、カルボキシ末端のアミノ酸は、その天然のカルボン酸基を保持する。いくつかの実施形態によれば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH（配列番号10）の配列を有し、ここで、ペプチドは、天然のグルカゴンよりも、グルカゴン受容体に対する活性がほぼ5倍に増強されている（実施例2のin vitroでのcAMPアッセイで測定）。

10

20

#### 【0504】

3番目のアミノ酸修飾、たとえば3番目の天然のグルタミンの置換などによって、グルカゴン受容体の活性を低減、維持または増強してもよい。いくつかの実施形態では、3番目のアミノ酸から、酸性、塩基性または疎水性のアミノ酸（グルタミン酸、オルニチン、ノルロイシン）に置換すると、グルカゴン受容体の活性が実質的に低減または破壊されることが明らかになっている。たとえば、グルタミン酸、オルニチンまたはノルロイシンで置換された類縁体は、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの約10%またはそれ未満、約1%～約10%あるいは、約0.1%～約10%あるいは、約0.1%を上回るが約10%未満である一方で、GLP-1受容体に対する活性はGLP-1の少なくとも20%である。たとえば、本明細書に記載の例示としての類縁体は、天然のグルカゴンに対する活性がGLP-1の約0.5%、約1%または約7%である一方で、GLP-1受容体に対する活性はGLP-1の少なくとも20%である。特に、本明細書に記載のグルカゴン類縁体、グルカゴンアゴニスト類縁体、グルカゴンコアゴニストおよびグルカゴン/GLP-1コアゴニスト分子をはじめとする、クラス3のグルカゴン関連ペプチドのいずれも、たとえばGlnをGluで置換するなど、3番目に修飾を含むように修飾して、グルカゴン受容体に対する選択性と比較した場合に、GLP-1受容体に対する選択性が高い、たとえば選択性が10倍のペプチドを生成できるものである。

30

#### 【0505】

もうひとつの実施形態では、どのクラス3のグルカゴンペプチドの3番目の天然のグルタミンでも、場合によっては、本明細書に記載するように、グルカゴン受容体の活性を増強しつつ、グルカゴン受容体に対する活性を実質的に損なうことなくグルタミン類縁体と置換可能である。具体的な実施形態では、3番目のアミノ酸をDab(Ac)で置換する。たとえば、グルカゴンアゴニストは、配列番号595、配列番号601、配列番号603、配列番号604、配列番号605、配列番号606のアミノ酸配列を有するものであってもよい。

40

#### 【0506】

2番目（2番目のAibなど）の修飾ならびに、場合によっては1番目の修飾によって、グルカゴン活性が低下する場合があることが観察された。本明細書に記載の手段、「i

50

」番目と「 $i + 4$ 」番目のアミノ酸の側鎖間、たとえば12番目と16番目、16番目と20番目または20番目と24番目での共有結合によって、グルカゴンのC末端領域の $\alpha$ 螺旋を安定化することで、このグルカゴン活性の低下を回復可能である。いくつかの実施形態では、この共有結合は、16番目のグルタミン酸と20番目のリジンとの間のラクタム架橋である。いくつかの実施形態では、この共有結合は、ラクタム架橋以外の分子内架橋である。たとえば、好適な共有結合方法は、オレフィンメタセシス、ランチオニンを基にした環化、ジスルフィド結合または修飾された硫黄含有架橋の形成、 $\alpha$ ,  $\omega$ -ジアミノアルカンでの繋ぎの使用、金属原子架橋の形成、他のペプチド環化手段のうちの任意の1つまたは2つ以上を含む。

GLP-1活性に影響する修飾

【0507】

C末端のアミノ酸のカルボン酸を、アミドまたはエステルなどの電荷が中性の基で置換することによって、GLP-1受容体に対する活性が増強される。いくつかの実施形態では、これらのクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号20の配列を有し、この場合のカルボキシ末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸に見られるカルボン酸基に代えてアミド基を有する。これらのクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン受容体とGLP-1受容体の両方に対して強い活性を有するため、両方の受容体に対するコアゴニストとして作用する。いくつかの実施形態によれば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴンおよびGLP-1受容体コアゴニストであり、この場合のペプチドは、28番目のアミノ酸がAsnまたはLysであり、29番目のアミノ酸がチロシニアミドである配列番号20の配列を有する。

【0508】

グルカゴンのC末端領域(12番目~29番目の残基のあたりなど)における $\alpha$ 螺旋を安定化する修飾によって、GLP-1受容体に対する活性が高められる。

【0509】

いくつかの実施形態では、このような修飾によって、あいだに介在するアミノ酸3個(すなわち、「 $i$ 」番目のアミノ酸と「 $i + 4$ 」番目のアミノ酸で、 $i$ は12~25の任意の整数である)、アミノ酸2個(すなわち、「 $j$ 」番目のアミノ酸と「 $j + 3$ 」番目のアミノ酸で、 $j$ は12~27の任意の整数である)またはアミノ酸6個(すなわち、「 $k$ 」番目のアミノ酸と「 $k + 7$ 」番目のアミノ酸で、 $k$ は12~22の任意の整数である)だけ離れた2つのアミノ酸の側鎖間に分子内架橋を形成することが可能である。例示としての実施形態では、架橋またはリンカーは、原子約8個(または約7個~約9個)の長さであり、12番目と16番目または16番目と20番目または20番目と24番目または24番目と28番目のアミノ酸の側鎖間に形成される。非共有結合、たとえば、水素結合、塩結合の形成などのイオンの相互作用または共有結合によって、2つのアミノ酸側鎖を互いに結合することが可能である。

【0510】

いくつかの実施形態によれば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴン/GLP-1受容体コアゴニスト活性を示し、配列番号11、47、48、49からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、側鎖が互いに共有結合し、いくつかの実施形態では、2つのアミノ酸が互いに結合して、ラクタム環が形成される。

【0511】

いくつかの実施形態によれば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、12番目と16番目、16番目と20番目、20番目と24番目または24番目と28番目のアミノ酸の対からなる群から選択されるアミノ酸の対の側鎖間に少なくとも1個のラクタム環が形成される、配列番号45を有する。いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、ペプチドの12番目と16番目のアミノ酸の間または16番目と20番目のアミノ酸の間に分子内ラクタム架橋が形成された、配列番号20のグルカゴンペプチド類似体を有する。いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、12番目

10

20

30

40

50

と16番目のアミノ酸の間、16番目と20番目のアミノ酸の間番目または20番目と24番目のアミノ酸の間に分子内ラクタム架橋が形成され、29番目のアミノ酸がグリシンである、配列番号20の配列を有し、ここで、配列番号20のC末端のアミノ酸には、配列番号29の配列が結合している。別の実施形態では、28番目のアミノ酸はアスパラギン酸である。

#### 【0512】

いくつかの具体的な実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドのC末端領域での $\alpha$ 螺旋構造の安定化は、ラクタム架橋以外の分子内架橋の形成によって達成される。たとえば、好適な共有結合方法は、オレフィンメタセシス、ランチオニンを基にした環化、ジスルフィド結合または修飾された硫黄含有架橋の形成、 $\alpha$ ,  $\omega$ -ジアミノアルカンでの

10

#### 【0513】

さらに、1個または2個以上の $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸を、所望の活性を保持する位置に目的をもって導入することで、グルカゴンペプチドのC末端領域（アミノ酸12番目～29番目のあたり）における $\alpha$ 螺旋構造を安定化して、GLP-1受容体に対する活性を増強してもよい。このようなペプチドは、本明細書では、分子内架橋を欠いたペプチドとみなすことができる。いくつかの態様では、塩結合または共有結合などの分子内架橋を導入することなく、このようにして $\alpha$ 螺旋を安定化する。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドの16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目または29番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所、4箇所またはそれより多くを、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸で置換する。たとえば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドの16番目をアミノイソ酪酸（Aib）で置換すると、塩結合またはラクタムがなくても、GLP-1活性が増強される。いくつかの実施形態では、16番目、20番目、21番目または24番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所またはそれより多くを、Aibで置換する。

20

#### 【0514】

20番目でのアミノ酸修飾によって、GLP-1受容体に対する活性を増強してもよい。いくつかの実施形態では、20番目のグルタミンを、電荷を持つ水素結合でき、かつ、少なくとも原子約5個（または約4個～約6個）の長さの側鎖を有する別の親水性アミノ酸、たとえば、リジン、シトルリン、アルギニンまたはオルニチンで置換する。

30

#### 【0515】

GLP-1受容体に対する活性の増大が、配列番号26のC末端の延長部分を有するクラス3のグルカゴン関連ペプチドで認められる。本明細書に記載するように、配列番号26を有するこのようなクラス3のグルカゴン関連ペプチドのGLP-1活性を、18番目、28番目または29番目のアミノ酸を修飾するか、あるいは18番目と29番目のアミノ酸を修飾することによって、さらに高めることが可能である。

#### 【0516】

10番目のアミノ酸をTrpに修飾することで、GLP-1活性を、さらに適度に高めることもできる。

#### 【0517】

GLP-1受容体の活性を高める修飾を組み合わせると、このような修飾のどれを単独で用いる場合よりも、GLP-1活性を高められることがある。たとえば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、任意に、12番目のアミノ酸がArgではないという条件で；または任意に9番目のアミノ酸がGluではないという条件で、16番目、20番目およびC末端のカルボン酸基に、任意に16番目と20番目のアミノ酸の間の共有結合によって、修飾を含むものであってもよい；16番目とC末端のカルボン酸基に修飾を有するものであってもよい；16番目と20番目に、任意に、16番目と20番目のアミノ酸の間の共有結合によって、修飾を有するものであってもよい；または20番目とC末端のカルボン酸基に修飾を有するものであってもよい。

40

溶解性に影響する修飾

50

## 親水体の付加

## 【0518】

クラス3のグルカゴン関連ペプチドをさらに修飾し、天然のグルカゴンの高い生物学的活性を維持したまま、生理的なpHでの水溶液に対するペプチドの溶解性および水溶液中での安定性を改善してもよい。本明細書に記載の親水体は、本明細書でさらに論じるように、クラス3のグルカゴン関連ペプチドに結合可能なものである。

## 【0519】

いくつかの実施形態によれば、配列番号9または配列番号10を有するクラス3のグルカゴン関連ペプチドの17番目、21番目、24番目に親水基を導入すると、生理的なpHの溶液に対する高活性なグルカゴン類縁体の溶解性と、このような溶液中での安定性が、改善されると予想される。このような基を導入すると、作用時間が長くなるが、これは血中半減期が延びることを基準に判断できるものである。

10

## 【0520】

いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19からなる群から選択される配列を有し、この場合、前記クラス3のグルカゴン関連ペプチドの16番目、17番目、21番目または24番目のうちの1つのアミノ酸残基の側鎖が、約500～約40,000ダルトンの範囲から選択される分子量のポリエチレングリコール鎖をさらに有する。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の分子量は、約500～約5,000ダルトンの範囲から選択される。もうひとつの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の分子量は、約10,000～約20,000ダルトンである。さらに他の例示としての実施形態では、ポリエチレングリコール鎖の分子量は、約20,000～約40,000ダルトンである。

20

## 【0521】

好適な親水体としては、本明細書に記載の親水体、PEGのホモポリマーまたはコポリマー、PEGのモノメチル置換ポリマー(mPEG)をはじめとして、当分野で知られた水溶性ポリマーがあげられる。いくつかの実施形態によれば、親水基は、ポリエチレン(PEG)鎖を有する。特に、いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号6または配列番号7の配列を有し、クラス3のグルカゴン関連ペプチドの21番目および24番目に存在するアミノ酸の側鎖にPEG鎖が共有結合し、クラス3のグルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸は、カルボン酸基を有する。いくつかの実施形態によれば、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が、約500～約10,000ダルトンの範囲から選択される。

30

## 【0522】

いくつかの実施形態によれば、PEG化されたクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、クラス3のグルカゴン関連ペプチドに共有結合している2つまたは3つ以上のポリエチレングリコール鎖を有し、この場合のグルカゴン鎖の合計の分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。いくつかの実施形態では、PEG化グルカゴンアゴニストは、PEG鎖が21番目および24番目でアミノ酸残基に共有結合し、2つのPEG鎖の合算での分子量が約1,000～約5,000ダルトンである、配列番号5からなるペプチドまたは配列番号5のグルカゴンアゴニスト類縁体を有する。

40

電荷を持つC末端

## 【0523】

たとえば、1個、2個、3個または4個以上の電荷を持つアミノ酸(単数または複数)を、配列番号20のグルカゴンペプチドのC末端領域、好ましくは27番目よりC末端側の位置に導入することによって、配列番号20を有するクラス3のグルカゴン関連ペプチドの溶解性を、さらに改善することが可能である。このような電荷を持つアミノ酸は、28番目または29番目などで、天然のアミノ酸を電荷を持つアミノ酸で置換することあるいは、27番目、28番目または29番目の後などに、電荷を持つアミノ酸を付加することによって導入可能なものである。例示としての実施形態では、電荷を持つアミノ酸のう

50

ち、１個、２個、３個またはすべてが、負の電荷を持つ。クラス３のグルカゴン関連ペプチドに、修飾後もペプチドがグルカゴン活性を保持できる、保存的な置換などの追加の修飾をほどこしてもよい。いくつかの実施形態では、配列番号２０のクラス３のグルカゴン関連ペプチドの類縁体が提供され、この類縁体は、配列番号２０とは、１７番目から２６番目での１～２個のアミノ酸置換が異なり、いくつかの実施形態では、類縁体は、配列番号２０のペプチドとは、２０番目のアミノ酸置換が異なる。

アシル化／アルキル化

【０５２４】

いくつかの実施形態によれば、グルカゴンペプチドは、Ｃ４～Ｃ３０アシル基またはアルキル基など、アシル基またはアルキル基を含むように修飾される。いくつかの態様では、このアシル基またはアルキル基は、アミノ酸に天然のものではない。特定の態様では、アシル基またはアルキル基は、天然のどのアミノ酸に対しても非天然である。アシル化またはアルキル化によって、血中半減期を延ばすおよび／または作用開始を遅らせるおよび／または作用時間を延ばすおよび／またはＤＰＰ－ＩＶなどのプロテアーゼに対する耐性を改善することが可能である。クラス３のグルカゴン関連ペプチドのグルカゴン受容体およびＧＬＰ－１受容体に対する活性は、アシル化後に実質的に増強されないまでも、維持される。さらに、アシル化された類縁体の活性は、実質的に増強されていないにしても、アシル化されていないクラス３のグルカゴン関連ペプチドに匹敵するものであった。

10

【０５２５】

いくつかの実施形態では、本発明は、グルカゴンペプチドの１０番目のアミノ酸に共有結合しているアシル基またはアルキル基を有するように修飾された、クラス３のグルカゴン関連ペプチドを提供するものである。グルカゴンペプチドは、クラス３のグルカゴン関連ペプチドの１０番目のアミノ酸とアシル基またはアルキル基との間にスペーサーをさらに有するものであってもよい。上述したクラス３のグルカゴン関連ペプチドはいずれも、２個のアシル基または２個のアルキル基あるいはこれらの組み合わせを有するものであってもよい。

20

【０５２６】

本発明の具体的な態様では、アシル化されたクラス３のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号５３４～５４４および５４６～５４９のいずれかのアミノ酸配列を有する。

30

Ｃ末端の短縮

【０５２７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクラス３のグルカゴン関連ペプチドを、グルカゴンペプチドのＣ末端の１個または２個のアミノ酸（すなわち、２９番目および／または２８番目）の短縮または欠失によって、グルカゴンおよびＧＬＰ－１受容体に対する活性および／または活性に影響することなく、さらに修飾する。この点について、クラス３のグルカゴン関連ペプチドは、天然のグルカゴンペプチド（配列番号１）の１番目から２７番目または１番目から２８番目のアミノ酸を有するものであってもよく、任意に、本明細書に記載の１個または２個以上の修飾がなされている。

【０５２８】

いくつかの実施形態では、短くされたクラス３のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号５５０または配列番号５５１を有する。もうひとつの実施形態では、短くされたグルカゴンアゴニストのペプチドは、配列番号５５２または配列番号５５３を有する。

40

Ｃ末端の延長部分

【０５２９】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に開示のクラス３のグルカゴン関連ペプチドを、配列番号２６、配列番号２７または配列番号２８などのグルカゴンペプチドのカルボキシ末端に第２のペプチドを付加することによって、修飾する。いくつかの実施形態では、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９からなる群から選択される配列を有するクラス３のグルカゴン関連

50

ペプチドが、ペプチド結合によって、第2のペプチドに共有結合し、この場合の第2のペプチドは、配列番号26、配列番号27、配列番号28からなる群から選択される配列を有する。別の実施形態では、C末端の延長部分を有するクラス3のグルカゴン関連ペプチドにおいて、天然のグルカゴンペプチドの29番目のスレオニンがグリシンに置換される。29番目のスレオニンに代えてグリシン置換を有し、配列番号26のカルボキシ末端の延長部分を有するクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号26のカルボキシ末端の延長部分を有するように修飾された天然のグルカゴンよりも、GLP-1受容体に対する活性が4倍高い。18番目を天然のアルギニンからアラニンに置換することによって、GLP-1受容体に対する活性を、さらに増強することが可能である。

#### 【0530】

したがって、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号27 (KRNRRNNIA) または配列番号28のカルボキシ末端の延長部分を有するものであってもよい。いくつかの実施形態によれば、配列番号33または配列番号20を有するクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、グルカゴンペプチドの29番目のアミノ酸に結合した配列番号27 (KRNRRNNIA) または配列番号28のアミノ酸配列をさらに有する。特に、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号10、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15からなる群から選択される配列を有し、グルカゴンペプチドの29番目に結合した、配列番号27 (KRNRRNNIA) または配列番号28のアミノ酸配列をさらに有する。特に、グルカゴンペプチドは、配列番号10、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号55、配列番号56からなる群から選択される配列を有し、クラス3のグルカゴン関連ペプチドの29番目のアミノ酸に結合した、配列番号26 (GPSSGAPPPS) または配列番号29のアミノ酸配列をさらに有する。いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号64の配列を有する。

他の修飾

#### 【0531】

グルカゴン受容体の活性を高めるまたは低下させ、かつ、GLP-1受容体の活性を高める、クラス3のグルカゴン関連ペプチドに関して上述したいずれかの修飾を、個々に適用してもよいし、組み合わせで適用してもよい。GLP-1受容体の活性を高める修飾の組み合わせを用いると、通常は、このような修飾のどれを単独で用いる場合よりも、GLP-1活性が高くなる。上述したどの修飾も、溶解性および/または安定性および/または作用時間の増大などの他の望ましい特性を与える、クラス3のグルカゴン関連ペプチドに関する本明細書に記載の他の修飾と組み合わせることが可能である。あるいは、上述した修飾はいずれも、溶解性または安定性または活性に実質的に影響しない、クラス3のグルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に記載の他の修飾と組み合わせることが可能である。修飾の例として以下のものがあげられるが、これらに限定されるものではない。

(A) 1個、2個、3個または4個以上の電荷を持つアミノ酸 (単数または複数) を、天然のグルカゴンのC末端領域、好ましくは27番目よりC末端側の位置に導入することなどによる、溶解性の改善。このような電荷を持つアミノ酸は、28番目または29番目などで、天然のアミノ酸を電荷を持つアミノ酸で置換することあるいは、27番目、28番目または29番目の後などに、電荷を持つアミノ酸を付加することによって導入可能なものである。例示としての実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうち、1個、2個、3個またはすべてが、負の電荷を持つ。他の実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうち、1個、2個、3個またはすべてが、正の電荷を持つ。このような修飾によって、25℃で24時間後に測定すると、約5.5～約8の特定のpH、たとえばpH7で、天然のグルカゴンと比較して、溶解性が少なくとも2倍、5倍、10倍、15倍、25倍、30倍またはそれより高くなるなど、溶解性が高まる。

(B) ペプチドの16番目、17番目、20番目、21番目、24番目または29番目またはC末端のアミノ酸などで、本明細書に記載するようなポリエチレングリコール鎖などの親水体を付加することによる、溶解性および作用時間または血中半減期の増大。

(C) 欠失あるいは、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸への置換などの15番目のアスパラギン酸の修飾による、安定性の向上。このような修飾によって、このような修飾によって、25℃で24時間後に、もとのペプチドの少なくとも75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%、最大100%が保持されるなど、特に酸性バッファーまたはアルカリ性バッファー中で、pH5.5~8の範囲内であるpHにおいて、分解または切断を低減することができる。

(D) ロイシンまたはノルロイシンへの置換などによる、27番目のメチオニンの修飾による安定性の向上。このような修飾によって、酸化による分解を低減することができる。また、Ser、Thr、AlaまたはAibへの置換など、20番目または24番目のグルタミンの修飾によって、安定性を向上させることも可能である。このような修飾によって、Glnの脱アミド化によって生じる分解を低減することができる。Gluへの置換など、21番目のAspの修飾によって安定性を向上させることが可能である。このような修飾によって、Aspが脱水し、環状スクシンイミド中間体を形成した後、イソアスパラギン酸へ異性体化することで生じる分解を低減することができる。

(E) 1番目または2番目のアミノ酸を、本明細書に記載のDPP-IV耐性アミノ酸で修飾すること(2番目のアミノ酸をN-メチルアラニンで修飾することを含む)による、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)での切断に対する耐性の向上。

(F) 活性には影響しない保存的または非保存的な置換、付加または欠失、たとえば、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目のうちの1箇所または2箇所以上における保存的な置換、27番目、28番目または29番目のうちの1箇所または2箇所以上におけるアミノ酸の欠失あるいは、29番目のアミノ酸の欠失(任意に、C末端のカルボン酸基からC末端のアミドまたはエステルへの変更を組み合わせてもよい)。

(G) 本明細書に記載するようなC末端の延長部分の付加。

(H) たとえば、本明細書に記載するようなグルカゴンペプチドのアシル化またはアルキル化によって、血中半減期を長くするおよび/または作用時間を延ばすおよび/または作用開始を遅らせること。

(I) 本明細書に記載するようなホモダイマー化またはヘテロダイマー化。

#### 【0532】

他の修飾として、1番目のヒスチジンから高分子芳香族アミノ酸(Tyr、Phe、Trpまたはアミノフェニルアラニンなど)への置換、2番目のSerからAlaへの置換、10番目のTyrからValまたはPheへの置換、12番目のLysからArgへの置換、15番目のAspからGluへの置換、16番目のSerからThrまたはAibへの置換があげられる。

#### 【0533】

1番目のヒスチジンから高分子芳香族アミノ酸(Tyrなど)への非保存的な置換を含むGLP-1活性を有する、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、本明細書に記載したものなどの分子内架橋によってα螺旋が安定化しているかぎり、GLP-1活性を保持することができる。

結合体と融合体

#### 【0534】

クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、任意に共有結合を介し、かつ、任意にリンカーによって、結合体部分に結合可能なものである。

#### 【0535】

また、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、第2のペプチドまたはポリペプチドが、クラス3のグルカゴン関連ペプチドのカルボキシ末端などの末端に融合した、融合ペプチドまたはタンパク質の一部であってもよい。

#### 【0536】

特に、クラス3のグルカゴン関連融合ペプチドは、配列番号55、配列番号9または配

10

20

30

40

50



列番号 10 のグルカゴンアナログを含むものであってもよく、さらに、配列番号 26 (GPSSGAPPPS)、配列番号 27 (KRNRRNNIA) または配列番号 28 (KRNRR) のアミノ酸配列が、グルカゴンペプチドの 29 番目のアミノ酸に結合している。いくつかの実施形態では、配列番号 26 (GPSSGAPPPS)、配列番号 27 (KRNRRNNIA) または配列番号 28 (KRNRR) は、ペプチド結合を介して、クラス 3 のグルカゴン関連ペプチドの 29 番目のアミノ酸に結合している。本出願人は、発エキセンディン - 4 (配列番号 26 または配列番号 29 など) の C 末端の延長部分ペプチドでは、29 番目の天然のスレオニン残基からグリシンへの置換を有するクラス 3 のグルカゴン関連ペプチド融合ペプチドが、GLP-1 受容体の活性を劇的に高めることを見した。このアミノ酸置換を、クラス 3 のグルカゴン関連ペプチドに関して本明細書に開示の他の修飾と一緒に利用して、GLP-1 受容体に対するグルカゴン類似体の親和性を高めることが可能である。たとえば、T29G 置換を、S16E および N20K のアミノ酸置換と組み合わせ、任意に 16 番目と 20 番目との間のラクタム架橋も組み合わせ、さらに任意に、本明細書に記載するような PEG 鎖の付加も組み合わせることが可能である。いくつかの実施形態では、クラス 3 のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号 64 の配列を有する。いくつかの実施形態では、グルカゴン融合ペプチドのクラス 3 のグルカゴン関連ペプチド部分は、配列番号 55、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5 からなる群から選択され、ここで、PEG 鎖は、17 番目、21 番目、24 番目または C 末端のアミノ酸あるいは、21 番目と 24 番目の両方に存在する場合、500 ~ 40,000 ダルトンの範囲から選択される。特に、いくつかの実施形態では、クラス 3 のグルカゴン関連ペプチドセグメントは、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 63 からなる群から選択され、PEG 鎖は、500 ~ 5,000 の範囲から選択される。いくつかの実施形態では、クラス 3 のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号 55 および配列番号 65 の配列を有する融合ペプチドであり、配列番号 65 のペプチドは、配列番号 55 のカルボキシ末端に結合している。

10

20

30

40

#### 【0537】

いくつかの実施形態によれば、配列番号 10 のクラス 3 のグルカゴン関連ペプチドの追加の化学修飾によって、グルカゴン受容体と GLP-1 受容体に対する相対活性が、事実上等しくなる点まで、GLP-1 受容体の活性が高められる。したがって、いくつかの実施形態では、クラス 3 のグルカゴン関連ペプチドは、天然のアミノ酸に存在するカルボン酸基に代えて、アミド基を有する末端のアミノ酸を有する。クラス 3 のグルカゴン関連ペプチドをさらに修飾することによって、グルカゴン受容体および GLP-1 受容体それぞれに対するクラス 3 のグルカゴン関連ペプチドの相対活性を調節し、グルカゴン受容体に対する活性が天然のグルカゴンの約 40% ~ 約 500% またはそれより高く、GLP-1 受容体に対する活性が天然の GLP-1 の約 20% ~ 約 200% またはそれより高い類似体を生成することが可能である (たとえば、GLP-1 受容体に対するグルカゴンの通常の活性と比較して、50 倍、100 倍またはそれより高めるなど)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のグルカゴンペプチドは、グルカゴン受容体に対する活性が、天然のグルカゴンの最大で約 100%、約 1000%、約 10,000%、約 100,000% または約 1,000,000% である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のグルカゴンペプチドは、GLP-1 受容体に対する活性が、天然の GLP-1 の最大で約 100%、約 1000%、約 10,000%、約 100,000% または約 1,000,000% である。

例示としての実施形態

#### 【0538】

いくつかの実施形態によれば、配列番号 55 の配列を有するグルカゴン類似体が提供され、ここで、上記の類似体は、1 番目、2 番目、3 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、13 番目、14 番目、17 番目、18 番目、19 番目、21 番目、24 番目、27 番目、28 番目、29 番目から選択される 1 ~ 3 個のアミノ酸が配列番号 55 とは異なり、上記のグルカゴンペプチドは、GLP-1 受容体に対する活性が天然の GLP-1 の少なくとも 20% である。

50

## 【0539】

いくつかの実施形態によれば、次の配列すなわち、

NH<sub>2</sub> - His - Ser - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp  
- Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Xaa - Xaa - Arg - Arg - Ala  
- Xaa - Asp - Phe - Val - Xaa - Trp - Leu - Met - Xaa - Xaa  
- R (配列番号33) を有するグルカゴン / GLP - 1 受容体コアゴニストが提供される。  
ここで、15番目のXaaは、Asp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸、ホ  
モシステイン酸からなるアミノ酸の群から選択され、16番目のXaaは、Ser、Glu、  
Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなるアミノ酸の群から選択され、  
20番目のXaaは、GlnまたはLysであり、24番目のXaaは、GlnまたはGlu  
であり、28番目のXaaは、Asn、Lysまたは酸性アミノ酸であり、29番目  
のXaaは、Thr、Glyまたは酸性アミノ酸であり、Rは、COOHまたはCONH<sub>2</sub>  
である。ただし、16番目がセリンの場合、20番目はLysであるか、あるいは、1  
6番目がセリンの場合、24番目はGluであり、20番目または28番目のいずれかが  
Lysである。いくつかの実施形態では、グルカゴン / GLP - 1 受容体コアゴニストは  
、配列番号33の配列を有し、ここで、28番目のアミノ酸はアスパラギン酸であり、2  
9番目のアミノ酸はグルタミン酸である。もうひとつの実施形態では、28番目のアミノ  
酸は天然のアスパラギンであり、29番目のアミノ酸はグリシンであり、配列番号29ま  
たは配列番号65のアミノ酸配列は、配列番号33のカルボキシ末端と共有結合している。

10

20

## 【0540】

いくつかの実施形態では、追加の酸性アミノ酸がペプチドのカルボキシ末端に付加され  
た、配列番号33の配列を有するコアゴニストが提供される。別の実施形態では、グルカ  
ゴン類縁体のカルボキシ末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸のカルボン酸基の代わりに、  
アミドを有する。いくつかの実施形態では、グルカゴン類縁体は、配列番号40、配列番  
号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44からなる群から選択される配列を有  
する。

## 【0541】

いくつかの実施形態によれば、配列番号33のグルカゴンペプチド類縁体が提供され、  
ここで、上記の類縁体は、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、10番目、11番  
目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、21番目、27番目から選択  
される1～3個のアミノ酸が配列番号33とは異なる。ただし、16番目のアミノ酸がセ  
リンの場合、20番目がリジンであるか、あるいは、24番目のアミノ酸と20番目また  
は28番目のいずれかのアミノ酸との間に、ラクタム架橋が形成される。いくつかの実施  
形態によれば、この類縁体は、1番目、2番目、3番目、21番目、27番目から選択さ  
れる1～3個のアミノ酸が配列番号33とは異なる。いくつかの実施形態では、配列番号  
33のグルカゴンペプチド類縁体は、その配列と1～2個のアミノ酸が異なるか、いくつ  
かの実施形態では、1番目、2番目、3番目、5番目、7番目、10番目、11番目、1  
3番目、14番目、17番目、18番目、19番目、21番目、27番目から選択される  
単一のアミノ酸が異なる。ただし、16番目のアミノ酸がセリンの場合、20番目がリジ  
ンであるか、あるいは、24番目のアミノ酸と20番目または28番目のいずれかのアミ  
ノ酸との間に、ラクタム架橋が形成される。

30

40

## 【0542】

もうひとつの実施形態によれば、配列NH<sub>2</sub> - His - Ser - Xaa - Gly - Thr  
- Phe - Thr - Ser - Asp - Tyr - Ser - Lys - Tyr - Leu - Xaa  
- Xaa - Arg - Arg - Ala - Xaa - Asp - Phe - Val - Xaa - Trp  
- Leu - Met - Xaa - Xaa - R (配列番号53) を含む、比較的選択性の高い  
GLP - 1 受容体アゴニストが提供され、ここで、3番目のXaaは、Glu、Ornま  
たはNleからなるアミノ酸の群から選択され、15番目のXaaは、Asp、Glu、  
システイン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなるアミノ酸の群から選択され

50

、16番目のXaaは、Ser、Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなるアミノ酸の群から選択され、20番目のXaaは、GlnまたはLysであり、24番目のXaaは、GlnまたはGluであり、28番目のXaaは、Asn、Lysまたは酸性アミノ酸であり、29番目のXaaは、Thr、Glyまたは酸性アミノ酸であり、Rは、COOH、CONH<sub>2</sub>、配列番号26または配列番号29である。ただし、16番目がセリンの場合、20番目はLysであるか、あるいは、16番目がセリンの場合、24番目はGluであり、20番目または28番目のいずれかがLysである。いくつかの実施形態では、3番目のアミノ酸はグルタミン酸である。いくつかの実施形態では、28番目および/または29番目で置換される酸性アミノ酸は、アスパラギン酸またはグルタミン酸である。いくつかの実施形態では、コアゴニストのペプチドをはじめとするグルカゴンペプチドは、ペプチドのカルボキシ末端に付加された追加の酸性アミノ酸をさらに有する配列番号33の配列を有する。別の実施形態では、グルカゴン類縁体のカルボキシ末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸のカルボン酸基の代わりに、アミドを有する。

10

【0543】

いくつかの実施形態によれば、以下からなる群から選択される、修飾されたグルカゴンペプチドを有するグルカゴン/GLP-1受容体コアゴニストが提供される。

【0544】

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(配列番号34)。ここで、15番目のXaaは、Asp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなるアミノ酸の群から選択され、16番目のXaaは、Ser、Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなるアミノ酸の群から選択され、20番目のXaaは、GlnまたはLysであり、24番目のXaaは、GlnまたはGluであり、28番目のXaaは、Asn、AspまたはLysであり、Rは、COOHまたはCONH<sub>2</sub>であり、29番目のXaaは、ThrまたはGlyであり、Rは、COOH、CONH<sub>2</sub>、配列番号26または配列番号29である。ただし、16番目がセリンの場合、20番目はLysであるか、あるいは、16番目がセリンの場合、24番目はGluであり、20番目または28番目のいずれかがLysである。いくつかの実施形態では、RはCONH<sub>2</sub>であり、15番目のXaaはAspであり、16番目のXaaは、Glu、Gln、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなるアミノ酸の群から選択され、20番目と24番目のXaaは各々Glnであり、28番目のXaaはAsnまたはAspであり、29番目のXaaはThrである。いくつかの実施形態では、15番目と16番目のXaaは各々Gluであり、20番目と24番目のXaaは各々Glnであり、28番目のXaaはAsnまたはAspであり、29番目のXaaはThrであり、RはCONH<sub>2</sub>である。

20

30

【0545】

親ペプチドの活性を少なくともいくらか維持しつつ、天然のグルカゴンペプチドの特定の位置を修飾可能であることが報告されている。したがって、本出願人は、配列番号11のペプチドの2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目または29番目の位置にあるアミノ酸のうち1つまたは2つ以上を、天然のグルカゴンペプチドに存在するものとは異なるアミノ酸で置換して、それでもなおグルカゴン受容体に対する活性を保つことが可能であると予想している。いくつかの実施形態では、天然のペプチドの27番目に存在するメチオニン残基をロイシンまたはノルロイシンに変更して、ペプチドの酸化による分解を防止する。もうひとつの実施形態では、20番目のアミノ酸が、Lys、Arg、Ornまたはシトルリンで置換されるおよび/または21番目を、Glu、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸に置換する。

40

【0546】

いくつかの実施形態では、配列番号20のグルカゴン類縁体であって、この類縁体の1

50

番目、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、21番目、27番目、28番目または29番目から選択される1～6個のアミノ酸が、配列番号1の対応するアミノ酸とは異なる、配列番号20のグルカゴン類縁体が提供されるが、ただし、16番目のアミノ酸がセリンの場合、20番目はLysであるか、あるいは、16番目がセリンの場合、24番目はGluであり、20番目または28番目のいずれかがLysである。もうひとつの実施形態によれば、配列番号20のグルカゴン類縁体であって、この類縁体の1番目、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、27番目、28番目または29番目から選択される1～3個のアミノ酸が、配列番号1の対応するアミノ酸とは異なる、配列番号20のグルカゴン類縁体が提供される。もうひとつの実施形態では、配列番号8、配列番号9または配列番号11のグルカゴン類縁体であって、この類縁体の1番目、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、20番目または21番目から選択される1～2個のアミノ酸が、配列番号1の対応するアミノ酸とは異なる、配列番号8、配列番号9または配列番号11のグルカゴン類縁体が提供され、別の実施形態では、1～2個の異なるアミノ酸が、天然のグルカゴン配列（配列番号1）に存在するアミノ酸に対する保存的なアミノ酸置換を表す。いくつかの実施形態では、配列番号12、配列番号13、配列番号14または配列番号15のグルカゴンペプチドが提供され、この場合のグルカゴンペプチドは、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、13番目、14番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、27番目または29番目から選択される1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換をさらに有する。いくつかの実施形態では、2番目、5番目、7番目、10番目、11番目、13番目、14番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、27番目または29番目での置換は、保存的なアミノ酸置換である。

10

20

30

40

50

**【0547】**

いくつかの実施形態によれば、配列番号33の配列の変異種を有し、この変異種の16番目、17番目、18番目、20番目、21番目、23番目、24番目、27番目、28番目、29番目から選択される1～10個のアミノ酸が、配列番号1の対応するアミノ酸とは異なる、グルカゴン/GLP-1受容体コアゴニストが提供される。いくつかの実施形態によれば、配列番号33の配列の変異種であって、17番目のグルタミン、18番目のアラニン、21番目のグルタミン酸、23番目のイソロイシン、24番目のアラニン、27番目のバリン、29番目のグリシンからなる群から選択される1個または2個以上のアミノ酸置換が配列番号33とは異なる、変異種が提供される。いくつかの実施形態によれば、配列番号33の配列の変異種を有し、この変異種の17番目～26番目から選択される1～2個のアミノ酸が、配列番号1の対応するアミノ酸とは異なる、グルカゴン/GLP-1受容体コアゴニストが提供される。いくつかの実施形態によれば、配列番号33の配列の変異種が提供され、この場合の変異種は、17番目のグルタミン、18番目のアラニン、21番目のグルタミン酸、23番目のイソロイシン、24番目のアラニンからなる群から選択されるアミノ酸置換が、配列番号33とは異なる。いくつかの実施形態によれば、配列番号33の配列の変異種が提供され、この場合の変異種は、18番目のアミノ酸置換が配列番号33とは異なる。ここで、置換されたアミノ酸は、Ala、Ser、Thr、Glyからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、配列番号33の配列の変異種が提供され、この場合の変異種は、18番目のAlaのアミノ酸置換が、配列番号33とは異なる。このような変異は、配列番号55に包含される。もうひとつの実施形態では、配列番号33の配列の変異種を有し、この変異種の17番目～22番目から選択される1～2個のアミノ酸が、配列番号1の対応するアミノ酸とは異なる、グルカゴン/GLP-1受容体コアゴニストが提供され、別の実施形態では、配列番号33の変異種が提供され、この変異種は、20番目および21番目の1～2個のアミノ酸置換が、配列番号33とは異なる。いくつかの実施形態によれば、次の配列を有するグルカゴン/GLP-1受容体コアゴニストが提供される。

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - X a a - X a a - A r g - A r g - A l a  
- X a a - X a a - P h e - V a l - X a a - T r p - L e u - M e t - X a a - X a a  
- R ( 配列番号 5 1 )。ここで、15 番目の X a a は、A s p、G l u、システイン酸、  
ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸であり、16 番目の X a a は、S e r、G l u  
、G l n、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸であり、20 番目の X a a は、G l  
n、L y s、A r g、O r n またはシトルリンであり、21 番目の X a a は、A s p、G  
l u、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸であり、24 番目の X a a は、G l n ま  
たは G l u であり、28 番目の X a a は、A s n、L y s または酸性アミノ酸であり、2  
9 番目の X a a は、T h r または酸のアミノ酸であり、R は、C O O H または C O N H 2  
である。いくつかの実施形態では、R は C O N H 2 である。いくつかの実施形態によれば  
、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号  
47、配列番号 48 または配列番号 49 の変異種を有するグルカゴン / G L P - 1 受容体  
コアゴニストが提供され、この場合の変異種は、20 番目のアミノ酸置換が前記配列とは  
異なる。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、20 番目の L y s、A r g、O r n  
またはシトルリンからなる群から選択される。

10

## 【0548】

いくつかの実施形態では、配列番号 34 の類縁体ペプチドを有し、この類縁体が、セリ  
ン以外のアミノ酸を 2 番目に有することで配列番号 34 とは異なる、グルカゴンアゴニス  
トが提供される。いくつかの実施形態では、セリン残基が、アミノイソ酪酸、D - アラニ  
ンで置換され、いくつかの実施形態では、セリン残基はアミノイソ酪酸で置換される。こ  
のような修飾は、親化合物の固有の活性を保持したまま、ジペプチジルペプチダーゼ I V  
による切断を抑制するものである（親化合物の活性の少なくとも 75 %、80 %、85 %  
、90 %、95 % またはそれより高いなど）。いくつかの実施形態では、たとえば、1 個  
、2 個、3 個または 4 個以上の電荷を持つアミノ酸（単数または複数）を、天然のグルカ  
ゴンの C 末端領域、好ましくは 27 番目より C 末端側の位置に導入することによって、類  
縁体の溶解性を高める。例示としての実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうち、1 個、  
2 個、3 個またはすべてが、負の電荷を持つ。もうひとつの実施形態では、この類縁体は  
、28 番目または 29 番目で天然のアミノ酸を置換した酸性アミノ酸あるいは、配列番号  
34 のペプチドのカルボキシ末端に付加された酸性アミノ酸をさらに有する。

20

30

## 【0549】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示のグルカゴン類縁体を 1 番目または 2 番目で  
さらに修飾し、ジペプチジルペプチダーゼ I V による切断に対する感受性を低減する。い  
くつかの実施形態では、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列  
番号 14 または配列番号 15 のグルカゴン類縁体を得られ、この類縁体は、2 番目の置換  
が親分子とは異なり、ジペプチジルペプチダーゼ I V による切断に対する感受性（すなわ  
ち耐性）が低下している。特に、いくつかの実施形態では、類縁体ペプチドの 2 番目は、  
D - セリン、D - アラニン、バリン、アミノ n - 酪酸、グリシン、N - メチルセリン、ア  
ミノイソ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換される。いくつかの実施形態では  
、類縁体ペプチドの 2 番目は、D - セリン、D - アラニン、グリシン、N - メチルセリン  
、アミノイソ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換される。もうひとつの実施形  
態では、類縁体ペプチドの 2 番目は、D - セリン、グリシン、N - メチルセリン、アミノ  
イソ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換される。いくつかの実施形態では、2  
番目のアミノ酸は D - セリンではない。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは  
、配列番号 21 または配列番号 22 の配列を有する。

40

## 【0550】

いくつかの実施形態では、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、  
配列番号 14 または配列番号 15 のグルカゴン類縁体を得られ、この類縁体は、1 番目の  
置換が親分子とは異なり、ジペプチジルペプチダーゼ I V による切断に対する感受性（す  
なわち耐性）が低下している。特に、類縁体ペプチドの 1 番目は、D - ヒスチジン、α、

50

α - ジメチルイミダゾール酢酸 ( D M I A )、N - メチルヒスチジン、α - メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸で置換される。もうひとつの実施形態では、配列番号 34 の類縁体ペプチドを有し、この類縁体が、1 番目にヒスチジン以外のアミノ酸を有することが配列番号 34 とは異なる、グルカゴンアゴニストが提供される。いくつかの実施形態では、たとえば、1 個、2 個、3 個または 4 個以上の電荷を持つアミノ酸 ( 単数または複数 ) を、天然のグルカゴンの C 末端領域、好ましくは 27 番目より C 末端側の位置に導入することによって、類縁体の溶解性を高める。例示としての実施形態では、電荷を持つアミノ酸のうち、1 個、2 個、3 個またはすべてが、負の電荷を持つ。もうひとつの実施形態では、この類縁体は、28 番目または 29 番目で天然のアミノ酸を置換した酸性アミノ酸あるいは、配列番号 34 のペプチドのカルボキシ末端に付加された酸性アミノ酸をさらに有する。いくつかの実施形態では、酸性アミノ酸は、アスパラギン酸またはグルタミン酸である。

10

## 【 0 5 5 1 】

いくつかの実施形態では、グルカゴン / G L P - 1 受容体コアゴニストは、配列番号 20 の配列を有し、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28 からなる群から選択される 1 つのアミノ酸またはペプチドの追加のカルボキシ末端延長部分をさらに有する。配列番号 20 のカルボキシ末端に単一のアミノ酸が付加される実施形態では、このアミノ酸は通常、20 種類の一般的なアミノ酸から選択され、いくつかの実施形態では、追加のカルボキシ末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸のカルボン酸に代えてアミド基を有する。いくつかの実施形態では、追加のアミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンからなる群から選択される。

20

## 【 0 5 5 2 】

別の実施形態では、ペプチドが、グルタミン酸残基とリジン残基の側鎖間に形成される少なくとも 1 個のラクタム環を有する、グルカゴン / G L P - 1 受容体コアゴニストが提供され、この場合のグルタミン酸残基とリジン残基とは、アミノ酸 3 個あけて離れている。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドを持つラクタムのカルボキシ末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸のカルボン酸に代えて、アミド基を有する。特に、いくつかの実施形態では、以下からなる群から選択される修飾されたグルカゴンペプチドを有する、グルカゴンおよび G L P - 1 コアゴニストが提供される。

30

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - G l u - A r g - A r g - A l a  
- G l n - A s p - P h e - V a l - G l n - T r p - L e u - M e t - X a a - X a a  
- R ( 配列番号 66 )

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - G l u - A r g - A r g - A l a  
- L y s - A s p - P h e - V a l - G l n - T r p - L e u - M e t - X a a - X a a  
- R ( 配列番号 67 )

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - S e r - A r g - A r g - A l a  
- L y s - A s p - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - M e t - X a a - X a a  
- R ( 配列番号 68 )

40

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - S e r - A r g - A r g - A l a  
- G l n - A s p - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - M e t - L y s - X a a  
- R ( 配列番号 69 )

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - G l u - A r g - A r g - A l a  
- L y s - A s p - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - M e t - A s n - T h r  
- R ( 配列番号 16 )

50

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - G l u - A r g - A r g - A l a  
- G l n - A s p - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - M e t - L y s - T h r  
- R ( 配列番号 17 )

NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p  
- T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - G l u - A r g - A r g - A l a  
- L y s - A s p - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - M e t - L y s - T h r  
- R ( 配列番号 18 )

ここで、28番目のXaaはAspまたはAsnであり、29番目のXaaはThrまたはGlyであり、Rは、COOH、CONH<sub>2</sub>、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシン、配列番号26、配列番号27、配列番号28からなる群から選択され、ラクタム架橋が、配列番号66の場合は12番目のLysと16番目のGluとの間、配列番号67の場合は16番目のGluと20番目のLysとの間、配列番号68の場合は20番目のLysと24番目のGluとの間、配列番号69の場合は24番目のGluと28番目のLysとの間、配列番号16の場合は、12番目のLysと16番目のGluの間と、20番目のLysと24番目のGluとの間、配列番号17の場合は、12番目のLysと16番目のGluとの間と、24番目のGluと28番目のLysとの間、配列番号18の場合は、16番目のGluと20番目のLysとの間と、24番目のGluと28番目のLysとの間に形成される。いくつかの実施形態では、Rは、COOH、CONH<sub>2</sub>、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンからなる群から選択され、28番目のアミノ酸はAsnであり、29番目のアミノ酸はスレオニンである。いくつかの実施形態では、RはCONH<sub>2</sub>であり、28番目のアミノ酸はAsnであり、29番目のアミノ酸はスレオニンである。もうひとつの実施形態では、Rは、配列番号26、配列番号29、配列番号65からなる群から選択され、29番目のアミノ酸はグリシンである。

10

20

#### 【0553】

別の実施形態では、グルカゴン / GLP - 1 受容体コアゴニストは、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18からなる群から選択され、ここで、ペプチドは、配列番号26、配列番号27、配列番号28からなる群から選択される1つのアミノ酸またはペプチドの追加のカルボキシ末端延長部分をさらに有する。いくつかの実施形態では、末端の延長部分は、配列番号26、配列番号29または配列番号65の配列を有し、グルカゴンペプチドは、配列番号55の配列を有する。いくつかの実施形態では、グルカゴン / GLP - 1 受容体コアゴニストは、配列番号33の配列を有し、ここで、16番目のアミノ酸はグルタミン酸であり、20番目のアミノ酸はリジンであり、28番目のアミノ酸はアスパラギンであり、配列番号26または配列番号29のアミノ酸配列は、配列番号33のカルボキシ末端に結合している。

30

#### 【0554】

配列番号20のカルボキシ末端に単一のアミノ酸が付加される実施形態では、このアミノ酸は通常、20種類の一般的なアミノ酸から選択され、いくつかの実施形態では、このアミノ酸は、天然のアミノ酸のカルボン酸に代えてアミド基を有する。いくつかの実施形態では、追加のアミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンからなる群から選択される。グルカゴンアゴニスト類縁体がカルボキシ末端延長部分をさらに有する実施形態では、いくつかの実施形態における延長部分のカルボキシ末端のアミノ酸は、カルボン酸ではなくアミド基またはエステル基で終端する。

40

#### 【0555】

もうひとつの実施形態では、グルカゴン / GLP - 1 受容体コアゴニストは、配列NH<sub>2</sub> - H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - G l u - A r g - A r g - A l a - G l n - A s p - P h e - V a l - G l n - T r p - L e u - M e t - A s n - T h r - X a a - C O N H <sub>2</sub> ( 配列番号 19 ) を有し、ここで、30番目のXaaは任意のアミノ酸を

50

表す。いくつかの実施形態では、X a a は、20 種類の一般的なアミノ酸から選択され、いくつかの実施形態では、このアミノ酸が、グルタミン酸、アスパラギン酸またはグリシンである。配列番号 19 の 17 番目、21、24 または 30 で、PEG 鎖をアミノ酸の側鎖に共有結合することで、このペプチドの溶解性をさらに改善することが可能である。別の実施形態では、ペプチドは、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28 からなる群から選択されるペプチドの追加のカルボキシ末端延長部分を有する。いくつかの実施形態によれば、グルカゴン / GLP - 1 受容体コアゴニストは、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32 の配列を有する。

#### 【0556】

配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 64 のグルカゴン配列内部の別の部位特異的修飾をほどこして、さまざまな度合いの GLP - 1 活性化作用を持つ一組のグルカゴンアゴニストを生成することが可能である。したがって、それぞれの受容体に対して事実上同じ *in vitro* 活性を持つペプチドを調製し、特徴を調べた。同様に、2つの受容体それぞれに対して 10 倍選択的に増強された活性を持つペプチドを同定し、特徴を調べた。上述したように、16 番目のセリン残基をグルタミン酸に置換すると、グルカゴン受容体と GLP - 1 受容体の両方に対する天然のグルカゴンの活性が増強されるが、グルカゴン受容体に対する約 10 倍の選択性は維持される。また、3 番目の天然のグルタミンをグルタミン酸（配列番号 22）に置換すると、GLP - 1 受容体に対する選択性が約 10 倍のグルカゴン類縁体が生成される。

#### 【0557】

ペプチドの 16 番目、17 番目、21 番目、24 番目に親水基を導入することあるいは、グルカゴン / GLP - 1 コアゴニストのペプチドのカルボキシ末端に、単一の修飾されたアミノ酸（すなわち、親水基を含むように修飾されたアミノ酸）を付加することで、天然のグルカゴンに対して高い生物学的活性を維持したまま、生理的な pH の水溶液中に対するグルカゴン / GLP - 1 コアゴニストのペプチドの溶解性を、さらに高めることが可能である。いくつかの実施形態によれば、親水基は、ポリエチレン（PEG）鎖を有する。特に、いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、このグルカゴンペプチドの 16 番目、17 番目、21 番目、24 番目、29 番目または C 末端のアミノ酸で、アミノ酸の側鎖に PEG 鎖が共有結合している、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17 または配列番号 18 の配列を有し、ただし、ペプチドが配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 または配列番号 13 を有する場合、ポリエチレングリコール鎖は、17 番目、21 番目または 24 番目でアミノ酸残基に共有結合し、ペプチドが配列番号 14 または配列番号 15 を有する場合、ポリエチレングリコール鎖は、16 番目、17 番目または 21 番目のアミノ酸残基に共有結合し、ペプチドが配列番号 16、配列番号 17 または配列番号 18 を有する場合、ポリエチレングリコール鎖は、17 番目または 21 番目のアミノ酸残基に共有結合している。

#### 【0558】

いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、このグルカゴンペプチドの 17 番目、21 番目、24 番目または C 末端のアミノ酸で、アミノ酸の側鎖に PEG 鎖が共有結合し、ペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸が、天然のアミノ酸のカルボン酸基に代えてアミド基を有する、配列番号 11、配列番号 12 または配列番号 13 の配列を有する。いくつかの実施形態では、グルカゴン / GLP - 1 受容体コアゴニストのペプチドは、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19 からなる群から選択される配列を有し、ここで、グルカゴンペプチドの配列番号 12、配列番号 13、配列番号 19 の 17 番目、21 番目または 24 番目または配列番号 14 および配列番号 15 の 16 番目、17 番目または 21 番目あるいは、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 の 17 番目または 21 番目で、アミノ酸の側鎖に PEG 鎖が共有結合している。もうひとつの実施形態では、グルカゴン / GLP -



1 受容体コアゴニストのペプチドは、17番目、21番目または24番目あるいは、グルカゴンペプチドのC末端のアミノ酸で、アミノ酸の側鎖にPEG鎖が共有結合している、配列番号11または配列番号19の配列を有する

【0559】

いくつかの実施形態に従って、かつ、前述の段落に記載の但し書きされた条件を考慮して、16番目、17番目、21番目、24番目または29番目またはC末端のアミノ酸に1個または2個以上のアミノ酸置換を含むように、グルカゴンコアゴニストのペプチドを修飾し、ここで、天然のアミノ酸を、PEGなどをはじめとする親水体と架橋させるのに適した側鎖を有するアミノ酸に置換する。この天然のペプチドについては、天然のアミノ酸で置換してもよいし、合成（非天然）のアミノ酸で置換してもよい。合成または非天然のアミノ酸は、*in vivo*では天然に生じないが、本明細書に記載のペプチド構造に取り込むことは可能である。あるいは、PEGなどをはじめとする親水体と架橋するのに適した側鎖を有するアミノ酸を、本明細書に開示のどのグルカゴン類縁体のカルボキシ末端にも付加することが可能である。いくつかの実施形態によれば、グルカゴン/GLP-1受容体コアゴニストのペプチドにおいて、16番目、17番目、21番目、24番目または29番目からなる群から選択される位置で、天然のアミノ酸を、リジン、システイン、オルニチン、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸に置換する、アミノ酸置換がなされ、ここで、置換しているアミノ酸は、アミノ酸の側鎖に共有結合しているPEG鎖をさらに有する。いくつかの実施形態では、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19からなる群から選択されるグルカゴンペプチドを、グルカゴンペプチドの17番目または21番目でアミノ酸の側鎖に共有結合しているPEG鎖を有するように、さらに修飾する。いくつかの実施形態では、PEG化グルカゴン/GLP-1受容体コアゴニストは、配列番号26、配列番号27または配列番号29の配列をさらに有する。

【0560】

もうひとつの実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号55または配列番号56の配列を有し、配列番号55または配列番号56のC末端のアミノ酸に結合した配列番号26、配列番号29または配列番号65のC末端の延長部分をさらに含み、任意に、ペプチドの17番目、18番目、21番目、24番目または29番目あるいは、C末端のアミノ酸で、アミノ酸の側鎖に共有結合しているPEG鎖をさらに有する。もうひとつの実施形態では、グルカゴンペプチドは、このグルカゴンペプチドの21番目または24番目で、アミノ酸の側鎖にPEG鎖が共有結合している、配列番号55または配列番号56の配列を有し、このペプチドは、配列番号26または配列番号29のC末端の延長部分をさらに有する。

【0561】

もうひとつの実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号33または配列番号34のカルボキシ末端に、追加のアミノ酸が付加され、付加したアミノ酸の側鎖に、PEG鎖が共有結合している、配列番号55または配列番号33または配列番号34の配列を有する。別の実施形態では、配列番号33または配列番号34のPEG化グルカゴン類縁体は、C末端のアミノ酸に結合した配列番号26または配列番号29のC末端の延長部分をさらに有する。もうひとつの実施形態では、グルカゴンペプチドは、このグルカゴンペプチドの30番目のアミノ酸の側鎖にPEG鎖が共有結合している配列番号19の配列を有し、このペプチドは、配列番号19のC末端のアミノ酸に結合した配列番号26または配列番号29のC末端の延長部分をさらに有する。

【0562】

ポリエチレングリコール鎖は、直鎖状であってもよいし、分岐状であってもよい。いくつかの実施形態によれば、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が、約500～約10,000ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が、約1,000～約5,000ダルトンの範囲から選択される。別の実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が、約10,000～約

20,000ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施形態によれば、PEG化グルカゴンペプチドは、グルカゴンペプチドに共有結合している2つまたは3つ以上のポリエチレングリコール鎖を有し、この場合のグルカゴン鎖の合計の分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。いくつかの実施形態では、PEG化グルカゴンアゴニストは、PEG鎖が21番目および24番目でアミノ酸残基に共有結合し、2つのPEG鎖の合算での分子量が約1,000～約5,000ダルトンである。配列番号5からなるペプチドまたは配列番号5のグルカゴンアゴニスト類縁体を有する。

#### 【0563】

特定の例示としての実施形態では、グルカゴンペプチドは、最大10個のアミノ酸修飾を含む配列番号1のアミノ酸配列を有し、10番目に、アシル化されたまたはアルキル化されたアミノ酸を有する。いくつかの実施形態では、10番目のアミノ酸は、C4～C30脂肪酸でアシル化またはアルキル化されている。特定の態様では、10番目のアミノ酸は、天然のアミノ酸に対して非天然のアシル基またはアルキル基を有する。

10

#### 【0564】

特定の実施形態では、10番目にアシル化またはアルキル化されたアミノ酸を有するグルカゴンペプチドは、安定化された $\alpha$ 螺旋を有する。したがって、特定の態様では、グルカゴンペプチドは、本明細書に記載するようなアシル基またはアルキル基と、i番目のアミノ酸とi+4番目のアミノ酸の側鎖間の分子内架橋、たとえば、共有結合の分子内架橋（ラクタム架橋など）と、を有し、ここで、iは、12、16、20または24である。上記に代えてまたは上記に加えて、グルカゴンペプチドは、本明細書に記載するようなアシル基またはアルキル基と、グルカゴンペプチドの16番目、20番目、21番目および/または24番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所または4箇所以上を、Aibなどの $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸に置換する。場合によっては、非天然のグルカゴンペプチドは、16番目のGluと20番目のLysとを有し、ここで、任意に、ラクタム架橋がGluとLysとを結合し、任意に、グルカゴンペプチドは、17番目のGln、18番目のAla、21番目のGlu、23番目のIle、24番目のAlaからなる群から選択される1個または2個以上の修飾をさらに有する。

20

#### 【0565】

また、グルカゴンペプチドが、10番目に、アシル化されたまたはアルキル化されたアミノ酸を有するいずれの実施形態でも、グルカゴンペプチドは、C末端の $\alpha$ カルボキシレートに代えて、C末端のアミドをさらに含むものであってもよい。

30

#### 【0566】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載するようなアシル基またはアルキル基を有するグルカゴンペプチドは、1番目、2番目または1番目と2番目にアミノ酸置換をさらに有し、このアミノ酸置換（単数または複数）によって、DPP-IVプロテアーゼ耐性を達成する。たとえば、1番目のHisを、D-ヒスチジン、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -ジメチルイミダゾール酢酸（DMI A）、N-メチルヒスチジン、 $\alpha$ -メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸で置換してもよい。上記に代えてまたは上記に加えて、2番目のSerを、D-セリン、アラニン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン、アミノイソ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換してもよい。いくつかの実施形態では、2番目のアミノ酸はD-セリンではない。

40

#### 【0567】

本明細書に記載するようにアシル化またはアルキル化されている10番目のアミノ酸を有するグルカゴンペプチドは、実質的に配列番号1と関連するアミノ酸配列を含むものであってもよい。たとえば、グルカゴンペプチドは、最大で10個のアミノ酸修飾（0個、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個の修飾など）を含む、配列番号1を有する。特定の実施形態では、アシル化されたまたはアルキル化されたグルカゴンペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1と25%を超えて同一である（配列番号1と比較して、30%、35%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85

50

%、90%、95%、96%、97%、98%、99%を超えて同一であるか、ほぼ100%同一であるなど)。特定の具体的な実施形態では、グルカゴンペプチドは、10番目のアミノ酸が、本明細書に記載するようにアシル化またはアルキル化された、配列番号55を有するものである。グルカゴンペプチドは、配列番号55、1個または2個のアミノ酸修飾を有する配列番号55、配列番号2~4、9~18、20、23~25、33、40~44、53、56、61、62、64、66~514、534のいずれであってもよい。

#### 【0568】

これらの実施形態のアシル基またはアルキル基は、本明細書に記載のどのアシル基またはアルキル基であってもよい。たとえば、アシル基は、C4~C30(C8~C24など)の脂肪族アシル基であってもよく、アルキル基は、C4~C30(C8~C24など)のアルキル基であってもよい。

10

#### 【0569】

アシル基またはアルキル基が結合しているアミノ酸は、たとえば、式I(Lysなど)、式II、式IIIのいずれかのアミノ酸など、本明細書に記載のどのアミノ酸であってもよい。

#### 【0570】

いくつかの実施形態では、アシル基またはアルキル基は、10番目のアミノ酸に直接的に結合している。いくつかの実施形態では、アシル基またはアルキル基は、原子3~10個の長さのスペーサー、たとえば、アミノ酸またはジペプチドなどのスペーサーを介して10番目のアミノ酸に結合している。アシル基またはアルキル基を結合するための好適なスペーサーについては、本明細書で説明する。

20

#### 【0571】

いくつかの実施形態によれば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、本明細書に記載するような上記のクラス3のグルカゴン関連ペプチドのいずれかの類縁体であってもよく、この類縁体は、GIP受容体に対するアゴニスト活性を示す。グルカゴン受容体、GLP-1受容体、GIP受容体に対する類縁体の活性レベル、これらの受容体各々に対する活性、これらの受容体各々に対する選択性は、本明細書に記載したクラス2のグルカゴン関連ペプチドについての教示内容に従うものであってもよい。クラス2のグルカゴン関連ペプチドのセクションで「活性」というタイトルのついたサブセクションの教示内容を参照のこと。

30

#### 【0572】

本発明のいくつかの実施形態では、GIP受容体に対するアゴニスト活性を示すグルカゴンペプチドの類縁体が提供される。特定の実施形態における類縁体は、少なくとも1個のアミノ酸修飾(任意に、最大15のアミノ酸修飾)を含む配列番号1のアミノ酸配列と、類縁体の29番目のアミノ酸よりC末端側で1~21個のアミノ酸からなる延長部分と、を有する。

#### 【0573】

特定の態様では、類縁体は、少なくとも1個のアミノ酸修飾を有し、最大15個のアミノ酸修飾(1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個のアミノ酸修飾、最大10個のアミノ酸修飾など)を有する。特定の実施形態では、類縁体は、最大で10個のアミノ酸修飾における少なくとも1個のアミノ酸修飾と、追加の保存的なアミノ酸修飾とを有する。保存的なアミノ酸修飾については、本明細書で説明する。

40

#### 【0574】

いくつかの態様では、アミノ酸修飾のうちの少なくとも1個が、類縁体のC末端領域に、安定化した $\alpha$ 螺旋構造を与える。安定化した $\alpha$ 螺旋構造を達成する修飾については、本明細書で説明する。たとえば、 $\alpha$ 螺旋/分子内架橋の安定化というタイトルのセクションを参照のこと。いくつかの態様では、類縁体は、類縁体の2つのアミノ酸の側鎖間に分子内架橋(共有結合の分子内架橋、非共有結合の分子内架橋など)を有する。特定の態様で

50

は、分子内架橋は、 $i$  番目のアミノ酸の側鎖と  $i + 4$  番目のアミノ酸の側鎖とを結合し、ここで、 $i$  は、12、13、16、17、20または24である。他の態様では、分子内架橋によって、 $j$  番目と  $j + 3$  番目のアミノ酸の側鎖を結合（ $j$  は17である）するか、 $k$  番目と  $k + 7$  番目のアミノ酸の側鎖を結合（ $k$  は12～22の整数）する。特定の実施形態では、分子内架橋は、共有結合の分子内架橋、たとえば、ラクタム架橋である。特定の態様では、ラクタム架橋は、16番目と20番目のアミノ酸の側鎖を結合する。特定の態様では、16番目および20番目のアミノ酸の一方が正の電荷を持つアミノ酸であり、他方が負の電荷を持つアミノ酸である。たとえば、類縁体は、16番目のGluと20番目のLysの側鎖を結合するラクタム架橋を含むものであってもよい。他の態様では、負の電荷を持つアミノ酸と、正の電荷を持つアミノ酸が、塩結合を形成する。この場合、分子内架橋は、非共有結合の分子内架橋である。

10

## 【0575】

特定の態様では、安定化された $\alpha$ 螺旋を与えるアミノ酸修飾は、配列番号1のアミノ酸に $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸を入れる挿入または配列番号1のアミノ酸から $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸への置換である。 $\alpha$ 螺旋を安定化するのに適した $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸については、本明細書にて説明し、たとえばAibがあげられる。いくつかの態様では、配列番号1の16番目、20番目、21番目、24番目のアミノ酸のうちの1つ、2つ、3つまたは4つ以上を、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸、たとえばAibで置換する。特定の実施形態では、16番目のアミノ酸はAibである。

## 【0576】

GIP受容体に対するアゴニスト活性を示す類縁体は、本明細書に記載したものなどの追加の修飾を含むものであってもよい。たとえば、アミノ酸修飾は、GLP-1受容体およびグルカゴン受容体の一方または両方に対する活性を高めるまたは低下させることがある。アミノ酸修飾は、ペプチドの安定性を高める、たとえば、DPP-IVプロテアーゼ分解に対する耐性を高め、15番目と16番目のアミノ酸の間の結合を安定化することがある。アミノ酸修飾は、ペプチドの溶解性を高めるおよび/またはGIP受容体、グルカゴン受容体、GLP-1受容体のいずれかに対する類縁体の作用時間を変化させることがある。これらのタイプの修飾のいずれかの組み合わせが、GIP受容体に対するアゴニスト活性を示す類縁体に存在してもよい。

20

## 【0577】

したがって、いくつかの態様では、類縁体は、17番目のGln、18番目のAla、21番目のGlu、23番目のIle、24番目のAlaまたはCysまたはこれらの保守的なアミノ酸置換のうち1個または2個以上を伴う配列番号1のアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、類縁体は、C末端の $\alpha$ カルボキシレートに代えて、C末端のアミドを有する。特定の実施形態では、類縁体は、1番目、2番目または1番目と2番目にアミノ酸置換を有し、この置換（単数または複数）が、DPP-IVプロテアーゼ耐性を達成する。好適なアミノ酸置換については、本明細書で説明する。たとえば、1番目のDMI Aおよび/または2番目のd-SerまたはAib。いくつかの実施形態では、2番目のアミノ酸はD-セリンではない。

30

## 【0578】

上記に加えてあるいは上記に代えて、類縁体は、以下のうちの1つまたはいずれかの組み合わせを含むものであってもよい。（a）2番目のSerにおける、Alaとの置換、（b）3番目のGlnにおける、Gluまたはグルタミン類縁体との置換、（c）7番目のThrにおける、Ileとの置換、（d）10番目のTyrにおける、Trpあるいは天然のアミノ酸に対して非天然のアシル基またはアルキル基を有するアミノ酸との置換、（e）12番目のLysにおける、Ileとの置換、（f）15番目のAspにおける、Gluとの置換、（g）16番目のSerにおける、Gluとの置換、（h）20番目のGlnにおける、Ser、Thr、Ala、Aibとの置換、（i）24番目のGlnにおける、Ser、Thr、Ala、Aibとの置換、（j）27番目のMetにおける、LeuまたはNleとの置換、（k）29番目のAsnにおける、電荷を持つアミノ酸

40

50

、任意に A s p または G l u との置換、および ( 1 ) 2 9 番目の T h r における、 G l y または電荷を持つアミノ酸、任意に A s p または G l u との置換。

【 0 5 7 9 】

G I P 受容体に対するアゴニスト活性を示す類縁体に関して、類縁体は、 1 ~ 2 1 個のアミノ酸 ( 5 ~ 1 9 個、 7 ~ 1 5 個、 9 ~ 1 2 個のアミノ酸など ) からなる延長部分を有する。類縁体の延長部分は、この延長部分が 1 ~ 2 1 個のアミノ酸であるかぎり、どのアミノ酸配列を含むものであってもよい。いくつかの態様では、延長部分は、 7 ~ 1 5 個のアミノ酸であり、他の態様では、延長部分は 9 ~ 1 2 個のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、延長部分は、 ( i ) 配列番号 2 6 または 6 7 4 のアミノ酸配列、 ( i i ) 配列番号 2 6 または 6 7 4 のアミノ酸配列との配列同一性が高い ( 少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % 、 9 9 % など ) アミノ酸配列または ( i i i ) 1 個または 2 個以上の保存的なアミノ酸修飾を有する、 ( i ) または ( i i ) のアミノ酸配列を有する。

10

【 0 5 8 0 】

いくつかの実施形態では、延長部分のアミノ酸のうちの少なくとも 1 個が、アシル化またはアルキル化されている。アシル基またはアルキル基を有するアミノ酸は、類縁体の延長部分のどの位置にあってもよい。特定の実施形態では、延長部分のアシル化またはアルキル化されたアミノ酸は、 ( 配列番号 1 の番号で ) 類縁体の 3 7 番目、 3 8 番目、 3 9 番目、 4 0 番目、 4 1 番目または 4 2 番目に位置する。特定の実施形態では、アシル化またはアルキル化されたアミノ酸は、類縁体の 4 0 番目に位置する。

20

【 0 5 8 1 】

例示としての実施形態では、アシル基またはアルキル基は、天然のアミノ酸に対して非天然のアシル基またはアルキル基である。たとえば、アシル基またはアルキル基は、 C 4 ~ C 3 0 ( C 1 2 ~ C 1 8 など ) の脂肪族アシル基または C 4 ~ C 3 0 ( C 1 2 ~ C 1 8 など ) のアルキルであってもよい。アシル基またはアルキル基は、本明細書で説明するうちのいずれであってもよい。

【 0 5 8 2 】

いくつかの実施形態では、アシル基またはアルキル基は、たとえばアミノ酸の側鎖を介して、アミノ酸に直接結合している。他の実施形態では、アシル基またはアルキル基は、スパーサー ( アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性の二官能性スパーサー、疎水性の二官能性スパーサーなど ) を介して、アミノ酸に結合している。特定の態様では、スパーサーは、原子 3 ~ 1 0 個の長さである。いくつかの実施形態では、アミノ酸スパーサーは、  $\gamma$  - G l u でない。いくつかの実施形態では、ジペプチドスパーサーは、  $\gamma$  - G l u -  $\gamma$  - G l u でない。

30

【 0 5 8 3 】

また、例示としての実施形態では、アシル基またはアルキル基が結合しているアミノ酸は、たとえば、式 I、式 I I または式 I I I のアミノ酸をはじめとして、本明細書で説明するうちのいずれであってもよい。アシル化またはアルキル化されたアミノ酸は、たとえば L y s であってもよい。アシル基またはアルキル基を有する好適なアミノ酸ならびに、好適なアシル基およびアルキル基については、本明細書に記載してある。たとえば、アシル化およびアルキル化というタイトルのセクションの教示内容を参照のこと。

40

【 0 5 8 4 】

他の実施形態では、延長部分の 1 ~ 6 個のアミノ酸 ( 1 ~ 2 個、 1 ~ 3 個、 1 ~ 4 個、 1 ~ 5 個のアミノ酸など ) は、正の電荷を持つアミノ酸、たとえば、 L y s などの式 I V のアミノ酸である。本明細書で使用する場合、「正の電荷を持つアミノ酸」という表現は、生理的な p H で側鎖の原子に正の電荷を持つ天然または非天然のアミノ酸を示す。特定の態様では、正の電荷を持つアミノ酸は、 3 7 番目、 3 8 番目、 3 9 番目、 4 0 番目、 4 1 番目、 4 2 番目、 4 3 番目のどこに位置していてもよい。具体的な実施形態では、正の電荷を持つアミノ酸は、 4 0 番目に位置する。

【 0 5 8 5 】

50

他の例では、延長部分は、本明細書に記載するようにアシル化またはアルキル化され、本明細書に記載するような1～6個の正の電荷を持つアミノ酸を有する。

#### 【0586】

さらに他の実施形態では、GIP受容体に対するアゴニスト活性を示す類縁体は、(i)少なくとも1個のアミノ酸修飾を有する配列番号1、(ii)類縁体の29番目のアミノ酸よりC末端側における、1～21個のアミノ酸(5～18個、7～15個、9～12個のアミノ酸など)からなる延長部分、(iii)C末端の延長部分の外側(1番目から29番目の任意の位置など)に位置する、天然のアミノ酸に対して非天然のアシル基またはアルキル基を有するアミノ酸を有する。いくつかの実施形態では、類縁体は、10番目に、アシル化またはアルキル化されたアミノ酸を有する。特定の態様では、アシル基またはアルキル基は、C4～C30の脂肪族アシル基またはC4～C30のアルキル基である。いくつかの実施形態では、アシル基またはアルキル基は、スペーサー、たとえばアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、親水性の二官能性スペーサー、疎水性の二官能性スペーサー)を介して結合している。特定の態様では、類縁体は、16番目のGluと20番目のLysの間の塩結合あるいは、16番目、20番目、21番目、24番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所または4箇所以上における $\alpha$ 、 $\alpha$ -二置換アミノ酸など、 $\alpha$ 螺旋を安定化するアミノ酸修飾を有する。具体的な態様では、類縁体は、DPP-IVプロテアーゼ耐性を与えるアミノ酸修飾、たとえば、1番目のDMI A、2番目のAibをさらに有する。別のアミノ酸修飾を有する類縁体も、本明細書で考えられている。

10

#### 【0587】

特定の実施形態では、GIP受容体の活性を有する類縁体は、GIP受容体に対する活性が、天然のGIPの少なくとも0.1%(少なくとも0.5%、1%、2%、5%、10%、15%または20%など)である。いくつかの実施形態では、類縁体は、GIP受容体に対する活性が、天然のGIPの20%を超える(50%を超える、75%を超える、100%を超える、200%を超える、300%を超える、500%を超えるなど)。いくつかの実施形態では、類縁体は、GLP-1受容体およびグルカゴン受容体の一方または両方に対して、かなりのアゴニスト活性を示す。いくつかの態様では、これらの受容体(GIP受容体およびGLP-1受容体および/またはグルカゴン受容体)に対する選択性が、1000倍以内である。たとえば、GIP受容体の活性を有する類縁体のGLP-1受容体に対する選択性は、GIP受容体および/またはグルカゴン受容体に対する選択性の500倍未満、100倍、50倍以内、25倍以内、15倍以内、10倍以内)であってもよい。

20

30

#### 【0588】

いくつかの実施形態によれば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、以下の修飾を有する天然のグルカゴンのアミノ酸配列(配列番号1)を有する。2番目のAib、3番目のGlu、10番目のLys、16番目のGlu、17番目のGln、18番目のAla、20番目のLys、21番目のGlu、23番目のIle、24番目のAla;ここで、10番目のLysは、C14またはC16脂肪酸でアシル化され、C末端のカルボキシレートは、アミドに置き換えられている。具体的な実施形態では、このクラス3のグルカゴン関連ペプチドは、リンカー(L)を介してNHRリガンド(Y)に結合している。

40

#### 【0589】

いくつかの実施形態によれば、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、GLP-1アゴニスト活性および/またはグルカゴンアゴニスト活性を保持する、任意に最大で1個、2個、3個、4個または5個のさらなる修飾を有する、配列番号70～514、517～534または554のいずれかのアミノ酸配列を有する、本質的にこのようなアミノ酸配列からなる、あるいは、このようなアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号562～760のいずれかのアミノ酸を有する。いくつかの実施形態では、クラス3のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号1301～1421のいずれかのアミノ酸配列を有する。

50

クラス4のグルカゴン関連ペプチド

## 【0590】

特定の実施形態では、Qは、クラス4のグルカゴン関連ペプチドである（たとえば、国際（PCT）特許出願公開第WO2009/058662号（その全体を本明細書に援用する）を参照のこと）。

## 【0591】

以下のセクションに示す生物学的配列（配列番号1301～1371）はすべて、国際特許出願公開第WO2009/058662号における配列番号1～71に対応する。

活性

## 【0592】

いくつかの実施形態によれば、クラス4のグルカゴン関連ペプチドが提供される（以下、「クラス4のペプチド」と呼ぶ）。特定の態様では、グルカゴンアンタゴニスト活性を有するクラス4のペプチドが提供される。グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン活性化作用の抑制が望ましい環境であれば、どのような環境でも使用されるであろう。最も直接的で明らかな用途は、高血糖症の前臨床モデルでグルカゴンの拮抗作用が示されている糖尿病の治療に適用して、血糖を低下させる用途であろう。グルカゴンアンタゴニストをさらに修飾し、親化合物のアンタゴニスト活性を維持したまま、化合物の生物物理学的安定性および/または水溶性を改善してもよい。特定の態様では、クラス4のペプチドは、純粋なグルカゴンアンタゴニストとして望ましい。

## 【0593】

「グルカゴンアンタゴニスト」という用語は、グルカゴンの活性を低下させるまたはグルカゴンの機能を阻害する化合物を示す。たとえば、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の反応の少なくとも60%を阻害し（少なくとも70%阻害するなど）、好ましくは、少なくとも80%を阻害する。いくつかの実施形態では、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の反応の少なくとも90%を阻害する。具体的な実施形態では、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の反応の100%を阻害する。また、濃度約1  $\mu$  Mのグルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の約20%未満しかアゴニスト活性を示さない。いくつかの実施形態では、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の約10%未満しかアゴニスト活性を示さない。具体的な実施形態では、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の約5%未満しかアゴニスト活性を示さない。さらにもうひとつの具体的な実施形態では、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の0%しかアゴニスト活性を示さない。

## 【0594】

「純粋なグルカゴンアンタゴニスト」とは、確立されたin vitroモデルでのアッセイを用いてcAMPの産生を基準に判断できる、グルカゴン受容体またはGLP-1受容体の活性の検出される刺激を生成しないグルカゴンアンタゴニストである（たとえば、国際特許出願公開第WO2009/058662号を参照のこと）。たとえば、純粋なグルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体でグルカゴンが達成する最大限の約5%未満（約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0%など）しかアゴニスト活性を示さず、GLP-1受容体でGLP-1が達成する最大限の約5%未満（約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0%など）しかアゴニスト活性を示さない。

## 【0595】

したがって、いくつかの態様では、純粋なグルカゴンアンタゴニスト活性を示すクラス4のペプチドが提供される。いくつかの実施形態によれば、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体を0.8 nMのグルカゴンとグルカゴンアンタゴニストに同時に接触させると、in vitroアッセイでのcAMPの産生を基準に判断できる、グルカゴン受容体に対してグルカゴン誘導cAMP産生を最大で少なくとも50%低下させる活性を示す。いくつかの実施形態では、グルカゴンアンタゴニストは、グルカゴン受容体に対してグルカゴン誘導cAMP産生を最大量で少なくとも80%低下させる。

## 【0596】

クラス4のペプチドは、グルカゴンアンタゴニストについて上述したどのような用途にも適していると考えられる。したがって、本明細書に記載のクラス4のペプチドを、高血糖症の治療またはグルカゴンの血中濃度またはグルコースの血中濃度が高いことで生じる他の代謝疾患の治療に用いることが可能である。いくつかの実施形態によれば、本明細書に開示のクラス4のペプチドを用いて治療される患者は、飼いなされた動物であり、別の実施形態では、治療対象となる患者はヒトである。研究では、糖尿病患者におけるグルカゴン抑制の欠如は、ある程度、グリコーゲンの分解を加速させることで、食後高血糖症の一因となる。経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）にて血糖を分析したところ、ソマトスタチン誘導グルカゴンの抑制がなされる状態またはなされない状態で、グルカゴン濃度の高い治療対象者で、グルコースの有意な増加が認められた。したがって、本発明のクラス4のペプチドを高血糖症の治療に用いることが可能であり、糖尿病Ⅰ型、真性糖尿病Ⅱ型または妊娠性糖尿病（インスリン依存性または非インスリン依存性）をはじめとするさまざまなタイプの糖尿病を治療し、胃障害、網膜症、血管疾患などの糖尿病の合併症を低減するのに有用であると思われる。

10

## 【0597】

いくつかの実施形態では、エキセンディン-4の末端の10個のアミノ酸（すなわち、配列番号1319（GPSSGAPPPS）の配列）を、クラス4のペプチドのカルボキシ末端に結合する。これらの融合タンパク質は、食欲を抑制し、体重減少/体重維持を誘導するための薬理的活性を有するものと予想される。いくつかの実施形態によれば、本明細書に開示のクラス4のペプチドを、配列番号1342のクラス4のペプチドの24番目のアミノ酸に結合した配列番号1319（GPSSGAPPPS）のアミノ酸配列を含むようにさらに修飾し、対象個体に投与して体重減少を誘導する、あるいは、体重維持を助けることが可能である。特に、配列番号1302、配列番号1303、配列番号1304、配列番号1305、配列番号1306、配列番号1307、配列番号1308、配列番号1336、配列番号1339、配列番号1340、配列番号1341、配列番号1342、配列番号1343、配列番号1344からなる群から選択される配列を有し、かつ、クラス4のペプチドの24番目のアミノ酸に結合した配列番号1319（GPSSGAPPPS）のアミノ酸配列をさらに有するクラス4のペプチドは、食欲を抑制し、体重減少/体重維持を誘導するのに用いられる。いくつかの実施形態では、投与されるクラス4のペプチドは、配列番号1346または配列番号1347の配列を有する。

20

30

## 【0598】

食欲を低減し、あるいは体重減少を促進するための上述したような方法は、体重を落とし、体重増加を防止し、あるいは、薬物誘発性肥満をはじめとするさまざまな原因の肥満を治療し、血管疾患（冠動脈疾患、脳卒中、末梢血管疾患、虚血再灌流障害など）、高血圧症、Ⅱ型糖尿病の発症、高脂血症、筋骨格系疾患をはじめとする肥満に関連する合併症を軽減する上で、有用であると思われる。

## 【0599】

本発明のクラス4のペプチドは、単独で投与してもよいし、他の抗糖尿病薬または抗肥満薬との組み合わせで投与してもよいものである。当分野で知られた抗糖尿病薬または研究中の抗糖尿病薬として、インスリン、トルブタミド（Orinase）、アセトヘキサミド（Dymelor）、トラザミド（Tolinase）、クロルプロパミド（Diabinese）、グリピジド（Glucotrol）、グリブリド（Diabeta、Mcronase、Glynase）、グリメピリド（Amaryl）またはグリクラジド（Diamicon）などのスルホニル尿素；レバグリニド（Prandin）またはナテグリニド（Starlix）などのメグリチニド；メトホルミン（Glucophage）またはフェンホルミンなどのビグアナイド；ロシグリタゾン（Avandia）、ピオグリタゾン（Actos）またはトログリタゾン（Rezulin）または他のPPAR $\gamma$ 阻害薬などのチアゾリジンジオン；ミグリトール（Glyset）、アカルボース（Precose/Glucobay）などの炭水化物の消化を阻害する $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬；エクセナチド（Byetta）またはプラムリンチド；ビルダグリプチンまたはシタグリプチンなどのジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4

40

50



）阻害薬；SGLT（ナトリウム依存性グルコーストランスポーター１）阻害剤；またはFBPase（フルクトース１，６－ビスホスファターゼ）阻害薬があげられる。

#### 【０６００】

当分野で知られた抗肥満薬または研究中の抗肥満薬は、フェネチルアミンタイプの刺激薬、フェンテルミン（任意にフェンフルラミンまたはデクスフェンフルラミン併用）、ジエチルプロピオン（Tenuate（登録商標））、フェンジメトラジン（Prelu-2（登録商標））、Bontril（登録商標）、ベンズフェタミン（Didrex（登録商標））、シブトラミン（Meridia（登録商標））、Reductil（登録商標）；リモナバン（Acomplia（登録商標））、他のカンナビノイド受容体アンタゴニスト；オキシントモジュリン；塩酸フルオキセチン（Prozac）；Qnexa（トピラマートとフェンテルミンとの合剤）、Excalia（ブプロピオンおよびゾニサミド）またはContrave（ブプロピオンおよびナルトレキソン）；またはゼニカル（Orlistat）またはセチリストット（ATL-962としても知られる）またはGT 389-255に類するリパーゼ阻害薬をはじめとする食欲抑制薬を含む。

10

20

#### 【０６０１】

また、本発明のクラス４のペプチドを、悪液質になった患者に投与することも可能である。悪液質は、意図的ではなく体重が減少しつづけ、衰弱し、体脂肪と筋肉が落ちることが特徴であり、がん患者の半数以上に悪液質が生じると推定される。この症候群はAIDSにも普通に見られ、細菌による疾患や寄生虫症、関節リウマチならびに、腸、肝臓、肺、心臓の慢性疾患に伴うこともある。これは通常、摂食障害に関連し、老化に伴う状態として、あるいは肉体的な外傷の結果として、顕在化することがある。悪液質は、生活の質を落とし、基礎疾患を悪化させる症状であり、主な死因のひとつでもある。本出願人らは、悪液質を治療するために、本明細書に開示のクラス４のペプチドを患者に投与可能であると予想している。

#### 【０６０２】

当業者に知られた標準的な薬学的に許容されるキャリアおよび投与経路を用いて、本明細書に開示のクラス４のペプチドを含む薬学的組成物を、調製し、患者に投与することが可能である。したがって、本開示は、本明細書に開示のクラス４のペプチド１つまたは２つ以上を、薬学的に許容されるキャリアとの組み合わせで含む薬学的組成物も包含する。この薬学的組成物は、クラス４のペプチドを、唯一の薬学的に活性な成分として含むものであってもよいし、クラス４のペプチドを、１種または２種以上の別の活性剤と組み合わせることも可能である。いくつかの実施形態によれば、本発明のクラス４のペプチドと、GLP-1受容体（GLP-1、GLP-1類縁体、エキセンディン-4類縁体またはこれらの誘導体など）を活性化する化合物とを含む、組成物が提供される。いくつかの実施形態によれば、本発明のクラス４のペプチドと、インスリンまたはインスリン類縁体とを含む、組成物が提供される。あるいは、配列番号１３４２の配列を有し、かつ、配列番号１３４２の２４番目のアミノ酸に結合した配列番号１３１９（GPSSGAPPPS）のアミノ酸配列と抗肥満ペプチドとをさらに有する、体重減少を誘導または体重増加を防止するために提供される組成物を提供することが可能である。好適な抗肥満ペプチドとして、米国特許第５，６９１，３０９号、同第６，４３６，４３５号または米国特許出願第２００５０１７６６４３号に開示されたものがあげられ、GLP-1、GIP（胃抑制ポリペプチド）、MP1、PYY、MC-4、レプチンを含むがこれらに限定されるものではない。

30

40

クラス４のペプチドの構造

#### 【０６０３】

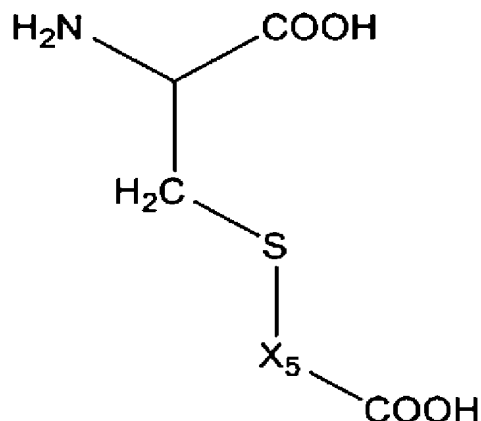
いくつかの実施形態では、（グルカゴン、配列番号１３０１）の９番目の普通に生じるアスパラギン酸が、グルタミン酸を基にした誘導体またはシステイン酸を基にした誘導体で置換された、クラス４のグルカゴン関連ペプチドが提供される。特に、１番目のアミノ酸の欠失（デスヒスチジン）と、９番目のアスパラギン酸からグルタミン酸への置換によって、いくつかの態様では、クラス４のペプチドが生成される。グルカゴンの９番目のアミノ酸が置換された、スルホン酸置換基を有するクラス４のグルカゴン関連ペプチドは、カルボン酸を基にしたアミノ酸と似たような形で働くが、溶解性などの物性の点でいくつ

50

か重要な差異がある。ホモシステイン酸 (h C y s S O 3 ) を、従来のデスヒスチジンにおける 9 番目の等配電子でグルタミン酸と置換すると、9 番目のアミノ酸がグルタミン酸であるクラス 4 のペプチドは、部分アンタゴニストと弱いアゴニストとを保持する。

【 0 6 0 4 】

いくつかの実施形態では、最初の 2 ~ 5 個のアミノ酸が除去され、( 配列番号 1 3 0 1 の番号で ) 9 番目が、h C y s ( S O 3 )、ホモグルタミン酸、β - ホモグルタミン酸あるいは、以下の構造を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体で置換された、クラス 4 のペプチドが提供される



10

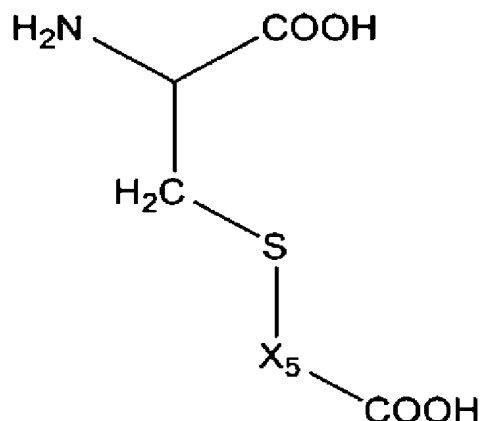
20

式中、X 5 は、C 1 ~ C 4 アルキル、C 2 ~ C 4 アルケニルまたは C 2 ~ C 4 アルキニルであり、極めて特異的かつ活性が高く、アゴニスト特性を低下させないホルモンアンタゴニストとして作用する化合物を提供する。

【 0 6 0 5 】

いくつかの実施形態によれば、配列番号 1 3 0 1 の野生型配列に比して、2 ~ 5 個のアミノ酸残基が N 末端から欠失し、天然のタンパク質の 9 番目のアスパラギン酸残基が、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、β - ホモグルタミン酸、システインのスルホン酸誘導体あるいは、以下の構造を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体で置換されたグルカゴンペプチドを有する、クラス 4 のペプチドが提供される。

30



40

式中、X 5 は、C 1 ~ C 4 アルキル、C 2 ~ C 4 アルケニルまたは C 2 ~ C 4 アルキニルである。

【 0 6 0 6 】

具体的な一実施形態では、2 ~ 5 個のアミノ酸残基が N 末端から欠失し、天然のグルカゴンの 9 番目の A s p が置換されたクラス 4 のペプチドを、最大でアミノ酸修飾 3 個までさらに修飾する。たとえば、クラス 4 のペプチドは、1 個、2 個または 3 個の保存的なアミノ酸修飾を有するものであってもよい。上記に代えてまたは上記に加えて、クラス 4 の

50

ペプチドは、以下からなる群から選択される 1 個または 2 個以上のアミノ酸修飾を有するものであってもよい。

A. (配列番号 1301 のアミノ酸番号で) 10 番目、20 番目、24 番目の 1 個または 2 個のアミノ酸またはクラス 4 のペプチドの N 末端または C 末端のアミノ酸を、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、アミド結合またはアルキルアミン結合を介してアシル基またはアルキル基に共有結合しているアミノ酸で置換、

B. (配列番号 1301 のアミノ酸番号で) 16 番目、17 番目、20 番目、21 番目、24 番目の 1 個または 2 個のアミノ酸またはクラス 4 のペプチドの N 末端または C 末端のアミノ酸を、Cys、Lys、オルニチン、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン (Ac-Phe) からなる群から選択されるアミノ酸 (この群のアミノ酸は親水体に共有結合している) と置換、

C. 親水体に共有結合しているアミノ酸を、クラス 4 のペプチドの N 末端または C 末端に付加、

D. (配列番号 1301 の番号で) 15 番目の Asp を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸と置換、

E. (配列番号 1301 の番号で) 16 番目の Ser を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸と置換、

F. 配列番号 1301 のアミノ酸番号で 16 番目、20 番目、21 番目、24 番目のうちの 1 箇所または 2 箇所以上における、Aib との置換、

G. 配列番号 1301 の番号で 29 番目のアミノ酸または 28 番目と 29 番目のアミノ酸の欠失、

H. (配列番号 1301 のアミノ酸番号で) 28 番目の Asn と 29 番目の Thr の一方または両方を、電荷を持つアミノ酸で置換および / または配列番号 1301 の C 末端に 1 ~ 2 個の電荷を持つアミノ酸を付加、

I. (配列番号 1301 の番号で) 27 番目の Met を、Leu またはノルロイシンと置換、

J. 配列番号 19 ~ 21 および 53 のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドを、配列番号 1301 の C 末端に付加 (ここで、(配列番号 1301 の番号で) 29 番目は Thr または Gly である)、

K. C 末端のカルボキシレートを、アミドまたはエステルと置換。

#### 【0607】

具体的な実施形態では、クラス 4 のペプチドは、上述したような A、B または C のアミノ酸修飾またはこれらの組み合わせを有する。さらにもうひとつの具体的な実施形態では、クラス 4 のペプチドは、A、B および / または C のアミノ酸修飾 (単数または複数) に加えて、上述したような D ~ K のいずれかのアミノ酸修飾またはこれらの組み合わせをさらに有する。

#### 【0608】

いくつかの実施形態では、クラス 4 のペプチドは、N 末端から最初の 5 個のアミノ酸を除去し、残りの N 末端のアミノ基をヒドロキシ基に置換 (「PLA6 類縁体」) して生成される、配列番号 1339 のペプチドであるグルカゴンペプチドを有する。本出願人らは、最初の 5 個のアミノ酸が欠失し、(天然のグルカゴンでみた) 9 番目のグルタミン酸が置換されたクラス 4 のペプチド類縁体のフェニルアラニンをフェニル乳酸で置換すると、これらのクラス 4 のペプチド類縁体の活性がさらに増強されることを見出した。

#### 【0609】

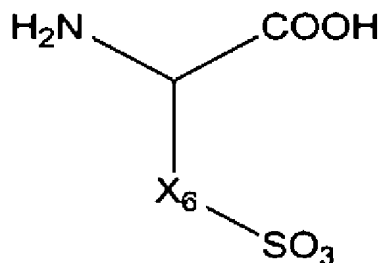
いくつかの実施形態では、配列番号 1339 のクラス 4 のペプチドのペプチドを、4 番目 (天然のグルカゴンであれば 9 番目) のアスパラギン酸残基を、以下に示す一般構造を有するアミノ酸と置換することによって、さらに修飾する。

10

20

30

40



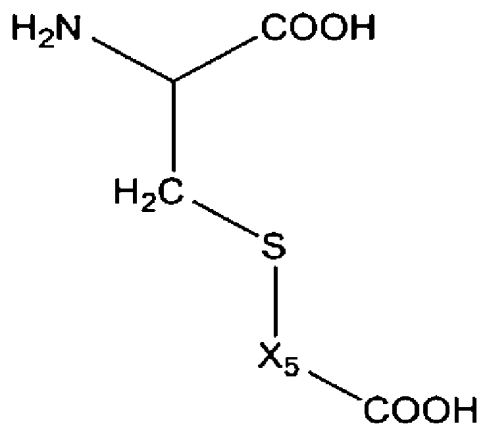
式中、 $X_6$  は、 $C_1 \sim C_3$  アルキル、 $C_2 \sim C_3$  アルケンまたは  $C_2 \sim C_3$  アルキニルであり、いくつかの実施形態では、 $X_6$  は  $C_1 \sim C_3$  アルキルであり、もうひとつの実施形態では、 $X_6$  は  $C_2$  アルキルである。いくつかの実施形態では、クラス 4 のペプチドは、最初の 5 個のアミノ酸が N 末端から除去され、4 番目（天然のグルカゴンであれば 9 番目）のアスパラギン酸残基がシステイン酸またはホモシステイン酸と置換された、グルカゴンペプチドを有する。いくつかの実施形態では、クラス 4 のペプチドは、配列番号 1339、配列番号 1307、配列番号 1308 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するグルカゴンペプチドを有する。いくつかの実施形態では、クラス 4 のペプチドは、4 番目のアミノ酸がホモシステイン酸である配列番号 1308 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

10

【0610】

20

もうひとつの実施形態では、配列番号 1339 のクラス 4 のペプチドを、4 番目（天然のグルカゴンであれば 9 番目）のアスパラギン酸残基を、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、 $\beta$ -ホモグルタミン酸または以下に示す構造を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体で置換することによって、さらに修飾する。



30

式中、 $X_5$  は、 $C_1 \sim C_4$  アルキル、 $C_2 \sim C_4$  アルケニルまたは  $C_2 \sim C_4$  アルキニルである。具体的な実施形態では、 $X_5$  は、 $C_1$  または  $C_2$  アルキルである。

40

【0611】

しかしながら、本出願人らは、純粋な拮抗作用を示す類縁体を生成するのに、デス 1 ~ 5 グルカゴン類縁体（すなわち、最初の 5 個のアミノ酸が欠失したグルカゴン類縁体）において、N 末端のフェニルアラニンを P L A で置換すると、4 番目（天然のグルカゴンであれば 9 番目）の天然のアスパラギン酸残基をさらに置換する必要はないことを見出した。グルカゴン（2 - 29）類縁体の親和性および活性の高いアンタゴニストを生成するには、4 番目の天然のアスパラギン酸残基を置換しなければならないという従来技術の教示内容を考慮すると、この結果は驚くべきものである。P L A 置換を用いることで、A s p 9 類縁体の相対活性が、G l u 9 類縁体および h C y s ( S O <sub>3</sub> H ) 9 類縁体に匹敵する点まで改善される。

50

【0612】

フェニルアラニン残基を、3,4-2F-フェニルアラニン(3,4-2F-Phe)、2-ナフチルアラニン(2-Nal)、N-アシル-フェニルアラニン(Ac-Phe)、 $\alpha$ -メチルヒドロキシ酪酸(MCA)およびベンジルマロン酸(BMA)をはじめとする他のフェニルアラニン類縁体と置換しても、PLA置換ほど高い活性では作用しなかった。

#### 【0613】

(天然のグルカゴンのアミノ酸番号で)4番目および5番目を含む6番目以外の部位でPLAを置換すると、PLA6類縁体が、わずかに伸長させたN末端を有するグルカゴン類縁体よりも明らかに活性の高いアンタゴニストであることがわかる。また、本発明jは、N末端のアミノ基がアシル化およびアルキル化された「O末端」ペプチドで置換された類縁体も含む。

10

#### 【0614】

さらに、PLA6置換は、アンタゴニストの活性を高めるだけでなく、PEG化で重要な役割も果たす。PLA6類縁体は、グルカゴン活性化作用を回復させることなく選択的にPEG化可能なものである。PLA置換がない場合、驚くべきことに、類縁体のPEG化によってグルカゴン活性化作用が誘導される。このグルカゴン活性化作用は、PEG化されたPLA6類縁体には見られない。3番目、6番目、19番目(天然のグルカゴンの8番目、11番目、19番目)ならびにN末端のアミノ酸残基をはじめとするいくつかのPEG化部位を調査した。いくつかの実施形態では、PEG化は、19番目(天然のグルカゴンの24番目)でなされる。この部位が最も活性が高く、かつ選択性の高いグルカゴン拮抗作用を示すからである。

20

#### 【0615】

いくつかの実施形態では、クラス4のペプチドは、A-B-Cの一般構造を有し、ここで、Aは以下の化合物からなる群から選択され、

(i)フェニル乳酸(PLA)

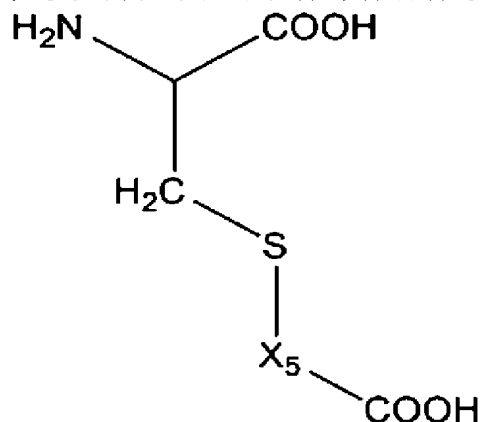
(ii)PLAのオキシ誘導体

(iii)ペプチドの2個の連続したアミノ酸がエステル結合またはエーテル結合を介して結合している、2~6個のアミノ酸からなるペプチド

Bは、任意に、以下からなる群から選択される1個または2個以上のアミノ酸修飾を有する、配列番号1301のi番目~26番目(iは、3、4、5、6または7である)のアミノ酸を表し、

30

(iv)(配列番号1301のアミノ酸番号で)9番目のAspが、Glu、Cysのスルホン酸誘導体、ホモグルタミン酸、 $\beta$ -ホモグルタミン酸または以下に示す構造を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体で置換される



40

(式中、X5は、C1~C4アルキル、C2~C4アルケニルまたはC2~C4アルキニルである。)

(v)(配列番号1301のアミノ酸番号で)10番目、20番目、24番目の1個ま

50

たは2個のアミノ酸を、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、アミド結合またはアルキルアミン結合を介してアシル基またはアルキル基に共有結合しているアミノ酸で置換

(v i) (配列番号1301のアミノ酸番号で) 16番目、17番目、20番目、21番目、24番目の1個または2個のアミノ酸を、C y s、L y s、オルニチン、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン(A c - P h e)からなる群(この群のアミノ酸は、親水体に共有結合している)から選択されるアミノ酸で置換

(v i i) (配列番号1301の番号で) 15番目のA s pが、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換される

(v i i i) (配列番号1301の番号で) 16番目のS e rが、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換される

(i x) 配列番号1301のアミノ酸番号で16番目、20番目、21番目、24番目のうちの1箇所または2箇所以上において、A i bで置換

Cは、以下からなる群から選択される。

(x) X

(x i) X - Y

(x i i) X - Y - Z

(x i i i) X - Y - Z - R 1 0

ここで、Xは、M e t、L e uまたはN l eであり、Yは、A s nまたは電荷を持つアミノ酸であり、Zは、T h r、G l y、C y s、L y s、オルニチン(O r n)、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン(A c - P h e)または電荷を持つアミノ酸であり、R 1 0は、配列番号1319~1321および1353からなる群から選択され、

(x i v) C末端のカルボキシレートがアミドで置換されている、(x)から(x i i i)のいずれか。

【0616】

具体的な態様において、クラス4のペプチドは、P L Aのオキシ誘導体を有する。本明細書で使用する場合、「P L Aのオキシ誘導体」とは、ヒドロキシ基がO - R<sub>11</sub>で置換された、P L Aの修飾された構造を有する化合物を示し、式中、R<sub>11</sub>は、化学部分である。この点について、P L Aのオキシ誘導体は、たとえば、P L AのエステルまたはP L Aのエーテルであってもよい。

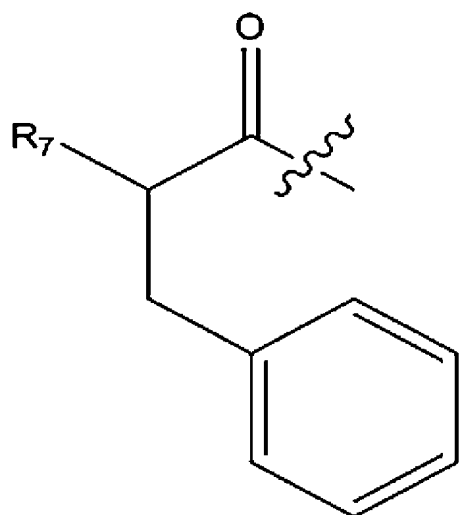
【0617】

P L Aのオキシ誘導体を生成する方法は、当分野で知られている。たとえば、オキシ誘導体がP L Aのエステルである場合、P L Aのヒドロキシルと求核物質を持つカルボニルとの反応によって、エステルを形成してもよい。求核物質は、アミンまたはヒドロキシルを含むがこれらに限定されるものではない、好適な求核物質であればよい。したがって、P L Aのエステルには、式I Vの構造を有するものを用いることが可能である。

10

20

30



式IV

10

式中、 $R_7$  は、PLAのヒドロキシルと求核物質を持つカルボニルとの反応時に形成されるエステルである。

20

## 【0618】

求核物質を持つカルボニル（PLAのヒドロキシルと反応してエステルを形成する）は、たとえば、カルボン酸、カルボン酸誘導体またはカルボン酸の活性化エステルであってもよい。カルボン酸誘導体は、塩化アシル、酸無水物、アミド、エステルまたはニトリルであってもよいが、これらに限定されるものではない。カルボン酸の活性化エステルは、たとえば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、トシレート（Tos）、カルボジイミドまたはヘキサフルオロホスフェートであってもよい。いくつかの実施形態では、カルボジイミドは、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、1,1'-カルボニルジイミダゾール（CDI）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC）または1,3-ジイソプロピルカルボジイミド（DICD）である。いくつかの実施形態では、ヘキサフルオロホスフェートは、ヘキサフルオロホスフェート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ホスフェート（BOP）、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、2-（1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU）、o-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロホスフェート（HBTU）からなる群から選択される。

30

## 【0619】

ヒドロキシ基（PLAのヒドロキシルなど）との反応からエーテルを生成する方法も、当分野で知られている。たとえば、PLAのヒドロキシ基を、ハロゲン化アルキルまたはトシル化アルキルアルコールと反応させ、エーテル結合を形成する。

40

## 【0620】

通常、 $R_{11}$  の化学部分は、クラス4のペプチドの活性を低下させないものである。いくつかの実施形態では、化学部分は、クラス4のペプチドの活性、安定性および/または溶解性を高めるものである。

## 【0621】

具体的な実施形態では、酸素含有結合を介して（エステル結合またはエーテル結合を介するなど）PLAに結合する化学部分は、ポリマー（ポリアルキレングリコールなど）、

50

炭水化物、アミノ酸、ペプチドまたは脂質、たとえば、脂肪酸またはステロイドである。

【0622】

具体的な実施形態では、化学部分はアミノ酸であり、これは任意に、式IVがデブシペプチドになるようなペプチドの一部であってもよい。この点について、クラス4のペプチドが、PLA残基より手前に1個または2個以上（1個、2個、3個、4個、5個、6個またはそれより多いなど）のアミノ酸のN末端を有するように、PLAがクラス4のペプチドのN末端のアミノ酸残基以外の位置にあってもよい。たとえば、クラス4のペプチドは、n番目にPLAを有するものであってもよく、ここで、nは、クラス4のペプチドの2、3、4、5または6である。

【0623】

PLA残基よりN末端側のアミノ酸は、合成であっても天然であってもよい。具体的な実施形態では、N末端PLAであるアミノ酸は、天然のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、PLAよりN末端側のアミノ酸は、天然のグルカゴンのN末端のアミノ酸である。たとえば、クラス4のペプチドは、N末端に、配列番号1354～1358のいずれかのアミノ酸配列を有するものであってもよく、ここで、PLAは、エステル結合を介してスレオニンに結合している。

配列番号1354 His - Ser - Gln - Gly - Thr - PLA

配列番号1355 Ser - Gln - Gly - Thr - PLA

配列番号1356 Gln - Gly - Thr - PLA

配列番号1357 Gly - Thr - PLA

配列番号1358 Thr - PLA

【0624】

別の実施形態では、N末端のアミノ酸のうちの1個または2個以上を、天然のグルカゴンのアミノ酸以外のアミノ酸で置換してもよい。たとえば、クラス4のペプチドが、5番目または6番目のアミノ酸としてPLAを有する場合、1番目および/または2番目のアミノ酸は、ジペプチジルペプチダーゼIVによる切断に対する感受性を低減するアミノ酸であってもよい。特に、いくつかの実施形態では、クラス4のペプチドの1番目は、D-ヒスチジン、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -ジメチルイミダゾール酢酸(DMIA)、N-メチルヒスチジン、 $\alpha$ -メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸である。特に、いくつかの実施形態では、アンタゴニストのペプチドの2番目は、D-セリン、D-アラニン、バリン、グリシン、N-メチルセリン、N-メチルアラニン、アミノイソ酪酸(Aib)からなる群から選択されるアミノ酸である。また、たとえば、クラス4のペプチドが、4番目、5番目または6番目のアミノ酸としてPLAを有する場合、クラス4のペプチドの3番目のアミノ酸は、天然のグルカゴンでは天然のグルタミン残基であるのに対し、グルタミン酸であってもよい。本発明の例示としての実施形態では、クラス4のペプチドは、N末端に、配列番号1359～1361のいずれかのアミノ酸配列を有する。

【0625】

式IVの化合物を有するクラス4のペプチドに関して、ポリマーは、PLAのヒドロキシ基と反応できるものであれば、どのようなポリマーであってもよい。ポリマーは、自然にまたは普通に求核物質を持つカルボニルを有するものであってもよい。あるいは、ポリマーは、カルボニルを持つカルボニルを含むように誘導体化されたものであってもよい。ポリマーは、以下に示すいずれかの物質の誘導体化されたポリマーであってもよい：ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレンおよびこれらの誘導体（ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレートなど）、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルのポリマー（ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレー

10

20

30

40

50



ト)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)など)、ポリビニルポリマー(ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリ(ビニルアセテート)、ポリビニルピロリドンなど)、ポリグリコライド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびこれらのコポリマー、セルロース(アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース、セルロース硫酸ナトリウム塩など)、ポリプロピレン、ポリエチレン(ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)など)、ポリスチレン。

10

## 【0626】

ポリマーは、合成生分解性ポリマー(乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ酸無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-コカプロラクトン)など)、天然の生分解性ポリマー(たとえば、アルギン酸および他の多糖類(デキストランおよびセルロースを含む)、コラーゲン、これらの化学的誘導体(置換、化学基の付加、たとえば、アルキル、アルキレン、ヒドロキシル化、酸化ならびに、当業者によって常法でなされる他の修飾)、アルブミンおよび他の親水性タンパク質(ゼインおよび他のプロラミンおよび疎水性タンパク質など))ならびにこれらのコポリマーまたは混合物をはじめとする、生分解性ポリマーであってもよい。通常、これらの物質は、*in vivo*での酵素による加水分解または水への曝露によって、あるいは表面が浸食されたり、内部まで一挙に浸食されたりすることで、分解される。

20

## 【0627】

ポリマーは、H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587(その教示内容を本明細書に援用する)に記載された生浸食性ハイドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ酸無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸、キトサン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)などの生付着性ポリマーであってもよい。

30

## 【0628】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、水溶性ポリマーである。好適な水溶性ポリマーは当分野で知られており、たとえば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC; Klucel)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC; Methocel)、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシプロピルブチルセルロース、ヒドロキシプロピルペンチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース(Ethocel)、ヒドロキシアセチルセルロース、さまざまなアルキルセルロースおよびヒドロキシアシルセルロース、さまざまなセルロースエーテル、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルシウムカルボキシメチルセルロース、酢酸ビニル/クロトン酸コポリマー、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、ヒドロキシメチルメタクリレート、メタクリル酸コポリマー、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、無水マレイン酸/メチルビニルエーテルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウムおよびポリアクリル酸カルシウム、ポリアクリル酸、酸性カルボキシポリマー、カルボキシポリメチレン、カルボキシビニルポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポリメチルビニルエーテルコ無水マレイン酸、カルボキシメチルアミド、カリウムメタクリレートジビニルベンゼンコポリマー、ポリオキシエチレングリコール、ポリエチレンオキシドならびに、これら

40

50

の誘導体、塩および組み合わせがあげられる。

【0629】

具体的な実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）などをはじめとするポリアルキレングリコールである。

【0630】

炭水化物は、 $\alpha$  脱離基を持つカルボニルを有するまたは有するようにできるものであれば、どのような炭水化物であってもよい。炭水化物は、たとえば、 $\alpha$  脱離基を持つカルボニルを有するように誘導体化されたものであってもよい。この点について、炭水化物は、単糖（グルコース、ガラクトース、フルクトースなど）、二糖（スクロース、ラクトース、マルトースなど）、オリゴ糖（ラフィノース、スタキオースなど）、多糖（スターチ、10 アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナンの誘導体化された形態であってもよい。

【0631】

式IVの化合物を有するクラス4のペプチドに関して、脂質は、 $\alpha$  脱離基を持つカルボニルを有するどのような脂質であってもよい。脂質は、たとえば、カルボニルを有するように誘導体化されたものであってもよい。この点について、脂質は、脂肪酸（C4～C30脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミンなど）、グリセロ脂質（一置換グリセロール、二置換グリセロール、三置換グリセロールなど）、グリセロリン脂質（ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなど）、20 スフィンゴ脂質（スフィンゴシン、セラミドなど）、ステロール脂質（ステロイド、コレステロールなど）、フェノール脂質、糖脂質またはポリケタイドの誘導体であってもよい。いくつかの実施形態では、脂質は、オイル、ワックス、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質である。

【0632】

いくつかの実施形態では、 $R_7$  は、分子量が約100kDaまたはそれ未満、たとえば、約90kDaまたはそれ未満、約80kDaまたはそれ未満、約70kDaまたはそれ20 未満、約60kDaまたはそれ未満、約50kDaまたはそれ未満、約40kDaまたはそれ未満である。したがって、 $R_7$  は、分子量が約35kDaまたはそれ未満、約30kDaまたはそれ未満、約25kDaまたはそれ未満、約20kDaまたはそれ未満、約15kDaまたはそれ未満、約10kDaまたはそれ未満、約5kDaまたはそれ未満あるいは、約1kDaであってもよい。

【0633】

別の実施形態では、クラス4のペプチドは、Aとして2～6個のアミノ酸からなるペプチドを有し、この場合、ペプチドの2個の連続したアミノ酸は、エステル結合またはエーテル結合を介して結合している。エステル結合またはエーテル結合は、たとえば、2番目と3番目のアミノ酸、3番目と4番目のアミノ酸、4番目と5番目のアミノ酸または5番目と6番目のアミノ酸の間であってもよい。任意に、ポリマー（親水性ポリマーなど）への結合を含むもうひとつの化学部分への共有結合、アルキル化またはアシル化によって、このペプチドをさらに修飾してもよい。40

【0634】

一般構造A-B-Cを有するクラス4のペプチドに関して、Bは、任意に1個または2個以上のアミノ酸修飾を有する、天然のグルカゴンのアミノ酸、たとえば、配列番号1301のi番目～26番目（iは、3、4、5、6または7である）を表す。具体的な実施形態では、Bは、任意にさらに修飾されている、配列番号1301の7番目～26番目のアミノ酸を表す。

【0635】

いくつかの実施形態では、Bは、最大で3個のアミノ酸修飾によって修飾される。たとえば、配列番号1301の天然のアミノ酸配列を表すBは、1個または2個以上の保存的なアミノ酸修飾によって修飾される。50

## 【0636】

もうひとつの実施形態では、Bは、本明細書に記載するような(i v) ~ (i x)からなる群から選択される1個または2個以上のアミノ酸修飾を有する。具体的な実施形態では、Bは、アミノ酸修飾(v)および(v i)の一方または両方を有する。別の具体的な実施形態では、Bは、(v)および(v i)に加えて、(i v)、(v i i)、(v i i i)、(i x)からなる群から選択されるアミノ酸修飾のうちの1つまたは組み合わせを有する。

## 【0637】

もうひとつの具体的な実施形態では、クラス4のペプチドは、C末端に、1個または2個以上の電荷を持つアミノ酸を有する。たとえば、Yおよび/またはZが、電荷を持つアミノ酸、たとえば、L y s、A r g、H i s、A s p、G l uであってもよい。さらにもうひとつの実施形態では、クラス4のペプチドは、1 ~ 2個の電荷を持つアミノ酸(L y s、A r g、H i s、A s p、G l uなど)を、ZよりC末端側に有する。具体的な態様において、Zに1 ~ 2個の電荷を持つアミノ酸が続く場合、R 10は含まれない。

10

## 【0638】

いくつかの実施形態におけるクラス4のペプチドは、本明細書に記載するようなクラス4のペプチドのアミノ酸残基に共有結合している親水体を有する。たとえば、クラス4のペプチドは、配列番号1301の番号で1番目、16番目、20番目、21番目または24番目でアミノ酸に共有結合している親水体を有するものであってもよい。もうひとつの実施形態では、親水体は、クラス4のペプチドのC末端のアミノ酸に結合し、これは、場合によってはZよりアミノ酸1個または11個、C末端側である。さらにもうひとつの実施形態では、親水体はP L Aに結合し、AがP L Aである場合、P L A - P h eまたはP L A - T h r - P h eに結合し、この場合のP L Aは親水体を有するように修飾されている。もうひとつの実施形態では、親水体を有するアミノ酸を、クラス4のペプチドのN末端またはC末端に付加する。もうひとつの実施形態では、クラス4のペプチドは、本明細書に記載するようなアシル基またはアルキル基を有する。たとえば、アシル化またはアルキル化は、配列番号1301の番号で10番目、20番目または24番目のアミノ酸の側鎖から離れて生じるものであってもよい。別の実施形態では、アシル化またはアルキル化は、場合によってはZよりアミノ酸1個または11個、C末端側の、クラス4のペプチドのC末端のアミノ酸の側鎖から離れて生じる。さらにもうひとつの実施形態では、AがP L A、P L A - P h eまたはP L A - T h r - P h eである場合、P L Aは、アシル基またはアルキル基を含むように修飾される。

20

30

例示としての実施形態

## 【0639】

クラス4のペプチドは、ペプチドの少なくとも2個の連続したアミノ酸がエステル結合またはエーテル結合を介して結合されているかぎり、合成または天然のどのようなアミノ酸を有するものであってもよい。具体的な実施形態では、ペプチドは、天然のグルカゴンのアミノ酸を有する。たとえば、ペプチドは、天然のグルカゴン(配列番号1301)のj番目 ~ 6番目(jは、1、2、3、4または5である)を含むものであってもよい。あるいは、ペプチドは、1個または2個以上のアミノ酸が修飾された配列番号1301のN末端に基づくアミノ酸配列を含むものであってもよい。1番目および/または2番目のアミノ酸は、ジペプチジルペプチダーゼI Vによる切断に対する感受性を低減するアミノ酸であってもよい。たとえば、ペプチドは、クラス4のペプチドの1番目に、D - ヒスチジン、 $\alpha$ ,  $\alpha$  - ジメチルイミダゾール酢酸(D M I A)、N - メチルヒスチジン、 $\alpha$  - メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸を含むものであってもよい。特に、いくつかの実施形態では、アンタゴニストのペプチドの2番目は、D - セリン、D - アラニン、バリン、グリシン、N - メチルセリン、N - メチルアラニン、アミノイソ酪酸(A i b)からなる群から選択されるアミノ酸である。また、たとえば、クラス4のペプチドの3番目のアミノ酸は、天然のグルカゴンでは天然のグルタミン残基で

40

50

あるのに対し、グルタミン酸であってもよい。したがって、クラス4のペプチドは、以下に示すアミノ酸配列を有するものであってもよい。

X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - T h r - G l y - P h e ( 配列番号 1 3 6 8 )

X a a 2 - X a a 3 - T h r - G l y - P h e ( 配列番号 1 3 6 9 ) または

X a a 3 - T h r - G l y - P h e ( 配列番号 1 3 7 0 )

ここで、X a a 1 は、H i s、D - ヒスチジン、 $\alpha$ ,  $\alpha$  - ジメチルイミダゾール酢酸 ( D M I A )、N - メチルヒスチジン、 $\alpha$  - メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択され、X a a 2 は、S e r、D - セリン、D - アラニン、バリン、グリシン、N - メチルセリン、N - メチルアラニン、アミノイソ酪酸 ( A i b ) からなる群から選択され、X a a 3 は、G l n または G l u である。

10

【 0 6 4 0 】

また、本発明は、クラス4のペプチドのC末端のアミノ酸が、天然のアミノ酸に存在するカルボン酸基を置換するアミド基を有する、実施形態も包含する。

【 0 6 4 1 】

クラス4のペプチドがPEG化されているいくつかの実施形態では、クラス4のペプチドは、短くされたグルカゴンペプチド、特に6 ~ 29を有し、この場合の「N末端」アミノ酸はP L A ( フェニル乳酸 ) である。このようなグルカゴン誘導体には、独特の利点がある。これらは天然のN末端フェニルアラニンを有するものよりも活性の高いペプチドであり、天然のフェニルアラニンには見られない、PEG化によるグルカゴン活性化作用を抑制する。最後に、現時点での文献には、アンタゴニスト活性を得るには9番目の天然のアスパラギン酸を置換しなければならないことが示されているが、本出願人は、P L A 6 - ( 6 - 29 ) グルカゴン類縁体ではこのような置換が必要ないという驚くべき結果を見出した。

20

【 0 6 4 2 】

いくつかの実施形態では、クラス4のペプチドのアミノ酸を少なくとも1個のシステイン残基で置換し、この場合のシステイン残基の側鎖を、マレイミド、ビニルスルホン、2 - ピリジルチオ、ハロアルキル、ハロアシルなどをはじめとするチオール反応性試薬でさらに修飾する。これらのチオール反応性試薬は、カルボキシ基、ケト基、ヒドロキシ基、エーテル基ならびに、ポリエチレングリコール単位などの他の親水体を含むものであってもよい。別の実施形態では、クラス4のペプチドのアミノ酸をリジンで修飾し、ポリエチレングリコールなどの親水体のアルデヒドまたはカルボン酸の活性エステル ( スクシンイミド、無水物など ) などのアミン反応性試薬を用いて、置換するリジン残基の側鎖をさらに修飾する。いくつかの実施形態によれば、天然のペプチドの12番目に相当するリジン残基をアルギニンに置換し、天然のペプチドの1番目、16番目、17番目、20番目、21番目、24番目または29番目に対応するアミノ酸のうちの1つに単一のリジン置換を挿入するか、クラス4のペプチドのN末端またはC末端にリジンを付加する。

30

【 0 6 4 3 】

もうひとつの実施形態では、天然のペプチドの27番目に対応するメチオニン残基をロイシンまたはノルロイシンに変更して、ペプチドの酸化による分解を防止する。

40

【 0 6 4 4 】

いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドのC末端の1個または2個のアミノ酸の短縮すなわち欠失 ( すなわち、天然のグルカゴンの29番目あるいは、28番目と29番目のアミノ酸の短縮 ) によって、グルカゴン受容体に対する活性 ( a c t i v i t y ) および / または活性 ( p o t e n c y ) 影響することなく、本明細書に記載のクラス4のペプチドをさらに修飾する。この点について、本明細書に記載のクラス4のペプチドは、たとえば、本明細書に記載するようなクラス4のペプチドの活性が生じる1個または2個以上の修飾を有する、天然のグルカゴンペプチド ( 配列番号 1 3 0 1 ) の1番目 ~ 27番目、1番目 ~ 28番目、2番目 ~ 27番目、2番目 ~ 28番目、3番目 ~ 27番目、3番目 ~ 28番目、4番目 ~ 27番目、4番目 ~ 28番目、5番目 ~ 27番目、5番目 ~ 28番

50

目、6番目～27番目または6番目～28番目のアミノ酸から本質的になるまたはこのようなアミノ酸からなるものであってもよい。

【0645】

また、本明細書に開示のクラス4のペプチドは、グルカゴンペプチドの機能に重要ではないことが知られている位置でのアミノ酸置換も包含する。いくつかの実施形態では、置換は、配列番号1339の2番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目、12番目、13番目、14番目、15番目、16番目、19番目、22番目、23番目または24番目からなる群から選択される1箇所、2箇所または3箇所における保存的なアミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、クラス4のペプチドは、配列番号1342の誘導体ペプチドを有し、ここで、グルカゴンペプチドは、2番目、5番目、6番目、8番目、9番目、12番目、13番目、14番目から選択される1～3箇所のアミノ酸で、配列番号1342に比してさらなるアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、配列番号1342の2番目、5番目、6番目、8番目、9番目、12番目、13番目、14番目での置換は、保存的なアミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、天然のペプチドの16番目、17番目、20番目、21番目、24番目または29番目に対応するアミノ酸、特に、21番目および/または24番目を、システインまたはリジンで置換し、この場合のPEG鎖は、置換されたシステイン残基またはリジン残基に共有結合している。

10

【0646】

いくつかの実施形態によれば、修飾されたクラス4のペプチドは、ペプチドに共有結合している2つまたは3つ以上のポリエチレングリコール鎖を有し、この場合のグルカゴン鎖の合計の分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。いくつかの実施形態では、PEG化されたクラス4のペプチドは、配列番号1312および配列番号1322からなる群から選択されるペプチドを有する。当該ペプチドは、11番目と19番目でアミノ酸に結合したポリエチレングリコール鎖を含み、2つのPEG鎖の合計の分子量は約1,000～約5,000ダルトンである。

20

【0647】

いくつかの実施形態によれば、以下の配列からなる群から選択される修飾されたグルカゴンペプチドを含むクラス4のペプチドが提供される。

R<sub>1</sub> - P h e - T h r - S e r - X a a - T y r - S e r - X a a - T y r - L e u -  
X a a - X a a - A r g - A r g - A l a - G l n - A s p - P h e - V a l - G l n -  
T r p - L e u - X a a - A s n - T h r - R<sub>2</sub> (配列番号1309)

30

R<sub>1</sub> - P h e - T h r - S e r - X a a - T y r - S e r - X a a - T y r - L e u -  
A s p - S e r - A r g - A r g - A l a - G l n - X a a - P h e - V a l - G l n -  
T r p - L e u - X a a - A s n - T h r - R<sub>2</sub> (配列番号1310)

R<sub>1</sub> - P h e - T h r - S e r - X a a - T y r - S e r - X a a - T y r - L e u -  
A s p - S e r - A r g - A r g - A l a - G l n - A s p - P h e - V a l - X a a -  
T r p - L e u - X a a - A s n - T h r - R<sub>2</sub> (配列番号1311)

R<sub>1</sub> - P h e - T h r - S e r - X a a - T y r - S e r - X a a - T y r - L e u -  
A s p - S e r - A r g - A r g - A l a - G l n - X a a - P h e - V a l - X a a -  
T r p - L e u - X a a - A s n - T h r - R<sub>2</sub> (配列番号1312)

40

ここで、4番目のXaa = アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸であり、7番目のXaa = LysまたはArgであり、10番目のXaaは、アスパラギン酸、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸であり、11番目のXaaは、Ser、Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンであり、16番目のXaaは、Asp、Lys、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンであり、19番目のXaaは、Gln、Lys、Cys、Orn、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニンであり、22番目のXaa = Met、LeuまたはNleであり、R<sub>1</sub>は、OHまたはNH<sub>2</sub>であり、R<sub>2</sub>は、COOHまたはCONH<sub>2</sub>であり、ここで、配列番号1309の場合は11番目で、配列番号1310の場合は16番目で、配列番号1311の場合は19番目で、配列番

50

号 1 3 1 2 は 1 6 番目および 1 9 番目で、ペプチドが P E G 化され、ただし、4 番目の X a a = アスパラギン酸である場合、 $R_1$  は O H である。いくつかの実施形態によれば、ペプチドは、配列番号 1 3 0 9、配列番号 1 3 1 0 または配列番号 1 3 1 1 の配列を有し、ここで、 $R_1$  は O H であり、 $R_2$  は C O N H<sub>2</sub> である。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号 1 3 0 9、配列番号 1 3 1 0 または配列番号 1 3 1 1 の配列を有し、ここで、 $R_1$  は O H であり、 $R_2$  は C O N H<sub>2</sub> であり、4 番目のアミノ酸はアスパラギン酸であり、別の実施形態では、このようなペプチドは、配列番号 1 3 1 9 の配列を有するカルボキシ末端の延長部分を有する。

【 0 6 4 8 】

いくつかの実施形態によれば、ペプチドは、配列番号 1 3 0 9、配列番号 1 3 1 0、配列番号 1 3 1 3、配列番号 1 3 1 4、配列番号 1 3 1 6 からなる群から選択される配列を有し、このペプチドは、配列番号 1 3 0 9 および配列番号 1 3 1 3 の場合は 1 1 番目で P E G 化され、配列番号 1 3 1 0 の場合は 1 6 番目で P E G 化され、配列番号 1 3 1 0 および配列番号 1 3 1 4 の場合は 1 9 番目で P E G 化される。いくつかの実施形態では、グルカゴンアナログは、配列番号 1 3 1 3 または配列番号 1 3 1 4 のペプチドを有する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示のクラス 4 のペプチドの C 末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸に存在するカルボン酸基に代えてアミド基を有する。いくつかの実施形態によれば、クラス 4 のペプチドは、配列番号 1 3 1 8 の配列を有する。

【 0 6 4 9 】

いくつかの実施形態によれば、グルカゴンペプチドの溶解性、安定性および / または薬物動態を改善するために、ペプチドのアミノ酸側鎖に血漿タンパク質が共有結合したクラス 4 のペプチドが提供される。たとえば、血清アルブミンを、本明細書で提示するクラス 4 のペプチドに共有結合することが可能である。いくつかの実施形態では、血漿タンパク質は、天然のグルカゴンペプチドの 1 6 番目、1 7 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目または 2 9 番に対応するアミノ酸に共有結合している。特に、いくつかの実施形態では、血漿タンパク質は、天然のグルカゴンペプチドの 1 6 番目または 2 4 番目に対応するアミノ酸に結合し、ここで、クラス 4 のペプチドは、配列番号 1 3 0 3、配列番号 1 3 0 4、配列番号 1 3 0 5、配列番号 1 3 0 6、配列番号 1 3 0 7、配列番号 1 3 0 8、配列番号 1 3 0 9、配列番号 1 3 1 1、配列番号 1 3 1 2、配列番号 1 3 2 2、配列番号 1 3 2 3、配列番号 1 3 2 4、配列番号 1 3 2 5、配列番号 1 3 2 6、配列番号 1 3 2 7、配列番号 1 3 2 8、配列番号 1 3 3 6、配列番号 1 3 3 9 の配列を有する。いくつかの実施形態では、クラス 4 のペプチドは、配列番号 1 3 0 9、配列番号 1 3 1 0、配列番号 1 3 1 1、配列番号 1 3 1 2 からなる群から選択されるペプチドを有する。

【 0 6 5 0 】

いくつかの実施形態によれば、グルカゴンペプチドの溶解性、安定性および / または薬物動態を改善するために、免疫グロブリン分子の F c 部分を表す直鎖状のアミノ酸配列が、本明細書に記載のクラス 4 のペプチドのアミノ酸側鎖に共有結合している、クラス 4 のペプチドが提供される。たとえば、免疫グロブリン分子の F c 部分を表すアミノ酸配列を、配列番号 1 3 0 7、配列番号 1 3 3 9 のグルカゴンペプチドまたはそれらのグルカゴン類縁体の 1 1 番目、1 2 番目、1 5 番目、1 6 番目、1 9 番目、2 1 番目または 2 4 番目に共有結合させてもよい。いくつかの実施形態では、F c ペプチドは、配列番号 1 3 0 6、配列番号 1 3 0 7、配列番号 1 3 0 8 または配列番号 1 3 3 6 のクラス 4 のペプチドの 1 1 番目または 1 9 番目に共有結合している。F c 部分は通常、I g G から単離されるが、どの免疫グロブリン由来の F c ペプチド断片も等しく機能するはずである。いくつかの実施形態では、グルカゴンペプチドは、配列番号 1 3 0 3、配列番号 1 3 0 4、配列番号 1 3 0 5、配列番号 1 3 0 7、配列番号 1 3 0 8、配列番号 1 3 3 9 からなる群から選択され、ここで、F c 部分は、天然のグルカゴンペプチドの 1 6 番目、1 7 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目または 2 9 番目の対応する位置に結合している。いくつかの実施形態では、クラス 4 のペプチドは、配列番号 1 3 0 9、配列番号 1 3 1 0、配列番号 1 3 1 1、配列番号 1 3 1 2 からなる群から選択されるグルカゴンペプチドを有し、F c ペプチ

ドは、それぞれ配列番号 1 3 0 9、配列番号 1 3 1 0、配列番号 1 3 1 1 の 1 1 番目、1 6 番目または 1 9 番目と、配列番号 1 3 1 2 の 1 1 番目および 1 9 番目の両方にあるアミノ酸の側鎖に結合している。

【0 6 5 1】

本発明の特定の実施形態では、クラス 4 のペプチドは、配列番号 1 3 6 2、1 3 6 4 ~ 1 3 6 7、1 3 7 1 のいずれかのアミノ酸配列を有する。

溶解性を改善するための修飾

【0 6 5 2】

いくつかの態様において、クラス 4 のペプチドをさらに修飾して、グルカゴンアンタゴニスト活性を保持したまま、生理的な pH での水溶液に対するペプチドの溶解性を改善してもよい。天然のペプチドの 1 番目、1 6 番目、1 7 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目、2 9 番目に対応する位置または C 末端に親水基を導入することで、親化合物のアンタゴニスト活性を維持したまま、得られるクラス 4 のペプチドの、生理的な pH の溶液に対する溶解性を改善することが可能である。したがって、いくつかの実施形態では、天然のグルカゴンペプチドのアミノ酸の 1 番目、1 6 番目、1 7 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目、2 9 番目に対応するアミノ酸の側鎖または N 末端または C 末端のアミノ酸の側鎖に共有結合している 1 個または 2 個以上の親水基を有するように、本明細書に開示のクラス 4 のペプチドをさらに修飾する。別の実施形態では、天然のグルカゴンペプチドのアミノ酸の 1 6 番目および 2 4 番目に対応するアミノ酸の側鎖は親水基に共有結合し、いくつかの実施形態では、親水基はポリエチレングリコール ( P E G ) である。

10

20

【0 6 5 3】

本出願人は、天然のグルカゴンのカルボキシ末端に電荷を導入することで、天然のグルカゴンを修飾して、ペプチドのアゴニスト特性を保持したままペプチドの溶解性を高められることを見出した。溶解性が高まると、グルカゴン溶液を、中性の pH 付近で調製および保管できるようになる。グルカゴン溶液を比較的中性の pH ( pH 約 6 . 0 ~ 約 8 . 0 など ) で調製すると、クラス 4 のペプチドの長期の安定性が改善される。

【0 6 5 4】

繰り返すが、本出願人は、本明細書に開示のクラス 4 のペプチドを同様に修飾して、親タンパク質のアンタゴニスト特性を保持したまま、比較的中性の pH ( pH 約 6 . 0 ~ 約 8 . 0 など ) の水溶液に対するペプチドの溶解性を改善することが可能であると予測している。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、天然の電荷を持たないアミノ酸を電荷を持つアミノ酸で置換するか、電荷を持つアミノ酸をカルボキシ末端に付加することによって、ペプチドに電荷を付加するために、野生型グルカゴン ( 配列番号 1 3 0 1 ) の 6 番目 ~ 2 9 番目に存在する天然のアミノ酸をさらに修飾した配列番号 1 3 3 9 のクラス 4 のペプチドに関するものである。いくつかの実施形態によれば、配列番号 1 3 3 9 のクラス 4 のペプチドの電荷を持たない天然のアミノ酸 1 ~ 3 個を、電荷を持つアミノ酸で置換する。いくつかの実施形態では、電荷を持つアミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸からなる群から選択される。特に、本出願人は、天然のグルカゴンに比して対応する 2 8 番目および / または 2 9 番目にある普通に生じるアミノ酸を電荷を持つアミノ酸で置換することおよび / または 1 ~ 2 個の電荷を持つアミノ酸をクラス 4 のペプチドのカルボキシ末端に付加することで、生理的に関連する pH ( すなわち、pH 約 6 . 5 ~ 約 7 . 5 ) の水溶液に対するクラス 4 のペプチドの溶解性および当該水溶液中における安定性が高められることを見出した。したがって、親ペプチドの生物学的活性を保持したまま、特に約 5 . 5 ~ 約 8 . 0 の範囲の pH で、水溶液に対する溶解性に同様の作用を持つように、本明細書に開示のクラス 4 のペプチドの上記のような修飾が予想される。

30

40

【0 6 5 5】

いくつかの実施形態によれば、天然のグルカゴンで対応する 2 8 番目および / または 2 9 番目における天然のアミノ酸を、負の電荷を持つアミノ酸 ( アスパラギン酸またはグルタミン酸など ) で置換し、任意に、負の電荷を持つアミノ酸 ( アスパラギン酸またはグル

50

タミン酸など)を、ペプチドのカルボキシ末端に付加することによって、配列番号1339のクラス4のペプチドを修飾する。別の実施形態では、天然のグルカゴンで対応する29番目における天然のアミノ酸を、正の電荷を持つアミノ酸(リジン、アルギニンまたはヒスチジンなど)で置換し、任意に、1個または2個の正の電荷を持つアミノ酸(リジン、アルギニンまたはヒスチジンなど)を、ペプチドのカルボキシ末端に付加することによって、配列番号1339のクラス4のペプチドを修飾する。いくつかの実施形態によれば、溶解性と安定性が改善されたクラス4のペプチドが提供され、ここで、ペプチドは配列番号1341のアミノ酸配列を有し、ただし、配列番号1341の23番目または24番目における少なくとも1個のアミノ酸が酸性アミノ酸で置換されるおよび/または配列番号1341のカルボキシ末端に追加の酸性アミノ酸が付加される。いくつかの実施形態では、酸性アミノ酸は、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から独立に選択される。

10

#### 【0656】

いくつかの実施形態によれば、溶解性と安定性が改善されたクラス4のペプチドが提供され、ここで、アンタゴニストは、配列番号1341、配列番号1342、配列番号1343または配列番号1344のアミノ酸配列を有し、23番目または24番目のアミノ酸のうちの少なくとも1個が、非天然のアミノ酸残基で置換されている(すなわち、類縁体の23番目または24番目に存在する少なくとも1個のアミノ酸が、配列番号1307の対応する位置に存在するアミノ酸とは異なる酸性アミノ酸である)。いくつかの実施形態によれば、配列番号1341または1342の配列を有するグルカゴンアゴニストが提供され、ただし、23番目のアミノ酸がアスパラギンであり、24番目のアミノ酸がスレオニンである場合、ペプチドは、クラス4のペプチドのカルボキシ末端に付加された、Lys、Arg、His、AspまたはGluからなる群から独立に選択される1~2個のアミノ酸をさらに含む。

20

#### 【0657】

もうひとつの実施形態では、11番目、12番目、15番目、16番目、19番目または24番目のアミノ酸残基に親水体を共有結合することによって、配列番号1342のクラス4のペプチドの溶解性を改善することが可能であり、いくつかの実施形態では、親水体は11番目、16番目または19番目のアミノ酸に結合し、別の実施形態では、親水体は19番目のアミノ酸に結合している。いくつかの実施形態では、親水体は血漿タンパク質または免疫グロブリンのFc部分であり、別の実施形態では、親水体は親水性の炭化水素鎖である。いくつかの実施形態では、親水体は、分子量が約1,000~約5,000ダルトンの範囲から選択されるポリエチレングリコールである。もうひとつの実施形態では、親水体は、分子量が少なくとも約20,000ダルトンのポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、ポリエチレンで修飾されたクラス4のペプチドは、配列番号1309、配列番号1310、配列番号1311、配列番号1312、配列番号1343、配列番号1344または配列番号1345のアミノ酸配列を有する。

30

安定性を改善するための修飾

#### 【0658】

天然のグルカゴンの15番目と16番目のAsp-Ser配列は、水性バッファーにおける天然のホルモンの早期の化学反応による開裂につながる独特の不安定なジペプチドとして同定されている。たとえば、0.01NのHClにて37℃で2週間維持すると、天然のグルカゴンの50%を超える部分が切断されて断片になってしまうことがある。この遊離した2つのペプチド断片1-15および16-29は、グルカゴン様の生物学的活性を持たず、よって、グルカゴンおよびその関連の類縁体の水溶液による使用前調製に対する制約を示す。天然のグルカゴンペプチドの15番目のAspをGluで選択的に化学置換すると、15番目と16番目のペプチド結合の化学反応による開裂が、事実上なくなることが観察されている。

40

#### 【0659】

したがって、本発明のクラス4のペプチドを同様に修飾して、水性バッファーにおける

50



早期の化学反応による開裂に対する感受性を低減することが可能であると思われる。いくつかの実施形態によれば、水溶液中での安定性を高めるために、天然のグルカゴンペプチドの15番目にある天然のアスパラギン酸のアミノ酸を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換することによって、本明細書に記載のクラス4のペプチドを、さらに修飾することが可能である。いくつかの実施形態によれば、配列番号1339のクラス4のペプチドの10番目のアスパラギン酸残基を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換してもよく、いくつかの実施形態では、配列番号1339の10番目の天然のアスパラギン酸をグルタミン酸で置換する。いくつかの実施形態によれば、水溶液中での安定性が改善されたクラス4のペプチドが提供され、こ

10

#### 【0660】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に記載のクラス4のペプチドの分解が低減されることによる安定性の向上を、（天然のグルカゴンの番号で）16番目のセリンからグルタミン酸、システイン酸、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸への置換によって達成してもよい。具体的な実施形態では、（天然のグルカゴンの番号で）16番目のセリンをグルタミン酸に置換する。一層具体的な態様では、このような修飾を有するクラス4のペプチドは、C末端のカルボキシレートを有し、アミド化されていない。

20

#### 【0661】

いくつかの実施形態によれば、配列番号1307、配列番号1336、配列番号1339、配列番号1340、配列番号1341、配列番号1342、配列番号1343、配列番号1344からなる群から選択されるグルカゴンペプチドを有し、天然のグルカゴンペプチドの11番目、12番目、15番目、16番目、19番目および/または24番目に対応する1個または2個以上の追加のアミノ酸置換によってさらに修飾される、クラス4のペプチドが提供される。ここで、アミノ酸置換は、親水体、たとえばPEGとの架橋に適した側鎖を有するアミノ酸での置換であってもよい。ペプチドは、天然のアミノ酸で置換されてもよいし、合成（非天然）のアミノ酸で置換されてもよい。合成または非天然のアミノ酸は、in vivoでは天然に生じないが、本明細書に記載のペプチド構造に取り込むことは可能である。いくつかの実施形態では、ペプチドが、配列番号1307、配列番号1336、配列番号1339、配列番号1340、配列番号1341、配列番号1342、配列番号1343、配列番号1344の配列を有し、天然のグルカゴンペプチドの対応する21番目または24番目に結合したポリエチレングリコール鎖をさらに有する、クラス4のペプチドが提供される。別の実施形態では、クラス4のペプチドのC末端を、カルボン酸基がアミド基で置換されるように修飾する。

30

融合ペプチドと結合体

#### 【0662】

また、本開示は、クラス4のペプチドのC末端に第2のペプチドが融合した、クラス4のペプチドの融合ペプチドも包含する。特に、この融合ペプチドは、配列番号1344のクラス4のペプチドのペプチドを有するものであってもよく、このペプチドは、クラス4のペプチドのC末端のアミノ酸に結合した配列番号1319（GPSSGAPPPS）、配列番号1320（Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala）または配列番号1321（Lys Arg Asn Arg）のアミノ酸配列をさらに有する。いくつかの実施形態では、配列番号1319（GPSSGAPPPS）のアミノ酸配列が、ペプチド結合を介して、配列番号1342のクラス4のペプチドの24番目のアミノ酸に結合している。もうひとつの実施形態では、融合ペプチドは、配列番号1307、配列番号1336、配列番号1339、配列番号1340、配列番号1341または配列番号1343のクラス4のペプチドのペプチドを有し、クラス4のペプチドの24番目のアミノ酸に結合した配列番号1319（GPSSGAPPPS）のアミノ酸配列をさらに有する。もうひとつの実施形

40

50

態では、融合ペプチドは、配列番号1307、配列番号1336、配列番号1337、配列番号1338、配列番号1339、配列番号1341または配列番号1343のクラス4のペプチドのペプチドを有し、クラス4のペプチドの24番目のアミノ酸に結合した配列番号1320、配列番号1321または配列番号1353のアミノ酸配列をさらに有する。いくつかの実施形態では、クラス4のペプチドの融合ペプチドは、配列番号1346および配列番号1347からなる群から選択される配列を有する。別の実施形態では、融合ペプチドのC末端を、カルボン酸基がアミド基に置換されるように修飾する。

#### 【0663】

いくつかの実施形態では、融合ペプチドのクラス4のペプチド部分が、配列番号1303、配列番号1304、配列番号1305、配列番号1306、配列番号1307、配列番号1308、配列番号1309、配列番号1311、配列番号1312、配列番号1313、配列番号1314、配列番号1315、配列番号1310、配列番号1316、配列番号1317、配列番号1318、配列番号1339からなる群から選択される、クラス4のペプチドの融合ペプチドが提供され、配列番号1319の配列は、クラス4のペプチド部分のカルボキシ末端に融合し、ここで、PEG鎖が存在する場合には、このPEG鎖は、500～40,000ダルトンの範囲から選択される。特に、いくつかの実施形態では、クラス4のペプチドセグメントは、配列番号1313、配列番号1314、配列番号1315、配列番号1316、配列番号1346、配列番号1347からなる群から選択され、ここで、PEG鎖は、約500～約5,000ダルトンの範囲から選択され、特に、いくつかの実施形態では、PEG鎖は約1,000ダルトンである。別の実施形態では、C末端を、カルボン酸基がアミド基で置換されるように修飾する。

#### 【0664】

クラス4のペプチドは、カルボキシ末端に付加された、1～2個の電荷を持つアミノ酸をさらに有するものであってもよい。1～2個の電荷を持つアミノ酸が配列番号1344のカルボキシ末端に付加されるいくつかの実施形態では、アミノ酸は、たとえば、グルタミン酸およびアスパラギン酸などの負の電荷を持つアミノ酸である。いくつかの実施形態では、クラス4のペプチドは、配列番号1342の配列を有し、天然のグルカゴンペプチドに対応する27番目および28番目のうちの少なくとも1つは、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸を有し、配列番号1342を、任意に、カルボキシ末端に付加される1～2個の負の電荷を持つアミノ酸の付加を含むように修飾する。いくつかの実施形態では、負の電荷を持つアミノ酸は、グルタミン酸またはアスパラギン酸である。

#### 【0665】

過剰なグルカゴン活性を特徴とする疾患または状態を治療するために、本明細書に開示のクラス4のペプチドを、たとえばインスリンをはじめとする他の活性剤と組み合わせてもよい。いくつかの実施形態では、糖尿病患者で安定した血中グルコース濃度を維持しやすくするために、分子量が10,000ダルトンを超えるPEG鎖に共有結合するよう修飾されたクラス4のペプチドを、インスリンとの併用で投与してもよい。本開示のクラス4のペプチドは、単一の組成物としてインスリンと同時に投与してもよいし、別々の溶液として同時に投与してもよく、あるいは、インスリンとクラス4のペプチドを互いに異なる時刻に投与してもよい。いくつかの実施形態では、インスリンを含む組成物と、クラス4のペプチドを含む組成物とを、互いに12時間以内の間隔で投与する。投与されるインスリンに対するクラス4のペプチドの正確な比は、ある程度は患者のグルカゴン濃度についての判断に左右されることになり、ルーチンな実験で求めることが可能なものである。

ダイマーペプチド

#### 【0666】

また、本開示は、本明細書に開示の修飾されたクラス4のペプチドのマルチマーも包含する。修飾されたクラス4のペプチドのうち2つまたは3つ以上を、当業者に知られた標準的な結合剤と手順を用いて、互いに結合してもよい。たとえば、特に(11番目、16番目または19番目などで)システイン残基、リジン残基、オルニチン残基、ホモシス

テイン残基またはアセチルフェニルアラニン残基で置換されたクラス4のペプチド（配列番号1309、配列番号1310、配列番号1311、配列番号1312など）の場合、二官能性のチオールクロスリンカーと二官能性のアミンクロスリンカーを使用して、2つの修飾されたクラス4のペプチドの間に、ダイマーを形成してもよい。ダイマーは、ホモダイマーであってもよいし、ヘテロダイマーであってもよい。いくつかの実施形態では、ダイマーは、配列番号1308、配列番号1309、配列番号1310、配列番号1311、配列番号1312、配列番号1345、配列番号1346または配列番号1347からなる群から独立に選択される2つのクラス4のペプチドの間に形成され、ここで、2つのペプチドは、各自ペプチドの11番目、各ペプチドの16番目または各ペプチドの19番目またはこれらの任意の組み合わせに結合したリンカーを介して、互いに結合する。いくつかの実施形態では、結合は、それぞれのクラス4のペプチドのペプチドの11番目のシステイン残基と11番目のシステイン残基との間または19番目のシステイン残基と19番目のシステイン残基との間あるいは、11番目のシステイン残基と19番目のシステイン残基との間のジスルフィド結合である。

10

**【0667】**

同様に、配列番号1303、配列番号1304、配列番号1305、配列番号1306、配列番号1307、配列番号1308、配列番号1309、配列番号1310、配列番号1311、配列番号1312、配列番号1336、配列番号1337、配列番号1338、配列番号1339、配列番号1342からなる群から独立に選択される2つのクラス4のペプチドのペプチド間に、ダイマーを形成してもよく、ここで、結合は、天然のグルカゴンペプチドでの16番目、21番目、24番目から独立に選択されるアミノ酸の位置間に形成される。

20

**【0668】**

いくつかの実施形態によれば、各々が配列番号1346の配列を有する2つのクラス4のペプチドを有する、クラス4のペプチドダイマーが提供され、ここで、2つのアンタゴニストは、アミノ酸の25番目を介したジスルフィド結合によって、互いに結合している。もうひとつの実施形態では、各々が配列番号1347の配列を有する2つのクラス4のペプチドを含むクラス4のペプチドダイマーが提供され、ここで、2つのアンタゴニストは、アミノ酸の35番目を介したジスルフィド結合によって、互いに結合している。いくつかの実施形態では、ダイマーは、10番目のアミノ酸がグルタミン酸である配列番号1346および配列番号1347のクラス4のペプチドから形成される。

30

**【0669】**

いくつかの実施形態では、ダイマーは、配列番号1307、配列番号1308、配列番号1336、配列番号1337、配列番号1340、配列番号1339、配列番号1340、配列番号1341、配列番号1342、当該クラス4のペプチドの薬学的に許容される塩からなる群から選択されるクラス4のペプチドの融合ペプチドのホモダイマーであってもよい。いくつかの実施形態によれば、リンカーを介して第2のクラス4のペプチドに結合した第1のクラス4のペプチドを含むダイマーが提供され、ここで、ダイマーの第1および第2のペプチドは、配列番号1307、配列番号1308、配列番号1336、配列番号1337、配列番号1339、配列番号1340、配列番号1341、配列番号1342、当該グルカゴンポリペプチドの薬学的に許容される塩からなる群から独立に選択される。もうひとつの実施形態では、ダイマーの第1および第2のクラス4のペプチドは、配列番号1307、配列番号1308、配列番号1336、配列番号1339からなる群から独立に選択される。

40

**【0670】**

もうひとつの実施形態では、ダイマーは、配列番号1323、配列番号1324、配列番号1325、配列番号1326、配列番号1327、配列番号1328、配列番号1329、配列番号1330、配列番号1331からなる群から選択されるクラス4のペプチドのホモダイマーであってもよい。もうひとつの実施形態では、ダイマーの第1および第2のペプチドが、配番号1323、配列番号1324、配列番号1325、配列番号13

50

26、配列番号1327、配列番号1328からなる群から独立に選択されるアミノ酸配列を有する、クラス4のペプチドダイマーが提供される。もうひとつの実施形態では、ダイマーは、配列番号1309、配列番号1311、配列番号1312からなる群から選択されるクラス4のペプチドのホモダイマーであってもよく、ここで、ペプチドは、グルカゴンペプチドの11番目または19番目に共有結合しているポリエチレングリコール鎖をさらに含むものであってもよい。

【0671】

クラス4のグルカゴン関連ペプチドは、配列番号1301～1371のいずれのアミノ酸配列を有するものであってもよく、任意に、グルカゴンアンタゴニスト活性を保持する、最大1個、2個、3個、4個または5個の修飾をさらに有する。

10

クラス5のグルカゴン関連ペプチド

【0672】

特定の実施形態では、グルカゴン関連ペプチドは、クラス5のグルカゴン関連ペプチドである（たとえば、国際（PCT）特許出願公開第WO2009/058734号（その全体を本明細書に援用する）を参照のこと）。

【0673】

以下のセクションに示す生物学的配列（配列番号1401～1518）はすべて、国際特許出願公開第WO2009/058734号における配列番号1～118に対応する。活性

【0674】

特定の態様では、クラス5のグルカゴン関連ペプチド（以下、「クラス5のペプチド」と呼ぶ）は、グルカゴンアンタゴニスト/GLP-1アゴニストであってもよい。グルカゴンアンタゴニスト/GLP-1アゴニストは、グルカゴン活性化作用の抑制が望ましく、同時にGLP-1活性の刺激も望ましい環境であれば、どのような環境でも使用される。たとえば、高血糖症の前臨床モデルでグルカゴンの拮抗作用が示されている糖尿病の治療において、血糖を低下させるためにGLP-1の刺激と併せてグルカゴンアンタゴニスト活性を使用することが可能であり、GLP-1活性はインスリンの産生と関連している。GLP-1活性を示す化合物は、肥満を治療し、体重増加を防止するのに有用であることも知られている。

20

【0675】

特定の態様では、クラス5のペプチドは、他のグルカゴンアンタゴニスト/GLP-1アゴニストについて上述したどのような用途にも適していると思われる。これらの2種類の活性は、別々に、メタボリックシンドローム、特に糖尿病および肥満を治療する上で、極めて望ましい特性であることが示されている。グルカゴンアンタゴニスト活性は、グルカゴン活性化作用の抑制が望ましい環境であれば、どのような環境でも有用である。また、GLP-1活性化作用は、インスリンの合成と分泌を刺激する一方で、膵臓からのグルカゴンの内在性分泌をさらに抑制する。2つの薬理学的作用が、代謝の異常を正常化するように相乗的に機能する。したがって、高血糖症を治療またはグルカゴンの血中濃度またはグルコースの血中濃度が高いことで生じる他の代謝疾患を治療するために、クラス5のペプチドを用いることが可能である。いくつかの実施形態によれば、本明細書に開示のクラス5のペプチドなどのグルカゴンアンタゴニスト/GLP-1アゴニストを用いる治療の対象となる患者は、飼育ならされた動物であり、別の実施形態では、治療対象となる患者はヒトである。研究では、糖尿病患者におけるグルカゴン抑制の欠如は、ある程度、グリコーゲンの分解を加速させることで、食後高血糖症の一因となる。経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）にて血糖を分析したところ、ソマトスタチン誘導グルカゴンの抑制がなされる状態またはなされない状態で、グルカゴン濃度の高い治療対象者で、グルコースの有意な増加が認められた。したがって、本明細書に記載のグルカゴンアンタゴニスト/GLP-1アゴニストまたはクラス5のペプチドは、高血糖症の治療に使用でき、糖尿病I型、真性糖尿病II型または妊娠性糖尿病（インスリン依存性または非インスリン依存性）をはじめとするさまざまなタイプの糖尿病を治療し、胃障害、網膜症、血管疾患などの糖尿

30

40

50

病の合併症を低減するのに有用であると思われる。

【 0 6 7 6 】

食欲を低減し、あるいは体重減少を促進するための上述したような方法は、体重を落とし、体重増加を防止し、あるいは、薬物誘発性肥満をはじめとするさまざまな原因の肥満を治療し、血管疾患（冠動脈疾患、脳卒中、末梢血管疾患、虚血再灌流障害など）、高血圧症、I I型糖尿病の発症、高脂血症、筋骨格系疾患をはじめとする肥満に関連する合併症を軽減する上で、有用であると思われる。

【 0 6 7 7 】

当業者に知られた標準的な薬学的に許容されるキャリアおよび投与経路を用いて、クラス5のペプチドを含む薬学的組成物を、調製し、患者に投与することが可能である。したがって、したがって、本開示は、本明細書に開示のクラス5のペプチド1つまたは2つ以上を、薬学的に許容されるキャリアとの組み合わせで含む薬学的組成物も包含する。この薬学的組成物は、クラス5のペプチドを、唯一の薬学的に活性な成分として含むものであってもよいし、クラス5のペプチドを、1種または2種以上の別の活性剤と組み合わせることも可能である。いくつかの実施形態によれば、クラス5のペプチドと、インスリンまたはインスリン類縁体とを含む、組成物が提供される。あるいは、配列番号1415または配列番号1451の配列を有し、配列番号1415または配列番号1451の24番目のアミノ酸に結合した配列番号1421（GPSSGAPPPS）または配列番号1450のアミノ酸配列と抗肥満ペプチドとをさらに有する、体重減少を誘導または体重増加を防止するために提供される組成物を提供することが可能である。好適な抗肥満ペプチドとして、米国特許第5,691,309号、同第6,436,435号または米国特許出願第20050176643号に開示されたものがあげられる。

10

20

クラス5のペプチドの構造

【 0 6 7 8 】

いくつかの実施形態によれば、N末端からの最初の1～5個のアミノ酸残基（最初のアミノ酸、最初の2個のアミノ酸、最初の3個のアミノ酸、最初の4個のアミノ酸、最初の5個のアミノ酸など）の欠失ならびに、たとえば、水素結合またはイオンの相互作用（塩結合の形成など）または共有結合による、（天然のグルカゴンペプチド配列で）12番目と16番目、16番目と20番目、20番目と24番目、24番目と28番目から選択されるアミノ酸の対の側鎖同士の結合による、化合物のC末端領域でのα螺旋構造の安定化（野生型グルカゴンすなわち配列番号1401のアミノ酸番号で12番目～29番目のアミノ酸のあたり）によって修飾されたグルカゴンペプチドを含む、クラス5のペプチドが提供される。あるいは、所望の活性を保持する位置に、1個または2個以上のα,α-二置換アミノ酸を導入することで、12番目～29番目の残基のあたりでのα螺旋の安定化を達成する。いくつかの実施形態では、クラス5のペプチドまたはその類縁体の（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目または29番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所、4箇所または5箇所以上が、α,α-二置換アミノ酸で置換される。たとえば、クラス5のペプチドまたはその類縁体の（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）16番目をアミノイソ酪酸（Aib）で置換すると、塩結合またはラクタムが存在しない状態で、安定化したα螺旋が提供される。いくつかの実施形態では、（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）16番目、20番目、21番目または24番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所または4箇所以上を、Aibで置換する。

30

40

【 0 6 7 9 】

いくつかの実施形態によれば、ペプチドは、GLP-1受容体に対して天然のGLP-1が達成する最大限の活性化作用の少なくとも80%を示し、in vitroアッセイでのcAMPの産生を基準に判断できる、グルカゴン受容体に対する最大限のグルカゴン誘導cAMP産生を少なくとも約50%低減するグルカゴンアンタゴニスト活性を示す、クラス5のペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、クラス5のペプチドは、GLP-1受容体に対する活性が天然のGLP-1の少なくとも90%であり、グルカゴン受容体に

50

対する最大限のグルカゴン誘導 c A M P 産生を少なくとも約 80 % 低減する、グルカゴンアンタゴニスト活性を示す。

【0680】

いくつかの実施形態によれば、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1402 の誘導体ペプチドを有し、この場合のペプチドは、配列番号 1402 に比して、1 番目、2 番目、4 番目、5 番目、6 番目、7 番目、8 番目、9 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、15 番目、16 番目、19 番目、22 番目、24 番目から選択される 1 ~ 3 箇所のアミノ酸の位置でのアミノ酸置換をさらに有し、GLP-1 受容体に対する活性が天然の GLP-1 の少なくとも 90 % であり、グルカゴン受容体に対する最大限のグルカゴン誘導 c A M P 産生を少なくとも約 80 % 低減する、グルカゴンアンタゴニスト活性を示す。

10

【0681】

いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドの C 末端領域（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で 12 番目 ~ 29 番目のアミノ酸のあたり）の  $\alpha$  螺旋構造を、たとえば、共有結合または非共有結合の分子内架橋の形成あるいは、12 番目 ~ 29 番目あたりで、 $\alpha$  螺旋を安定化するアミノ酸（ $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸など）で置換するアミノ酸置換および / またはこれを挿入することによって、安定化する。いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドまたはその類縁体の（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目、24 番目または 29 番目のうちの 1 箇所、2 箇所、3 箇所、4 箇所または 5 箇所以上を、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸、たとえばアミノイソ酪酸（Aib）で置換する。たとえば、クラス 5 のペプチドまたはその類縁体の（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で）16 番目をアミノイソ酪酸（Aib）で置換すると、塩結合またはラクタムが存在しない状態で、安定化した  $\alpha$  螺旋が提供される。

20

【0682】

いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1415 または配列番号 1451 を有し、特に、配列番号 1405、配列番号 1406、配列番号 1407、配列番号 1408、配列番号 1409、配列番号 1416、配列番号 1417、配列番号 1418、配列番号 1419、配列番号 1422、配列番号 1423、配列番号 1424、配列番号 1425 からなる群から選択される配列を有する。別の実施形態では、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1415 または配列番号 1451 の誘導体ペプチドを有し、この場合のペプチドは、配列番号 1415 または配列番号 1451 に比して、1 番目、2 番目、5 番目、6 番目、8 番目、9 番目、12 番目、13 番目、14 番目から選択される 1 ~ 3 箇所のアミノ酸の位置で、アミノ酸置換をさらに有する。いくつかの実施形態では、1 番目、2 番目、5 番目、6 番目、8 番目、9 番目、12 番目、13 番目、14 番目での置換は、保存的なアミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、配列番号 1405 または配列番号 1406 の 24 番目のスレオニンを、グリシンで置換する。

30

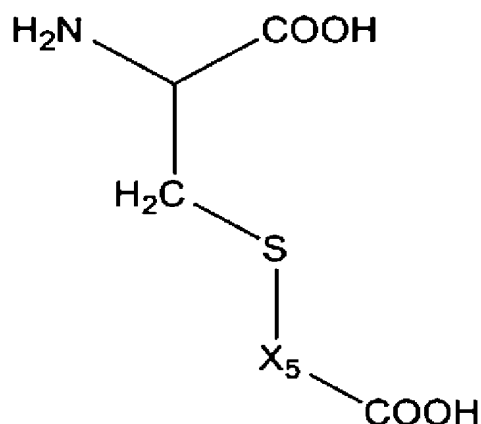
【0683】

いくつかの実施形態によれば、クラス 5 のペプチドは、ペプチドのさらなる修飾を表すものであり、ここで、N 末端での欠失に加え、天然のグルカゴンペプチドの 6 番目のフェニルアラニンが、たとえば、N 末端のアミノ基に代えてヒドロキシ基を含むように修飾される。別の実施形態では、C 末端のアミノ酸の天然のカルボン酸に代えて、アミドまたはエステルなどの電荷が中性の基が用いられる。

40

【0684】

いくつかの実施形態によれば、天然のグルカゴンの最初の 3 個 ~ 5 個のアミノ酸が欠失され、天然のグルカゴンペプチドで 9 番目のアミノ酸が、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、 $\beta$ -ホモグルタミン酸、システインのスルホン酸誘導体または以下に示す構造を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体からなる群から選択されるアミノ酸で置換された、クラス 5 のペプチドが調製される。



10

式中、 $\text{X}_5$  は、 $\text{C}1 \sim \text{C}4$  アルキル、 $\text{C}2 \sim \text{C}4$  アルケニルまたは $\text{C}2 \sim \text{C}4$  アルキニルであり、グルカゴンの $\text{C}$ 末端領域（野生型グルカゴンのアミノ酸番号で12番目～29番目のアミノ酸のあたり）の $\alpha$ 螺旋構造が、たとえば、天然のグルカゴンペプチドで12番目と16番目のアミノ酸または16番目と20番目のアミノ酸の側鎖間に形成されたラクタム架橋によって安定化される。共有結合して原子7個の結合架橋を形成できるアミノ酸対形成の例を、本開示全体で詳細に説明する。いくつかの実施形態では、システインのスルホン酸誘導体は、システイン酸またはホモシステイン酸である。

20

#### 【0685】

いくつかの実施形態では、配列番号1405、配列番号1406、配列番号1407または配列番号1408からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するクラス5が提供され、ここで、当該ペプチドは、配列番号1405の場合は7番目と11番目、配列番号1406の場合は11番目と15番目、配列番号1407の場合は15番目と19番目、配列番号1408の場合は19番目と24番目のアミノ酸の側鎖間に形成されるラクタム環を有し、前記配列は各々、ペプチドに共有結合している親水体を含むようにさらに修飾される。特に、いくつかの実施形態では、ラクタムを持つクラス5のペプチド各々を、ポリエチレングリコール鎖の共有結合によって修飾する。たとえば、配列番号1405を有するクラス5のペプチドの場合、このペプチドを、12番目、15番目、16番目、19番目、24番目からなる群から選択される位置でPEG化する；配列番号1406を有するクラス5のペプチドの場合、このペプチドを、12番目、16番目、19番目、24番目からなる群から選択される位置でPEG化する；配列番号1407を有するクラス5のペプチドの場合、このペプチドを、11番目、12番目、16番目、24番目からなる群から選択される位置でPEG化する；配列番号1408を有するクラス5のペプチドの場合、このペプチドを、11番目、12番目、15番目、16番目からなる群から選択される位置でPEG化する。いくつかの実施形態によれば、配列番号1447または配列番号1448を有するクラス5のペプチドが提供され、ここで、ペプチドは、配列番号1447または配列番号1448の配列で12番目、16番目、19番目、24番目からなる群から選択される位置でPEG化される。別の実施形態では、配列番号1421の配列をペプチドのカルボキシ末端に付加することで、配列番号1447または配列番号1448のペプチドを、さらに修飾する。

30

40

#### 【0686】

上記にて詳細に説明したように、特定の態様では、天然のグルカゴンの最初の5個のアミノ酸が欠失され、 $\text{N}$ 末端のアミノ酸（フェニルアラニン）のアミノ基が、ヒドロキシ基で置換され（すなわち、最初のアミノ酸がフェニル乳酸である）、12番目と16番目、16番目と20番目、20番目と24番目、24番目と28番目から選択される1つまたは2つ以上のアミノ酸の対の側鎖が互いに結合しているため、クラス5のペプチドの $\alpha$ 螺旋が安定化している、クラス5のペプチドが提供される。

#### 【0687】

50

いくつかの実施形態によれば、配列番号 1402 の 11 番目（天然のグルカゴンのアミノ酸番号で 16 番目）のセリン残基を、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸、スレオニンまたはグリシンからなる群から選択されるアミノ酸で置換することによって修飾された配列番号 1402 の配列を有する、クラス 5 のペプチドが提供される。いくつかの実施形態によれば、配列番号 1402 の 11 番目のセリン残基を、グルタミン酸、グルタミン、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換する。いくつかの実施形態では、セリン残基をグルタミン酸で置換する。いくつかの実施形態によれば、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1438 の配列を有する。

#### 【0688】

いくつかの実施形態では、配列番号 1402 のペプチドのカルボキシ末端の三次元構造を安定化するために、2つのアミノ酸側鎖間に分子内架橋が形成された、クラス 5 のペプチドが提供される。特に、配列番号 1402 の 7 番目と 11 番目、11 番目と 15 番目、15 番目と 19 番目または 19 番目と 23 番目のアミノ酸の対から選択される 1 個または 2 個以上のアミノ酸の側鎖を互いに結合することで、C 末端領域の  $\alpha$  螺旋を安定化する。2つの側鎖を、水素結合、イオンの相互作用（塩結合の形成など）または共有結合によって、互いに結合することが可能である。いくつかの実施形態によれば、リンカーのサイズは原子 7 ~ 9 個であり、いくつかの実施形態では、リンカーのサイズは原子 8 個である。いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1405、配列番号 1406、配列番号 1407、配列番号 1408 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドの C 末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸に存在するカルボン酸基を置換するアミド基を有する。

#### 【0689】

いくつかの実施形態によれば、類縁体が配列番号 1409 のアミノ酸配列を有するクラス 5 のペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1409 のペプチドのカルボキシ末端の三次元構造を、ペプチドの側鎖間に共有結合を形成することで安定化する。いくつかの実施形態では、2つのアミノ酸側鎖を互いに結合し、ラクタム環を形成する。ラクタム環のサイズは、アミノ酸側鎖の長さに応じて可変であり、いくつかの実施形態では、リジンアミノ酸の側鎖をグルタミン酸の側鎖に結合することで、ラクタムを形成する。いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドの C 末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸に存在するカルボン酸基を置換するアミド基を有する。

#### 【0690】

ラクタム環のアミド結合の順序を逆にしてもよい（ラクタム環を、12 番目のリジンと 16 番目のグルタミン酸の側鎖間あるいは、12 番目のグルタミン酸と 16 番目のリジンとの間に形成してもよいなど）。いくつかの実施形態によれば、配列番号 1409 の 7 番目と 11 番目、11 番目と 15 番目、15 番目と 19 番目または 19 番目と 23 番目のアミノ酸の対からなる群から選択されるアミノ酸の側鎖対の間に少なくとも 1 個のラクタム環が形成される、配列番号 1409 のグルカゴン類縁体が提供される。いくつかの実施形態では、ペプチドが配列番号 1410 の配列を有し、当該配列は、配列番号 1410 の 7 番目と 11 番目のアミノ酸の間または 11 番目と 15 番目のアミノ酸の間または 15 番目と 19 番目のアミノ酸の間に形成される分子内ラクタム架橋をさらに含む、クラス 5 のペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、ペプチドが配列番号 1411 の配列を有し、当該配列が、配列番号 1411 の 7 番目と 11 番目のアミノ酸の間または 11 番目と 15 番目のアミノ酸の間に形成される分子内ラクタム架橋をさらに有する、クラス 5 のペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1417 の配列を有する。

#### 【0691】

配列番号 1405 の誘導体を有する別のクラス 5 のペプチドが提供され、ここで、配列番号 1405 の 10 番目（天然のグルカゴンの 15 番目）のアスパラギン酸は、グルタミン酸、以下の一般構造を有するアミノ酸で置換されている。

10

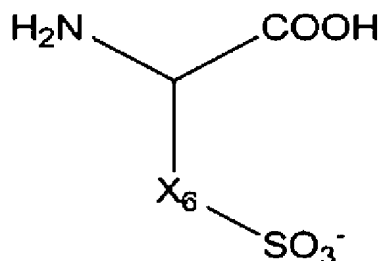
20

30

40

50





式中、 $X_6$  は、 $C1 \sim C3$  アルキル、 $C2 \sim C3$  アルケンまたは  $C2 \sim C3$  アルキニルであり、いくつかの実施形態では、 $X_6$  は  $C1 \sim C3$  アルキルであり、もうひとつの実施形態では、 $X_6$  は  $C2$  アルキルである。いくつかの実施形態では、配列番号 1409 の 10 番目（天然のグルカゴンの 15 番目）が、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換される、配列番号 1409 のクラス 5 のペプチド誘導体が提供される。別の実施形態では、配列番号 1409 の 10 番目を、システイン酸またはホモシステイン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換する。いくつかの実施形態では、配列番号 1406、配列番号 1407 または配列番号 1408 の 10 番目が、グルタミン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、ホモグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換される、配列番号 1406、配列番号 1407 または配列番号 1408 のクラス 5 のペプチド誘導体が提供される。いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドの C 末端のアミノ酸は、天然のアミノ酸に存在するカルボン酸基に代えて、アミド基を有する。

10

20

30

#### 【0692】

いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドのアミノ酸を少なくとも 1 個のシステイン残基で置換し、この場合のシステイン残基の側鎖を、マレイミド、ビニルスルホン、2 - ピリジルチオ、ハロアルキル、ハロアシルなどをはじめとするチオール反応性試薬でさらに修飾する。これらのチオール反応性試薬は、カルボキシ基、ケト基、ヒドロキシ基、エーテル基ならびに、ポリエチレングリコール単位などの他の親水体を含むものであってもよい。別の実施形態では、クラス 5 のペプチドのアミノ酸をリジンで置換し、ポリエチレングリコールなどの親水体のアルデヒドまたはカルボン酸の活性エステル（スクシンイミド、無水物など）などのアミン反応性試薬を用いて、置換するリジン残基の側鎖をさらに修飾する。いくつかの実施形態によれば、配列番号 1405 のペプチドの 7 番目に対応するリジン残基をアルギニンに置換し、単一のリジン置換を、配列番号 1405 の 12 番目、15 番目、16 番目、19 番目、24 番目に対応するアミノ酸の 1 つに代えて、挿入する。

#### 【0693】

もうひとつの実施形態では、本明細書に開示のクラス 5 のペプチドの 22 番目に対応するメチオニン残基をロイシンまたはノルロイシンに変更して、ペプチドの酸化による分解を防止する。

#### 【0694】

さらに、いくつかの態様におけるクラス 5 のペプチドは、グルカゴン類縁体の機能に重要ではないことが知られている位置でのアミノ酸置換も包含する。いくつかの実施形態では、置換は、2 番目、5 番目、6 番目、7 番目、8 番目、9 番目、12 番目、13 番目、14 番目、15 番目、16 番目、19 番目、22 番目、23 番目または 24 番目からなる群から選択される 1 箇所、2 箇所または 3 箇所における保存的なアミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、天然のグルカゴンペプチドの 16 番目、17 番目、20 番目、21 番目、24 番目または 29 番目に対応するアミノ酸、特に、天然のグルカゴンでの 21 番目および / または 24 番目を、システインまたはリジンで置換し、この場合の PEG 鎖は、置換されたシステイン残基またはリジン残基に共有結合している。

#### 【0695】

40

50

いくつかの実施形態によれば、配列番号1409からなる配列を有し、ペプチドの11番目、12番目、15番目、16番目、19番目および/または24番目に対応する位置で、1個または2個以上の追加のアミノ酸置換（システインでの置換などを含む）によってさらに修飾された、クラス5のペプチドが提供され、この場合のアミノ酸置換は、PEGなどをはじめとする親水体との架橋に適した側鎖を有するアミノ酸を有する。この天然のグルカゴンについては、天然のアミノ酸で置換してもよいし、合成（非天然）のアミノ酸で置換してもよい。合成または非天然のアミノ酸は、*in vivo*では天然に生じないが、本明細書に記載のペプチド構造に取り込むことは可能である。いくつかの実施形態では、ペプチドが配列番号1409の配列を有し、ペプチドの16番目または19番目に結合したポリエチレングリコール鎖をさらに有する、クラス5のペプチドが提供される。別の実施形態では、グルカゴン類縁体のC末端を、カルボン酸基がアミド基に置換されるように修飾する。

10

## 【0696】

いくつかの実施形態によれば、以下の配列からなる群から選択されるグルカゴン類縁体を有する、クラス5のペプチドが提供される。

R<sub>1</sub> - P h e - T h r - S e r - X a a - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u -  
X a a - G l u - A r g - A r g - A l a - G l n - A s p - P h e - V a l - G l n -  
T r p - L e u - X a a - A s n - T h r - R<sub>2</sub> (配列番号1439)

R<sub>1</sub> - P h e - T h r - S e r - X a a - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u -  
A s p - G l u - A r g - A r g - A l a - G l n - X a a - P h e - V a l - G l n -  
T r p - L e u - X a a - A s n - T h r - R<sub>2</sub> (配列番号1413)

R<sub>1</sub> - P h e - T h r - S e r - X a a - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u -  
A s p - G l u - A r g - A r g - A l a - G l n - A s p - P h e - V a l - X a a -  
T r p - L e u - X a a - A s n - T h r - R<sub>2</sub> (配列番号1414)

R<sub>1</sub> - P h e - T h r - S e r - X a a - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u -  
A s p - G l u - A r g - A r g - A l a - G l n - X a a - P h e - V a l - X a a -  
T r p - L e u - X a a - A s n - T h r - R<sub>2</sub> (配列番号1412)

ここで、4番目のXaa = アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸であり、10番目のXaa = Asp、Glu、システイン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸であり、16番目のXaaは、Asp、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンであり、19番目のXaaは、Gln、Cys、Orn、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニンであり、22番目のXaa = Met、LeuまたはNleであり、R<sub>1</sub>は、OHまたはNH<sub>2</sub>であり、R<sub>2</sub>は、Gly Pro

20

30

Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser (配列番号1421)、Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa (配列番号1450;ここで、Xaaは、Cys、Orn、ホモシステインまたはアセチルフェニルアラニンである)、COOHまたはCONH<sub>2</sub>であり、ここで、ペプチドは、配列番号1413の16番目、配列番号1414の19番目と配列番号1412の16番目および19番目で、任意にPEG化される。いくつかの実施形態では、配列番号1412~1414および1439の24番目のThrをGlyで置換する。いくつかの実施形態によれば、ペプチドは、配列番号13または配列番号1414の配列を有し、ここで、R<sub>1</sub>はOHである。いくつかの実施形態によれば、ペプチドは、配列番号1413または配列番号1414の配列を有し、ここで、R<sub>1</sub>はOHであり、R<sub>2</sub>はCONH<sub>2</sub>である。いくつかの実施形態によれば、ペプチドは、配列番号1413または配列番号1414の配列を有し、ここで、R<sub>1</sub>はOHであり、R<sub>2</sub>はCONH<sub>2</sub>であり、24番目のスレオニンはグリシンで置換される。

40

## 【0697】

いくつかの実施形態では、クラス5のペプチドは、対応するアミノ酸の位置で、天然のグルカゴン残基（単数または複数）を置換することによって、天然のGLP-1の1個または2個以上のアミノ酸を有するようにさらに修飾される。たとえば、クラス5のペプチ

50

ドは、(天然のグルカゴンのアミノ酸番号で) 2 番目、3 番目、17 番目、18 番目、21 番目、23 番目、24 番目のいずれかに、1 個または 2 個以上のアミノ酸置換を有するものであってもよい。具体的な実施形態では、以下のアミノ酸置換のうちの 1 個または 2 個以上で、クラス 5 のペプチドを修飾する。2 番目のセリンを A l a で置換し、3 番目のグルタミンを G l u で置換し、17 番目のアルギニンを G l n で置換し、18 番目の A r g を A l a で置換し、21 番目の A s p を G l u で置換し、23 番目のバリンを I l e で置換し、24 番目の G l n を A l a で置換する(アミノ酸の位置は、天然のグルカゴン配列での位置である)。具体的な実施形態では、(天然のグルカゴンのアミノ酸番号で) 2 番目のセリンを A l a で置換し、3 番目のグルタミンを G l u で置換することによって、クラス 5 のペプチドを修飾する。もうひとつの具体的な実施形態では、以下のアミノ酸置換のすべてでクラス 5 のペプチドを修飾する。(天然のグルカゴンのアミノ酸番号で) 17 番目のアルギニンを G l n で置換し、18 番目の A r g を A l a で置換し、21 番目の A s p を G l u で置換し、23 番目のバリンを I l e で置換し、24 番目の G l n を A l a で置換する。さらにもうひとつの具体的な実施形態では、(配列番号 1401 の番号で) 21 番目の G l u だけを含むようにクラス 5 のペプチドを修飾する。したがって、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1460 ~ 1470、1473 ~ 1478、1480 ~ 1488、1490 ~ 1496、1503、1504、1506、1514 ~ 1518 のいずれかのアミノ酸配列を有するものであってもよい。

10

【0698】

また、本明細書で提供されるのは、(1) 本明細書に記載の手段で安定化した $\alpha$  螺旋(たとえば、分子内架橋あるいは、(配列番号 1401 の番号で) 16 番目での 1 個または 2 個以上の $\alpha$ ,  $\alpha$  二置換アミノ酸または酸性アミノ酸の取り込みまたはこれらの組み合わせ、(2) C 末端のカルボキシレートに代えて、C 末端のアミドまたはエステル、(3) A - B - C の一般構造、を有するクラス 5 のペプチドまたはその結合体である。ここで、A は以下の化合物からなる群から選択され、

20

(i) フェニル乳酸 (P L A)

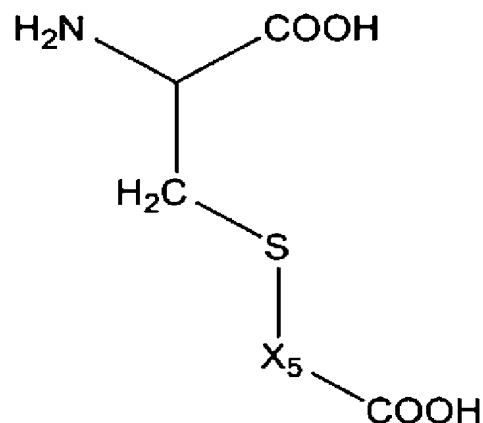
(i i) P L A のオキシ誘導体

(i i i) ペプチドの 2 個の連続したアミノ酸がエステル結合またはエーテル結合を介して結合している、2 ~ 6 個のアミノ酸からなるペプチド

B は、任意に、本明細書に記載するような 1 個または 2 個以上のアミノ酸修飾を有する、配列番号 1401 の p 番目 ~ 26 番目 (p は、3、4、5、6 または 7 である) のアミノ酸を表し、たとえば、クラス 5 のペプチドで説明したいずれかの修飾を含む。たとえば、1 個または 2 個以上の修飾は、以下の修飾からなる群から選択される。

30

(i v) (配列番号 1401 のアミノ酸番号で) 9 番目の A s p が、G l u、C y s のスルホン酸誘導体、ホモグルタミン酸、 $\beta$  - ホモグルタミン酸または以下に示す構造を有するシステインのアルキルカルボキシレート誘導体で置換される



40

(式中、X<sub>5</sub> は、C1 ~ C4 アルキル、C2 ~ C4 アルケニルまたは C2 ~ C4 アルキニ

50

ルである)

(v) (配列番号1401のアミノ酸番号で)10番目、20番目、24番目の1個または2個のアミノ酸を、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、アミド結合またはアルキルアミン結合を介してアシル基またはアルキル基に共有結合しているアミノ酸で置換

(vi) (配列番号1401のアミノ酸番号で)16番目、17番目、20番目、21番目、24番目の1個または2個のアミノ酸を、Cys、Lys、オルニチン、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン(Ac-Phe)からなる群(この群のアミノ酸は、親水体に共有結合している)から選択されるアミノ酸で置換

(vii) (配列番号1401の番号で)15番目のAspが、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換される

10

(viii) (配列番号1401の番号で)16番目のSerが、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸で置換される

(ix) (配列番号1401のアミノ酸の番号で)17番目のArgがGlnで置換され、18番目のArgがAlaで置換され、21番目のAspがGluで置換され、23番目のバリンがIleで置換され、24番目のGlnがAlaで置換される

(x) (配列番号1401のアミノ酸番号で)16番目のSerがGluで置換され、20番目のグルタミンがGluで置換され、あるいは、24番目のGlnがGluで置換される

(一般構造A-B-C)のCは、以下からなる群から選択される。

20

(vii) X

(viii) X-Y

(ix) X-Y-Z

(x) X-Y-Z-R10

ここで、Xは、Met、LeuまたはNleであり、Yは、Asnまたは電荷を持つアミノ酸であり、Zは、Thr、Gly、Cys、Lys、オルニチン(Orn)、ホモシステイン、アセチルフェニルアラニン(Ac-Phe)または電荷を持つアミノ酸であり、R10は、配列番号1421、1426、1427、1450からなる群から選択される。

#### 【0699】

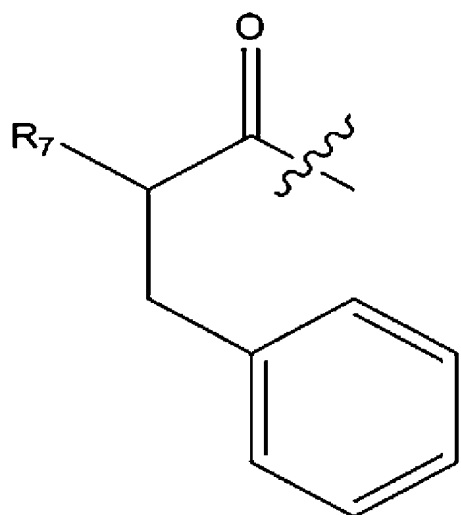
30

具体的な態様において、ペプチドは、PLAのオキシ誘導体を有する。本明細書で使用する場合、「PLAのオキシ誘導体」とは、ヒドロキシ基がO-R<sub>11</sub>で置換された、PLAの修飾された構造を有する化合物を示し、式中、R<sub>11</sub>は、化学部分である。この点について、PLAのオキシ誘導体は、たとえば、PLAのエステルまたはPLAのエーテルであってもよい。

#### 【0700】

PLAのオキシ誘導体を生成する方法は、当分野で知られている。たとえば、オキシ誘導体がPLAのエステルである場合、PLAのヒドロキシルと求核物質を持つカルボニルとの反応によって、エステルを形成してもよい。求核物質は、アミンまたはヒドロキシルを含むがこれらに限定されるものではない、好適な求核物質であればよい。したがって、PLAのエステルには、式IVの構造を有するものを用いることが可能である。

40



式IV

10

(式中、 $R_7$  は、PLAのヒドロキシルと求核物質を持つカルボニルとの反応時に形成されるエステルである。

20

## 【0701】

求核物質を持つカルボニル(PLAのヒドロキシルと反応してエステルを形成する)は、たとえば、カルボン酸、カルボン酸誘導体またはカルボン酸の活性化エステルであってもよい。カルボン酸誘導体は、塩化アシル、酸無水物、アミド、エステルまたはニトリルであってもよいが、これらに限定されるものではない。カルボン酸の活性化エステルは、たとえば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、トシレート(Tos)、カルボジイミドまたはヘキサフルオロホスフェートであってもよい。いくつかの実施形態では、カルボジイミドは、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)または1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DICD)である。いくつかの実施形態では、ヘキサフルオロホスフェートは、ヘキサフルオロホスフェート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ホスフェート(BOP)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)、o-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロホスフェート(HBTU)からなる群から選択される。

30

## 【0702】

ヒドロキシ基(PLAのヒドロキシルなど)との反応からエーテルを生成する方法も、当分野で知られている。たとえば、PLAのヒドロキシ基を、ハロゲン化アルキルまたはトシル化アルキルアルコールと反応させ、エーテル結合を形成する。

40

## 【0703】

具体的な実施形態では、酸素含有結合を介して(エステル結合またはエーテル結合を介するなど)PLAに結合する化学部分は、ポリマー(ポリアルキレングリコールなど)、炭水化物、アミノ酸、ペプチドまたは脂質、たとえば、脂肪酸またはステロイドである。

## 【0704】

具体的な実施形態では、化学部分はアミノ酸であり、これは任意に、式IVがデブシペプチドになるようなペプチドの一部であってもよい。この点について、ペプチドが、PL

50

A 残基より手前に 1 個または 2 個以上（1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個またはそれより多いなど）のアミノ酸の N 末端を有するように、P L A がペプチドの N 末端のアミノ酸残基以外の位置にあってもよい。たとえば、ペプチドは、n 番目に P L A を有するものであってもよく、ここで、n は、ペプチドの 2、3、4、5 または 6 である。

【0705】

P L A 残基より N 末端側のアミノ酸は、合成であっても天然であってもよい。具体的な実施形態では、N 末端 P L A であるアミノ酸は、天然のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、P L A より N 末端側のアミノ酸は、天然のグルカゴンの N 末端のアミノ酸である。たとえば、ペプチドは、N 末端に、配列番号 1452 ~ 1456 のいずれかのアミノ酸配列を有するものであってもよく、ここで、P L A は、エステル結合を介してスレオニンに結合している。

10

配列番号 1452    H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P L A

配列番号 1453    S e r - G l n - G l y - T h r - P L A

配列番号 1454    G l n - G l y - T h r - P L A

配列番号 1455    G l y - T h r - P L A

配列番号 1456    T h r - P L A

【0706】

別の実施形態では、N 末端のアミノ酸のうちの 1 個または 2 個以上を、天然のグルカゴンのアミノ酸以外のアミノ酸で置換してもよい。たとえば、ペプチドが、5 番目または 6 番目のアミノ酸として P L A を有する場合、1 番目および / または 2 番目のアミノ酸は、ジペプチジルペプチダーゼ I V による切断に対する感受性を低減するアミノ酸であってもよい。特に、いくつかの実施形態では、ペプチドの 1 番目は、D - ヒスチジン、 $\alpha$  ,  $\alpha$  - ジメチルイミダゾール酢酸（D M I A）、N - メチルヒスチジン、 $\alpha$  - メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸である。特に、いくつかの実施形態では、アンタゴニスト / アゴニストのペプチドの 2 番目は、D - セリン、D - アラニン、バリン、グリシン、N - メチルセリン、N - メチルアラニン、アミノイソ酪酸（A i b）からなる群から選択されるアミノ酸である。また、たとえば、ペプチドが、4 番目、5 番目または 6 番目のアミノ酸として P L A を有する場合、ペプチドの 3 番目のアミノ酸は、天然のグルカゴンでは天然のグルタミン残基であるのに対し、グルタミン酸であってもよい。本発明の例示としての実施形態では、ペプチドは、N 末端に、配列番号 1457 ~ 1459 のいずれかのアミノ酸配列を有する。

20

30

【0707】

式 I V の化合物を有するペプチドに関して、ポリマーは、P L A のヒドロキシ基と反応できるものであれば、どのようなポリマーであってもよい。ポリマーは、自然にまたは普通に求核物質を持つカルボニルを有するものであってもよい。あるいは、ポリマーは、カルボニルを持つカルボニルを含むように誘導体化されたものであってもよい。ポリマーは、以下に示すいずれかの物質の誘導体化されたポリマーであってもよい：ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレンおよびこれらの誘導体（ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレートなど）、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルのポリマー（ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）など）、ポリビニルポリマー（ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリ（ビニルアセテート）、ポリビニルピロリドンなど）、ポリグリコライド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびこれらのコポリマー、セルロース（アルキルセルロース、ヒドロキシアリルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース）など。

40

50

ース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース、セルロース硫酸ナトリウム塩など)、ポリプロピレン、ポリエチレン(ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)など)、ポリスチレン。

#### 【0708】

ポリマーは、合成生分解性ポリマー(乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ酸無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-コカプロラクトン)など)、天然の生分解性ポリマー(たとえば、アルギン酸および他の多糖類(デキストランおよびセルロースを含む)、コラーゲン、これらの化学的誘導体(置換、化学基の付加、たとえば、アルキル、アルキレン、ヒドロキシル化、酸化ならびに、当業者によって常法でなされる他の修飾)、アルブミンおよび他の親水性タンパク質(ゼインおよび他のプロラミンおよび疎水性タンパク質など))ならびにこれらのコポリマーまたは混合物をはじめとする、生分解性ポリマーであってもよい。通常、これらの物質は、*in vivo*での酵素による加水分解または水への曝露によって、あるいは表面が浸食されたり、内部まで一挙に浸食されたりすることで、分解される。

10

#### 【0709】

ポリマーは、H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587(その教示内容を本明細書に援用する)に記載された生浸食性ハイドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ酸無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸、キトサン、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メチルアクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアクリレート)などの生付着性ポリマーであってもよい。

20

#### 【0710】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、水溶性ポリマーである。好適な水溶性ポリマーは当分野で知られており、たとえば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC; Klucel)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC; Methocel)、ニトロセルロース、ヒドロキシプロピルエチルセルロース、ヒドロキシプロピルブチルセルロース、ヒドロキシプロピルペンチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース(Ethocel)、ヒドロキシエチルセルロース、さまざまなアルキルセルロースおよびヒドロキシアリルセルロース、さまざまなセルロースエーテル、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルシウムカルボキシメチルセルロース、酢酸ビニル/クロトン酸コポリマー、ポリヒドロキシアリルメタクリレート、ヒドロキシメチルメタクリレート、メタクリル酸コポリマー、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、無水マレイン酸/メチルビニルエーテルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウムおよびポリアクリル酸カルシウム、ポリアクリル酸、酸性カルボキシポリマー、カルボキシポリメチレン、カルボキシビニルポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポリメチルビニルエーテルコ無水マレイン酸、カルボキシメチルアミド、カリウムメタクリレートジビニルベンゼンコポリマー、ポリオキシエチレングリコール、ポリエチレンオキシドならびに、これらの誘導体、塩および組み合わせがあげられる。

30

40

#### 【0711】

具体的な実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)などをはじめとするポリアルキレングリコールである。

#### 【0712】

炭水化物は、 $\alpha$  脱離基を持つカルボニルを有するまたは有するようにできるものであれ

50

ば、どのような炭水化物であってもよい。炭水化物は、たとえば、α 脱離基を持つカルボニルを有するように誘導体化されたものであってもよい。この点について、炭水化物は、単糖（グルコース、ガラクトース、フルクトースなど）、二糖（スクロース、ラクトース、マルトースなど）、オリゴ糖（ラフィノース、スタキオースなど）、多糖（スターチ、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナンの誘導体化された形態であってもよい。

【0713】

脂質は、α 脱離基を持つカルボニルを有するどのような脂質であってもよい。脂質は、たとえば、カルボニルを有するように誘導体化されたものであってもよい。この点について、脂質は、脂肪酸（C4～C30 脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミンなど）、グリセロ脂質（一置換グリセロール、二置換グリセロール、三置換グリセロールなど）、グリセロリン脂質（ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなど）、スフィンゴ脂質（スフィンゴシン、セラミドなど）、ステロール脂質（ステロイド、コレステロールなど）、フェノール脂質、糖脂質またはポリケタイドの誘導体であってもよい。いくつかの実施形態では、脂質は、オイル、ワックス、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドまたはリン脂質である。

10

【0714】

いくつかの実施形態では、R<sub>7</sub> は、分子量が約 100 kDa またはそれ未満、たとえば、約 90 kDa またはそれ未満、約 80 kDa またはそれ未満、約 70 kDa またはそれ未満、約 60 kDa またはそれ未満、約 50 kDa またはそれ未満、約 40 kDa またはそれ未満である。したがって、R<sub>7</sub> は、分子量が約 35 kDa またはそれ未満、約 30 kDa またはそれ未満、約 25 kDa またはそれ未満、約 20 kDa またはそれ未満、約 15 kDa またはそれ未満、約 10 kDa またはそれ未満、約 5 kDa またはそれ未満あるいは、約 1 kDa であってもよい。

20

【0715】

別の実施形態では、一般構造 A-B-C を有するペプチドは、A として 2～6 個のアミノ酸からなるペプチドを有し、この場合、A のペプチドの 2 個の連続したアミノ酸は、エステル結合またはエーテル結合を介して結合している。エステル結合またはエーテル結合は、たとえば、2 番目と 3 番目のアミノ酸、3 番目と 4 番目のアミノ酸、4 番目と 5 番目のアミノ酸または 5 番目と 6 番目のアミノ酸の間であってもよい。任意に、ポリマー（親水性ポリマーなど）への結合を含むもうひとつの化学部分への共有結合、アルキル化またはアシル化によって、A のペプチドをさらに修飾してもよい。

30

【0716】

具体的な実施形態では、PLA を有する上述したクラス 5 のペプチドを、PLA のエステルまたは PLA のエーテルなどの PLA のオキシ誘導体を有するように修飾する。たとえば、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1402、1405～1420、1422～1425、1432～1436、1438、1439、1445、1446、1451 のいずれのアミノ酸配列を有するものであってもよく、ここで、PLA は、エステル結合またはエーテル結合を介して、アミノ酸、ペプチド、ポリマー、アシル基またはアルキル基に結合している。アミノ酸、ペプチド、ポリマー、アシル基またはアルキル基は、本明細書に記載のいずれであってもよい。PLA がエステル結合を介してアミノ酸またはペプチドに結合している場合、クラス 5 のペプチドは、デブシペプチドであるとみなすことができる。

40

【0717】

また、もうひとつの具体的な実施形態では、PLA を欠いた上述したクラス 5 のペプチドを、（天然のグルカゴンの番号で）7 番目のアミノ酸より N 末端側の 2 個の連続したアミノ酸の間に少なくとも 1 個のエステル結合またはエーテル結合を有するように修飾する。具体的な実施形態では、クラス 5 のペプチドは、2 個の連続したアミノ酸の間に、少な

50



くとも 1 個のエステル結合またはエーテル結合を有する。一層具体的な実施形態では、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1 4 0 1 の N 末端の 6 個のアミノ酸を有し、N 末端の 6 個のアミノ酸の 2 個の連続したアミノ酸が、エステル結合またはエーテル結合を介して結合している。

【0718】

A のペプチドは、少なくとも 2 個の連続したアミノ酸がエステル結合またはエーテル結合を介して結合されているかぎり、合成または天然のどのようなアミノ酸を有するものであってもよい。具体的な実施形態では、A のペプチドは、天然のグルカゴンのアミノ酸を有する。1 番目および/または 2 番目のアミノ酸は、ジペプチジルペプチダーゼ IV による切断に対する感受性を低減するアミノ酸であってもよい。たとえば、A のペプチドは、1 番目に、D - ヒスチジン、 $\alpha$ ,  $\alpha$  - ジメチルイミダゾール酢酸 (DMIA)、N - メチルヒスチジン、 $\alpha$  - メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択されるアミノ酸を含むものであってもよい。特に、いくつかの実施形態では、A のペプチドの 2 番目は、D - セリン、D - アラニン、バリン、グリシン、N - メチルセリン、N - メチルアラニン、アミノイソ酪酸 (Aib) からなる群から選択されるアミノ酸である。また、たとえば、A のペプチドの 3 番目のアミノ酸は、天然のグルカゴンでは天然のグルタミン残基であるのに対し、グルタミン酸であってもよい。したがって、一般構造 A - B - C のペプチドは、以下に示すアミノ酸配列を有するものであってもよい。

X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - T h r - G l y - P h e ( 配列番号 1 5 0 7 )

X a a 2 - X a a 3 - T h r - G l y - P h e ( 配列番号 1 5 0 8 ) または

X a a 3 - T h r - G l y - P h e ( 配列番号 1 5 0 9 )

ここで、X a a 1 は、H i s、D - ヒスチジン、 $\alpha$ ,  $\alpha$  - ジメチルイミダゾール酢酸 (DMIA)、N - メチルヒスチジン、 $\alpha$  - メチルヒスチジン、イミダゾール酢酸、デスアミノヒスチジン、ヒドロキシルヒスチジン、アセチルヒスチジン、ホモヒスチジンからなる群から選択され、X a a 2 は、S e r、D - セリン、D - アラニン、バリン、グリシン、N - メチルセリン、N - メチルアラニン、アミノイソ酪酸 (Aib) からなる群から選択され、X a a 3 は、G l n または G l u である。

【0719】

いくつかの実施形態では、B は、最大で 3 個のアミノ酸修飾によって修飾される。たとえば、配列番号 1 4 0 1 の天然のアミノ酸配列を表す B は、1 個または 2 個以上の保存的なアミノ酸修飾によって修飾される。

【0720】

もうひとつの実施形態では、B は、本明細書に記載するような ( i v ) ~ ( x ) からなる群から選択される 1 個または 2 個以上のアミノ酸修飾を有する。具体的な実施形態では、B は、アミノ酸修飾 ( v ) および ( v i ) の一方または両方を有する。別の具体的な実施形態では、B は、( v ) および ( v i ) に加えて、( i v )、( v i i )、( v i i i )、( i x )、( x ) からなる群から選択されるアミノ酸修飾のうちの 1 つまたは組み合わせを有する。

【0721】

本明細書で説明するように、一般構造 A - B - C を有するペプチドは、本明細書に記載するように、Y および/または Z などの C 末端に、1 個または 2 個以上の電荷を持つアミノ酸を有するものであってもよい。上記に代えてまたは上記に加えて、一般構造 A - B - C を有するペプチドは、C が X - Y - Z を有する場合、Z より C 末端側に、1 ~ 2 個の電荷を持つアミノ酸をさらに有するものであってもよい。電荷を持つアミノ酸は、たとえば、L y s、A r g、H i s、A s p、G l u のうちの 1 つであってもよい。具体的な実施形態では、Y は A s p である。

【0722】

いくつかの実施形態では、一般構造 A - B - C を有するペプチドは、( 配列番号 1 4 0 1 のアミノ酸番号で ) 1 番目、1 6 番目、2 0 番目、2 1 番目または 2 4 番目または一般

構造 A - B - C を有するペプチドの N 末端残基または C 末端残基に、アミノ酸残基に共有結合する親水体を有する。具体的な実施形態では、親水体は、一般構造 A - B - C を有するペプチドの C y s 残基に結合される。この点について、天然のグルカゴン（配列番号 1401）の 16 番目、21 番目、24 番目または 29 番目のアミノ酸を、C y s 残基で置換してもよい。あるいは、たとえば、一般構造 A - B - C を有するペプチドが、C 末端の延長部分（配列番号 1401 のアミノ酸番号での位置）を有する場合、親水体を有する C y s 残基を、30 番目または 40 番目として、一般構造 A - B - C を有するペプチドの C 末端に付加してもよい。あるいは、親水体を、一般構造 A - B - C を有するペプチドの P L A に、P L A のヒドロキシル部分を介して結合してもよい。親水体は、本明細書に記載のいずれであってもよく、たとえば、ポリエチレングリコールを含む。

10

## 【0723】

具体的な態様において、一般構造 A - B - C を有するペプチドは、分子内架橋の取り込みがゆえに、安定化された  $\alpha$  螺旋を有する。いくつかの実施形態では、分子内架橋はラクタム架橋である。ラクタム架橋は、（配列番号 1401 のアミノ酸番号で）9 番目と 12 番目のアミノ酸の間、12 番目と 16 番目のアミノ酸の間、16 番目と 20 番目のアミノ酸の間、20 番目と 24 番目のアミノ酸の間または 24 番目と 28 番目のアミノ酸であってもよい。具体的な実施形態では、（配列番号 1401 のアミノ酸番号で）12 番目と 16 番目のアミノ酸または 16 番目と 20 番目のアミノ酸を、ラクタム架橋によって結合する。他のラクタム架橋の位置も考えられている。

20

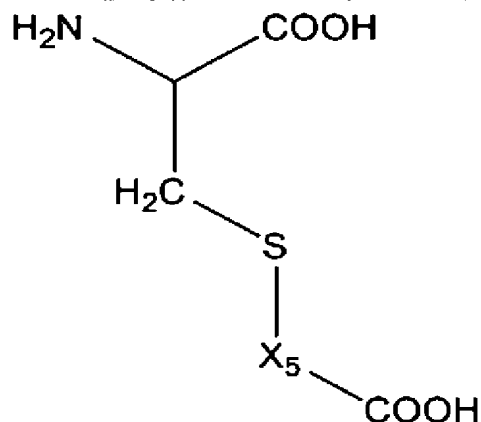
## 【0724】

上記に加えてあるいは上記に代えて、一般構造 A - B - C を有するペプチドは、たとえば、（配列番号 1401 のアミノ酸番号で）16 番目、20 番目、21 番目または 24 番目のいずれかに、 $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸を有するものであってもよい。いくつかの実施形態では、 $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸は A i b である。具体的な態様において、A i b は、（配列番号 1401 の番号で）16 番目に位置する。

## 【0725】

上記に代えてまたは上記に加えて、一般構造 A - B - C を有するペプチドを、（配列番号 1401 の番号で）16 番目に酸性アミノ酸を有するように修飾してもよく、この修飾は  $\alpha$  螺旋の安定性を高めるものである。いくつかの実施形態では、酸性アミノ酸は、側鎖のスルホン酸または側鎖のカルボン酸を有するアミノ酸である。一層具体的な実施形態では、酸性アミノ酸は、G l u、A s p、ホモグルタミン酸、C y s のスルホン酸誘導体、システイン酸、ホモシステイン酸、A s p、以下に示す構造を有する C y s のアルキル化された誘導体からなる群から選択される。

30



40

式中、X<sub>5</sub> は、C 1 ~ C 4 アルキル、C 2 ~ C 4 アルケニルまたは C 2 ~ C 4 アルキニルである。

## 【0726】

具体的な実施形態では、クラス 5 のペプチドは、配列番号 1460 ~ 1470、147

50

3 ~ 1 4 7 8、1 4 8 0 ~ 1 4 8 8、1 4 9 0 ~ 1 4 9 6、1 5 0 3、1 5 0 4、1 5 0 6、1 5 1 4 ~ 1 5 1 8 のいずれのアミノ酸配列を有するものであってもよく、あるいは、表 1 3 のペプチド 2 ~ 6、表 1 4 のペプチド 1 ~ 8、表 1 5 のペプチド 2 ~ 6、8、9 のアミノ酸配列を有する。

表 13 : ラクタム、Cex グルカゴン(6-39)ペプチドおよびグルカゴンアンタゴニストおよび GLP-1 アゴニスト

|   |                          |                                        | GLP-1 EC <sub>50</sub> | Glu IC <sub>50</sub> |
|---|--------------------------|----------------------------------------|------------------------|----------------------|
|   |                          |                                        | (nM)                   | (nM)                 |
| 1 | E9, K12,E16              | FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS     | 1451                   | 762                  |
| 2 | E9, K12E16(ラクタム)         | FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS     | 63                     | 2008                 |
| 3 | E9, E16K20(ラクタム)         | FTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS     | 36                     | 42                   |
| 4 | D9, K12E16(ラクタム)         | FTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS     | 118.7                  | 828                  |
| 5 | [PLA6, E9, K12E16(ラクタム)  | PLA- TSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS | 6                      | 72                   |
| 6 | [PLA6, E9, E16K20(ラクタム)] | PLA- TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS | 20                     | 20                   |

10

20

30

40

表 14 : ラクタムグルカゴン(1-29、2-29、4-29、 6-29)ペプチドおよび  
そのグルカゴンアンタゴニストおよび GLP-1 アゴニスト活性  
(PA = 部分アンタゴニスト)

|   |                                                                          | GLP-1 EC50<br>(nM) | グルカゴン<br>IC50<br>(nM) |
|---|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------|
|   | グルカゴン<br>HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT                                   |                    | 0.2~1.0*              |
|   | GLP-1 (aa 1-30)<br>HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWIVKGR                        | 0.02~0.1           |                       |
| 1 | [PLA6, D9, E16K20(ラクタム), D28]G(6-29)<br>PLA TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT      | 5~25               | 10~30                 |
| 2 | [PLA6, D9, K12E16(ラクタム), D28]G(6-29)<br>PLA TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT      | 177                | 63                    |
| 3 | [PLA6, D9, E16, K20E24(ラクタム), D28]G(6-29)<br>PLA TSDYSKYLDERRAKDFVEWLMDT | 239                | 74                    |
| 4 | [PLA6, D9, E16, E24K28(ラクタム)]G(6~29)<br>PLA TSDYSKYLDERRAQDFVEWLMDT      | 289                | 22                    |
| 5 | [E9, E16K20(ラクタム), D28]G(4~29)<br>GTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT             | 151                | 10~30                 |
| 6 | [E9, E16K20(ラクタム), D28]G(2~29)<br>SQGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT           | 203                | 49 (PA)               |
| 7 | [A2E3, E16K20(ラクタム), D28]G(2~29)<br>AEGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT         | 175                | 63                    |
| 8 | [A2E3, E16K20(ラクタム), D28]G(1~29)<br>HAEGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT        | 0.2                | 130 (PA)              |
| 9 | ANK2 (Bayer ペプチド)<br>HSQGTFTSDY ARYLDARRAREFIKWV VRGRG                   | 0.28               | アゴニスト                 |

\* グルカゴン受容体に対する EC50

表 15 : アゴニスト/アントゴニストの特徴

| グルカゴン(6-CEX)類縁体 |                          |                                       |      |      |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------------|------|------|
| 1               | E9, K12, E16             | FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS    | 1451 | 762  |
| 2               | E9, K12E16(ラクタム)         | FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS    | 63   | 2008 |
| 3               | E9, E16K20(ラクタム)         | FTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS    | 36   | 42   |
| 4               | D9, K12E20(ラクタム)         | FTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS    | 18   | 828  |
| 5               | [PLA6, E9, K12E20(ラクタム)] | PLA-TSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS | 6    | 72   |
| 6               | [PLA6, E9, E16K20(ラクタム)] | PLA-TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS | 20   | 20   |

グルカゴン D<sup>9</sup>(6-29)類縁体

|   |                        |                             | GLP-1 EC50 (nM) | グルカゴン IC50 (nM) |
|---|------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| 7 | PLA 6, D9, D28         | PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT | -700            | tbd             |
| 8 | PLA6, D9, K12E20(ラクタム) | PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT | 21              | 13              |
| 9 | PLA6, D9, E16K20(ラクタム) | PLA-TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT | 4               | 6               |

【 0 7 2 7 】

いくつかの実施形態では、一般構造 A - B - C を有するペプチドは、クラス 5 のペプチ

10

20

30

40

ドである。具体的な実施形態では、ペプチドは、G L P - 1 受容体に対して天然の G L P - 1 が達成する最大限の活性化作用の少なくとも約 5 0 % を示し、かつ、グルカゴン受容体で天然のグルカゴンが達成する最大限の反応の少なくとも約 5 0 % を阻害する。もうひとつの具体的な実施形態では、ペプチドは、G L P - 1 受容体に対して天然の G L P - 1 が達成する最大限の活性化作用の少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 % または約 1 0 0 % を示す。上記に代えてまたは上記に加えて、ペプチドは、受容体で天然のグルカゴンが達成する最大限の反応の少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 % または約 1 0 0 % を阻害するものであってもよい。

10

**【 0 7 2 8 】**

いくつかの実施形態では、以下のものを有する、クラス 5 のペプチドまたはその結合体を有するペプチドが提供される。

( 1 ) 以下の修飾を含むがこれらに限定されるものではない、グルカゴンアンタゴニスト活性を与える修飾

( a ) ( 野生型グルカゴンのアミノ酸番号で ) 6 番目の P h e から P L A への置換、任意に、野生型グルカゴンの N 末端からの 1 ~ 5 個のアミノ酸の欠失または

( b ) 野生型グルカゴンの N 末端からの 2 ~ 5 個のアミノ酸の欠失 ; 任意に、( 野生型グルカゴンのアミノ酸番号で ) 野生型グルカゴンの 9 番目の A s p から、グルタミン酸、ホモグルタミン酸またはシステインのスルホン酸誘導体への置換

20

( 2 ) 以下の修飾を含むがこれらに限定されるものではない、G L P - 1 アゴニスト活性を与える修飾

( a ) 野生型グルカゴンの 1 2 番目 ~ 2 9 番目、たとえば、( 野生型グルカゴンのアミノ酸番号で ) 1 6 番目、1 7 番目、1 8 番目、1 9 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目または 2 9 番目のうちの 1 箇所、2 箇所、3 箇所、4 箇所または 5 箇所以上でのアミノ酸での  $\alpha$  ,  $\alpha$  - 二置換アミノ酸の挿入または置換または

( b ) 野生型グルカゴンの 1 2 番目 ~ 2 9 番目のアミノ酸への分子内架橋、たとえば塩結合またはラクタム架橋または他のタイプの共有結合の導入または

( c ) ( 天然のグルカゴンのアミノ酸番号で ) 2 番目、3 番目、1 7 番目、1 8 番目、2 1 番目、2 3 番目または 2 4 番目 1 箇所または 2 箇所以上のアミノ酸から、G L P - 1 の対応するアミノ酸への置換、たとえば、2 番目のセリンを A l a で置換、3 番目のグルタミンを G l u で置換、1 7 番目のアルギニンで置換、1 8 番目の A r g を A l a で置換、2 1 番目の A s p を G l u で置換、2 3 番目のバリンを I l e で置換および / または 2 4 番目の G l n を A l a で置換または

30

( d ) 野生型グルカゴンのアミノ酸番号で 1 2 番目 ~ 2 9 番目のアミノ酸のあたりで  $\alpha$  螺旋構造を安定化する他の修飾

( 3 ) G L P - 1 アゴニスト活性を高める他の修飾、たとえば、C 末端のカルボキシレートに代えた C 末端のアミドまたはエステルならびに、任意に

( 4 ) 以下の修飾のうちの 1 つまたは 2 つ以上

( a ) たとえば N 末端または 6 番目、1 6 番目、1 7 番目、2 0 番目、2 1 番目、2 4 番目、2 9 番目、4 0 番目または C 末端のアミノ酸でのポリエチレングリコールなどの親水体に対する共有結合および / または

40

( b ) アシル化またはアルキル化ならびに、任意に

( 5 ) 以下の追加の修飾のうちの 1 つまたは 2 つ以上

( a ) 意に、D P P - I V 切断に対する耐性を改善する、本明細書に記載するような 1 番目または 2 番目での修飾を伴う、N 末端に対するアミノ酸の共有結合、たとえば、任意に ( 野生型グルカゴンの番号で ) 6 番目で P L A へのエステル結合を介した N 末端に対する 1 ~ 5 個のアミノ酸の共有結合

( b ) ( 野生型グルカゴンの番号で ) 2 9 番目および / または 2 8 番目ならびに、任意に 2 7 番目のアミノ酸の欠失

50

( c ) C 末端に対するアミノ酸の共有結合

( d ) 所望の活性を保持したままでの非保存的な置換、保存的な置換、付加または欠失、たとえば、2 番目、5 番目、7 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目、24 番目、27 番目、28 番目または29 番目のうちの1箇所または2箇所以上での保存的な置換、10 番目のT y r からV a l またはP h e への置換、12 番目のL y s からA r g への置換、これらの位置の1個または2個以上のアミノ酸からA l a への置換、

( e ) グルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸で置換することなどによる15 番目のアスパラギン酸の修飾（この修飾が分解を低減することがある）；または16 番目のセリンの修飾、たとえば、スレオニン、A i b、グルタミン酸の置換による修飾あるいは、原子4 個の長さの側鎖を有する別の負の電荷を持つアミノ酸への置換あるいは、グルタミン、ホモグルタミン酸またはホモシステイン酸のうちの任意の1つへの置換による修飾（この修飾も同様に、15 番目のアスパラギン酸と16 番目のセリンとの間の結合の切断による分解を低減することがある）、

( f ) 酸化による分解を低減するための、ロイシンまたはノルロイシンで置換することなどによる27 番目のメチオニンの修飾、

( g ) G l n の脱アミド化によって起こる分解を低減するための、A l a またはA i b で置換することなどによる20 番目または24 番目のG l n の修飾、

( h ) A s p が脱水し、環状スクシンイミド中間体を形成した後、イソアスパラギン酸へ異性体化することで生じる分解を低減するための、G l u で置換することなどによる21 番目のA s p の修飾、

( j ) 本明細書に記載するようなホモダイマー化またはヘテロダイマー化、

( k ) 上記の組み合わせ。

#### 【0729】

同一クラスの修飾を任意に組み合わせてもよいおよび／または異なるクラスの修飾を組み合わせてもよいことは、理解できよう。たとえば、(1)(a)の修飾を(2)(a)および(3)と組み合わせてもよい；(1)(a)の修飾を、ラクタム架橋または塩結合などの(2)(b)および(3)と組み合わせてもよい；(1)(a)の修飾を(2)(c)および(3)と組み合わせてもよい；(1)(b)の修飾を(2)(a)および(3)と組み合わせてもよい；(1)(b)の修飾をラクタム架橋または塩結合などの(2)(b)および(3)と組み合わせてもよい；(1)(b)の修飾を(2)(c)および(3)と組み合わせてもよい；上記のいずれかを(4)(a)および／または(4)(b)と組み合わせてもよい；および上記のいずれかを(5)(a)から(5)(k)のいずれかと組み合わせてもよい。

#### 【0730】

例示としての実施形態では、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸A i bを、(野生型グルカゴンのアミノ酸番号で)16 番目、20 番目、21 番目または24 番目のうちの1箇所、2箇所、3箇所またはすべてで置換する。

#### 【0731】

例示としての実施形態では、分子内架橋は塩結合である。

#### 【0732】

他の例示としての実施形態では、分子内架橋は、ラクタム架橋などの共有結合である。いくつかの実施形態では、ラクタム架橋は、(配列番号1401のアミノ酸番号で)9 番目と12のアミノ酸、12 番目と16 番目のアミノ酸、16 番目と20 番目のアミノ酸、20 番目と24 番目のアミノ酸または24 番目と28 番目のアミノ酸の間である。

#### 【0733】

例示としての実施形態では、(配列番号1401の野生型グルカゴンのアミノ酸番号で)アシル化またはアルキル化は、6 番目、10 番目、20 番目または24 番目またはN末端またはC末端である。

#### 【0734】

10

20

30

40

50

例示としての実施形態では、以下の修飾を含む。

(i) (配列番号1401の番号で) 15番目のA s p から、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸への置換、

(ii) (配列番号1401の番号で) 16番目のS e r から、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸への置換、

(iii) 28番目のA s n から電荷を持つアミノ酸への置換、

(iv) 28番目のA s n から、L y s、A r g、H i s、A s p、G l u、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、

(v) 28番目でのA s n、A s pまたはG l uへの置換、

(vi) 28番目でのA s pへの置換、

10

(vii) 28番目でのG l uへの置換、

(viii) 29番目のT h r から電荷を持つアミノ酸への置換、

(ix) 29番目のT h r から、L y s、A r g、H i s、A s p、G l u、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択される電荷を持つアミノ酸への置換、

(x) 29番目でのA s p、G l uまたはL y sへの置換、

(xi) 29番目でのG l uへの置換、

(xii) 29番目の後ろに電荷を持つ1～3個のアミノ酸の挿入、

(xiii) 29番目の後ろにG l uまたはL y sの挿入、

(xiv) 29番目の後ろにG l y - L y sまたはL y s - L y sの挿入、

20

またはこれらの組み合わせ。

#### 【0735】

G L P - 1受容体アゴニスト活性、グルカゴン受容体アンタゴニスト活性、ペプチドの溶解性および/またはペプチドの安定性を高める、上述した修飾を、個々に適用してもよいし、組み合わせで適用してもよい。

安定性を高めるための修飾

#### 【0736】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に開示のクラス5のペプチドを、クラス5のペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸(24番目)に結合した配列番号1421(GPSSGAPP S)または配列番号1450のアミノ酸配列を含むようにさらに修飾し、対象個体に投与して体重減少を誘導する、あるいは、体重維持を助けることが可能である。特に、クラス5のペプチドは、配列番号1405、配列番号1406、配列番号1407、配列番号1408、配列番号1409、配列番号1412、配列番号1413、配列番号1414、配列番号1416、配列番号1417、配列番号1418、配列番号1419、配列番号1422、配列番号1423、配列番号1424、配列番号1425からなる群から選択される配列を有し、ペプチドまたはクラス5のペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸(24番目)に結合した配列番号1421(GPSSGAPPPS)または配列番号1450のアミノ酸配列をさらに有し、食欲を抑制し、体重減少/体重維持を誘導するのに用いられる。いくつかの実施形態では、投与されるペプチドまたはクラス5のペプチドは、配列番号1416、配列番号1417、配列番号1418、配列番号1419からなる群から選択される配列を有し、クラス5のペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸(24番目)に結合した配列番号1421(GPSSGAPPPS)のアミノ酸配列をさらに有する。いくつかの実施形態では、この方法は、配列番号1445または配列番号1446の配列を有するペプチドまたはクラス5のペプチドを投与することを含む。

30

40

#### 【0737】

したがって、本明細書に開示のクラス5のペプチドを同様に修飾して、水性バッファー中での早期の化学反応による開裂に対する感受性を低減することが可能である。いくつかの実施形態によれば、天然のグルカゴンの対応する15番目に位置する天然のアスパラギン酸のアミノ酸を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換することによって、本明細書に記載のクラス5のペプチドを、水溶液中でのその安定性を高めるようにさらに修飾してもよい。いくつか

50



の実施形態によれば、配列番号 1 4 0 5、配列番号 1 4 0 6、配列番号 1 4 0 7 または配列番号 1 4 0 8 のクラス 5 のペプチドの 1 0 番目におけるアスパラギン酸残基を、システイン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、ホモシステイン酸からなる群から選択されるアミノ酸で置換してもよく、いくつかの実施形態では、配列番号 1 4 0 5、配列番号 1 4 0 6、配列番号 1 4 0 7 または配列番号 1 4 0 8 の 1 0 番目の天然のアスパラギン酸を、グルタミン酸で置換する。いくつかの実施形態によれば、水溶液中での安定性が改善されたクラス 5 のペプチドが提供され、ここで、アンタゴニストは、配列番号 1 4 0 9 の修飾された配列を有し、この修飾は、配列番号 1 4 0 9 の 1 0 番目の A s p から G l u への置換を含む。いくつかの実施形態では、配列番号 1 4 2 2、配列番号 1 4 2 3、配列番号 1 4 2 4、配列番号 1 4 2 5 からなる群から選択される配列を有するクラス 5 のペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、クラス 5 のペプチドは、アミド化されている。

10

#### 【 0 7 3 8 】

天然のグルカゴンの 1 5 番目と 1 6 番目の A s p - S e r 配列は、水性バッファーにおける天然のホルモンの早期の化学反応による開裂につながる独特の不安定なジペプチドとして同定されている。たとえば、0 . 0 1 N の H C l にて 3 7 ℃ で 2 週間維持すると、天然のグルカゴンの 5 0 % を超える部分が切断されて断片になってしまうことがある。この遊離した 2 つのペプチド断片 1 - 1 5 および 1 6 - 2 9 は、グルカゴン様の生物学的活性を持たず、よって、グルカゴンおよびその関連の類縁体の水溶液による使用前調製に対する制約を示す。天然のグルカゴンの 1 5 番目の A s p を G l u で選択的に化学置換すると、1 5 番目と 1 6 番目のペプチド結合の化学反応による開裂が、事実上なくなることが観察されている。

20

#### 【 0 7 3 9 】

一例としてのさらに別の実施形態では、特に酸性バッファーまたはアルカリ性バッファーでの経時的なペプチドの分解を低減するように、天然のグルカゴンの 1 5 番目または 1 6 番目に対応するアミノ酸を修飾することによって、上記の化合物のいずれかをさらに修飾して安定性を改善してもよい。

溶解性を高めるための修飾

#### 【 0 7 4 0 】

クラス 5 のペプチドをさらに修飾して、特定の態様ではグルカゴンアンタゴニスト活性および G L P - 1 アゴニスト活性を保持したまま、生理的な p H の水溶液に対するペプチドの溶解性を改善することが可能である。配列番号 1 4 0 5 のペプチドの 1 2 番目、1 5 番目、1 6 番目、1 9 番目および 2 4 番目に対応する位置または配列番号 1 4 0 6 のペプチドの 1 2 番目、1 6 番目、1 9 番目または 2 4 番目に対応する位置に親水基を導入することで、親化合物のグルカゴンアンタゴニスト活性および G L P アゴニスト活性を保持したまま、生理的な p H の溶液に対する、得られるペプチドの溶解性を改善することが可能である。したがって、いくつかの実施形態では、配列番号 1 4 0 5 または配列番号 1 4 0 6 のペプチドの 1 2 番目、1 5 番目、1 6 番目、1 9 番目および 2 4 番目のアミノ酸に対応するアミノ酸の側鎖に共有結合している 1 個または 2 個以上の親水基を有するようにさらに修飾された本明細書に開示のクラス 5 のペプチド。別の実施形態では、配列番号 1 4 0 5 または配列番号 1 4 0 6 のアミノ酸の 1 6 番目および 1 9 番目に対応するアミノ酸の側鎖は親水基に共有結合し、いくつかの実施形態では、親水基はポリエチレングリコール ( P E G ) である。

30

40

#### 【 0 7 4 1 】

カルボキシ末端に電荷を導することで、クラス 5 のグルカゴン関連ペプチドを修飾し、ペプチドのアゴニスト特性を維持したままペプチドの溶解性を高めることが可能である。溶解性が高まると、グルカゴン溶液を、中性の p H 付近で調製および保管できるようになる。グルカゴン溶液を比較的中性の p H ( p H 約 6 . 0 ~ 約 8 . 0 など ) で調製すると、クラス 5 のペプチドの長期の安定性が改善される。

#### 【 0 7 4 2 】

本出願人らは、本明細書に開示のクラス 5 のペプチドを同様に修飾して、場合によって

50

は、グルカゴンアンタゴニスト活性およびGLP-1活性を保持したまま、比較的中性のpH（pH約6.0～約8.0など）の水溶液に対する溶解性を高めることが可能であると予測している。したがって、いくつかの実施形態は、天然の電荷を持たないアミノ酸を電荷を持つアミノ酸で置換するか、電荷を持つアミノ酸をカルボキシ末端に付加することによって、ペプチドに電荷を付加するために、野生型グルカゴン（配列番号1401）の6番目～29番目に存在する天然のアミノ酸をさらに修飾した配列番号1405、配列番号1406、配列番号1407または配列番号1408のグルカゴンアンタゴニスト/ GLP-1に関するものである。いくつかの実施形態によれば、本明細書に開示のクラス5のペプチドの電荷を持たない天然のアミノ酸1～3個を、電荷を持つアミノ酸で置換する。いくつかの実施形態では、電荷を持つアミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸からなる群から選択される。特に、本出願人は、（天然のグルカゴンに比して）対応する28番目および/または29番目にある普通に生じるアミノ酸を電荷を持つアミノ酸で置換することおよび/または1～2個の電荷を持つアミノ酸をペプチドのカルボキシ末端に付加することで、生理的に関連するpH（すなわち、pH約6.5～約7.5）の水溶液に対するクラス5のペプチドの溶解性および当該水溶液中における安定性が高められることを見出した。したがって、親ペプチドの生物学的活性を保持したまま、特に約5.5～約8.0の範囲のpHで、水溶液に対する溶解性に同様の作用を持つように、クラス5のペプチドの上記のような修飾が予想される。

10

**【0743】**

いくつかの実施形態によれば、これらの配列の23番目および/または24番目の天然のアミノ酸を、負の電荷を持つアミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸など）で置換し、任意に、負の電荷を持つアミノ酸（アスパラギン酸またはグルタミン酸など）を、ペプチドのカルボキシ末端に付加することによって、配列番号1405、配列番号1406、配列番号1407または配列番号1408のクラス5のペプチドを修飾する。別の実施形態では、配列番号1405、配列番号1406、配列番号1407または配列番号1408の24番目の天然のアミノ酸を、正の電荷を持つアミノ酸（リジン、アルギニンまたはヒスチジンなど）で置換し、任意に、1個または2個の正の電荷を持つアミノ酸（リジン、アルギニンまたはヒスチジンなど）を、ペプチドのカルボキシ末端に付加することによって、配列番号1405、配列番号1406、配列番号1407または配列番号1408を有するクラス5のペプチドを修飾する。いくつかの実施形態によれば、類縁体が、配列番号1415または配列番号1451のアミノ酸配列を有する、溶解性および安定性が改善されたクラス5のペプチドが提供される。ただし、配列番号1415または配列番号1451の23番目または24番目の少なくとも1個のアミノ酸が、酸性アミノ酸で置換および/または追加の酸性アミノ酸が配列番号1415または配列番号1451のカルボキシ末端に付加される。いくつかの実施形態では、酸性アミノ酸は、Asp、Glu、システイン酸、ホモシステイン酸からなる群から独立に選択される。

20

30

**【0744】**

いくつかの実施形態によれば、アンタゴニストが、配列番号1416、配列番号1417、配列番号1418または配列番号1419のアミノ酸配列を有する、溶解性および安定性が改善されたクラス5のペプチドが提供される。いくつかの実施形態によれば、配列番号1416または配列番号1417を有するグルカゴンアゴニストが提供される。いくつかの実施形態では、クラス5のペプチドは、配列番号1420の配列を有する。

40

**【0745】**

いくつかの実施形態によれば、配列番号1415または配列番号1451の配列を有する、クラス5のペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号1415または配列番号1451の4番目は、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸であり、いくつかの実施形態では、4番目は、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン酸またはホモシステイン酸であり、別の実施形態では、配列番号1415または配列番号1451の4番目は、アスパラギン酸またはグルタミン酸であり、いくつかの実施形態では、配列番号1415または配列番号1451の4

50

番目は、アスパラギン酸である。いくつかの実施形態では、配列番号 1 4 1 5 の 4 番目がアスパラギン酸であり、配列番号 1 4 1 5 の 1 0 番目がグルタミン酸である、配列番号 1 4 1 5 または配列番号 1 4 5 1 の配列を有するクラス 5 のペプチドが提供される。別の実施形態では、配列番号 1 4 1 5 または配列番号 1 4 5 1 の C 末端のアミノ酸を、天然のカルボン酸基をアミドまたはエステルなどの電荷が中性の基で置換するように修飾する。

クラス 5 のペプチド融合体

【0746】

別の実施形態では、本明細書に記載のクラス 5 のペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸は、配列番号 1 4 2 1、1 4 2 6、1 4 2 7、1 4 5 0 からなる群から選択される配列を有する第 2 のペプチドに共有結合している。たとえば、いくつかの実施形態では、配列番号 1 4 1 5、配列番号 1 4 5 1、配列番号 1 4 0 5、配列番号 1 4 0 6、配列番号 1 4 0 7、配列番号 1 4 0 8、配列番号 1 4 1 2、配列番号 1 4 1 3、配列番号 1 4 1 4、配列番号 1 4 1 6、配列番号 1 4 1 7、配列番号 1 4 1 8、配列番号 1 4 1 9、配列番号 1 4 2 2、配列番号 1 4 2 3、配列番号 1 4 2 4、配列番号 1 4 2 5 のクラス 5 のペプチドは、配列番号 1 4 2 1 (GPSSGAPPPS)、配列番号 1 4 2 6 (KRNRNNIA)、配列番号 1 4 2 7 (KRNR)、配列番号 1 4 5 0 (GPSSGAPPPSX) からなる群から選択される配列を有する第 2 のペプチドに共有結合している。

10

【0747】

いくつかの実施形態では、配列番号 1 4 0 5、配列番号 1 4 0 6、配列番号 1 4 0 7、配列番号 1 4 0 8、配列番号 1 4 0 9、配列番号 1 4 2 2、配列番号 1 4 2 3、配列番号 1 4 2 4、配列番号 1 4 2 5 からなる群から独立に選択される 2 つの配列を有し、クラス 5 のペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸に結合した配列番号 1 4 2 1 (GPSSGAPPPS) のアミノ酸配列をさらに有する、クラス 5 のペプチドダイマーが提供される。

20

【0748】

いくつかの実施形態では、ペプチドの C 末端の 1 個または 2 個のアミノ酸の短縮または欠失 (すなわち、天然のグルカゴンの 2 9 番目あるいは、2 8 番目と 2 9 番目のアミノ酸の短縮) によって、クラス 5 のペプチドをさらに修飾する。好ましくは、短縮は、クラス 5 のペプチドの活性 (グルカゴン拮抗作用 / GLP - 1 活性化作用など) に影響しない。

クラス 5 のペプチド結合体

【0749】

グルカゴンペプチドが、任意に共有結合を介して、任意にリンカーを介して、結合体部分に結合している、クラス 5 のペプチドの結合体も提供される。

30

【0750】

クラス 5 のペプチドがポリエチレングリコール鎖を有する実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、直鎖状であってもよいし、分岐状であってもよい。いくつかの実施形態によれば、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が、約 5 0 0 ~ 約 1 0 , 0 0 0 ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が、約 1 , 0 0 0 ~ 約 5 , 0 0 0 ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が、約 1 , 0 0 0 ~ 約 5 , 0 0 0 ダルトンの範囲から選択される。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が約 1 , 0 0 0 ~ 約 2 , 0 0 0 ダルトンから選択される。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコール鎖は、平均分子量が約 1 , 0 0 0 ダルトンである。

40

【0751】

いくつかの実施形態では、PEG 化されたクラス 5 のペプチドは、配列番号 1 4 1 5 または配列番号 1 4 5 1 の配列からなるペプチドを有し、ここで、ポリエチレングリコール鎖は、配列番号 1 4 1 5 または配列番号 1 4 5 1 の 1 1 番目、1 2 番目、1 5 番目、1 6 番目、1 9 番目、2 4 番目から選択されるアミノ酸に結合し、PEG 鎖の分子量は約 1 , 0 0 0 ~ 約 5 , 0 0 0 ダルトンである。いくつかの実施形態では、PEG 化されたクラス 5 のペプチドは、配列番号 1 4 1 5 または配列番号 1 4 5 1 の配列からなるペプチドを有し、ここで、ポリエチレングリコール鎖は、配列番号 1 4 1 5 または配列番号 1 4 5 1 の

50

16番目または19番目でアミノ酸に結合し、PEG鎖の分子量は約1,000～約5,000ダルトンである。別の実施形態では、修飾されたクラス5のペプチドは、このペプチドに共有結合している2つまたは3つ以上のポリエチレングリコール鎖を有し、この場合のグルカゴン鎖の合計の分子量は、約1,000～約5,000ダルトンである。いくつかの実施形態では、クラス5のペプチドは、配列番号1415または配列番号1451の配列を有し、ポリエチレングリコール鎖は、配列番号1415または配列番号1451の16番目および19番目のアミノ酸に結合し、2つのPEG鎖の合計の分子量は約1,000～約5,000ダルトンである。

#### 【0752】

クラス5のグルカゴン関連ペプチドは、任意に、グルカゴンアンタゴニスト活性およびGLP-1アゴニスト活性を保持する最大で1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの修飾をさらに有する、配列番号1401～1518のいずれかのアミノ酸配列を有するものであってもよい。

#### 結合基(L)

#### 【0753】

本明細書で説明するように、本開示は、式Q-L-Yで表されるNHRリガンドと結合しているグルカゴンスーパーファミリーのペプチドを提供するものであり、式中、Lは結合基または化学結合である。いくつかの実施形態では、Lはin vivoで安定である。いくつかの実施形態では、Lはin vivoで加水分解可能である。いくつかの実施形態では、Lはin vivoで準安定である。

#### 【0754】

QとYとを、当業者に知られた標準的な結合剤と手順を用いて、Lを介して互いに結合することが可能である。いくつかの態様では、QとYとを直接的に融合させ、Lは結合である。他の態様では、QとYとを、結合基Lを介して融合する。たとえば、いくつかの実施形態では、QとYとを、任意に、ペプチドまたはアミノ酸スペーサーを介する、ペプチド結合によって互いに結合する。いくつかの実施形態では、QとYとを、任意に、結合基(L)を介して、化学的な結合によって互いに結合する。いくつかの実施形態では、Lは、QおよびYの各々に直接的に結合する。

#### 【0755】

化学的な結合は、一方の化合物の求核反応性基を他方の化合物の求電子反応性基と反応させることで、起こり得る。いくつかの実施形態では、Lが結合である場合、Qの求核反応性部分をYの求電子反応性部分と反応させるか、Qの求電子反応性部分をYの求核反応性部分と反応させることによって、QとYとを結合する。LがQとYとを結合する基である実施形態では、Qおよび/またはYの求核反応性部分をLの求電子反応性部分と反応させることによって、あるいは、Qおよび/またはYの求電子反応性部分をLの求核反応性部分と反応させることによって、Qおよび/またはYをLに結合することが可能である。求核反応性基の非限定的な例として、アミノ、チオール、ヒドロキシルがあげられる。求電子反応性基の非限定的な例として、カルボキシル、塩化アシル、無水物、エステル、スクシンイミドエステル、ハロゲン化アルキル、スルホン酸エステル、マレイミド、ハロアセチル、イソシアン酸があげられる。カルボン酸とアミンとの反応によってQとYとが互いに結合する実施形態では、活性化剤を用いてカルボン酸の活性化エステルを形成してもよい。

#### 【0756】

カルボン酸の活性化エステルは、たとえば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、トシレート(Tos)、メシレート、トリフレート、カルボジイミドまたはヘキサフルオロホスフェートであってもよい。いくつかの実施形態では、カルボジイミドは、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)または1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DICD)である。いくつかの実施形態では、ヘキサフルオロホスフェートは、ヘキサフルオロホスフェートベンゾトリア

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ホスフェート (BOP)、ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP)、2 - (1H - 7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HATU)、o - ベンゾトリアゾール - N, N, N', N' - テトラメチル - ウロニウム - ヘキサフルオロ - ホスフェート (HBTU) からなる群から選択される。

## 【0757】

いくつかの実施形態では、Qは、YまたはLの求電子反応性基に結合できる求核反応性基 (リジン、システインまたはセリンの側鎖のアミノ基、チオール基またはヒドロキシ基など) を有する。いくつかの実施形態では、Qは、YまたはLの求核反応性基に結合できる求電子反応性基 (AspまたはGluの側鎖のカルボキシレート基など) を有する。いくつかの実施形態では、Qを、YまたはLに直接結合できる反応性基を持つように、化学的に修飾する。いくつかの実施形態では、本明細書で上述した (アシル化およびアルキル化を参照のこと) ように、Qを、式I、式IIまたは式IIIで表されるアミノ酸などの求核側鎖を有する天然または非天然のアミノ酸を含むように、C末端で修飾する。例示としての実施形態では、QのC末端のアミノ酸は、リジン、オルニチン、セリン、システイン、ホモシステインからなる群から選択される。たとえば、QのC末端のアミノ酸を、リジン残基を持つように修飾してもよい。いくつかの実施形態では、Qを、AspおよびGluなどの求電子側鎖を有する天然または非天然のアミノ酸を含むように、C末端のアミノ酸で修飾する。いくつかの実施形態では、本明細書で上述した (アシル化およびアルキル化を参照のこと) ように、Qの末端以外のアミノ酸を、式I、式IIまたは式IIIで表されるアミノ酸などの求核側鎖を有する天然または非天然のアミノ酸で置換する。例示としての実施形態では、置換されるQの末端以外のアミノ酸は、リジン、オルニチン、セリン、システイン、ホモシステインからなる群から選択される。たとえば、Qの末端以外のアミノ酸を、リジン残基で置換してもよい。いくつかの実施形態では、Qの末端以外のアミノ酸を、AspおよびGluなどの求電子側鎖を有する天然または非天然のアミノ酸で置換してもよい。

10

20

## 【0758】

いくつかの実施形態では、Yは、QまたはLに直接結合できる反応性基を有する。いくつかの実施形態では、Yは、QまたはLの求電子反応性基に結合できる求核反応性基 (アミン、チオール、ヒドロキシルなど) を有する。いくつかの実施形態では、Yは、QまたはLの求核反応性基に結合できる求電子反応性基 (カルボキシ基、カルボキシ基の活性化形態、脱離基を有する化合物など) を有する。いくつかの実施形態では、Yは、QまたはLの求電子反応性基のいずれかに結合できる求核反応性基を持つように、化学的に修飾される。いくつかの実施形態では、Yは、QまたはLの求核反応性基に結合できる求電子反応性基を持つように化学的に修飾される。

30

## 【0759】

いくつかの実施形態では、グルタルアルデヒドで処理したアミノシランなどのオルガノシランによって；シラノール基のカルボニルジイミダゾール (CDI) 活性化；またはデンドリマーを用いることで、結合を実施することが可能である。多岐にわたるデンドリマーが当分野で知られており、アンモニアまたはエチレンジアミン開始剤コア試薬から開始して、多岐にわたる方法で合成されるポリ (アミドアミン) (PAMAN) デンドリマー；トリス - アミノエチレン - イミンコアに基づくPAMANデンドリマーのサブクラス；内側が親水性の求核ポリアミドアミン (PAMAN)、外側が疎水性有機ケイ素 (OS) からなる裏返しになった単分子層のミセルである、放射状に層状化したポリ (アミドアミン - オルガノシリコン) のデンドリマー (PAMANOS)；通常は一級アミンを末端基として有するポリアルキルアミンであるポリ (プロピレンイミン) (PPI) デンドリマーで、デンドリマーの内側は多数の三級トリス - プロピレンアミンからなる；ポリ (プロピレンアミン) (POPAM) デンドリマー；ジアミノブタン (DAB) デンドリマー；両親媒性デンドリマー；水溶性の超分岐ポリフェニレンの単分子層のミセルであるミセル

40

50

デンドリマー；ポリリジンデンドリマー；ポリベンジルエーテル超分岐骨格を基にしたデンドリマーがあげられる。

【0760】

いくつかの実施形態では、オレフィンメタセシスによって、結合を実施することが可能である。いくつかの実施形態では、YとQ、YとLまたはQとLは、ともに、メタセシスが生じるアルケン部分またはアルキン部分を有する。いくつかの実施形態では、好適な触媒（銅、ルテニウムなど）を用いて、メタセシス反応を加速する。オレフィンメタセシス反応を実施する好適な方法は、従来技術において説明されている。たとえば、Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000)、Walensky et al., Science 305: 1466-1470 (2004) および Blackwell et al., Angew. Chem., Int. Ed. 37: 3281-3284 (1998) を参照のこと。

10

【0761】

いくつかの実施形態では、クリックケミストリーを用いて結合を実施することが可能である。「クリック反応」は、適用範囲が広く、実施しやすく、容易に入手可能な試薬しか使用せず、酸素および水に対して非感受性である。いくつかの実施形態では、クリック反応は、アルキニル基とアジド基との環化付加反応であり、トリアゾリル基が形成される。いくつかの実施形態では、クリック反応で銅触媒またはルテニウム触媒を使用する。クリック反応を実施する好適な方法は、従来技術において説明されている。たとえば、Kolb et al., Drug Discovery Today 8:1128 (2003); Kolb et al., Angew. Chem. Int. Ed. 40:2004 (2001); Rostovtsev et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596 (2002); Tornøe et al., J. Org. Chem. 67:3057 (2002); Mønnich et al., J. Am. Chem. Soc. 126:12809 (2004); Lewis et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:1053 (2002); Speers, J. Am. Chem. Soc. 125:4686 (2003); Chan et al. Org. Lett. 6:2853 (2004); Zhang et al., J. Am. Chem. Soc. 127:15998 (2005); および Waser et al., J. Am. Chem. Soc. 127:8294 (2005) を参照のこと。

20

【0762】

ストレプトアビジン／ビオチンまたはアビジン／ビオチンまたはレクチン／炭水化物などの高親和性特異的結合相手を介した間接的な結合も考えられている。

Q および / または Y の化学修飾

【0763】

いくつかの実施形態では、有機誘導体化剤を用いて Q および / または Y を官能化し、求核反応性基または求電子反応性基を持つようにする。この誘導体化剤は、Q の標的にされるアミノ酸の選択された側鎖または N 末端残基または C 末端残基および Y の官能基と反応できる。Q および / または Y の反応性基として、たとえば、アルデヒド基、アミノ基、エステル、チオール基、 $\alpha$ -ハロアセチル基、マレイミド基またはヒドラジノ基があげられる。誘導体化剤として、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介した結合）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介して）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸または当分野で知られた他の薬剤があげられる。あるいは、Q および / または Y を、多糖またはポリペプチドキャリアなどの中間体のキャリアを用いて、互いに間接的に結合してもよい。多糖キャリアの例として、アミノデキストランがあげられる。好適なポリペプチドキャリアの例として、結合させたキャリアに望ましい溶解特性を与えるための、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、これらのコポリマーならびに、これらのアミノ酸と他のアミノ酸、たとえばセリンの混合ポリマーがあげられる。

30

40

【0764】

システニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸またはクロロアセトアミドなどの $\alpha$ -ハロ酢酸（および対応するアミン）と反応し、カルボキシメチル誘導体またはカルボキシアミドメチル誘導体を生成する。システニル残基も、プロモトリフルオロアセトン、 $\alpha$ -プロモ- $\beta$ -(5-イミダゾール)プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジ

50

スルフィド、p - クロロ水銀安息香酸、2 - クロロ水銀 - 4 - ニトロフェノールまたはクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

【0765】

ヒスチジル残基は、比較的ヒスチジル側鎖に特異的であるため、pH 5.5 ~ 7.0 でジエチルピロカルボネートとの反応によって誘導体化される。p - ブロモフェナシルブロミドも有用である。この反応については、0.1 M のカコジル酸ナトリウム中にて pH 6.0 で実施すると好ましい。

【0766】

リジニルおよびアミノ末端残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応する。これらの薬剤を用いる誘導体化には、リジニル残基の電荷を逆にする作用がある。α - アミノ含有残基を誘導体化するための他の好適な試薬として、ピコリンイミダートなどのイミドエステル、リン酸ピリドキサール、ピリドキサール、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O - メチルイソ尿素、2, 4 - ペンタンジオン、グリオキシル酸とのトランスアミナーゼ触媒反応があげられる。

10

【0767】

アルギニル残基は、1 種類または複数種類の従来の試薬との反応によって修飾され、この試薬としては、フェニルグリオキサール、2, 3 - ブタンジオン、1, 2 - シクロヘキサジオン、ニンヒドリンがあげられる。グアニジン官能基の pKa が高いため、アルギニン残基の誘導体化には、アルカリ条件で反応を実施する必要がある。さらに、これらの試薬は、リジンの基ならびにアルギニンの ε - アミノ基と反応することがある。

20

【0768】

チロシル残基に対しては、独特の修飾をほどこすことができ、特に興味深いのが、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によって、スペクトル標識をチロシル残基に導入することである。最も一般的には、N - アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを用いて、それぞれ O - アセチルチロシル種および 3 - ニトロ誘導体を生成する。

【0769】

カルボジイミド (R - N = C = N - R') との反応によって、カルボキシル側基 (アスパルチルまたはグルタミル) を選択的に修飾する。式中、R と R' は、1 - シクロヘキシル - 3 - (2 - モルホリニル - 4 - エチル) カルボジイミドまたは 1 - エチル - 3 - (4 - アゾニア - 4, 4 - ジメチルペンチル) カルボジイミドなどの異なるアルキル基である。さらに、アンモニウムイオンとの反応によって、アスパルチル残基およびグルタミル残基を、アスパラギン残基およびグルタミン残基に変換する。

30

【0770】

他の修飾として、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリル残基またはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン側鎖、アルギニン側鎖、ヒスチジン側鎖の α - アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、アスパラギンまたはグルタミンの脱アミド化、N 末端アミンのアセチル化および / またはアミド化または C 末端のカルボン酸基のエステル化があげられる。

40

【0771】

もうひとつのタイプの共有結合修飾では、グリコシドをペプチドに化学的または酵素的に結合する。(a) アルギニンおよびヒスチジン、(b) 遊離カルボキシ基、(c) システインのものなどの遊離スルフヒドリル基、(d) セリン、スレオニンまたはヒドロキシプロリンのものなどの遊離ヒドロキシ基、(e) チロシンまたはトリプトファンのものである芳香族残基または (f) グルタミンのアミド基に、糖 (単数または複数) を結合してもよい。これらの方法は、1987 年 9 月 11 日に公開された国際特許出願公開第 WO 87 / 05330 号ならびに、Aplin and Wiston, *CRC Crit. Rev. Biochem*, pp. 259-306 (1981) に記載されている。

50

L の構造

## 【 0 7 7 2 】

いくつかの実施形態では、L は結合である。これらの実施形態では、Q の求核反応性部分と Y の求電子反応性部分とを反応させることで、Q と Y とを結合する。別の実施形態では、Q の求電子反応性部分を Y の求核部分と反応させることで、Q と Y とを結合する。例示としての実施形態では、L は、Q のアミン（リジン残基の  $\epsilon$  - アミンなど）と Y のカルボキシ基との反応時に形成されるアミド結合である。別の実施形態では、結合前に、誘導体化剤で Q およびまたは Y を誘導体化する。

## 【 0 7 7 3 】

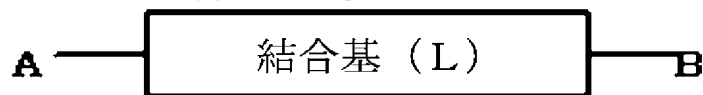
いくつかの実施形態では、L は結合基である。いくつかの実施形態では、L は、二官能性リンカーであり、Q および Y への結合前に、反応性基を 2 つしか持たない。Q と Y がともに求電子反応性基を有する実施形態では、L は、Q および Y への結合前に、同一の求核基（アミン、ヒドロキシル、チオールなど）2 個または異なる求核基 2 個を有する。Q と Y がともに求核反応性基を有する実施形態では、L は、Q および Y への結合前に、同一の求電子基（カルボキシ基、カルボキシ基の活性化形態、脱離基を有する化合物など）2 個または異なる求電子基 2 個を有する。Q または Y のうち的一方が求核反応性基を有し、Q または Y の他方が求電子反応性基を有する実施形態では、L は、Q および Y への結合前に、求核反応性基 1 個と求電子基 1 個を有する。

10

## 【 0 7 7 4 】

L は、Q および Y の各々と反応できる反応性基を（Q および Y への結合前に）少なくとも 2 個有するものであれば、どのような分子であってもよい。いくつかの実施形態では、L は反応性基を 2 個しか持たず、二官能性である。L（ペプチドへの結合前）を、式 V I で表すことが可能である。

20



（ここで、A および B は独立に、求核反応性基または求電子反応性基である。）いくつかの実施形態では、A および B は、ともに求核基であるか、ともに求電子基である。いくつかの実施形態では、A または B の一方が求核基であり、A または B の他方が求電子基である。A と B の非限定的な組み合わせを以下の表にあげておく。

30



| ともに求核基 |        | ともに求電子基 |           | 求核基/求電子基 |           |
|--------|--------|---------|-----------|----------|-----------|
| A      | B      | A       | B         | A        | B         |
| アミノ    | アミノ    | カルボキシル  | カルボキシル    | アミノ      | カルボキシル    |
| アミノ    | チオール   | カルボキシル  | 塩化アシル     | アミノ      | 塩化アシル     |
| アミノ    | ヒドロキシル | カルボキシル  | 無水物       | アミノ      | 無水物       |
| チオール   | アミノ    | カルボキシル  | エステル      | アミノ      | エステル      |
| チオール   | チオール   | カルボキシル  | NHS       | アミノ      | NHS       |
| チオール   | ヒドロキシル | カルボキシル  | ハロゲン      | アミノ      | ハロゲン      |
| ヒドロキシル | アミノ    | カルボキシル  | スルホン酸エステル | アミノ      | スルホン酸エステル |
| ヒドロキシル | チオール   | カルボキシル  | マレイミド     | アミノ      | マレイミド     |
| ヒドロキシル | ヒドロキシル | カルボキシル  | ハロアセチル    | アミノ      | ハロアセチル    |
|        |        | カルボキシル  | イソシアン酸    | アミノ      | イソシアン酸    |
|        |        | 塩化アシル   | カルボキシル    | チオール     | カルボキシル    |
|        |        | 塩化アシル   | 塩化アシル     | チオール     | 塩化アシル     |
|        |        | 塩化アシル   | 無水物       | チオール     | 無水物       |
|        |        | 塩化アシル   | エステル      | チオール     | エステル      |
|        |        | 塩化アシル   | NHS       | チオール     | NHS       |
|        |        | 塩化アシル   | ハロゲン      | チオール     | ハロゲン      |
|        |        | 塩化アシル   | スルホン酸エステル | チオール     | スルホン酸エステル |
|        |        | 塩化アシル   | マレイミド     | チオール     | マレイミド     |
|        |        | 塩化アシル   | ハロアセチル    | チオール     | ハロアセチル    |
|        |        | 塩化アシル   | イソシアン酸    | チオール     | イソシアン酸    |
|        |        | 無水物     | カルボキシル    | ヒドロキシル   | カルボキシル    |
|        |        | 無水物     | 塩化アシル     | ヒドロキシル   | 塩化アシル     |
|        |        | 無水物     | 無水物       | ヒドロキシル   | 無水物       |
|        |        | 無水物     | エステル      | ヒドロキシル   | エステル      |
|        |        | 無水物     | NHS       | ヒドロキシル   | NHS       |
|        |        | 無水物     | ハロゲン      | ヒドロキシル   | ハロゲン      |
|        |        | 無水物     | スルホン酸エステル | ヒドロキシル   | スルホン酸エステル |
|        |        | 無水物     | マレイミド     | ヒドロキシル   | マレイミド     |
|        |        | 無水物     | ハロアセチル    | ヒドロキシル   | ハロアセチル    |
|        |        | 無水物     | イソシアン酸    | ヒドロキシル   | イソシアン酸    |
|        |        | エステル    | カルボキシル    |          |           |
|        |        | エステル    | 塩化アシル     |          |           |
|        |        | エステル    | 無水物       |          |           |

10

20

30

40

50

| ともに求核基 |  | ともに求電子基   |           | 求核基/求電子基 |  |
|--------|--|-----------|-----------|----------|--|
|        |  | エステル      | エステル      |          |  |
|        |  | エステル      | NHS       |          |  |
|        |  | エステル      | ハロゲン      |          |  |
|        |  | エステル      | スルホン酸エステル |          |  |
|        |  | エステル      | マレイミド     |          |  |
|        |  | エステル      | ハロアセチル    |          |  |
|        |  | エステル      | イソシアン酸    |          |  |
|        |  | NHS       | カルボキシル    |          |  |
|        |  | NHS       | 塩化アシル     |          |  |
|        |  | NHS       | 無水物       |          |  |
|        |  | NHS       | エステル      |          |  |
|        |  | NHS       | NHS       |          |  |
|        |  | NHS       | ハロゲン      |          |  |
|        |  | NHS       | スルホン酸エステル |          |  |
|        |  | NHS       | マレイミド     |          |  |
|        |  | NHS       | ハロアセチル    |          |  |
|        |  | NHS       | イソシアン酸    |          |  |
|        |  | ハロゲン      | カルボキシル    |          |  |
|        |  | ハロゲン      | 塩化アシル     |          |  |
|        |  | ハロゲン      | 無水物       |          |  |
|        |  | ハロゲン      | エステル      |          |  |
|        |  | ハロゲン      | NHS       |          |  |
|        |  | ハロゲン      | ハロゲン      |          |  |
|        |  | ハロゲン      | スルホン酸エステル |          |  |
|        |  | ハロゲン      | マレイミド     |          |  |
|        |  | ハロゲン      | ハロアセチル    |          |  |
|        |  | ハロゲン      | イソシアン酸    |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | カルボキシル    |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | 塩化アシル     |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | 無水物       |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | エステル      |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | NHS       |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | ハロゲン      |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | スルホン酸エステル |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | マレイミド     |          |  |

10

20

30

40

50

| ともに求核基 |  | ともに求電子基   |           | 求核基/求電子基 |  |
|--------|--|-----------|-----------|----------|--|
|        |  | スルホン酸エステル | ハロアセチル    |          |  |
|        |  | スルホン酸エステル | イソシアン酸    |          |  |
|        |  | マレイミド     | カルボキシル    |          |  |
|        |  | マレイミド     | 塩化アシル     |          |  |
|        |  | マレイミド     | 無水物       |          |  |
|        |  | マレイミド     | エステル      |          |  |
|        |  | マレイミド     | NHS       |          |  |
|        |  | マレイミド     | ハロゲン      |          |  |
|        |  | マレイミド     | スルホン酸エステル |          |  |
|        |  | マレイミド     | マレイミド     |          |  |
|        |  | マレイミド     | ハロアセチル    |          |  |
|        |  | マレイミド     | イソシアン酸    |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | カルボキシル    |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | 塩化アシル     |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | 無水物       |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | エステル      |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | NHS       |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | ハロゲン      |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | スルホン酸エステル |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | マレイミド     |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | ハロアセチル    |          |  |
|        |  | ハロアセチル    | イソシアン酸    |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | カルボキシル    |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | 塩化アシル     |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | 無水物       |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | エステル      |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | NHS       |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | ハロゲン      |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | スルホン酸エステル |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | マレイミド     |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | ハロアセチル    |          |  |
|        |  | イソシアン酸    | イソシアン酸    |          |  |

10

20

30

40

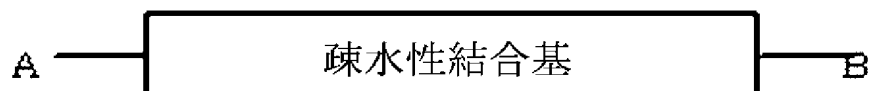
50

いくつかの実施形態では、AおよびBは、オレフィンメタセシス反応に適したアルケン官能基および/またはアルキン官能基を含むものであってもよい。いくつかの実施形態では、AおよびBは、クリックケミストリー（アルケン、アルキン、ニトリル、アジドなど）に適した部分を含む。反応性基（AおよびB）の他の非限定的な例として、ピリジルジチオール、アリールアジド、ジアジリン、カルボジイミド、ヒドラジドがあげられる。

#### 【0775】

いくつかの実施形態では、Lは疎水性である。疎水性リンカーは、当分野で知られている。たとえば、Bi conjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)（その内容全体を本明細書に援用する）を参照のこと。当分野で知られた好適な疎水性結合基として、たとえば、8-ヒドロキシオクタン酸および8-メルカプトオクタン酸があげられる。組成物のペプチドへの結合前に、疎水性の結合基は、本明細書で説明し、かつ、以下に示すように、少なくとも2つの反応性基（AおよびB）を有する。

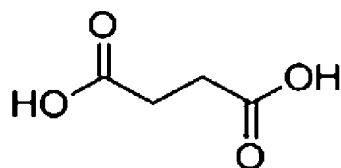
10



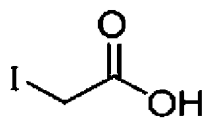
#### 【0776】

いくつかの実施形態では、疎水性結合基は、マレイミドまたはヨードアセチル基のいずれかと、カルボン酸または活性化カルボン酸（NHSエステルなど）のいずれかを反応性基として有する。これらの実施形態では、マレイミドまたはヨードアセチル基は、QまたはYのチオール部分に結合可能であり、カルボン酸または活性化カルボン酸は、QまたはYのアミンに結合可能である（カップリング試薬を使用する場合と使用しない場合がある）。当業者に知られたカップリング剤を使用して、DCC、DIC、HATU、HBTU、TBTUなどの遊離アミンならびに本明細書に記載の他の活性化剤に、カルボン酸を結合することが可能である。具体的な実施形態では、親水性の結合基は、2～100個のメチレン基からなる脂肪族鎖を有し、この場合のAおよびBは、カルボキシ基またはこれらの誘導体（コハク酸など）である。他の具体的な実施形態では、Lはヨード酢酸である。

20



コハク酸

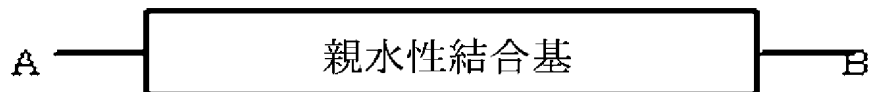


ヨード酢酸

30

#### 【0777】

いくつかの実施形態では、結合基は、ポリアルキレングリコールなど、親水性である。組成物のペプチドへの結合前に、親水性の結合基は、本明細書で説明し、かつ、以下に示すように、少なくとも2つの反応性基（AおよびB）を有する。



40

具体的な実施形態では、結合基は、ポリエチレングリコール（PEG）である。特定の実施形態におけるPEGは、分子量が約100ダルトン～約10,000ダルトン、たとえば、約500ダルトン～約5000ダルトンである。いくつかの実施形態におけるPEGは、分子量が、約10,000ダルトン～約40,000ダルトンである。

#### 【0778】

いくつかの実施形態では、親水性結合基は、マレイミドまたはヨードアセチル基のいずれかと、カルボン酸または活性化カルボン酸（NHSエステルなど）のいずれかを反応性基として有する。これらの実施形態では、マレイミドまたはヨードアセチル基は、Qまた

50

は Y のチオール部分に結合可能であり、カルボン酸または活性化カルボン酸は、Q または Y のアミンに結合可能である（カップリング試薬を使用する場合と使用しない場合がある）。当業者に知られた適切なカップリング剤を使用して、DCC、DIC、HATU、HBTU、TBTU などのアミンならびに本明細書に記載の他の活性化剤に、カルボン酸を結合することが可能である。いくつかの実施形態では、結合基は、マレイミド-PEG（20 kDa）-COOH、ヨードアセチル-PEG（20 kDa）-COOH、マレイミド-PEG（20 kDa）-NHS またはヨードアセチル-PEG（20 kDa）-NHS である。

#### 【0779】

いくつかの実施形態では、結合基は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチドまたはポリペプチドで構成され、このアミノ酸、ジペプチド、トリペプチドまたはポリペプチドは、本明細書に記載するような活性化基を少なくとも 2 つ有する。いくつかの実施形態では、結合基（L）は、アミノ、エーテル、チオエーテル、マレイミド、ジスルフィド、アミド、エステル、チオエステル、アルケン、シクロアルケン、アルキン、トリゾイル、カルバメート、カーボネート、カテプシン B 分解可能、ヒドラゾンからなる群から選択される部分を有する。

10

#### 【0780】

いくつかの実施形態では、L は、原子 1 ~ 約 60 個または 1 ~ 30 個の長さまたはこれよりも長い、原子 2 ~ 5 個、原子 2 ~ 10 個、原子 5 ~ 10 個または原子 10 ~ 20 個の長さの原子鎖を有する。いくつかの実施形態では、鎖の原子はすべて炭素原子である。いくつかの実施形態では、リンカーの骨格における鎖の原子は、C、O、N、S からなる群から選択される。鎖の原子およびリンカーは、さらに溶解性の高い結合体を提供するように、想定される溶解性（親水性）に応じて選択できるものである。いくつかの実施形態では、L は、標的となる組織または臓器または細胞に見られる酵素または他の触媒または加水分解状態によって切断される官能基を提供するものである。いくつかの実施形態では、L の長さは、立体障害の可能性を低減できるだけの十分な長さである。

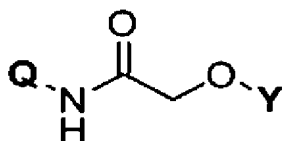
20

#### in vivo での L の安定性

#### 【0781】

いくつかの実施形態では、L は in vivo で安定である。いくつかの実施形態では、L は、たとえば、血清中で 5 分間インキュベートすると、結合体の 25 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満または 5 % 未満しか切断されないなど、血清中で少なくとも 5 分間、安定である。他の実施形態では、L は、血清中で少なくとも 10 分間または 20 分間または 25 分間または 30 分間または 60 分間または 90 分間または 120 分間または 3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、9 時間、10 時間、12 時間、15 時間、18 時間または 24 時間、安定である。これらの実施形態では、L は、in vivo で加水分解できる官能基を含まない。例示としてのいくつかの実施形態では、L は、血清中で少なくとも約 72 時間、安定である。in vivo で大幅に加水分解されない官能基の非限定的な例として、アミド、エーテル、チオエーテルがあげられる。たとえば、以下の化合物は、in vivo で大幅に加水分解されることがない。

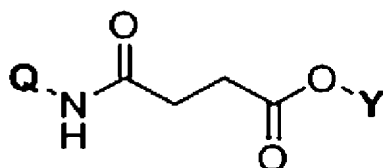
30



40

#### 【0782】

いくつかの実施形態では、L は in vivo で加水分解可能である。これらの実施形態では、L は、in vivo で加水分解できる官能基を含む。in vivo で加水分解できる官能基の非限定的な例として、エステル、無水物、チオエステルがあげられる。たとえば、以下の化合物は、エステル基を有するがゆえに in vivo で加水分解できるものである。



## 【0783】

いくつかの例示としての実施形態では、Lは不安定であり、血漿中にて37℃で、3時間以内でかなり加水分解され、6時間以内には完全に加水分解される。例示としてのいくつかの実施形態では、Lは不安定ではない。

## 【0784】

いくつかの実施形態では、Lはin vivoで準安定である。これらの実施形態では、Lは、任意に経時的に、in vivoで化学的または酵素的に切断される官能基を有する（酸感受性官能基、還元感受性官能基または酵素感受性官能基など）。これらの実施形態では、Lは、たとえば、ヒドラゾン部分、ジスルフィド部分またはカテプシン分解可能な部分を有するものであってもよい。Lが準安定である場合、特定の理論に拘泥することなく、Q-L-Y結合体は、たとえば血清中で上述した時間は安定であるなど、細胞外環境で安定であるが、細胞内環境または細胞内環境を真似た状態では不安定であるため、細胞内に入ると分解される。いくつかの実施形態では、Lが準安定である場合、Lは、血清中で少なくとも約24時間、25時間、26時間、27時間、28時間、29時間、30時間、31時間、32時間、33時間、34時間、35時間、36時間、42時間または48時間、たとえば、少なくとも約48時間、54時間、60時間、66時間または72時間または約24～約48、約48～約72、約24～約60、約36～約48、約36～約72または約48～約72時間、安定である。

Q-L-Y結合体

QとYとの結合

Lを介したYに対するQの結合は、1番目から29番目の任意の位置、C末端の延長部分の範囲内にある位置またはC末端のアミノ酸をはじめとして、Qの範囲内のどの位置で実施してもよいが、ただし、Qの活性は、増強されないまでも保持はされるものとする。非限定的な例として、（配列番号1601のアミノ酸番号で）5番目、7番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、15番目、16番目、17番目、18番目、19番目、20番目、21番目、24番目、27番目、28番目、29番目、30番目、37番目、38番目、39番目、40番目、41番目、42番目または43番目があげられる。いくつかの実施形態では、Yは、10番目、20番目、24番目、30番目、37番目、38番目、39番目、40番目、41番目、32番目または43番目のうちの1箇所または2箇所以上で、Lを介してQに結合する。具体的な実施形態では、Yは、Qの10番目および/または40番目で、Lを介してQに結合する。

活性

グルカゴン受容体および核内ホルモン受容体に対する

## 【0785】

いくつかの実施形態では、Q-L-Yは、グルカゴン受容体および核内ホルモン受容体の両方に対して活性を示す。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQの活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）は、核内ホルモン受容体に対するYの活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）と比較して、約100倍以内、約75倍以内、約60倍以内、約50倍以内、約40倍以内、約30倍以内、約20倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる（高いまたは低い）。いくつかの実施形態では、Qのグルカゴン活性は、Yの活性と比較して、約25倍以内、約20倍以内、約15倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる（高いまたは低い）。

## 【0786】

いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQの相対活性またはEC<sub>50</sub>または活性を核内ホルモン受容体に対するYの相対活性またはEC<sub>50</sub>または活性で割った比

は、X未満であるか約Xであり、ここで、Xは、100、75、60、50、40、30、20、15、10または5から選択される。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性を核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性で割った比は、約1から5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、Qのグルカゴン活性と比較した場合のYの核内ホルモン活性の比は、Z未満であるか約Zであり、ここで、Zは、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5から選択される。いくつかの実施形態では、Qのグルカゴン活性と比較した場合のYの核内ホルモン活性の比は、5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、グルカゴン受容体に対するQのEC<sub>50</sub>は、核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>よりも2倍～10倍（2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍など）大きい。

10

**【0787】**

いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYの相対活性または活性またはEC<sub>50</sub>をグルカゴン受容体に対するQの相対活性または活性またはEC<sub>50</sub>で割った比は、V未満であるか約Vであり、ここで、Vは、100、75、60、50、40、30、20、15、10または5から選択される。いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性をグルカゴン受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性で割った比は、5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、Yの核内ホルモン活性とQのグルカゴン活性との比は、W未満であるか約Wであり、ここで、Wは、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5から選択される。いくつかの実施形態では、Yの核内ホルモン活性とQのグルカゴン活性との比は、5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>は、グルカゴン受容体に対するQのEC<sub>50</sub>よりも約2～約10倍（2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍など）大きい。

20

**【0788】**

いくつかの実施形態では、Yは、核内ホルモン受容体に対する内因性のリガンドの活性（核内ホルモン活性）の少なくとも0.1%（約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど）を示し、Qは、グルカゴン受容体に対する天然のグルカゴン受容体の活性（グルカゴン受容体活性）の少なくとも0.1%（約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど）を示す。

30

GLP-1受容体および核内ホルモン受容体に対する活性

**【0789】**

いくつかの実施形態では、Q-L-Yは、GLP-1受容体および核内ホルモン受容体の両方に対して活性を示す。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するQの活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）は、核内ホルモン受容体に対するYの活性（EC<sub>50</sub>または相対活性など）と比較して、約100倍以内、約75倍以内、約60倍以内、約50倍以内、約40倍以内、約30倍以内、約20倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる（高いまたは低い）。いくつかの実施形態では、QのGLP-1活性は、Yの活性と比較して、約25倍以内、約20倍以内、約15倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる（高いまたは低い）。

40

**【0790】**

いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するQの相対活性またはEC<sub>50</sub>または活性を核内ホルモン受容体に対するYの相対活性またはEC<sub>50</sub>または活性で割った比は、X未満であるか約Xであり、ここで、Xは、100、75、60、50、40、30、20、15、10または5から選択される。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性を核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性で割った比は、約1から5未満（約4、約3、約2、約1など）である。

50

1 など)である。いくつかの実施形態では、QのGLP-1活性と比較した場合のYの核内ホルモン活性の比は、Z未満であるか約Zであり、ここで、Zは、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5から選択される。いくつかの実施形態では、QのGLP-1活性と比較した場合のYの核内ホルモン活性の比は、5未満(約4、約3、約2、約1など)である。いくつかの実施形態では、GLP-1受容体に対するQのEC<sub>50</sub>は、核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>よりも2倍~10倍(2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍など)大きい。

#### 【0791】

いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYの相対活性または活性またはEC<sub>50</sub>をGLP-1受容体に対するQの相対活性または活性またはEC<sub>50</sub>で割った比は、V未満であるか約Vであり、ここで、Vは、100、75、60、50、40、30、20、15、10または5から選択される。いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性をGLP-1受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性で割った比は、5未満(約4、約3、約2、約1など)である。いくつかの実施形態では、Yの核内ホルモン活性とQのGLP-1活性との比は、W未満であるか約Wであり、ここで、Wは、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5から選択される。いくつかの実施形態では、Yの核内ホルモン活性とQのGLP-1活性との比は、5未満(約4、約3、約2、約1など)である。いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>は、GLP-1受容体に対するQのEC<sub>50</sub>よりも約2~約10倍(2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍など)大きい。

10

20

#### 【0792】

いくつかの実施形態では、Yは、核内ホルモン受容体に対する内因性のリガンドの活性(核内ホルモン活性)の少なくとも0.1%(約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど)を示し、Qは、GLP-1受容体に対する天然のGLP-1受容体の活性(GLP-1受容体活性)の少なくとも0.1%(約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど)を示す。

30

GIP受容体および核内ホルモン受容体に対する活性

#### 【0793】

いくつかの実施形態では、Q-L-Yは、GIP受容体および核内ホルモン受容体の両方に対して活性を示す。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQの活性(EC<sub>50</sub>または相対活性など)は、核内ホルモン受容体に対するYの活性(EC<sub>50</sub>または相対活性など)と比較して、約100倍以内、約75倍以内、約60倍以内、約50倍以内、約40倍以内、約30倍以内、約20倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる(高いまたは低い)。いくつかの実施形態では、QのGIP活性は、Yの活性と比較して、約25倍以内、約20倍以内、約15倍以内、約10倍以内または約5倍以内で異なる(高いまたは低い)。

40

#### 【0794】

いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQの相対活性またはEC<sub>50</sub>または活性を核内ホルモン受容体に対するYの相対活性またはEC<sub>50</sub>または活性で割った比は、X未満であるか約Xであり、ここで、Xは、100、75、60、50、40、30、20、15、10または5から選択される。いくつかの実施形態では、GIP受容体に対するQのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性を核内ホルモン受容体に対するYのEC<sub>50</sub>または活性または相対活性で割った比は、約1から5未満(約4、約3、約2、約1など)である。いくつかの実施形態では、QのGIP活性と比較した場合のYの核内ホルモン活性の比は、Z未満であるか約Zであり、ここで、Zは、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5から選択される。いくつかの実施形態では、QのGIP活性と比較した場合のYの核内ホルモン活性の比は、5未満(約4、約3、約2、約1など

50



）である。いくつかの実施形態では、G I P 受容体に対するQのE C<sub>50</sub>は、核内ホルモン受容体に対するYのE C<sub>50</sub>よりも2倍～10倍（2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍など）大きい。

【0795】

いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYの相対活性または活性またはE C<sub>50</sub>をG I P 受容体に対するQの相対活性または活性またはE C<sub>50</sub>で割った比は、V未満であるか約Vであり、ここで、Vは、100、75、60、50、40、30、20、15、10または5から選択される。いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYのE C<sub>50</sub>または活性または相対活性をG I P 受容体に対するQのE C<sub>50</sub>または活性または相対活性で割った比は、5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、Yの核内ホルモン活性とQのG I P 活性との比は、W未満であるか約Wであり、ここで、Wは、100、75、60、50、40、30、20、15、10、5から選択される。いくつかの実施形態では、Yの核内ホルモン活性とQのG I P 活性との比は、5未満（約4、約3、約2、約1など）である。いくつかの実施形態では、核内ホルモン受容体に対するYのE C<sub>50</sub>は、G I P 受容体に対するQのE C<sub>50</sub>よりも約2～約10倍（2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍など）大きい。

10

【0796】

いくつかの実施形態では、Yは、核内ホルモン受容体に対する内因性のリガンドの活性（核内ホルモン活性）の少なくとも0.1%（約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど）を示し、Qは、G I P 受容体に対する天然のG I P 受容体の活性（G I P 受容体活性）の少なくとも0.1%（約0.5%またはそれよりも高い、約1%またはそれよりも高い、約5%またはそれよりも高い、約10%またはそれよりも高いあるいは、さらに高いなど）を示す。

20

Q - L - Yのプロドラッグ

【0797】

本発明のいくつかの態様では、国際特許出願第P C T U S 0 9 / 6 8 7 4 5号（2009年12月18日にファイル）（その内容全体を本明細書に援用する）に開示されているように、Q - L - Yのプロドラッグが提供され、ここで、このプロドラッグは、Qの活性部位にアミド結合を介して共有結合しているジペプチドプロドラッグ要素（A - B）を有する。あとから生理的条件下かつ酵素活性のない状態でジペプチドを除去すると、Q - L - Y結合体に対する活性が完全に回復する。

30

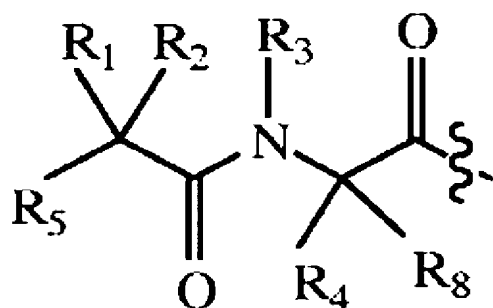
【0798】

いくつかの実施形態では、一般構造A - B - Q - L - Yを有する、Q - L - Yのプロドラッグが提供される。これらの実施形態では、Aはアミノ酸またはヒドロキシ酸であり、Bは、（A - Bの）BのカルボキシルとQのアミンとの間のアミド結合の形成によってQに結合した、N - アルキル化されたアミノ酸である。さらに、いくつかの実施形態では、A、BまたはA - Bが結合しているQのアミノ酸は、コードされていないアミノ酸であり、QからのA - Bの化学反応による開裂は、P B S中にて生理的条件下で、約1時間から約720時間以内に少なくとも約90%完了する。もうひとつの実施形態では、QからのA - Bの化学反応による開裂は、P B S中にて生理的条件下で、約1時間または約1週間以内に少なくとも約50%完了する。

40

【0799】

いくつかの実施形態では、ジペプチドプロドラッグ要素（A - B）は、以下の一般構造を有する化合物を含む。



10

式中、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_4$  および  $R_8$  は独立に、H、 $C_1 \sim C_{18}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$  アルケニル、( $C_1 \sim C_{18}$  アルキル)OH、( $C_1 \sim C_{18}$  アルキル)SH、( $C_2 \sim C_3$  アルキル)SCH<sub>3</sub>、( $C_1 \sim C_4$  アルキル)CONH<sub>2</sub>、( $C_1 \sim C_4$  アルキル)COOH、( $C_1 \sim C_4$  アルキル)NH<sub>2</sub>、( $C_1 \sim C_4$  アルキル)NHC(NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)NH<sub>2</sub>、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)( $C_3 \sim C_6$  シクロアルキル)、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)( $C_2 \sim C_5$  複素環)、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)( $C_6 \sim C_{10}$  アリール) $R_7$ 、( $C_1 \sim C_4$  アルキル)( $C_3 \sim C_9$  ヘテロアリール)、 $C_1 \sim C_{12}$  アルキル( $W_1$ ) $C_1 \sim C_{12}$  アルキルからなる群から選択され、 $W_1$  は、N、S、O からなる群から選択されるヘテロ原子であるか、または  $R_1$  および  $R_2$  は、これらが結合している原子と一緒にあって、 $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキルを形成しするか、または  $R_4$  および  $R_8$  は、これらが結合している原子と一緒にあって、 $C_3 \sim C_6$  シクロアルキルを形成し、

20

$R_3$  は、 $C_1 \sim C_{18}$  アルキル、( $C_1 \sim C_{18}$  アルキル)OH、( $C_1 \sim C_{18}$  アルキル)NH<sub>2</sub>、( $C_1 \sim C_{18}$  アルキル)SH、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)( $C_3 \sim C_6$ )シクロアルキル、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)( $C_2 \sim C_5$  複素環)、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)( $C_6 \sim C_{10}$  アリール) $R_7$ 、( $C_1 \sim C_4$  アルキル)( $C_3 \sim C_9$  ヘテロアリール)からなる群から選択されるか、または  $R_4$  および  $R_3$  は、これらが結合している原子と一緒にあって、4員環、5員環または6員環の複素環を形成し、

30

$R_5$  は、NHR<sub>6</sub> または OH であり、

$R_6$  は、H、 $C_1 \sim C_8$  アルキルであるか、または  $R_6$  および  $R_1$  は、これらが結合している原子と一緒にあって、4員環、5員環または6員環の複素環を形成し、

$R_7$  は、水素、 $C_1 \sim C_{18}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{18}$  アルケニル、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)CONH<sub>2</sub>、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)COOH、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)NH<sub>2</sub>、( $C_0 \sim C_4$  アルキル)OH、ハロゲンからなる群から選択される。

#### 【0800】

いくつかの実施形態では、ジペプチドプロドラッグ要素を、Qのアミノ末端に結合する。他の実施形態では、ジペプチドプロドラッグを、国際特許出願第PCT US 09/68745号に記載されているようなQの末端以外のアミノ酸に結合する。

40

#### Q-L-Yの例示としての実施形態

##### 【0801】

本発明のいくつかの実施形態では、グルカゴンスーパーファミリーのペプチド結合体は、式Q-L-Yで表すことが可能なものである(式中、Qはグルカゴンスーパーファミリーのペプチドであり、YはNHRリガンドであり、Lは結合基または結合である)。

##### 【0802】

具体的な態様では、Qは、天然のヒトGLP-1(配列番号1603)のアミノ酸配列を基にしたアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、Qは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、場合によっては16個または17個以上(17個、18個、19個、20個、21個、2

50

2 個、2 3 個、2 4 個、2 5 個など) のアミノ酸修飾を有する、配列番号 1 6 0 3 の修飾されたアミノ酸配列を有し、天然のヒト GLP - 1 配列 (配列番号 1 6 0 3) に対して最大 1 個、最大 2 個、最大 3 個、最大 4 個、最大 5 個、最大 6 個、最大 7 個、最大 8 個、最大 9 個または最大 1 0 個のアミノ酸修飾 (アシル化、アルキル化、PEG 化、C 末端での短縮、置換など) を有する。たとえば、Q は、GLP - 1 (A i b<sup>2</sup> E<sup>1 6</sup> C e x K<sup>4 0</sup>) (配列番号 1 6 4 7)、GLP - 1 (A i b<sup>2</sup> A<sup>2 2</sup> C e x K<sup>4 0</sup>) (配列番号 1 6 4 8)、d GLP - 1 (A<sup>1</sup> A i b<sup>2</sup> A<sup>2 2</sup> C e x K<sup>4 0</sup>) (配列番号 1 6 4 9)、GLP - 1 (A i b<sup>2</sup> E<sup>1 6</sup> C<sup>2 4</sup> (PEG - 4 0 k D a) C e x K<sup>4 0</sup>) (配列番号 1 6 5 0) であってもよい。

**【0803】**

10

具体的な態様では、Y は、ステロイドまたはその誘導体であり、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、糖質コルチコイド受容体またはRAR 関連オーファン受容体に対して作用する。いくつかの実施形態では、Y は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、糖質コルチコイド受容体またはRAR 関連オーファン受容体に対してアゴニスト活性を与えるまたは促進する構造を有し、他の実施形態では、Y は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、糖質コルチコイド受容体またはRAR 関連オーファン受容体のアンタゴニストである。たとえば、Y は、エストラジオール、エストロンまたはコレステロールであってもよい。

**【0804】**

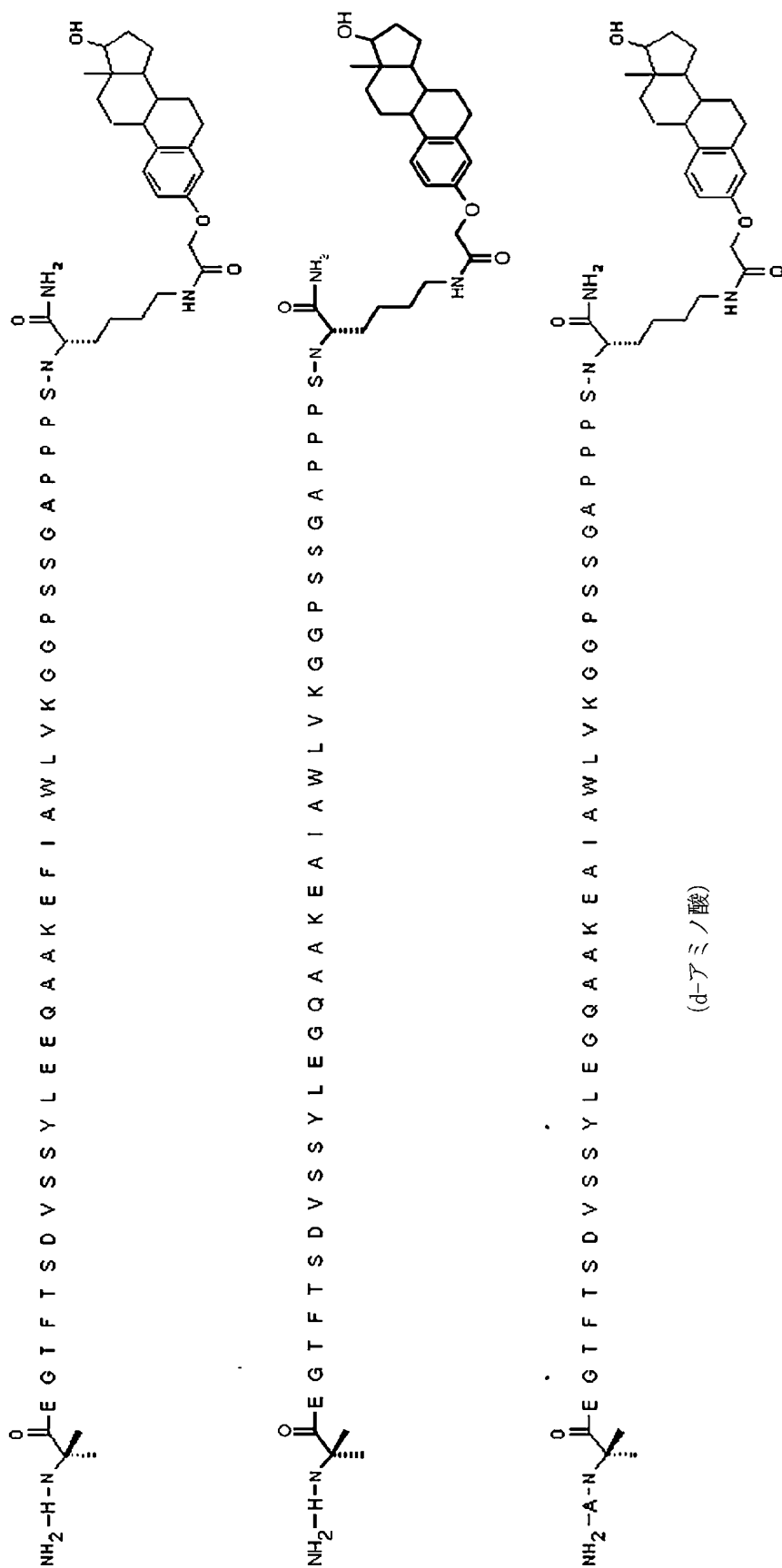
20

具体的な態様では、L はin vivoで安定である。いくつかの実施形態では、L は、たとえば、アミド、エーテル、カルバメートまたはチオエーテルを有する。別の態様では、L はin vivoで加水分解可能である。いくつかの実施形態では、L は、エステル、無水物またはチオエステルを有する。他の態様では、L はin vivoで準安定である。いくつかの態様では、L は、酸感受性 (ヒドラゾン部分を有するなど)、還元感受性 (ジスルフィド部分を有するなど) または酵素感受性 (カテプシン B 分解可能部分を有するなど) を有する。

**【0805】**

30

安定した結合を介してエストラジオールに結合する GLP - 1 を基にしたグルカゴンスーパーファミリーのペプチドの非限定的な例を、以下に示す (配列番号 1 6 5 1 ~ 1 6 5 4、1 6 6 7)。



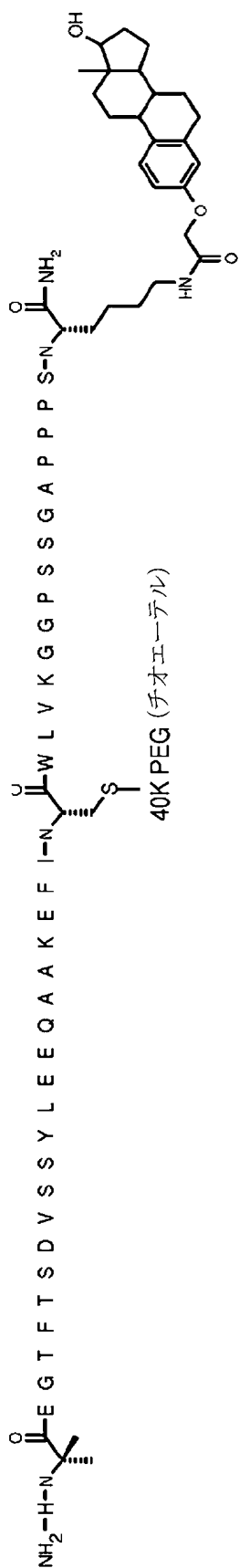
10

20

30

40

50



10

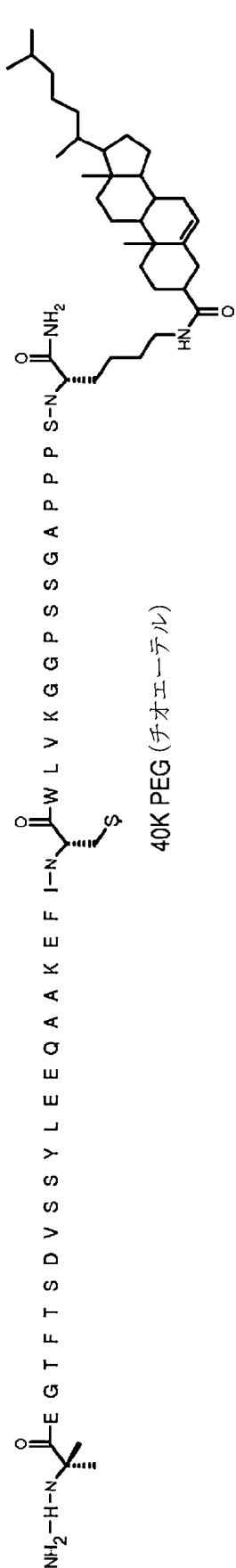
20

30

40

50

安定した結合を介してコレステロールに結合する G L P - 1 を基にしたグルカゴンスーパーファミリーのペプチドの非限定的な例を、以下に示す（配列番号 1 6 6 0 ~ 1 6 6 1 ）。



40K PEG (チオエーテル)



10

20

30

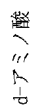
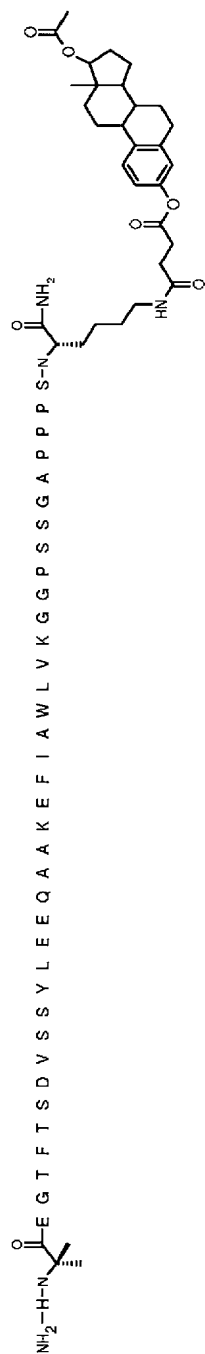
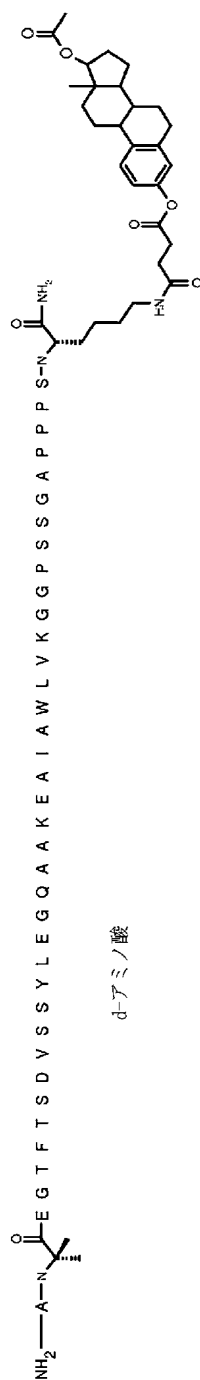
40

50

40







d-アミノ酸

40



10

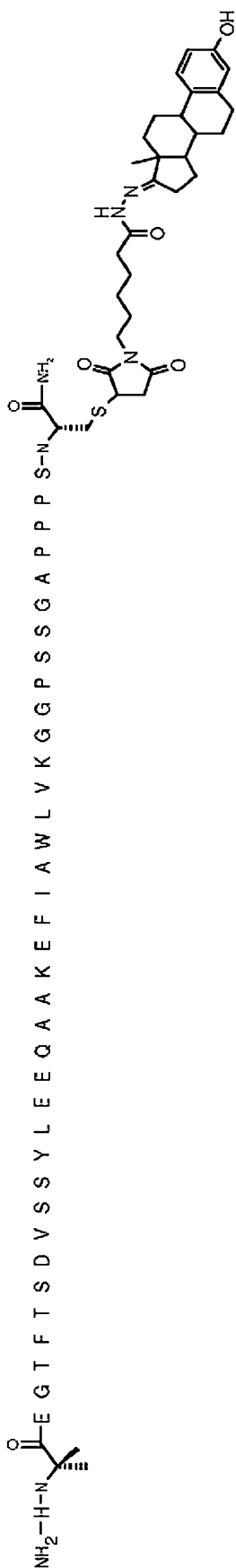
20

30

40

## 【 0 8 0 8 】

酸感受性の結合を介してエストラジオールに結合する G L P - 1 を基にしたグルカゴンスーパーファミリーのペプチドの非限定的な例を、以下に示す（配列番号 1 6 6 2 ）。



10

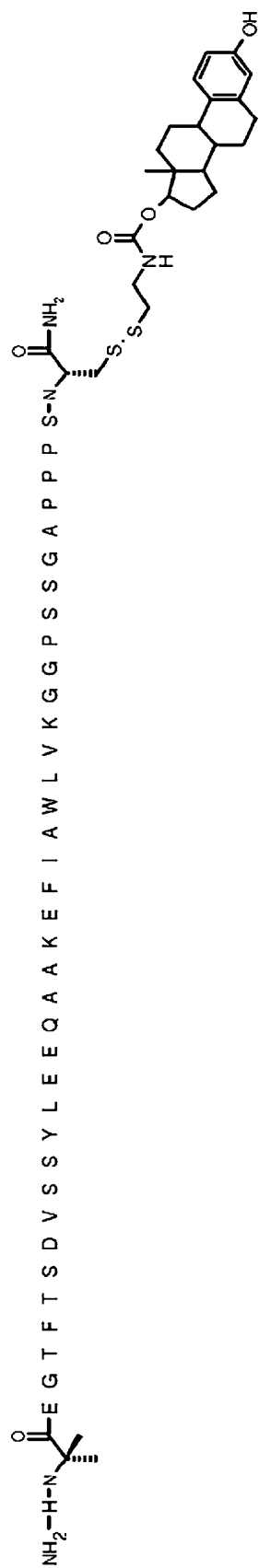
20

30

40

50

還元感受性の結合を介してエストラジオールに結合する G L P - 1 を基にしたグルカゴンスーパーファミリーのペプチドの非限定的な例を、以下に示す（配列番号 1 6 6 3 - 1 6 6 4 ）。



10

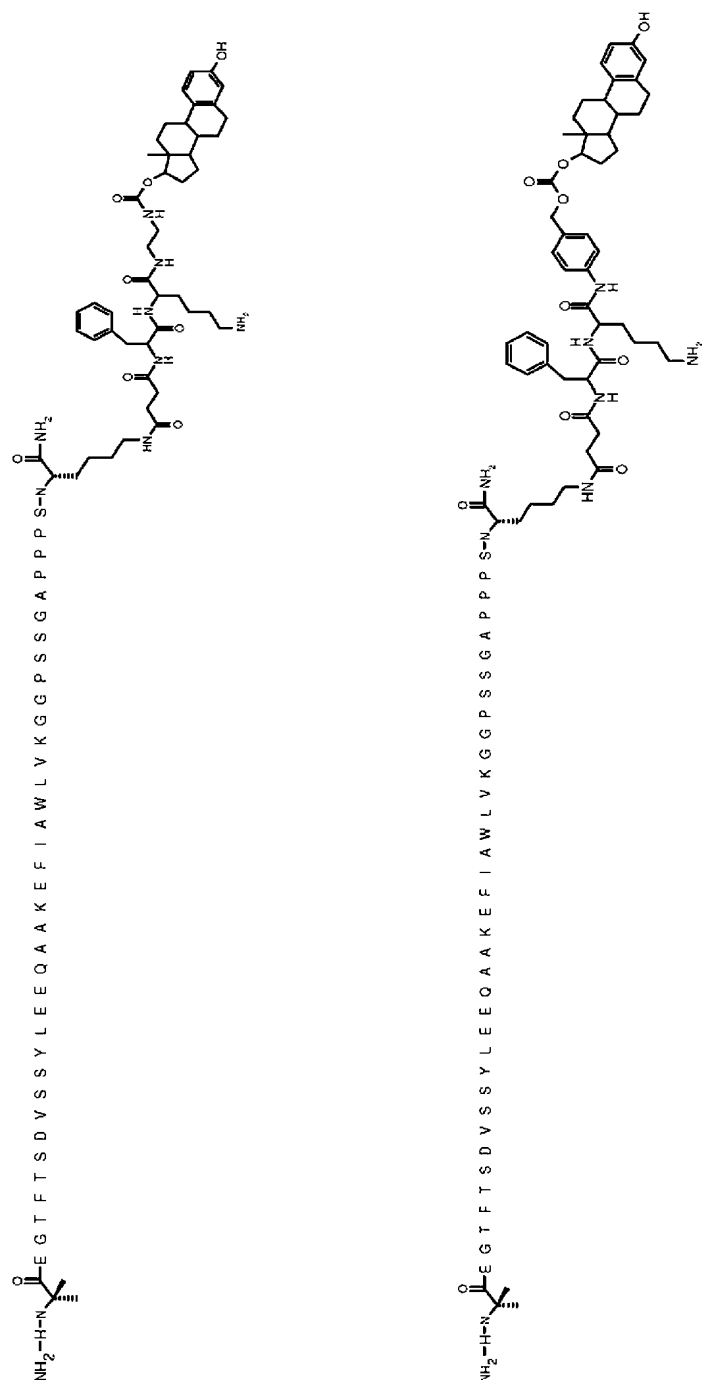
20

30

40

50

酵素感受性の結合を介してエストラジオールに結合する G L P - 1 を基にしたグルカゴンスーパーファミリーのペプチドの非限定的な例を、以下に示す（配列番号 1 6 6 5、1 6 6 8）。



10

20

30

40

#### 【0811】

いくつかの実施形態では、配列番号 1 ~ 7 6 0、8 0 1 ~ 9 1 9、1 0 0 1 ~ 1 2 7 5、1 3 0 1 ~ 1 3 7 1、1 4 0 1 ~ 1 5 1 8、1 6 0 1 ~ 1 6 4 6 のうちのいずれも、上記の例示としての実施形態での配列番号 1 6 4 7 ~ 1 6 5 0 に代えることができる。

#### 【0812】

本明細書に示すデータは、本発明のグルカゴンスーパーファミリーのペプチド（Q）およびエストロゲン（Y）を有する結合体が、相乗的な薬理学作用を有することを確認するものである。これらの結合体の Q 部分は、従来の婦人科学的組織から離れて、結合体のエ

50

ストロゲン部分に所望の作用を標的させ、さらに高い治療指数で血糖コントロールおよびエネルギーの恒常性を改善するよう作用できる。

【0813】

膵臓の $\beta$ 細胞の機能障害は、インスリンの生合成と分泌が損なわれることに加えて、慢性のグルコースおよび脂質酸化（糖脂肪毒性）に起因する $\beta$ 細胞のアポトーシスによる機能的な質量の減少と、代償性の機能亢進（ERストレス）とが組み合わさることを特徴とする。2型糖尿病は、 $\beta$ 細胞の機能障害に続いて生じるため、インスリン産生 $\beta$ 細胞をアポトーシスから保護し、あるいは、 $\beta$ 細胞の機能的な質量を回復させるための戦略は、2型糖尿病の治療に介入する主要な機会となる。

【0814】

エストロゲンは、齧歯類およびヒトの $\beta$ 細胞ならびに、体内の他の標的組織で、強い抗アポトーシス性作用を有する。脂質生成を抑制し、インスリン感受性を回復させる、肝臓におけるエストロゲンの膵臓外での機能は、間接的に $\beta$ 細胞の機能を改善できる。また、エストロゲンは、視床下部にも作用し、食物摂取量を減らしてエネルギー消費を増やす。しかしながら、エストロゲンによるこれらの作用は、婦人科学的標的組織では有害となり得る。これは、ホルモン交換療法が乳癌の発生率を高めることがわかっているためである。特定の理論に拘泥することなく、エストロゲンの作用を、 $\beta$ 細胞、肝臓および/または視床下部に選択的に向けることには、利点があり得る。

【0815】

エストロゲンの臨床への応用は、それによる発癌の可能性と婦人科学的な作用がゆえに、かぎられている。エストロゲンの治療指数を高めるには、本発明のインクレチンを基にした結合体を用いると、胸部および子宮内膜組織への作用を最小限に抑えつつ、所望の組織にエストロゲンを優先的に標的できるようになる。本明細書の実施例に示すデータは、グルカゴンスーパーファミリーのペプチドとエストロゲンとの結合体が、膵臓の $\beta$ 細胞でのインスリン分泌活性とタンパク質同化活性が視床下部での食欲を抑える作用と組み合わせることで、血糖コントロール（グルコース濃度の低下などを基準に判断できる）およびエネルギーの恒常性（体重および/または体脂肪量の減少などを基準に判断できる）に対して相乗的かつ有益な作用を持つことを証明するものである。

【0816】

結合体の各構成要素（GLP-1部分およびエストロゲン部分など）が血糖および体重を調節する機能を調べるために、血漿中への差次的なエストロゲン放出を可能にするリンカー化学（安定、不安定、準安定）を用いて、*in vitro*が0.1%未満から100%を超えるまでの範囲のGLP-1活性化作用を網羅するよう、一組のペプチド-エストロゲン結合体を合成した。安定した臨床形態から、エストロゲンを数時間以内に放出する他の形態まで、広い範囲内で変化するエストロゲンの特定の放出を判断した。

【0817】

たとえば、食餌で誘導した肥満マウスでは、エストロゲンが安定して結合した完全に活性のあるGLP-1アゴニストのほうが、これに匹敵するGLP-1対照よりも、一貫して、血糖および体重を落とす上で効果的であることが示された。安定のエストロゲン-ペプチド結合体は、卵巣を摘出したマウスで子宮に効果のある活性がないことを基準に判断できる、従来のエストロゲン活性を欠いていることが示されたのに対し、不安定なエストロゲン-ペプチド結合体は、子宮に栄養活性を示した。GLP-1活性化作用をノックアウトしたおよび/または血漿中でエストロゲン不安定性にした化学的な誘導体では、安定したGLP-1/エストロゲン結合体よりも効果が低く、GLP-1と標的のエストロゲンが組み合わせで存在することで、グルコースおよび体重を低減させる作用を高められることがわかる。

【0818】

調製された「準」安定のペプチド-エストロゲン結合体は、血漿中では安定であるが、細胞内移行時にエストロゲンを放出できる。これらの準安定の結合を有するグルカゴンスーパーファミリーのペプチド/エストロゲン結合体は、子宮に対する有害な活性がない状

10

20

30

40

50

態で、不安定な結合を有する結合体よりもグルコース濃度を下げて体重を減らすことができた。

#### 【0819】

エストロゲンに安定または準安定的に結合したグルカゴンスーパーファミリーのペプチドでは、肥満で糖尿病ではないマウスにおいて、適切な対照との比較で、一貫して体重、食物摂取量および体脂肪量における有効性が高くなることが証明された。このような有効性の上昇は、エストロゲンが薬理的に不安定な結合体には見られず、グルカゴンスーパーファミリーのペプチドを意図的に不活性にした結合体でも観察されない。エストロゲンをグルカゴンスーパーファミリーのペプチドに安定および準安定に結合すると、不安定な結合体に比してエストロゲン活性が差次的に欠如し、不安定な結合体とは対照的に、子宮の成長も認められなかった。まとめると、これらの所見は、肥満で代謝的に代償性のマウスにおいて、エストロゲンの医療用途を制限する従来のエストロゲンの作用の形跡なく、本発明の安定および準安定に結合したグルカゴンスーパーファミリーのペプチド/エストロゲン結合体を用いて、有効性を高められることを示すものである。

10

#### 【0820】

例示としての実施形態では、結合体は、高血糖の病状、肥満、メタボリックシンドローム、NAFLDを含むがこれらに限定されるものではない、本明細書に記載のいずれの状態の治療にも有用である。

#### 薬学的組成物

##### 塩

20

#### 【0821】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のQ-L-Y結合体は、薬学的に許容される塩などの塩の形態である。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される塩」という表現は、親化合物の生物学的活性を保持し、かつ、生物学的にまたはそれ以外に望ましくない点のない化合物の塩を示す。このような塩は、結合体の最終的な単離および精製時にin situにて調製可能であるか、あるいは、遊離塩基官能基を好適な酸と反応させることで、別途調製される。本明細書に開示する化合物の多くは、アミノ基および/またはカルボキシ基またはこれらに類する基が存在することで、酸性塩および/または塩基性塩を形成可能である。

#### 【0822】

薬学的に許容される酸付加塩を、無機酸および有機酸から調製してもよい。代表的な酸付加塩として、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、クエン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、硫酸水素塩、酪酸塩、カンファー酸塩、カンファースルホン酸塩、ニグロコン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、フマル酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩（イソチオシアン酸塩）、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、シュウ酸塩、バルミトエート、ベクチニン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、リン酸塩、グルタミン酸塩、炭酸水素塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩などがあげられるが、これらに限定されるものではない。無機酸から誘導される塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などがあげられる。有機酸から誘導される塩としては、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエン-スルホン酸、サリチル酸などがあげられる。薬学的に許容される酸付加塩を形成するのに使用可能な酸の例として、たとえば、無機酸（塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸など）、有機酸（シュウ酸、マレイン酸、コハク酸、クエン酸など）があげられる。

30

40

#### 【0823】

塩基付加塩も、サリチル酸のソースの最終的な単離および精製時にin situにて調製可

50



能であるか、あるいは、カルボン酸含有部分を、薬学的に許容される金属カチオンの水酸化物、炭酸塩または炭酸水素塩などの好適な塩基と反応させるか、アンモニアまたは一級、二級または三級の有機アミンと反応させることで調製可能である。薬学的に許容される塩として、アルカリ金属またはアルカリ土類金属を基にしたカチオン（リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム塩など）、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアンモニウム、ジメチルアンモニウム、トリメチルアンモニウム、トリエチルアンモニウム、ジエチルアンモニウム、エチルアンモニウムをはじめとする無毒の四級アンモニアおよびアミンカチオンなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。塩基付加塩の形成に有用な他の代表的な有機アミンとして、たとえば、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペリジン、ピペラジンなどがあげられる。有機塩基から誘導される塩としては、第1級アミンの塩、第2級アミンの塩、第3級アミンの塩があげられるが、これらに限定されるものではない。

10

#### 【0824】

さらに、本開示の結合を用いて、基本的な窒素含有基をメチル、エチル、プロピル、ブチル・クロリド、ブロミド、ヨージドなどの低級ハロゲン化アルキル；デシル、ラウリル、ミリスチル、ステアリル・クロリド、ブロミド、ヨージドなどの長鎖ハロゲン化物；ベンジルおよびフェネチルブロミドなどのアリールハロゲン化アルキルとし、第四級化することが可能である。水溶性または油溶性または分散可能な生成物を、このようにして得る。

20

#### 調製物

#### 【0825】

いくつかの実施形態によれば、本開示のQ - L - Y結合体またはその薬学的に許容される塩と、薬学的に許容されるキャリアとを含む、薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は、酸性化剤、添加剤、吸着剤、エアロゾル噴霧剤、空気置換剤、アルカリ化剤、固化防止剤、抗凝固剤、抗菌防腐剤、抗酸化剤、抗腐食剤、基剤、バインダー、緩衝剤、キレート化剤、コーティング剤、着色剤、乾燥剤、洗浄剤、希釈剤、殺菌消毒剤、崩壊剤、分散剤、溶解促進剤、染色剤、軟化剤、乳化剤、乳化安定剤、フィラー、成膜剤、香気増強剤、香味剤、流動促進剤、ゲル化剤、造粒剤、保湿剤、潤滑剤、粘着付与剤、軟膏基剤、軟膏、油性担体、有機塩基、トローチ基剤、顔料、可塑剤、研磨剤、防腐剤、金属イオン封鎖剤、皮膚浸透剤、可溶化剤、溶媒、安定化剤、坐剤の基剤、表面活性剤、界面活性剤、懸濁剤、甘味剤、治療剤、濃化剤、等張化剤、毒性剤、増粘剤、吸水剤、水混和性共溶媒、軟水化剤または湿潤剤などの薬学的に許容される成分を含むものであってもよい。

30

#### 【0826】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、以下の成分のうちの1つまたは組み合わせを含む：アカシア、アセスルファムカリウム、アセチルクエン酸トリブチル、アセチルクエン酸トリエチル、寒天、アルブミン、アルコール、無水アルコール、変性アルコール、希アルコール、アロイリチン酸、アルギン酸、脂肪族ポリエステル、アルミナ、水酸化アルミニウム、ステアリン酸アルミニウム、アミロペクチン、 $\alpha$ -アミロース、アスコルビン酸、アスコルビルパルミタート、アスパルテム、注射用静菌水、ベントナイト、マグマベントナイト、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、安息香酸、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロノポール、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチルパラベン、ブチルパラベンナトリウム、アルギン酸カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、炭酸カルシウム、シクラミン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム（無水物、anhydrous）、リン酸水素カルシウム（無水物、dehydrate）、第三リン酸カルシウム、プロピオン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、ソルビン酸カルシウム、ステアリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、硫酸カルシウム半水和物、キャノーラ油、カルボマー、二酸化炭素、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、 $\beta$ -カロテン、カラギーナン、ひまし油、硬化ひまし油、カチオン性乳化ワックス、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、エチルセルロース、微結晶セ

40

50

ルロース、粉末セルロース、ケイ化微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、セトステアリアルアルコール、セトリミド、セチルアルコール、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、コレステロール、酢酸クロルヘキシジン、グルコン酸クロルヘキシジン、塩酸クロルヘキシジン、クロロジフルオロエタン（H C F C）、クロロジフルオロメタン、クロロフロオロカーボン（C F C）クロロフェノキシエタノール、クロロキシレノール、コーンシロップ固体、無水クエン酸、クエン酸一水和物、カカオバター、着色料、コーン油、綿実油、クレゾール、m - クレゾール、o - クレゾール、p - クレゾール、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、シクラミン酸、シクロデキストリン、デキストレート、デキストリン、ブドウ糖、ブドウ糖（無水物）、ジアゾリジニル尿素、フタル酸ジブチル、セバシン酸ジブチル、ジエタノールアミン、フタル酸ジエチル、ジフルオロエタン（H F C）、ジメチル -  $\beta$  - シクロデキストリン、Captisol（登録商標）などのシクロデキストリンタイプの化合物、ジメチルエーテル、フタル酸ジメチル、エデト酸二カリウム、エデト酸二ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、ドクサートカルシウム、ドクサートカリウム、ドクサートナトリウム、没食子酸ドデシル、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、エデト酸カルシウム二ナトリウム、エデト酸、エグルミン、エチルアルコール、エチルセルロース、没食子酸エチル、ラウリン酸エチル、エチルマルトール、オレイン酸エチル、エチルパラベン、エチルパラベンカリウム、エチルパラベンナトリウム、エチルバニリン、フルクトース、フルクトース液、粉碎フルクトース、フルクトース（滅菌済）、粉末フルクトース、フマル酸、ゼラチン、グルコース、液体グルコース、飽和植物脂肪酸のグリセリド混合物、グリセリン、ベヘン酸グリセリル、モノオレイン酸グリセリル、モノステアリン酸グリセリル、自己乳化型モノステアリン酸グリセリル、パルミトステアリン酸グリセリル、グリシン、グリコール、グリコフロール、グアーガム、ヘプタフルオロプロパン（H F C）、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、高フルクトースシロップ、ヒト血清アルブミン、炭化水素（H C）、希塩酸、硬化植物油およびそのタイプ I E、ヒドロキシエチルセルロース、2 - ヒドロキシエチル -  $\beta$  - シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、2 - ヒドロキシプロピル -  $\beta$  - シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、イミド尿素、インジゴカルミン、イオン交換体、酸化鉄、イソプロピルアルコール、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、等張食塩水、カオリン、乳酸、ラクチトール、ラクトース、ラノリン、ラノリンアルコール、ラノリン（無水物）、レシチン、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、炭酸マグネシウム、正炭酸マグネシウム、炭酸マグネシウム（無水物）、炭酸水酸化マグネシウム、水酸化マグネシウム、ラウリル硫酸マグネシウム、酸化マグネシウム、ケイ酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、トリケイ酸マグネシウム、トリケイ酸マグネシウム（無水物）、リンゴ酸、麦芽、マルチトール、マルチトール溶液、マルトデキストリン、マルトール、マルトース、マンニトール、中鎖トリグリセリド、メグルミン、メントール、メチルセルロース、メチルメタクリレート、オレイン酸メチル、メチルパラベン、メチルパラベンカリウム、メチルパラベンナトリウム、微結晶セルロースおよびカルボキシメチルセルロースナトリウム、鉍物油、軽鉍物油、鉍物油 / ラノリンアルコール組成物、油、オリーブ油、モノエタノールアミン、モンモリロナイト、没食子酸オクチル、オレイン酸、パルミチン酸、パラフィン、ピーナッツ油、ワセリン、ワセリン / ラノリンアルコール組成物、医薬用つや出しコーティング液、フェノール、液状フェノール、フェノキシエタノール、フェノキシプロパノール、フェニルエチルアルコール、酢酸フェニル水銀、ホウ酸フェニル水銀、硝酸フェニル水銀、ポラクリリン、ポラクリリンカリウム、ポロキサマー、ポリデキストロース、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、ポリアクリレート、ポリエチレン - ポリオキシプロピレン - ブロックポリマー、ポリメタクリレート、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンひまし油誘導体、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオキシエチレン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、アルギン酸カリウム、安息香酸カリウム、炭酸水素カリウム、亜硫酸水素カリウム、塩化カリウム、ク

10

20

30

40

50

エン酸カリウム、クエン酸カリウム（無水物）、リン酸水素カリウム、ピロ亜硫酸カリウム、リン酸二水素カリウム、プロピオン酸カリウム、ソルビン酸カリウム、ポビドン、プロパノール、プロピオン酸、炭酸プロピレン、プロピレングリコール、アルギン酸プロピレングリコール、没食子酸プロピル、プロピルパラベン、プロピルパラベンカリウム、プロピルパラベナトリウム、プロタミンスルファート、ナタネ油、リンゲル液、サッカリン、サッカリンアンモニウム、サッカリンカルシウム、サッカリンナトリウム、ベニバナ油、サポナイト、血清タンパク質、ゴマ油、コロイドシリカ、コロイド状二酸化アンモニウム、アルギン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム（無水物、anhydrous）、クエン酸ナトリウム（無水物、dehydrate）、塩化ナトリウム、シクラミン酸ナトリウム、EDTAのナトリウム塩、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム（二塩基）、リン酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム（三塩基）、プロピオン酸ナトリウム（無水物）、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、フマル酸ステアリルナトリウム、亜硫酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビタンエステル（ソルビタン脂肪酸エステル）、ソルビトール、ソルビトール液70%、ダイズ油、鯨蠟、スターチ、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルファ化デンプン、滅菌可能なトウモロコシデンプン、ステアリン酸、精製ステアリン酸、ステアリルアルコール、スクロース、糖、錠剤圧縮形成用糖、粉砂糖、徐放剤用糖、転化糖、糖タブ、サンセットイエローFCF、合成パラフィン、タルク、酒石酸、タートラジン、テトラフルオロエタン（HFC）、カカオ油、チメロサル、二酸化チタン、アルファトコフェロール、トコフェロール酢酸エステル、 $\alpha$ 型ビタミンE、 $\beta$ -トコフェロール、 $\delta$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール、トラガント、トリアセチン、クエン酸トリブチル、トリエタノールアミン、クエン酸トリエチル、トリメチル- $\beta$ -シクロデキストリン、臭化トリメチルテトラデシルアンモニウム、トリスバッファー、EDTAの三ナトリウム塩、バニリン、タイプIの硬化植物油、水、軟水、硬水、二酸化炭素を含まない水、滅菌水、注射用水、吸入用滅菌水、注射用滅菌水、灌水用滅菌水、ワックス、アニオン性乳剤用蠟、カルナバワックス、カチオン性乳化ワックス、セチルエステルワックス、マイクロクリスタリンワックス、非イオン性乳剤用蠟、坐剤用蠟、白蠟、黄蠟、白色ワセリン、羊毛蠟、キサンタンガム、キシリトール、ゼイン、プロピオン酸亜鉛、亜鉛塩、ステアリン酸亜鉛あるいは、Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000)（その内容全体を本明細書に援用する）に記載の賦形剤。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)（その内容全体を本明細書に援用する）には、薬学的に許容される組成物を調製するのに用いられるさまざまな成分ならびに、これを調製するための周知の技術が開示されている。従来の薬剤が薬学的組成物と不適合ではないかぎり、これを薬学的組成物に用いることも考えられている。補助的な活性成分を組成物に取り込むことも可能である。

10

20

30

40

50

**【0827】**

いくつかの実施形態では、上記の成分（単数または複数）は、薬学的組成物中に、たとえば少なくともAなど、どのような濃度で存在してもよい。ここで、Aは、0.0001% w/v、0.001% w/v、0.01% w/v、0.1% w/v、1% w/v、2% w/v、5% w/v、10% w/v、20% w/v、30% w/v、40% w/v、50% w/v、60% w/v、70% w/v、80% w/vまたは90% w/vである。いくつかの実施形態では、上記の成分（単数または複数）は、薬学的組成物中に、たとえば、最大でBなど、どのような濃度で存在してもよい。ここで、Bは、90% w/v、80% w/v、70% w/v、60% w/v、50% w/v、40% w/v、30% w/v、20% w/v、10% w/v、5% w/v、2% w/v、1% w/v、0.1% w/v、0.001% w/vまたは0.0001%である。他の実施形態では、上記の成分（単数または複数）は、薬学的組成物中に、たとえば約Aから約Bなど、どのような濃度の範囲で存在してもよい。いくつかの実施形態では、Aは0.0001%、Bは90%である。

## 【0828】

薬学的組成物を、生理的に適応可能なpHが達成されるように調製してもよい。いくつかの実施形態では、薬学的組成物のpHは、処方と投与経路とに応じて、少なくとも5、少なくとも5.5、少なくとも6、少なくとも6.5、少なくとも7、少なくとも7.5、少なくとも8、少なくとも8.5、少なくとも9、少なくとも9.5、少なくとも10または少なくとも10.5、最大でpH11(11を含む)であればよい。特定の実施形態では、薬学的組成物は、生理的に適応可能なpHを達成するための緩衝剤を含むものであってもよい。緩衝剤は、リン酸バッファー(PBSなど)、トリエタノールアミン、トリス、ピシン、TAPS、トリシン、HEPES、TES、MOPS、PIPES、カコジル酸、MESなど、所望のpHで緩衝作用のあるどのような化合物を含むものであってもよい。特定の実施形態では、バッファーの強度は少なくとも0.5mM、少なくとも1mM、少なくとも5mM、少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも30mM、少なくとも40mM、少なくとも50mM、少なくとも60mM、少なくとも70mM、少なくとも80mM、少なくとも90mM、少なくとも100mM、少なくとも120mM、少なくとも150mMまたは少なくとも200mMである。いくつかの実施形態では、バッファーの強度は300mM以下(たとえば、最大で200mM、最大で100mM、最大で90mM、最大で80mM、最大で70mM、最大で60mM、最大で50mM、最大で40mM、最大で30mM、最大で20mM、最大で10mM、最大で5mM、最大で1mM)である。

10

投与経路

20

## 【0829】

投与経路についての以下の記述は、単に例示としての実施形態を示すためのものであり、いかなる形でも範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

## 【0830】

経口投与に適した調製物は、(a)有効量の本開示の結合体を、希釈剤(水、生理食塩水またはオレンジ果汁など)に溶解させたものなどの液体溶液；(b)あらかじめ定められた量の活性成分を、固体または顆粒として各々含有する、カプセル、サシェ、錠剤、薬用キャンディおよびトローチ；(c)粉末；(d)適切な液体を用いた懸濁液；および(e)好適なエマルションからなるものであってもよい。液体調製物は、薬学的に許容される界面活性剤を添加して、あるいは添加せずに、水およびアルコール(エタノール、ベンジルアルコール、ポリエチレンアルコールなど)などの希釈剤を含むものであってもよい。カプセル形態は、界面活性剤、潤滑剤、不活性フィラー、たとえばラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプンなどを含有する、通常の硬カプセルまたは軟カプセルのゼラチンタイプであってもよい。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸、微結晶セルロース、アカシア、ゼラチン、グアーガム、コロイド状二酸化アンモニウム、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸ならびに、他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、湿潤剤、防腐剤、香味剤および他の薬理学的に適応可能な賦形剤のうち、1つまたは2つ以上を含むものであってもよい。薬用キャンディの形態は、本開示の結合体を、通常はスクロース/アカシアまたはトラガントであるフレーバーに含むものであってもよい、ならびに、ゼラチン/グリセリンまたはスクロース/アカシア、エマルション、ゲルなどの不活性基剤に本開示の結合体を含み、これに加えて当分野で知られているような賦形剤も含有するトローチであってもよい。

30

40

## 【0831】

本開示の結合体は、単独または他の好適な成分との組み合わせで、経肺投与での送達が可能であり、これを吸入投与用のエアロゾル調製物にすることも可能である。これらのエアロゾル調製物を、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などのacceptableな高圧ガスに入れてもよい。また、ネブライザーまたはアトマイザーに入れるなど、非圧縮成型のための医薬として調製してもよい。このような噴霧調製物は、粘膜への噴霧にも

50

使用できるものである。いくつかの実施形態では、結合体を粉末ブレンドまたは微粒子またはナノ粒子に調製する。好適な経肺調製物は、当分野で知られている。たとえば、Qian et al., Int J Pharm 366: 218-220 (2009); Adjei and Garren, Pharmaceutical Research, 7(6): 565-569 (1990); Kawashima et al., J Controlled Release 62(1-2): 279-287 (1999); Liu et al., Pharm Res 10(2): 228-232 (1993); 国際特許出願公開第WO 2007/133747号および国際特許出願公開第WO 2007/141411号を参照のこと。

#### 【0832】

非経口投与に適した調製物として、抗酸化剤、バッファー、静菌剤、溶質を含有することが可能な、調製物と想定レシipientの血液とを等張にする水性および非水性の等張滅菌注射溶液ならびに、懸濁剤、可溶化剤、濃化剤、安定化剤、防腐剤を含み得る、水性および非水性の滅菌懸濁液があげられる。「非経口」という用語は、消化管を経由せず、皮下、筋肉内、脊髄内または静脈内など、他の何らかの経路によることを意味する。本開示の結合体は、薬学的キャリアにて、生理的に許容可能な希釈剤と一緒に投与可能なものである。この希釈剤としては、滅菌した液体または液体混合物、たとえば、水、生理食塩水、ブドウ糖液、関連の糖液、エタノールまたはヘキサデシルアルコールなどのアルコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、2,2-ジメチル-1,5,3-ジオキソラン-4-メタノールなどのケタール、エーテル、ポリ(エチレングリコール)400、油、脂肪酸、脂肪酸エステルまたはグリセリドまたはアセチル化脂肪酸グリセリド(石鹸または洗浄剤などの薬学的に許容される界面活性剤を添加するか、あるいは添加しない)、ペクチンなどの懸濁剤、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースまたは乳化剤および他の薬学的アジュバントなどがあげられる。

10

20

#### 【0833】

非経口調製物に使用可能な油として、石油、動物油、植物油または合成油があげられる。油の具体例として、ピーナッツ油、ダイズ油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ油、ワセリン、鉱物油があげられる。非経口調製物に用いられる好適な脂肪酸として、オレイン酸、ステアリン酸、イソステアリン酸があげられる。オレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピルが、好適な脂肪酸エステルの例である。

30

#### 【0834】

非経口調製物に用いられる好適な石鹸として、脂肪酸アルカリ金属、アンモニウム、トリエタノールアミン塩があげられ、好適な洗浄剤としては、(a)たとえば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライド、アルキルピリジニウムハライドなどのカチオン性洗浄剤、(b)たとえば、アルキル、アリールおよびスルホン酸オレフィン、アルキル、オレフィン、エーテルおよび硫酸モノグリセリド、スルホコハク酸塩などのアニオン性洗浄剤、(c)たとえば、脂肪族アミノオキシド、脂肪族アルカノイルアミド、ポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマーなどの非イオン性洗浄剤、(d)たとえば、アルキル-β-アミノプロピオネート、2-アルキル-イミダゾリン四級アンモニウム塩などの両性洗浄剤、(e)これらの混合物があげられる。

40

#### 【0835】

非経口調製物は一般に、約0.5重量%~約25重量%の本開示のQ-L-Y結合体を溶液で含有する。防腐剤とバッファーを使用してもよい。注射部位での刺激を最小限に抑えるか、あるいはなくすために、このような組成物は、親水性・親油性のバランス(HLB)が約12~約17の1種類または2種類以上の非イオン性界面活性剤を含有するものであってもよい。このような調製物に含まれる界面活性剤の量は一般に、約5重量%~約15重量%の範囲になる。好適な界面活性剤としては、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル(モノオレイン酸ソルビタンなど)ならびに、プロピレンオキシドをプロピレングリコールと縮合させて形成される、疎水性塩基を有するエチレンオキシドの高分子量付加物があげられる。非経口調製物は、アンプルおよびバイアルなどの単位用量または複数用量の密閉容器に入れて提供可能であり、注射用の滅菌された液体賦形剤(水な

50

ど)を使用直前に加えるだけでよい、フリーズドライ(凍結乾燥)状態で保管可能である。即時注射液および懸濁液を、上述したような種類の滅菌した粉末、顆粒および錠剤から調製することも可能である。

#### 【0836】

注射可能な調製物は、本発明によるものである。注射可能な組成物用の有効な薬学的キャリアの要件は、当業者らに良く知られている(たとえば、Pharmaceuticals and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982)およびASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)を参照のこと)。

#### 【0837】

また、乳化用基剤または水溶性基剤などの多岐にわたる基剤と混合して、本開示の結合体を直腸投与用の坐剤にしてもよい。経膣投与に適した調製物は、活性成分に加えて、適切であることが当分野で知られているキャリアを含有する、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたはスプレー調製物として提供可能なものである。

#### 【0838】

上述した薬学的組成物に加えて、本開示の結合体を、シクロデキストリン包接錯体またはリポソームなどの包接錯体として調製してもよいことは、当業者であれば理解できるであろう。

#### 用量

#### 【0839】

本開示のQ-L-Y結合体は、グルカゴン受容体活性化作用、GLP-1受容体の活性化作用、GIP受容体の活性化作用、グルカゴン受容体/GLP-1受容体二重活性化作用、グルカゴン受容体/GIP受容体二重活性化作用、GLP-1受容体/GIP受容体二重活性化作用またはグルカゴン受容体/GLP-1受容体/GIP受容体三重活性化作用が何らかの役割を果たす疾患または病状を治療する方法において有用であると思われる。本開示の目的で、本開示の結合体の投与量または用量は、たとえば、治療対象者または動物で、相応の時間にわたって治療応答または予防応答を得られるだけの十分なものでなければならない。たとえば、本開示の結合体の用量は、投与時点から起算して、約1分～約4分、約1時間～約4時間または約1週間～4週間またはそれより長く、たとえば、5～20週間またはそれより多くの週、本明細書に記載するように細胞からcAMPの分泌を刺激するのに十分あるいは、哺乳動物の血中グルコース濃度、脂肪濃度、食物摂取量または体重を低下させるのに十分な量でなければならない。特定の実施形態では、期間をさらに長くすることができる。用量については、本開示の特定の結合体の有効性ならびに、動物の状態(ヒトなど)、治療対象となる動物(ヒトなど)の体重に応じて判断されることになる。

#### 【0840】

投与量を判断するための多くのアッセイが、当分野で知られている。本明細書の目的で、異なる用量の結合体を与える哺乳動物の組において、一定用量の本開示の結合体を哺乳動物に投与したときに血中グルコース濃度が低下する度合いを比較することを含むアッセイを用いて、哺乳動物に投与する開始用量を判断することができる。特定用量の投与時に血中グルコース濃度が低下する度合いを、当分野で知られた方法(たとえば、本明細書の実施例セクションで説明するものを含む)でアッセイすることも可能である。

#### 【0841】

本開示の結合体の用量は、本開示の特定の結合体を投与することに伴って生じ得る有害作用の有無、性質、度合いによって決まることもある。一般に、対象患者を治療するのに用いられる本開示の結合体の投薬量は、年齢、体重、全身の健康状態、食事、性別、投与対象となる本開示の結合体、投与経路、治療対象となる状態の重症度などの多岐にわたる要因を考慮して、担当医師が決定することになる。本発明を限定する意図のない例として、本開示の結合体の用量は、約0.0001～約1g/kg治療対象者の体重/日、約0.0001～約0.001g/kg体重/日または約0.01mg～約1g/kg体重/

10

20

30

40

50

日であってもよい。

【0842】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に開示のいずれかの結合体を、患者への投与に適した純度レベルで含むものである。いくつかの実施形態では、結合体は、純度レベルが少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%であり、薬学的に許容される希釈剤、キャリアまたは賦形剤を有する。いくつかの態様における薬学的組成物は、本開示の結合体を、少なくともAの濃度で含み、ここで、Aは約0.001mg/ml、約0.01mg/ml、約0.1mg/ml、約0.5mg/ml、約1mg/ml、約2mg/ml、約3mg/ml、約4mg/ml、約5mg/ml、約6mg/ml、約7mg/ml、約8mg/ml、約9mg/ml、約10mg/ml、約11mg/ml、約12mg/ml、約13mg/ml、約14mg/ml、約15mg/ml、約16mg/ml、約17mg/ml、約18mg/ml、約19mg/ml、約20mg/ml、約21mg/ml、約22mg/ml、約23mg/ml、約24mg/ml、約25mg/mlまたはそれより高い。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、結合体を、最大Bの濃度で含み、ここで、Bは、約30mg/ml、約25mg/ml、約24mg/ml、約23mg/ml、約22mg/ml、約21mg/ml、約20mg/ml、約19mg/ml、約18mg/ml、約17mg/ml、約16mg/ml、約15mg/ml、約14mg/ml、約13mg/ml、約12mg/ml、約11mg/ml、約10mg/ml、約9mg/ml、約8mg/ml、約7mg/ml、約6mg/ml、約5mg/ml、約4mg/ml、約3mg/ml、約2mg/ml、約1mg/mlまたは約0.1mg/mlである。いくつかの実施形態では、組成物は、結合体を、AからBmg/mlの濃度範囲、たとえば、約0.001~約30.0mg/mlで含有する。

10

20

標的形態

【0843】

本開示の結合体の治療の有効性または予防の有効性が、修飾によって高まるように、本開示のQ-L-Y結合体を、いくつかの手段で修飾してもよいことは、当業者であれば容易に理解できるであろう。たとえば、本開示の結合体を、直接的にまたはリンカーを介して間接的に、ターゲットするための部分にさらに結合してもよい。本明細書に記載のグルカゴン結合体などの化合物を、ターゲットするための部分に結合するための実務は、当分野で知られている。たとえば、Wadhwa et al., J Drug Targeting, 3, 111-127 (1995)および米国特許第5,087,616号を参照のこと。「ターゲットするための部分」という表現は、本明細書で使用する場合、ターゲットするための部分が、本開示の結合体を、表面に受容体（グルカゴン受容体、GLP-1受容体）が発現している細胞集団に到達させることができるように、細胞表面受容体の特異的に認識し、これに結合する分子または薬剤を示す。ターゲットするための部分としては、細胞表面受容体（たとえば、上皮増殖因子受容体（EGFR）、T細胞受容体（TCR）、B細胞受容体（BCR）、CD28、血小板由来増殖因子受容体（PDGF）、ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）など）に結合する、抗体またはその断片、ペプチド、ホルモン、増殖因子、サイトカインならびに、他の天然または非天然のリガンドがあげられるが、これらに限定されるものではない。本明細書で使用する場合、「リンカー」とは、2つの別々のものを互いに結合する、結合、分子または分子群である。リンカーは、2つのものの間に最適な間隔を提供するものであってもよいし、あるいは、2つのものを互いに分離できるようにする不安定な結合をさらに提供するものであってもよい。不安定な結合としては、光切断可能な基、酸感受性部分、塩基感受性部分、加水分解可能な基および酵素切断可能な基があげられる。「リンカー」という用語は、いくつかの実施形態では、本開示の結合体をターゲットするための部分に結合する薬剤または分子を示す。リンカーおよび/またはターゲットするための部分が、本開示の結合体に結合したあとは本開示の結合体の機能すなわち、細胞からのcAMPの分泌を刺激し、糖尿病または肥満を治療する機能に干渉しないという条件で、本開示の結合体の機能に必要ではない、本開示の結合体上の部位が、リンカーおよび

30

40

50

／またはターゲットするための部分を結合するのに理想的な部位である旨は、当業者であれば認識している。リンカーおよび／またはターゲットするための部分が、本開示のペプチド（Ｑ）に結合したあとは、本開示のペプチドの機能に干渉しないという条件で、本開示のペプチド（グルカゴンアゴニストのペプチド、グルカゴンアンタゴニストのペプチド、ＧＬＰ－１アゴニストのペプチド、ＧＩＰアゴニストのペプチドまたは上記の任意の組み合わせなど）の機能に必要な、本開示のペプチド（Ｑ）上の部位が、リンカーおよび／またはターゲットするための部分を結合するのに理想的な部位である旨は、当業者であれば認識している。

#### 制御放出調製物

##### 【 0 8 4 4 】

10

あるいは、本開示の結合体を、これを投与する対象となる体内に放出する方法が、時間と体内での位置の点で制御されるように、本明細書に記載のグルカゴン結合体をデポアの形態に修飾してもよい（たとえば、米国特許第 4, 4 5 0, 1 5 0 号を参照のこと）。本開示の結合体のデポア形態は、たとえば、本開示の結合体と多孔性または非多孔性材料（ポリマーなど）を含む移植可能な組成物であってもよく、この場合、本開示の結合体を当該材料によってカプセル化するか、当該材料全体に拡散させるおよび／または非多孔性材料を分解する。このようにした上で、デポアを体内の所望の位置に植込み、そのインプラントから、あらかじめ定められた速度で、本開示の結合体が放出されることになる。

##### 【 0 8 4 5 】

20

特定の態様における薬学的組成物を、任意のタイプの *in vivo* 放出プロファイルを持つように修飾する。いくつかの態様では、薬学的組成物は、時放出調製物、制御放出調製物、持続性放出調製物、長時間放出調製物、遅延放出調製物または二相性放出調製物である。制御放出用のペプチドまたは結合体を調製するための方法は、当分野で知られている。たとえば、Qian et al., J Pharm 374: 46-52 (2009) および国際特許出願公開第 W O 2 0 0 8 / 1 3 0 1 5 8 号、同第 W O 2 0 0 4 / 0 3 3 0 3 6 号；同第 W O 2 0 0 0 / 0 3 2 2 1 8 号；同第 W O 1 9 9 9 / 0 4 0 9 4 2 号を参照のこと。

##### 【 0 8 4 6 】

30

本組成物は、たとえば、ミセルまたはリボソームあるいは、他の何らかのカプセル化形態をさらに含むものであってもよいし、あるいは、保存および／または送達効果を持続するために、長時間放出形態で投与してもよい。ここに開示の薬学的調製物は、たとえば、毎日（１日１回、１日２回、１日３回、１日４回、１日５回、１日６回）、２日に１回、３日に１回、４日に１回、５日に１回、６日に１回、毎週、２週間に１回、３週間に１回、毎月または２か月に１回など、どのような治療計画で投与してもよい。

#### 用途

##### 【 0 8 4 7 】

40

本明細書にて初めて提供された情報に基づいて、本明細書に記載のＱ－Ｌ－Ｙ結合体および関連の薬学的組成物は、たとえば、グルカゴン受容体、ＧＬＰ－１受容体、ＧＩＰ受容体または上記の任意の組み合わせに対する活性の欠如が、疾患または病状の発症および／または進行の一要因であるような場合に、その疾患または病状の治療に有用であると考えられている。したがって、本発明は、患者において、ＧＬＰ－１受容体の活性化および／またはグルカゴン受容体の活性化および／またはＧＩＰ活性化の欠如が、疾患または病状の発症および／または進行に関連している疾患または病状を治療または予防する方法を提供するものである。この方法は、患者に、本明細書に記載したいずれかの結合体を、疾患または病状を治療または予防するのに有効な量で提供することを含む。

##### 【 0 8 4 8 】

50

いくつかの実施形態では、疾患または病状は、メタボリックシンドロームである。メタボリックシンドロームは、メタボリックシンドローム X、インスリン抵抗性症候群または Reaven 症候群としても知られ、5 0 0 0 万人を超える米国人に認められる障害である。メタボリックシンドロームは一般に、以下の危険因子のうち少なくとも 3 つまたは 4 つ以上に該当することの特徴とするものである：（１）腹部肥満（腹部およびその周辺の脂肪組



織が過剰である)、(2)アテローム性脂質異常症(動脈壁へのプラークの蓄積を増やす、高トリグリセリド、高HDLコレステロール、高LDLコレステロールを含む血中脂質値の異常)、(3)血圧上昇、(4)インスリン抵抗性またはグルコース不耐性、(5)血栓形成傾向(たとえば、血中の高フィブリノーゲンまたはプラスミノゲン活性化因子阻害因子-1など)、(6)炎症誘発状態(血中のC反応性タンパク質など)。他の危険因子として、老化、ホルモンのアンバランス、遺伝的素因があげられる。

#### 【0849】

メタボリックシンドロームは、血管プラークの蓄積に関連する冠動脈心疾患ならびに、脳卒中およびアテローム動脈硬化性心血管疾患(ASCVD)と呼ばれる末梢血管疾患などの他の障害の危険性の増加と関連している。メタボリックシンドロームの患者は、初期のインスリン抵抗性状態から完全に打撃を受けたII型糖尿病まで進行し、ASCVDの危険性がさらに高まる。特定の理論に拘泥することなく、インスリン抵抗性、メタボリックシンドローム、血管疾患の関係は、インスリン刺激による血管拡張の障害、酸化ストレスが高まることによるインスリン抵抗性に関連したNO利用率の低下、アディポネクチンなどの脂肪細胞由来のホルモンにおける異常(Leif and Mather, Can. J. Cardiol. 20 (suppl. B):66B-76B (2004))のうちの1つまたは2つ以上が同時に発症することにある。

10

#### 【0850】

2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (ATP II)によれば、同一の対象個体で以下の特徴のうち3つが当てはまる場合に、メタボリックシンドロームの基準を満たすことになる:(a)腹部肥満(ウェスト周りが男性で102cmを超え、女性で88cmを超える);(b)血清トリグリセリド(150mg/dl以上);(c)HDLコレステロール(男性で40mg/dl以下、女性で50mg/dl以下);(d)血圧(130/85以上);(e)空腹時血糖(110mg/dl以上)。世界保健機関(WHO)によれば、以下の基準のうち少なくとも2つが当てはまる、インスリンレベルが高い対象個体(空腹時血糖上昇または食後高血糖単独)は、メタボリックシンドロームの基準を満たす:(a)腹部肥満(ウェスト部と腰部の比が0.9を上回り、肥満度指数が少なくとも30kg/m<sup>2</sup>またはウェスト周りが37インチを超える);(b)コレステロールパネルでトリグリセリドレベルが少なくとも150mg/dlまたはHDLコレステロールが35mg/dl未満;(c)血圧140/90以上または高血圧の治療中)。(Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome," ed. Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com May 11, 2009)。

20

30

#### 【0851】

本明細書の目的で、2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment PanelまたはWHOによって規定された基準の一方または両方を対象個体が満たす場合、その対象個体は、メタボリックシンドロームの状態にあるとみなす。

#### 【0852】

特定の理論に拘泥することなく、本明細書に記載のQ-L-Y結合体は、メタボリックシンドロームを治療するのに有用である。したがって、本発明は、治療対象者で、メタボリックシンドロームを予防または治療する、あるいは、その危険因子のうちの1つ、2つ、3つまたは4つ以上を低減する方法であって、その治療対象者に、本明細書に記載の結合体を、メタボリックシンドロームまたはその危険因子を予防または治療するのに有効な量で与えることを含む、方法が提供される。

40

#### 【0853】

いくつかの実施形態では、この方法は、高血糖の病状を治療する。特定の態様では、高血糖の病状は、糖尿病、糖尿病I型、真性糖尿病II型または妊娠性糖尿病(インスリン依存性または非インスリン依存性)である。いくつかの態様では、この方法は、胃障害、網膜症、血管疾患を含む、糖尿病の1つまたは2つ以上の合併症による高血糖の病状を治療する。

#### 【0854】

50

いくつかの態様では、疾患または病状は肥満である。いくつかの態様では、肥満は、薬物誘発性肥満である。いくつかの態様では、この方法は、患者における体重増加を防止または低減するか、体重減少量を増やすことで、肥満を治療する。いくつかの態様では、この方法は、患者の食欲を抑え、食物摂取量を減らし、脂肪レベルを下げるか、あるいは胃腸管系での食物の移動速度を落とすことで、肥満を治療する。

【0855】

肥満は他の疾患の発症または進行と関連しているため、肥満を治療する方法は、血管疾患（冠動脈疾患、脳卒中、末梢血管疾患、虚血再灌流障害など）、高血圧症、II型糖尿病の発症、高脂血症、筋骨格系疾患をはじめとする肥満に関連する合併症を減らす方法にも有用である。したがって、本発明は、これらの肥満関連合併症を治療または予防する方法を提供するものである。

10

【0856】

いくつかの実施形態では、疾患または病状は、非アルコール性脂肪肝（NAFLD）である。NAFLDは、単純性脂肪肝（脂肪過多症）から非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、肝硬変（不可逆的、肝臓の癒痕化が進行）まで、広い範囲の肝臓疾患を示す。NAFLDのすべての段階で、共通して、肝細胞（肝実質細胞）に脂肪の蓄積（脂肪浸潤）が認められる。単純性脂肪肝は、特定の種類の脂肪すなわちトリグリセリドが肝細胞に異常蓄積するもので、炎症または癒痕化はない。NASHでは、脂肪の蓄積が肝臓でのさまざまな度合いの炎症（肝炎）および癒痕化（線維症）と関連している。炎症細胞が肝細胞を破壊することもある（肝細胞の壊死）。「脂肪性肝炎」および「脂肪壊死（steatonecrosis）」という用語でステアト（steato）は脂肪浸潤を示し、肝炎は肝臓における炎症を示し、壊死は破壊された肝細胞を示す。NASHは、最終的には肝臓の癒痕化（線維症）に、さらには不可逆的かつ進行性の癒痕化（肝硬変）につながることもある。NASHによって生じる肝硬変は、NAFLDのスペクトルで最も重篤な最終段階である。（Mendler, Michel, "Fatty Liver: Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)," ed. Schoenfield, Leslie J., MedicineNet.com August 29, 2005）。

20

【0857】

アルコール性肝疾患またはアルコール誘発肝疾患は、アルコールの過剰摂取に関連するまたはこれによって生じる、病理学的に異なる3種類の肝疾患すなわち、脂肪肝（脂肪過多症）、慢性肝炎または急性肝炎、肝硬変を包含する。アルコール性肝炎は、臨床検査の異常だけが疾患を示す指標である軽度の肝炎から、黄疸（ビリルビンの貯留によって生じる皮膚の黄変）、肝性脳症（肝臓障害による神経の異常）、腹水症（腹部での体液蓄積）、食道静脈瘤の出血（食堂に静脈瘤が生じる）、凝血異常および昏睡などの合併症を伴う重篤な肝臓の機能障害までの範囲に至る。組織学的に、アルコール性肝炎は、肝細胞の風船様腫大による変性、好中球を伴う炎症、ときにはマロリー小体を伴う炎症（細胞の中間径フィラメントタンパク質の異常凝集）という見た目での特徴がある。肝硬変は、解剖学的に、肝臓全体に小結節が生じ、線維症を伴う。（Worman, Howard J., "Alcoholic Liver Disease", Columbia University Medical Centerのウェブサイト）。

30

【0858】

特定の理論に拘泥することなく、本明細書に記載のQ-L-Y結合体は、脂肪過多症、脂肪性肝炎、肝炎、肝臓の炎症、NASH、肝硬変またはこれらの合併症をはじめとするアルコール性肝疾患、NAFLDまたはそのいずれかのステージの治療に有用である。したがって、本発明は、治療対象者において、アルコール性肝疾患、NAFLDまたはそのいずれかのステージを予防または治療する方法であって、治療対象者に、本明細書に記載の結合を、アルコール性肝疾患、NAFLDまたはそのステージを予防または治療するのに効果的な量で提供することを含む。このような治療方法は、以下の1つ、2つ、3つまたは4つ以上の低減を含む：肝脂肪含有量、肝硬変の出現または進行、肝細胞癌の出現、炎症の徴候、たとえば肝酵素レベル（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）および/またはアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）またはLDHなど）の異

40

50

常、血清フェリチン上昇、血清ビリルビン上昇および／または線維症の徴候、たとえば TGF- $\beta$  レベルの上昇。好ましい実施形態では、本明細書に記載の Q-L-Y 結合体を用いて、単純性脂肪肝（脂肪過多症）よりも症状が進行し、炎症または肝炎の徴候が認められる患者を治療する。このような方法を用いると、たとえば、AST レベルおよび／または ALT レベルを下げることができる。

【0859】

GLP-1 およびエキセンディン-4 には、神経保護作用があることがわかっている。本発明は、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、他の脱髄関連障害、老年認知症、皮質下性認知症、動脈硬化性認知症、エイズ関連認知症または他の認知症、中枢神経系のがん、外傷性脳損傷、脊髄損傷、脳卒中または脳虚血、脳血管炎、てんかん、ハンチントン病、トゥレット症候群、ギラン・バレー症候群、ウイルスン病、ピック病、炎症性神経疾患、脳炎、脳脊髄炎または髄膜炎（ウイルス性、真菌性または細菌性）または他の中枢神経系感染症、プリオン病、小脳性運動失調症、小脳変性症、脊髄小脳変性症候群、フリードライヒ運動失調症、毛細血管拡張性運動失調症、脊髄性筋萎縮症、進行性核上性麻痺、ジストニア、筋痙縮、振戦、網膜色素変性、線条体黒質変性症、ミトコンドリア脳筋症、神経セロイドリポフスチン症、肝性脳症、腎性脳症、代謝性脳症、毒物による脳症および放射能による脳損傷を含むがこれらに限定されるものではない神経変性疾患の治療に、本明細書に記載の Q-L-Y 結合体を用いる用途も提供するものである。

10

【0860】

いくつかの実施形態では、疾患または病状が低血糖症である。いくつかの実施形態では、患者が糖尿病患者であり、インスリンを投与することで、低血糖症を誘導する。具体的な態様では、この方法は、インスリンのボーラス投与による血糖低下効果を結合体が緩衝するように、本開示の結合体をインスリンとの組み合わせで提供することを含む。

20

【0861】

いくつかの実施形態では、非経口で栄養を摂取している患者または完全非経口栄養などの病院環境で、非糖尿病患者への栄養の非経口投与と Q-L-Y 結合体とを併用する。非限定的な例として、手術患者、昏睡患者、消化管に病気のある患者または胃腸管が機能していない患者（外科手術での摘出、閉塞または吸収力の低下、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃腸管の通過障害、胃腸管の瘻孔、急性膵炎、虚血性大腸炎、胃腸外科手術、特定の先天性胃腸管異常、手術による遷延性下痢または短腸症候群、ショック患者ならびに、脂質、電解質、ミネラル、ビタミン、アミノ酸のさまざまな組み合わせと一緒に炭水化物の非経口投与を受けている治療中の患者があげられる。非経口栄養組成物が消化される時点で Q-L-Y 結合体によって所望の生物学的作用が得られるかぎり、Q-L-Y 結合体および非経口栄養組成物を、同時に、異なる時点で、互いに前後して投与することが可能である。たとえば、グルカゴン結合体を 2 日に 1 回、1 週間に 3 回、1 週間に 2 回、1 週間に 1 回、2 週間ごと、3 週間ごとまたは 1 か月ごとに投与しながら、非経口栄養を 1 日 1 回、1 日 2 回または 1 日 3 回投与してもよい。

30

【0862】

本明細書で使用する場合、「治療」および「予防」という表現ならびにその派生語は、かならずしも 100% または完全に治療または予防することを示唆するものではない。むしろ、当業者が潜在的な利点または治療効果が得られると認識する、さまざまな度合いの治療または予防がある。この点において、本発明の方法は、哺乳動物で、疾患または病状のあらゆるレベルの治療または予防の量を提供することが可能である。さらに、この方法によって提供される治療または予防に、疾患または病状の 1 つまたは 2 つ以上の状態または症状の治療または予防を含むものであってもよい。たとえば、肥満を治療する方法に関して、いくつかの実施形態における方法で、患者による食物摂取または患者における脂肪レベルの低下を実現する。また、本明細書の目的で、「予防」には、疾患またはその症状または状態の発症を遅らせることを含み得る。

40

【0863】

50

上記の治療方法に関して、患者はどのような宿主であってもよい。いくつかの実施形態では、宿主は哺乳動物である。本明細書で使用する場合、「哺乳動物」という用語は、哺乳綱の脊椎動物を示し、単孔類、有袋類、胎盤類を含むがこれらに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ネズミおよびハムスターなどの齧歯目、ウサギなどのウサギ目の哺乳動物の一種である。特定の実施形態では、哺乳動物は、ネコ（猫）およびイヌ（犬）を含む食肉目の動物である。特定の実施形態では、哺乳動物は、ウシ（牛）およびブタ（豚）を含む偶蹄目またはウマ（馬）を含む奇蹄目の動物である。場合によっては、哺乳動物は、霊長目、CeboidsまたはSimioids（サル）または類人猿目（ヒトおよびエイブである）の動物である。特定の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

組み合わせ

10

#### 【0864】

本明細書に記載のQ-L-Y結合体は、単独で投与してもよいし、本明細書に記載の疾患または病状を治療または予防することを目的とする他の治療剤との組み合わせで投与してもよい。たとえば、本明細書に記載のQ-L-Y結合体を、（同時にまたは順番に）抗糖尿病または抗肥満薬と同時投与してもよい。当分野で知られた抗糖尿病薬または研究中の抗糖尿病薬として、インスリン、レブチン、ペプチドYY（PYY）、チレプチド（PP）、繊維芽細胞増殖因子21（FGF21）、Y2Y4受容体アゴニスト、スルホニル尿素、たとえば、トルブタミド（Orinase）、アセトヘキサミド（Dymelor）、トラザミド（Tolinese）、クロルプロパミド（Diabinese）、グリビジド（Glucotrol）、グリブリド（Diabeta、Micronase、Glynase）、グリメピリド（Amaryl）またはグリクラジド（Diamicron）；メグリチニド、たとえば、レパグリニド（Prandin）またはナテグリニド（Starlix）；ビグアナイド、たとえば、メトホルミン（Glucophage）またはフェンホルミン；チアゾリジンジオン、たとえば、ロシグリタゾン（Avandia）、ピオグリタゾン（Actos）またはトログリタゾン（Rezulin）または他のPPAR $\gamma$ 阻害薬；炭水化物の消化を阻害する $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬、たとえば、ミグリトール（Glyset）、アカルボース（Precose / Glucobay）；エクセナチド（Byetta）またはプラムリンチド；ジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）阻害薬、たとえば、ビルダグリブチンまたはシタグリブチン；SGLT（ナトリウム依存性グルコーストランスポーター1）阻害剤；グルコキナーゼ活性化因子（GKA）；グルカゴン受容体アンタゴニスト（GRA）；またはFBPase（フルクトース1，6-ビスホスファターゼ）阻害薬があげられる。

20

30

#### 【0865】

当分野で知られた抗肥満薬または研究中の抗肥満薬は、フェネチルアミンタイプの刺激薬、フェンテルミン（任意にフェンフルラミンまたはデクスフェンフルラミン併用）、ジエチルプロピオン（Tenuate（登録商標））、フェンジメトラジン（Prelu-2（登録商標））、Bontril（登録商標）、ベンズフェタミン（Dibrex（登録商標））、シブトラミン（Meridia（登録商標））、Reductil（登録商標）；リモナパン（Acomplia（登録商標））、他のカンナビノイド受容体アンタゴニスト；オキシントモジュリン；塩酸フルオキセチン（Prozac）；Qnexa（トピラマートとフェンテルミンとの合剤）、Excalia（ブプロピオンおよびゾニサミド）またはContrave（ブプロピオンおよびナルトレキソン）；またはXENICAL（Orlistat）に類するリパーゼ阻害薬またはセチリストット（ATL-962としても知られる）またはGT 389-255をはじめとする食欲抑制薬を含む。

40

#### 【0866】

いくつかの実施形態で本明細書に記載のQ-L-Y結合体を、非アルコール性脂肪肝またはNAFLDの治療用の薬剤と同時投与する。非アルコール性脂肪肝疾患の治療に用いられる薬剤として、ウルソデオキシコール酸（Actigall、URSOおよびUrsodiolとしても知られる）、メトホルミン（Glucophage）、ロシグリタゾン（Avandia）、クロフィブラート、ゲムフィブロジル、ポリミキシンB、ベタインがあげられる。

#### 【0867】

いくつかの実施形態で本明細書に記載のQ-L-Y結合体を、神経変性疾患、たとえば、パーキンソン病の治療用の薬剤と同時投与する。抗パーキンソン病薬も当分野で知られ

50

ており、レボドパ、カルビドパ、抗コリン薬、プロモクリプチン、プラミベキソールおよびロピニロール、アマンタジン、ラサギリンがあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0868】

上記に鑑みて、本発明はさらに、これらの他の治療剤のうちの1つを含む薬学的組成物およびキットを提供するものである。追加の治療剤は、本開示の結合体と同時に投与してもよいし、順次投与してもよい。いくつかの態様では、追加の治療剤よりも前に結合体を投与するが、別の態様では、追加の治療剤の後に結合体を投与する。

【0869】

キット

10

【0870】

一実施形態では、キットの一部として本開示のQ-L-Y結合体を提供することができる。したがって、いくつかの実施形態では、Q-L-Y結合体の投与が必要な患者にこれ投与するためのキットであって、本明細書に記載するようなQ-L-Y結合体を含むキットが提供される。

【0871】

一実施形態では、注射針、ペンデバイス、ジェットインジェクターまたは他の針のない注射器など、Q-L-Y結合体組成物を患者に投与するための装置を含むキットが提供される。キットは、これらに代えてあるいはこれらに加えて、バイアル、チューブ、ボトル、シングルチャンバーまたはマルチチャンバーのプレフィルドシリンジ、カートリッジ、輸液ポンプ（体外型または移植型）、ジェットインジェクター、プレフィルドペンデバイスなど、任意にグルカゴン結合体を凍結乾燥形態または水溶液中で含む1つまたは2つ以上の容器を含むものであってもよい。いくつかの実施形態におけるキットは、取扱説明書を含む。一実施形態によれば、キットのデバイスはエアロゾル用の装置であり、この場合、組成物は、エアロゾル装置の中にあらかじめ封入されている。もうひとつの実施形態では、キットに注射器と針を含み、一実施形態では、滅菌グルカゴン組成物があらかじめ注射器に封入されている。

20

【0872】

以下の実施例は、単に本発明を例示するためのものにすぎず、その範囲を何ら限定するものではない。

30

実施例1：グルカゴンスーパーファミリーのペプチドのペプチド断片の合成

材料

【実施例】

【0873】

別段の記載がないかぎり、本明細書に記載のペプチドは、いずれもアミド化したものである。ペプチド合成時には、MBHA（4-メチルベンズヒドリルアミンポリスチレン）樹脂を使用した。MBHA樹脂、100～180メッシュ、1%ジビニルベンゼン（DVB）架橋ポリスチレン；ローディング0.7～1.0mmol/g）、Boc保護（tert-ブチルカルバメート）およびFmoc保護（9-フルオエニルメチルカルバメート）アミノ酸を、Mdwest Biotechから購入した。Boc保護したアミノ酸を用いる固相ペプチド合成を、Applied Biosystem 430A Peptide Synthesizerで実施した。Fmoc保護したアミノ酸の合成については、Applied Biosystems Model 433 Peptide Synthesizerを用いて実施した。具体的な実施形態では、以下の手順を用いることができる。

40

Boc化学戦略でのペプチド合成の一般的なプロトコール

【0874】

Boc化学を用いるペプチドの合成を、Applied Biosystem Model 430A Peptide Synthesizerを用いて実施した。2mmolのBoc保護したアミノ酸を含むカートリッジに、アミノ酸を連続的に付加することで、合成ペプチドを作製した。具体的には、3-（ジエトキシ-ホスホリルオキシ）-3H-ベンゾ[d][1,2,3]トリアジン-4-オン（DEPBT）またはHBTUをカップリング剤として使用して、シングルカップリング

50

で合成を実施した。カップリング工程の終わりに、ペプチジル樹脂をトリフルオロ酢酸 (TFA) で処理し、N末端の Boc 保護基を除去した。この樹脂をジメチルホルムアミド (DMF) で繰り返し洗浄し、この繰り返しサイクルを所望の回数のカップリング工程分だけ繰り返した。Boc アミノ酸および HBTU については、Mdwest Biotech (Fishers, IN) から入手した。使用した一般的な側鎖保護基は、Arg (Tos)、Asn (Xan)、Asp (OCHex)、Cys (pMeBzl)、His (Bom)、Lys (2Cl-Z)、Ser (OBzl)、Thr (OBzl)、Tyr (2Br-Z)、Trp (CHO) であった。ラクタム架橋形成部位には、Boc-Glu (OFm)-OH および Boc-Lys (Fmoc)-OH (ChemImpex, Wooddale, IL) を使用した。

#### 【0875】

ペプチドを構築した後、20% ピペリジン処理を用いて、Fmoc 保護した側鎖を脱保護した。ラクタム化では、Glu および Lys にオルソゴナル保護基グループを選択した (Glu (Fm)、Lys (Fmoc) など)。保護基の除去後かつ HF 開裂前に、上述したようにして環化を実施した (たとえば、国際特許出願公開第 WO 2008 / 101017 号を参照のこと)。

ペプチジル樹脂の HF 処理

#### 【0876】

p-クレゾールおよび硫化ジメチルの存在下、無水 HF でペプチジル樹脂を処理した。これによって、一般に約 350 mg (収率約 50%) の粗脱保護ペプチドが生成された。具体的には、ペプチジル樹脂 (30 mg ~ 200 mg) を、開裂用のフッ化水素 (HF) 反応容器に入れた。次に、500  $\mu$ L の p-クレゾールをカルボニウムイオンスカベンジャーとして容器に加えた。この容器を HF システムに取り付け、メタノール/ドライアイス混合物に浸漬した。真空ポンプで容器を脱気し、10 mL の HF を蒸留して反応容器に入れた。このペプチジル樹脂と HF の反応混合物を 0 °C で 1 時間攪拌した後、真空状態にして HF をすみやかに排除した (10 ~ 15 分)。この容器を慎重に取り出し、約 35 mL のエーテルを満たしてペプチドを沈殿させ、HF 処理による低分子有機保護基と p-クレゾールを抽出した。この混合物を Teflon フィルターで濾過し、2 回繰り返しして余分なクレゾールをすべて除去した。この濾液をあけた。沈殿したペプチドを約 20 mL の 10% 酢酸 (aq) に溶解させた。この濾液には所望のペプチドが含まれているが、これを回収して凍結乾燥した。

#### 【0877】

分析用の HPLC で、可溶化した粗ペプチドを以下の条件で分析した。[4.6  $\times$  30 mm の Xterra C8、1.50 mL / 分、220 nm、A バッファーは 0.1% TFA / 10% アセトニトリル (CH<sub>3</sub>CN)、B バッファーは 0.1% TFA / 100% CH<sub>3</sub>CN、15 分で勾配 5 ~ 95% B]。抽出物を水で 2 倍に希釈し、2.2  $\times$  25 cm の Vydac C4 分取逆相カラムに通し、アセトニトリル勾配を用いて、Waters の HPLC システムで溶出した (A バッファーは 0.1% TFA / 10% CH<sub>3</sub>CN、B バッファーは 0.1% TFA / 10% CH<sub>3</sub>CN、流速 15.00 mL / 分にて 120 分で勾配 0 ~ 100% B)。精製ペプチドの HPLC 分析によって、純度が 95% を超えていることがわかった。エレクトロスプレー/四重極質量分析計を用いて、ペプチドのアイデンティティを確認した。

Fmoc 化学戦略での一般的なペプチド合成プロトコール:

#### 【0878】

標準的な Fmoc 化学を用いて、Rink MBHA アミド樹脂または最初のアミノ酸が結合した Wang 樹脂 (Novabiochem San Diego, CA) で、DIC / HOBt をカップリング試薬として使用し、ABI 433A 自動ペプチド合成器でペプチドを合成した。使用可能な Na-Fmoc [N-(9-フルオレニル)メトキシカルボニル] アミノ酸の側鎖保護基は、Arg、Pmc; Asp、OtBu; Cys、Trt; Gln、Trt; His、Trt; Lys、Boc; Ser、tBu、Tyr、tBu; および Trp、Boc (Pmc = 2, 2, 5, 7, 8 - ペンタメチルクロマン-6 - スルホニル、OtBu = t er

10

20

30

40

50

t - ブチルエステル、T r t = トリチル、B o c = t e r t - ブチルオキシカルボニル、t B u = t e r t - ブチルエステル) であった。F m o c - G l u ( O - 2 - P h i P r ) - O H および F m o c - L y s ( M m t ) - O H ( Novabiochem San Diego, CA ) は、ラクタム架橋形成部位に取り込まれた。

#### 【0879】

固相合成後、1 % T F A / D C M をペプチジル樹脂にフラッシュして、G l u の 2 - フェニルイソプロピル ( 2 - P h i P r ) 基と L y s の 4 - メトキシトリチル ( M m t ) 基を除去した。ラクタム架橋形成の場合、通常は 150 mg ( 0.5 mmole, 5 倍 ) の B E P B T を 10 % D I E A / D M F に加え、ニンヒドリン試験で陰性になるまで 2 ~ 4 時間反応させた。

10

#### 【0880】

85 % T F A、5 % フェノール、5 % 水および 5 % チオアニソール ( ペプチドがシステインを含む場合は 2.5 % E D T を加えた ) を含有するクリーベジカクテルを用いて、ペプチドを樹脂から切断した。粗ペプチドをエーテル中で沈殿させ、遠心し、凍結乾燥した。次に、ペプチドを分析用 H P L C で分析し、E S I または M A L D I - T O F 質量分析法で調べた。さらに、一般的な H P L C 精製手順でペプチドを精製した。

ペプチドのアシル化

#### 【0881】

アシル化ペプチドを、以下のようにして調製した。固体の担体樹脂上で、CS Bio 4886 Peptide Synthesizer または Applied Biosystems 430A Peptide Synthesizer のいずれかを用いて、ペプチドを合成した。Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992) に説明されているような、in situ 中和法を使用した。アシル化ペプチドの場合、アシル化対象となる標的アミノ酸残基 ( 配列番号 1601 のアミノ酸の位置番号で 10 番目など ) を N ε - F M O C リジン残基で置換した。完成した N 端が B O C で保護されたペプチドを D M F 中にて 20 % ピペリジンで 30 分間処理し、F M O C / ホルミル基を除去した。10 倍モル過剰の F M O C した保護スパーサーのアミノ酸 (たとえば、F M O C - G l u - O t B u ) またはアシル鎖 (たとえば、C H <sub>3</sub> ( C H <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> - C O O H ) と、ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート ( P y B O P )、N, N' ジイソプロピルカルボジイミド ( D I C ) または D E P B T カップリング試薬とを、D M F / ジイソプロピルエチルアミン ( D I E A ) 溶液で反応させて、遊離 ε - アミノ L y s 残基への結合を達成した。その後、スパーサーのアミノ酸の F m o c 基を除去し、アシル鎖とのカップリングを繰り返す。100 % T F A での最後の処理で、側鎖保護基と N 末端の B O C 基を除去した。ペプチド樹脂を 5 % D I E A / D M F で中和し、乾燥させた後、H F / p - クレゾール ( 95 : 5 ) を 0 °C で 1 時間用いて、担体から接続する。エーテル抽出後、5 % 酢酸 ( H O A c ) 溶液を用いて、粗ペプチドを溶媒和させる。その後、E S I - M S によって、溶液の試料に正しい分子量のペプチドが含まれることを確認した。逆相 ( R P ) H P L C によって、10 % C H <sub>3</sub> C N / 0.1 % T F A から 100 % C H <sub>3</sub> C N 中 0.1 % T F A の直線勾配で、正しいペプチドを精製した。精製には、Vydac C18 の 22 mm × 250 mm のタンパク質カラムを用いた。アシル化したペプチド結合体は通常、バッファー比 20 : 80 で溶出された。一部をプールし、分析用 R P - H P L C で純度を確認した。純粋な画分を凍結乾燥し、白色で固体のペプチドを得た。

20

30

40

#### 【0882】

ペプチドがラクタム架橋とアシル化対象の標的残基を含むのであれば、そのアミノ酸をペプチド骨格に付加する際に、上述したようにしてアシル化を実施した。

チオエーテル結合を形成するためのペプチドの P E G 化

#### 【0883】

ペプチドを P E G するために、ペプチドと P E G の両方を溶解して透明な溶液にするのに必要な最小量の溶媒 (通常、2 ~ 3 mg のペプチドを用いる反応で 2 mL 未満) を使用して、40 k D a のメトキシポリ (エチレングリコール) ヨードアセトアミドを、7 M 尿

50

素、50 mM Tris-HCl バッファーにてモル等量のペプチドと反応させた。4～6 時間、室温での強い攪拌を開始し、分析用 RP-HPLC を用いて反応物を分析した。PEG 化生成物は、保持時間が短くなり、開始材料とは異なるように見えた。最初のペプチド精製に用いた条件と類似の条件で、Vydac C4 カラムで精製を実施した。溶出はバッファー比 50 : 50 のあたりで生じた。純粋な PEG 化ペプチドの画分を見つけ、凍結乾燥した。収率は 50 % を超え、反応ごとに異なっていた。

マレイミド結合を形成するためのペプチドの PEG 化

#### 【0884】

ペプチドを PEG 化するために、システインを含有するペプチドをリン酸緩衝食塩水 (5～0 mg/mL) に溶解させ、0.01 M のエチレンジアミン四酢酸を加える (合計容量の 10～15%)。過剰な (2 倍) マレイミドメトキシ PEG 試薬 (Dow) を加え、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で反応の進み具合を観察しながら反応物を室温にて攪拌した。8～24 時間後、反応混合物を酸性化し、分取逆相カラムに通して、0.1% テトラフルオロ酢酸 (TFA) / アセトニトリルを用いてグラジエントモードで精製する。適切な画分を合わせ、凍結乾燥して、所望の PEG 化誘導体を得た。

質量分析による分析

#### 【0885】

Sciex API-III エレクトロスプレー / 四重極質量分析計を標準的な ESI イオン化源で用いて、質量スペクトルを得た。使用したイオン化状態は次のとおりである：陽イオンモードで ESI；イオンスプレー電圧、3.9 kV；オリフィス電位 60 V。使用したネブライジングガスおよびカーテンガスは窒素で、流量を 9 L/分とした。600～1800 トンブソンの 1 ステップあたり 0.5 Th、滞留時間 2 ミリ秒で質量スペクトルを記録した。試料 (約 1 mg/mL) を 1% 酢酸もに含有 50% アセトニトリル溶液に溶解し、外側のシリンジポンプで 5  $\mu$ L/分で導入した。

#### 【0886】

PBS 溶液中で ESI MS によってペプチドを分析する場合、最初に、0.6  $\mu$ L の C4 樹脂の入った ZipTip 固相抽出チップを製造業者の指示どおりに用いて、ペプチドを脱塩した (Millipore Corporation, Billerica, MA、ワールドワイドウェブで millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737 の Millipore 社のウェブサイトを参照のこと)。

高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 分析：

#### 【0887】

これらの粗ペプチドで予備分析を実施し、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) および MALDI 分析を用いて、リン酸緩衝食塩水 (PBS) バッファー (pH、7.2) にて相対的な変換率を概算で求めた。粗ペプチド試料を PBS バッファーに 1 mg/mL の濃度で溶解させた。得られた溶液 1 mL を 1.5 mL の HPLC バイアルで保管し、これを密閉して 37℃ でインキュベートした。100  $\mu$ L のアリコートをさまざまな間隔で抜き取り、室温まで冷却し、HPLC で分析した。

#### 【0888】

214 nm で UV 検出器を使用して、Beckman System Gold Chromatography システムで、HPLC 分析を実施した。HPLC 分析は、150 mm  $\times$  4.6 mm の C18 Vydac カラムで実施する。流速は 1 mL/分とした。溶媒 A は 0.1% TFA を蒸留水に加えたものを含有し、溶媒 B は 0.1% TFA を 90% CH<sub>3</sub>CN に加えたものを含有した。直線勾配を用いた (15 分間で 40%～70% B)。データを集め、Peak Simple Chromatography ソフトウェアで分析した。

#### 実施例 2

#### 【0889】

それぞれのペプチドが cAMP を誘導する機能については、ホタルルシフェラーゼを用いるレポーターアッセイで測定した。誘導される cAMP 産生は、グルカゴン受容体または GIP 受容体または GLP-1 受容体に結合しているグルカゴン断片と正比例する。受容体と cAMP 応答配列に結合させたルシフェラーゼ遺伝子とをコトランスフェクトした

10

20

30

40

50



H E K 2 9 3 細胞を、バイオアッセイに使用した。

#### 【0890】

0.25% BGS (Bovine Growth Serum) (HyClone, Logan, UT) を加えたダルベッコ変法最小必須培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で16時間培養して、培地から血清を除去した後、37℃、5% CO<sub>2</sub> にて、96ウェルのポリ-D-リジンコートディッシュ「Biocoat (登録商標)」プレート (BD Biosciences, San Jose, CA) で5時間、グルカゴン断片を段階希釈したものとインキュベートした。インキュベーション終了時、100 μL の LucLite 発光基質試薬 (Perkin Elmer, Wellesley, MA) を各ウェルに加えた。プレートを軽く振盪し、暗所にて10分間インキュベートし、MicroBeta-1450 液体シンチレーションカウンター (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) で発光を測定した。Origin ソフトウェア (OriginLab, Northampton, MA) を用いて、50% 有効濃度 (EC<sub>50</sub>) および 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を計算した。以下の実施例では、別段の記載がないかぎり、記載の EC<sub>50</sub> および IC<sub>50</sub> はいずれも、nM 単位での値である。

10

20

30

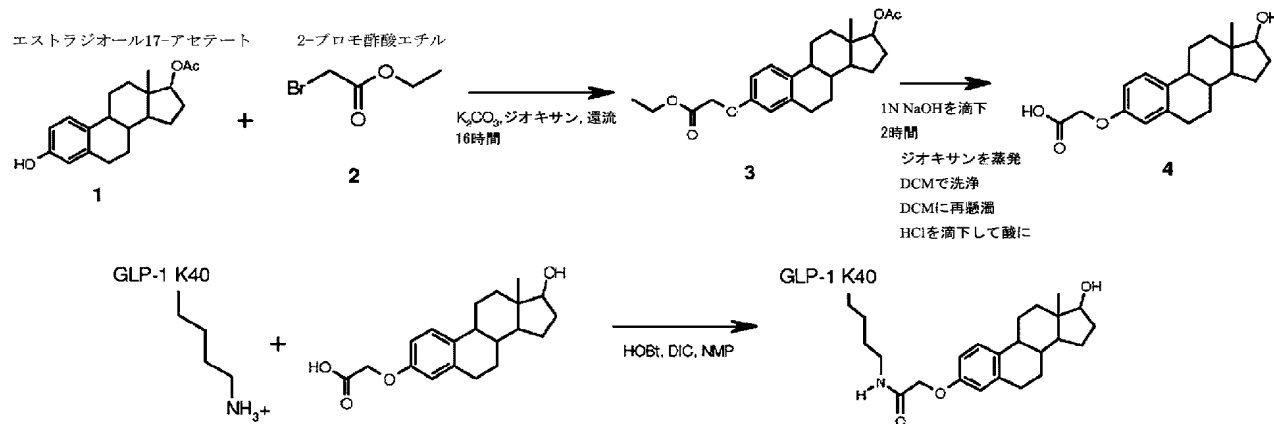
40

50

### 実施例3：GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) の調製

#### 【0891】

Boc プロトコールを使用し、実施例1に開示した Boc-Lys (Fmoc)-OH 残基をC末端に用いて、GLP-1 類縁体を合成した。(生成物4を加える前に、リジン残基の側鎖のアミンを保護している Fmoc 基を、20% ピペルジン / DMF で30分かけて除去した)。エチル 2-ブロモ酢酸との反応によって、エストラジオール 17-アセテートを3位で誘導体化した。以下に示すように、誘導体化後のエストラジオールを加水分解し、GLP-1 類縁体のC末端のリジンと反応させて、GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を生成した。



#### 【0892】

具体的には、等モル量のエストラジオール 17-アセテート (1) と 2-ブロモ酢酸エチル (2) とをジオキサン / K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> に溶解させ、反応物を還流条件下で16時間、攪拌した。反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物 (3) をジオキサンに再懸濁させた。NaOH (1N) をゆっくりと加え、2時間攪拌した。反応溶媒を真空中で蒸発させた。この生成物 (4) をジクロロメタンで3回洗浄した後、ジクロロメタンに再懸濁させた。HCl (1N) をゆっくりと加えて、生成物を酸性化した。生成物4と樹脂結合ペプチドとを HOBt / DIC / NMP にて4時間混合し、濾過し、トリフルオロ酢酸で処理し、フッ化水素酸で処理して樹脂から切断した。ペプチド-エストロゲン結合体を逆相 HPLC で精製し、ESI 質量分析で特徴を調べた。

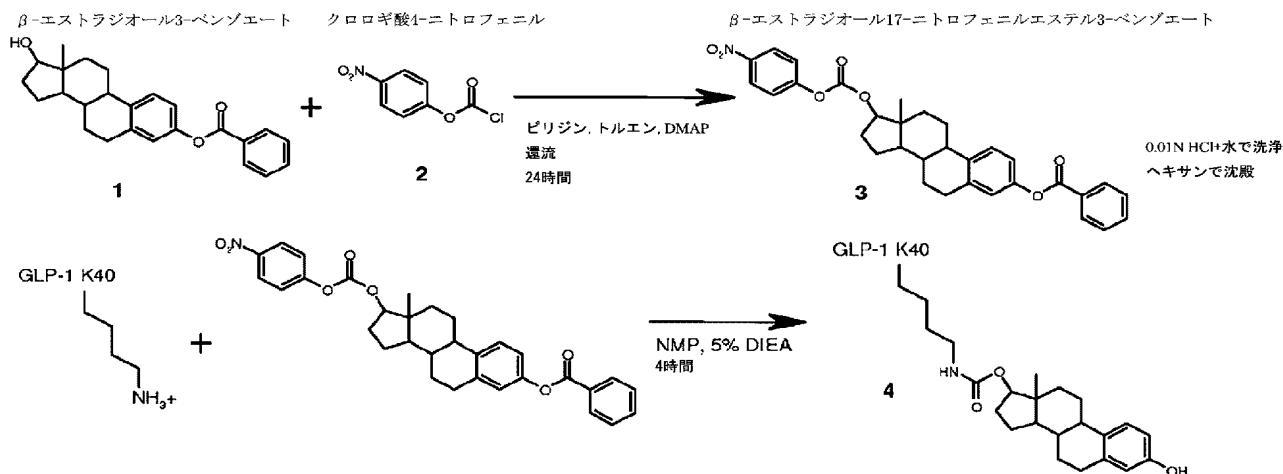
### 実施例4：GLP-1 / エストロゲン (17-カルバメート) の調製

#### 【0893】

Boc プロトコールを使用し、実施例1に開示した Boc-Lys (Fmoc)-OH

残基をC末端に用いて、GLP-1類縁体を合成した。(エストロゲン誘導体の結合前に、リジン残基の側鎖のアミンを保護しているFmoc基を、20%ピペルジン/DMFで30分かけて除去した)。以下に示すように、クロロギ酸4-ニトロフェニルとの反応によって、 $\beta$ -エストラジオール3-ベンゾエートを17位で誘導体化した。誘導体化後のエストラジオールをGLP-1類縁体のC末端のリジンと反応させて、GLP-1/エストロゲン(17-エステル)結合体を生成した。

【0894】



10

20

30

40

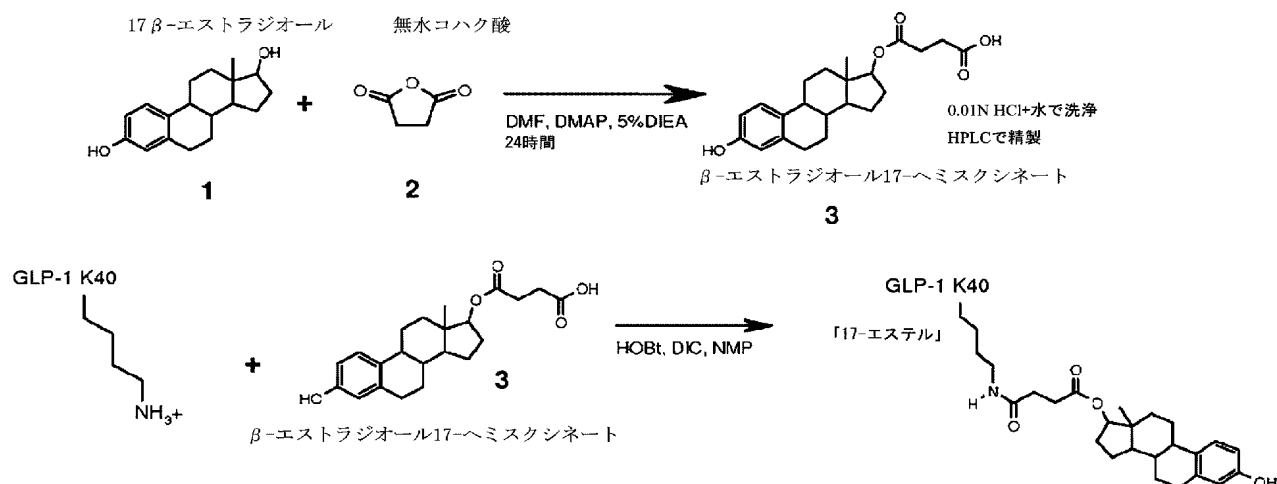
【0895】

具体的には、 $\beta$ -エストラジオール3-ベンゾエート(1)と2倍過剰のクロロギ酸4-ニトロフェニル(2)とを、ピリジン、トルエン、DMAP中、灌流条件下で24時間、一緒に攪拌した。反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物である $\beta$ -エストラジオール17-ニトロフェニルエステル3-ベンゾエート(3)を、酢酸エチルに再懸濁させた。反応生成物をHCl(0.01N)溶液で2回洗浄した後、水で1回洗浄した。酢酸エチルを真空中で蒸発させ、生成物(3)をヘキサンで沈殿させた。生成物3と樹脂結合ペプチドとをNMP/5%DIEA中にて4時間混合し、濾過し、TFAで処理し、HF処理によって樹脂から切断した。ペプチド-エストロゲン結合体を逆相HPLCで精製し、ESI質量分析で特徴を調べた。

#### 実施例5：GLP-1/エストロゲン(17-エステル)の調製

【0896】

Bocプロトコールを使用し、実施例1に開示したBoc-Lys(Fmoc)-OH残基をC末端に用いて、GLP-1類縁体を合成した。(エストロゲン誘導体の結合前に、リジン残基の側鎖のアミンを保護しているFmoc基を、20%ピペルジン/DMFで30分かけて除去した)。無水コハク酸との反応によって、エストラジオールを17位で誘導体化した。以下に示すように、誘導体化後のエストラジオールをGLP-1類縁体のC末端のリジンと反応させて、GLP-1/エストロゲン(17-エステル)結合体を生成した。



10

## 【0897】

具体的には、β-エストラジオール17-アセテート(1)と10倍過剰の無水コハク酸(2)とを、5%DIEAおよびDMAPを含有するDMF中、室温にて48時間、一緒に攪拌した。48時間後、反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物(3)を酢酸エチルに再懸濁させた。反応生成物(3)をHCl(0.01N)溶液で2回洗浄した後、水で1回洗浄した。酢酸エチルを真空中で蒸発させ、生成物(3)をMeOH/アセトニトリル/水の混合物に再懸濁させた。エストロゲン誘導体生成物(3)を逆相HPLCで精製した。凍結乾燥生成物(3)と樹脂結合ペプチドとを、HOBT/DIC/NMPにて4時間混合し、濾過し、TFAで処理し、HF処理によって樹脂から切断した。ペプチド-エストロゲン結合体を逆相HPLCで精製し、ESI質量分析で特徴を調べた。

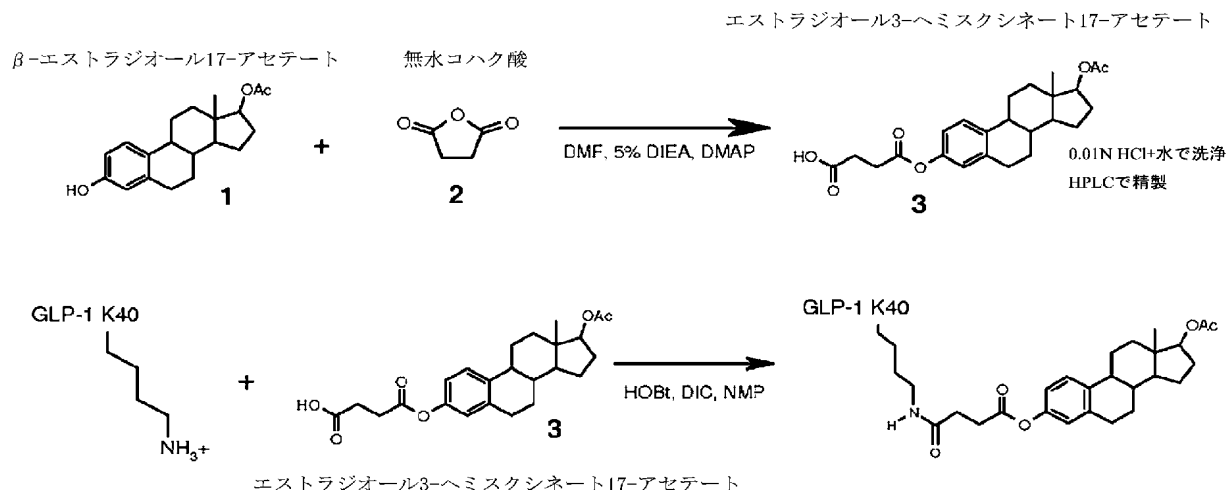
20

## 実施例6：GLP-1/エストロゲン(3-エステル)の調製

## 【0898】

Bocプロトコールを使用し、実施例1に開示したBoc-Lys(Fmoc)-OH残基をC末端に用いて、GLP-1類縁体を合成した。(エストロゲン誘導体の結合前に、リジン残基の側鎖のアミンを保護しているFmoc基を、20%ピペルジン/DMFで30分かけて除去した)。無水コハク酸との反応によって、エストラジオール17-アセテートを3位で誘導体化した。以下に示すように、誘導体化後のエストラジオールをGLP-1類縁体のC末端のリジンと反応させて、GLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体を生成した。

30



10

## 【0899】

具体的には、β-エストロジオール17-アセテート(1)と10倍過剰の無水コハク酸(2)とを、5% DIEAおよびDMAPを含有するDMF中、室温にて48時間、一緒に攪拌した。48時間後、反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物(3)を酢酸エチルに再懸濁させた。反応生成物(3)をHCl(0.01N)溶液で2回洗浄した後、水で1回洗浄した。酢酸エチルを真空中で蒸発させ、生成物(3)をMeOH/アセトニトリル/水の混合物に再懸濁させた。エストロゲン誘導体生成物(3)を逆相HPLCで精製した。凍結乾燥生成物(3)と樹脂結合ペプチドとを、HOBT/DIC/NMPにて4時間混合し、濾過し、TFAで処理し、HF処理によって樹脂から切断した。ペプチド-エストロゲン結合体を逆相HPLCで精製し、ESI質量分析で特徴を調べた。

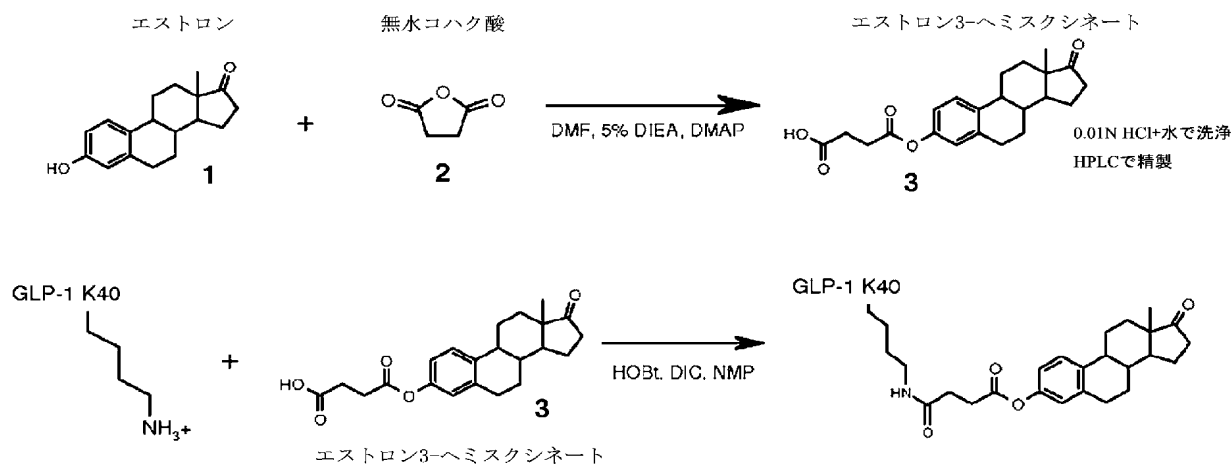
20

## 実施例7：GLP-1/エストロン3-エステル)の調製

## 【0900】

Bocプロトコルを使用し、実施例1に開示したBoc-Lys(Fmoc)-OH残基をC末端に用いて、GLP-1類縁体を合成した。(エストロゲン誘導体の結合前に、リジン残基の側鎖のアミンを保護しているFmoc基を、20%ピペルジン/DMFで30分かけて除去した)。無水コハク酸との反応によって、エストロンを3位で誘導体化した。以下に示すように、誘導体化後のエストロンをGLP-1類縁体のC末端のリジンと反応させて、GLP-1/エストロン(3-エステル)結合体を生成した。

30



40

50

## 【0901】

具体的には、エストロン（1）と10倍過剰の無水コハク酸（2）とを、5% DIEA および DMA P を含有する DMF 中、室温にて48時間、一緒に攪拌した。48時間後、反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物（3）を酢酸エチルに再懸濁させた。反応生成物（3）を HCl（0.01N）溶液で2回洗浄した後、水で1回洗浄した。酢酸エチルを真空中で蒸発させ、生成物（3）を MeOH / アセトニトリル / 水の混合物に再懸濁させた。エストロン誘導体生成物（3）を逆相 HPLC で精製した。凍結乾燥生成物（3）と樹脂結合ペプチドとを、HOBt / DIC / NMP にて4時間混合し、濾過し、TFA で処理し、HF 処理によって樹脂から切断した。ペプチド - エストロゲン結合体を逆相 HPLC で精製し、ESI 質量分析で特徴を調べた。

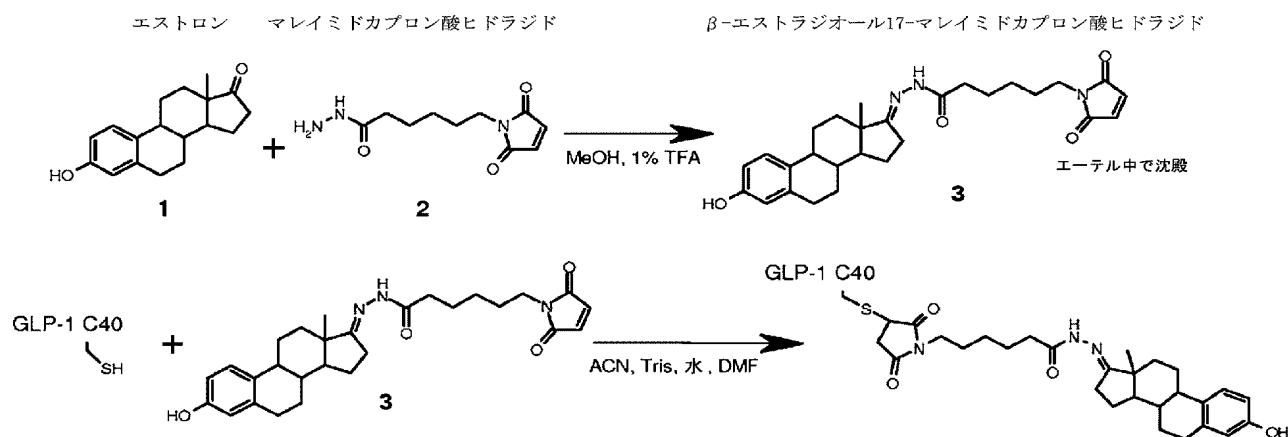
10

## 実施例 8：GLP-1 / エストロゲン（17 - ヒドラゾン）の調製

## 【0902】

実施例 1 に開示した Boc プロトコールを用いて、GLP-1 類縁体を合成した。Boc を用いる in situ 中和法を使用し、エストロゲンを付加しやすくするために Boc - Cys（4 - MeBzl）- OH 残基を C 末端に用いて、ペプチドを合成した。マレイミドカブロン酸ヒドラジドとの反応によって、エストロンを 17 位で誘導体化した。以下に示すように、誘導体化後のエストロンを GLP-1 類縁体の C 末端のシステインと反応させ、GLP-1 / エストラジオール（17 - ヒドラゾン）結合体を生成した。

20



30

## 【0903】

具体的には、等モル量のエストロン（1）とε - マレイミドカブロン酸ヒドラジド（2）とを、0.1% TFA を含有する MeOH 中、室温にて4時間、一緒に攪拌した。4時間後、反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物（3）を冷エーテル中で沈殿させ、シリカカラムで精製した。DMF、ACN、Tris、水の混合物（pH 7.5）を、室温にて24時間、5倍過剰の生成物 3 を切断・精製後のペプチドと混合し、ペプチド - エストロゲン結合体を生成した。ペプチド - エストロゲン結合体を逆相 HPLC で精製し、ESI 質量分光で特徴を調べた。

40

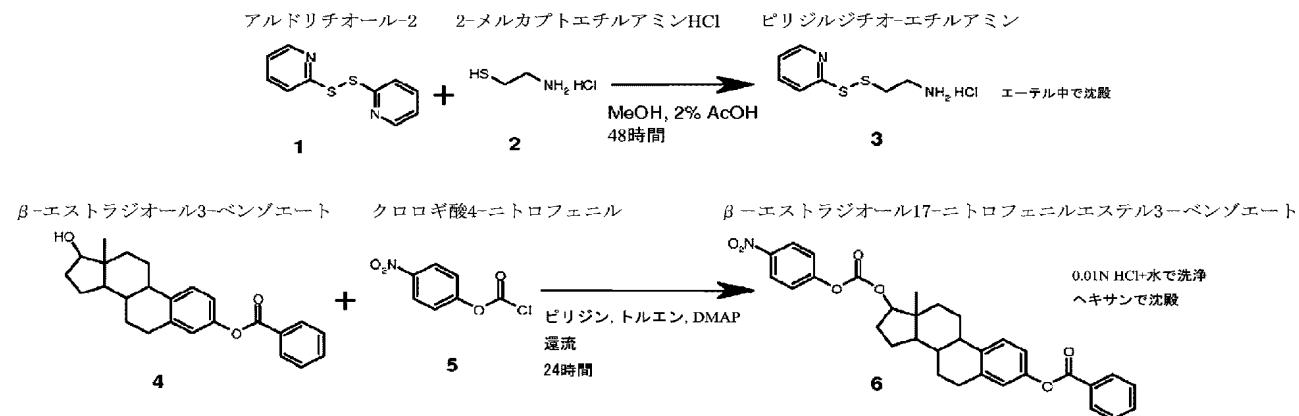
## 実施例 9：GLP-1 / エストロゲン（17 - カルバメートジスルフィド）の調製（立体障害があるものとなないもの）

## 【0904】

実施例 1 に開示した Boc プロトコールを用いて、GLP-1 類縁体を合成した。Boc を用いる in situ 中和法を使用し、エストロゲンを付加しやすくするために Boc - Cys（4 - MeBzl）- OH 残基（立体障害のないジスルフィド結合体を生成する場合）または Boc - Pen（4 - MeBzl）- OH 残基（立体障害のあるジスルフィド結合体を生成する場合）を C 末端に使用して、ペプチドを合成した。クロロギ酸 4 - ニトロ

50

フェニルとの反応によって、 $\beta$ -エストラジオール3-ベンゾエートを17位で誘導体化した。次に、以下に示すように、中間体をピリジルジチオ-エチルアミン-HClと反応させ、GLP-1類縁体のC末端のシステインとジスルフィド交換反応により、GLP-1/エストラジオール(17-カルバメートジスルフィド)結合体を生成した。



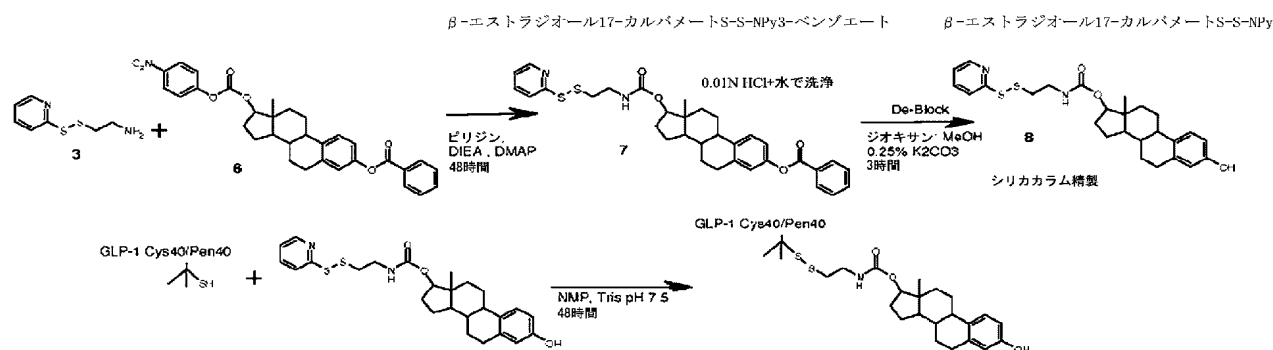
10

## 【0905】

20

まず、等モル量のアルドリチオール-2(1)と2-メルカプトエチルアミンHCl(2)とを、2% AcOHを含有するMeOH中、室温にて48時間、一緒に攪拌した。48時間後、反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物(3)を冷エーテル中で沈殿させた。第2に、 $\beta$ -エストラジオール3-ベンゾエート(4)と2倍過剰のクロロギ酸4-ニトロフェニル(5)とを、ピリジン、トルエン、DMAP中、灌流条件下で4時間、一緒に攪拌した。反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物である $\beta$ -エストラジオール17-ニトロフェニルエステル3-ベンゾエート(6)を酢酸エチルに再懸濁させた。この反応生成物をHCl(0.01N)溶液で2回洗浄した後、水で1回洗浄し、これを分液漏斗に移した。酢酸エチルを真空中で蒸発させ、生成物(6)をヘキサンで沈殿させた。

30



40

## 【0906】

等モル量のピリジルジチオ-エチルアミンHCl(3)と $\beta$ -エストラジオール17-ニトロフェニルエステル3-ベンゾエート(6)とを、5% DIEAおよびDMAPを含有するピリジン中、室温にて48時間、一緒に攪拌した。48時間後、反応溶媒を真空中で蒸発させ、生成物(7)を酢酸エチルに再懸濁させた。この反応生成物をHCl(0.01N)溶液で2回洗浄した後、水で1回洗浄し、酢酸エチルを真空中で蒸発させた。0.25%  $K_2CO_3$ のジオキサン/メタノール混液中で室温にて3時間処理することで、生成物(7)の3-ベンゾエート基を除去し、生成物である $\beta$ -エストラジオール17-カルバメートS-S-NPy(8)を生成した。この生成物をシリカカラムで精製した。NMPおよびTris(pH 7.5)中、室温にて48時間、5倍過剰の生成物8を切断

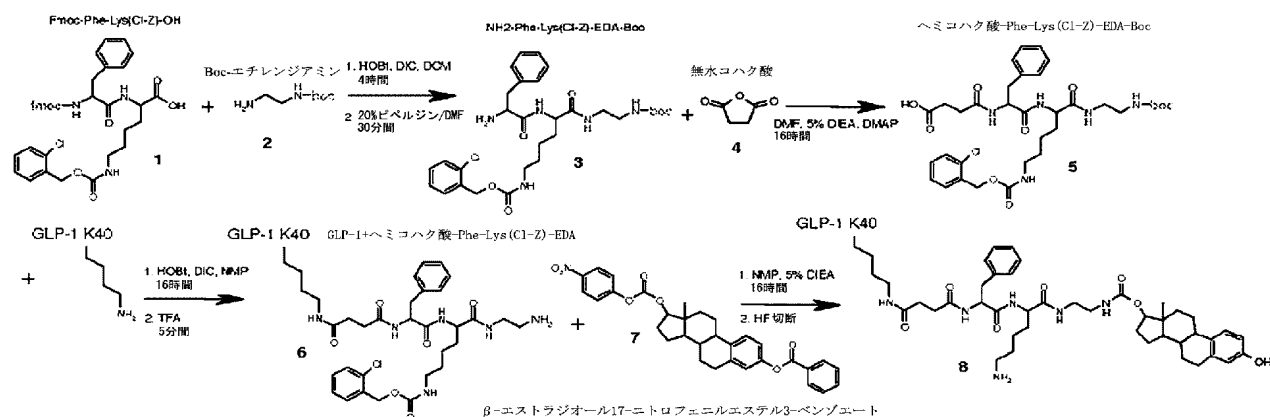
50

・精製後のペプチド（システイン残基またはペニシラミン残基を40番目に有する）と混合し、ペプチド-エストロゲン結合体を精製した。このペプチド-エストロゲン結合体を逆相HPLCで精製し、ESI質量分光で特徴を調べた。

#### 実施例10：GLP-1/エストロゲン（17-カテプシンジアミノエタン）の調製

【0907】

実施例1に開示したBocプロトコールを用いて、GLP-1類縁体を合成した。Bocを用いるin situ中和法を使用し、ジペプチドスパーサーおよびエストロゲンを付加しやすくするためにZ-His(BOM)-OH残基をN末端に、Boc-Lys(Fmoc)-OHをC末端に用いて、ペプチドを合成した。以下に示すように、β-エストラジオール17-ニトロフェニルエステルベンゾエートを17位で誘導体化して、GLP-1/エストラジオール（17-カテプシンジアミノエタン）結合体を生成した。



【0908】

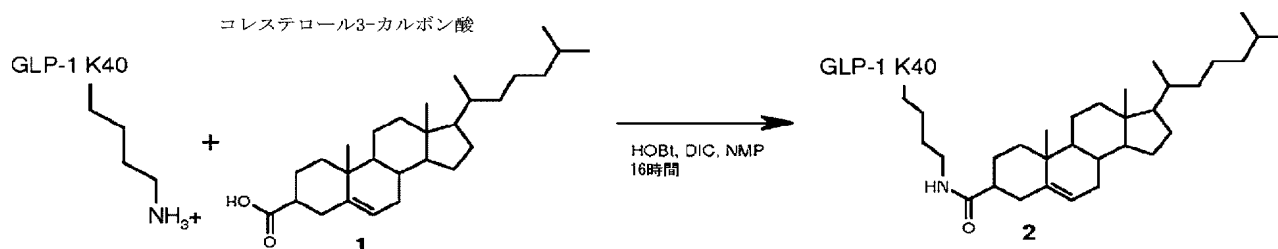
Wang樹脂でFmoc-を基にしたin situ中和法を使用してFmoc-Phy-Lys(C1-Z)-OH(1)を合成し、TFA/DCMを用いて樹脂から切断した。等モル量のFmoc-Phe-Lys(C1-Z)-OH(1)とBoc-エチレンジアミン(2)とを、HOBt、DIC、DCM中、室温にて4時間、一緒に攪拌した。この反応生成物をHCl(0.01N)溶液で2回洗浄した後、水で1回洗浄し、これを分液漏斗に移し、酢酸エチルを真空中で蒸発させた。洗浄ステップの後、反応生成物を20%ピペルジンのDMF溶液で30分間処理してN末端のFmoc基を除去し、NH<sub>2</sub>-Phe-Lys(C1-Z)-EDA-Boc(3)を生成した。これを、ピペルジン/DMF溶媒を真空中で除去した後に冷エーテル中で沈殿させた。NH<sub>2</sub>-Phe-Lys(C1-Z)-EDA-Boc(3)を、DMF、5% DIEA、DMAP中、室温にて16時間、2倍過剰の無水コハク酸(4)と一緒に攪拌した。その後、反応溶媒を真空中で蒸発させ、MeOH、アセトニトリル、水に再懸濁させた。反応生成物であるヘミコハク酸-Phe-Lys(C1-Z)-EDA-Boc(5)を、逆相HPLCで精製した。5倍過剰の凍結乾燥生成物(5)と樹脂結合ペプチドとをHOBt/DIC/NMP中にて16時間混合し、濾過し、TFAで処理して、生成物であるGLP-1+ヘミコハク酸-Phe-Lys(C1-Z)-EDA(6)を生成した。NMP/5% DIEA中、上記の樹脂結合生成物(6)を5倍過剰のβ-エストラジオール17-ニトロフェニルエステル3-ベンゾエート(7)と16時間混合し、濾過し、HF処理によって樹脂から切断して、最終生成物(8)を生成した。ペプチド-エストロゲン結合体を逆相HPLCで精製し、ESI質量分光で特徴を調べた。

#### 実施例11：GLP-1/コレステロール3-アミド)の調製

【0909】

実施例1に開示したBocプロトコールを用いて、GLP-1類縁体を合成した。Boc

cを用いるin situ中和法を使用し、Boc-Lys(Fmoc)-OH残基をC末端に用いて、ペプチドを合成した。以下に示すように、コレステロール3-カルボン酸をGLP-1類縁体のC末端のリジンと反応させて、GLP-1/コレステロール(3-アミド)結合体を生成した。



10

#### 【0910】

具体的には、コレステロール3-カルボン酸(1)と樹脂結合ペプチドとをHOBt/DIC/NMP中にて16時間混合し、濾過し、TFAで処理し、HF処理によって樹脂から切断した。生成物4を加える前に、リジン残基の側鎖のアミンを保護しているFmoc基を、20%ピペルジン/DMFで30分かけて除去した。ペプチド-コレステロール結合体(2)を逆相HPLCで精製し、ESI質量分析で特徴を調べた。ペプチド骨格をPEG化するのであれば、PEG部分を付加しやすいように配列の24番目にシステイン残基を付加し、等モル量のヨードアセチル40k PEGと結合体とを7Mの尿素/0.05Mのトリスバッファ(pH 8.5)で1時間混合することによって、PEG部分をペプチド-コレステロール結合体に付加した。

20

#### 実施例12：エストロゲン受容体結合アッセイ

精製ER $\alpha$ およびMillipore Filter Plateを用いるPhosphorImagerプロトコール

#### 【0911】

以下の試薬を使用して、エストロゲン受容体結合アッセイを実施した：リガンド結合バッファ(pH 7.6)、50 mMのHEPES-ナトリウム塩、1 mMのCaCl<sub>2</sub>、5 mMのMgCl<sub>2</sub>、0.5%のBSA、スクロース Cushion(pH 7.6)、20%スクロース、120 mMのNaCl、40 mMのTris-HCl、0.4% BSA、ポリエチレンジオキシ(PEI)、0.25% PEI。

30

「冷たい」エストラジオールの滴定

#### 【0912】

所望の試験濃度のうち最も高い濃度の5倍の冷たいエストラジオールのストック希釈液を調製した。試験した最高濃度は10  $\mu$ Mである。よって、合計容量500  $\mu$ lで、50  $\mu$ Mのストックを調製した。正確に40  $\mu$ lの結合バッファを、カラム11および12以外の滴定プレートの各ウェルに加えた。正確に60  $\mu$ lのストック濃縮液を滴定プレートのカラム11の各ウェルに加えた。20  $\mu$ lをカラム11からカラム10に移し、混合して、3倍滴定を実施した。それぞれのカラムを、カラム1から順に滴定した。正確に20  $\mu$ lを滴定プレートの各ウェルからアッセイプレートの対応するウェルに移した。正確に20  $\mu$ lの結合バッファを「全結合」ウェル(ウェル12(A~D))に加えた。正確に20  $\mu$ lの100  $\mu$ Mの冷たいエストラジオールを「非特異的結合」ウェル(ウェル12(E~H))に加えた。

40

一定濃度の「温かい」エストラジオール

#### 【0913】

望ましい試験濃度である0.05 nMよりも5倍高い濃度で、放射能標識したエストラジオールのストック溶液を調製した。このため、0.25 nMの放射能標識したエストラジオールのストックを、少なくとも合計容量2.3 mLで調製した。放射能標識したエストラジオールは、10  $\mu$ Ciで容量100  $\mu$ lの溶液になるが、これを2200 Ci/m

50



m o l で換算すると、濃度 4 5 . 4 5 n M に相当する。0 . 2 5 n M のストック 2 . 3 m L のために、放射能標識したエストラジオール 1 2 . 6 5  $\mu$  L を 2 . 2 9 m l の結合バッファーに加えた。正確に 2 0  $\mu$  L のストック溶液を、設計に応じてアッセイプレートの各ウェルに加えた。

精製エストロゲン受容体  $\alpha$  の滴定

【0914】

精製エストロゲン受容体を、濃度 1 . 5 n M で試験した。各ウェルに 6 0  $\mu$  L のエストロゲン受容体を加えているため、1 . 6 6 7 倍高いストック濃度とした。試験濃度 1 . 5 n M のために、ストック濃度を 2 . 5 n M とした。8 . 4  $\mu$  L のストックを 6 . 9 9 m L の結合バッファーに加えて、2 . 5 n M の受容体を容量 7 . 0 m L で調製した。その後、正確に 6 0  $\mu$  L の受容体を、アッセイプレートの適切なウェルに移した。

10

アッセイ

【0915】

アッセイプレート（冷たいリガンド、温かいリガンド、細胞ライセートを入れてある）を室温にて 2 時間、インキュベートした。正確に 2 5  $\mu$  L の 0 . 2 5 % P E I をフィルタープレートの各ウェルに加えた。フィルタープレートを 2 0 分間インキュベートした後、ウェルを真空でクリーニングした。アッセイプレートの懸濁液を正確に 8 0  $\mu$  L 、P E I コートフィルタープレートに移した。真空マニホールドを使用し、フィルタープレートを介して試料を真空にした。フィルタープレートを結合バッファーで数回洗浄した後、セロファンで包んだ。ウェルの底がスクリーンに最も近くなるようにして、プレートをホスホイメーシング用スクリーンの表面に固定した。ホスホイメーシング用スクリーンとプレートを、放射能測定用フィルムバッグに入れ、4 8 時間露光した。イメージング用スクリーンをホスホイメージャーでスキャンし、露光ファイルを得た。

20

### 実施例 1 3

【0916】

マウス（d b / d b 、N = 6 、平均初期体重 = 5 4 g ）に、以下のうちの 1 つを 4 0  $\mu$  g / k g または 4 0 0  $\mu$  g / k g か、そうでなければ溶媒を、4 週間にわたって 1 日 1 回、皮下注射した。

30

（a）GLP - 1（A i b <sup>2</sup> A <sup>2</sup> <sup>2</sup> C e x K <sup>4</sup> <sup>0</sup>）（4 0 0  $\mu$  g / k g - 日）

（b）GLP - 1（A i b <sup>2</sup> A <sup>2</sup> <sup>2</sup> C e x K <sup>4</sup> <sup>0</sup>）/ エストロゲン（1 7 - エステル）（4 0  $\mu$  g / k g - 日）または

（c）GLP - 1（A i b <sup>2</sup> A <sup>2</sup> <sup>2</sup> C e x K <sup>4</sup> <sup>0</sup>）/ エストロゲン（1 7 - エステル）（4 0 0  $\mu$  g / k g - 日）

【0917】

2 3 日後に体重を測定し、体重の変化を求めた（図 2 a）。高用量の GLP - 1（A i b <sup>2</sup> A <sup>2</sup> <sup>2</sup> C e x K <sup>4</sup> <sup>0</sup>）/ エストロゲン（1 7 - エステル）結合体を投与したマウスのほうが、GLP - 1 を単独で投与したマウスよりも体重の減り方が大きかった。

【0918】

GLP - 1（A i b <sup>2</sup> A <sup>2</sup> <sup>2</sup> C e x K <sup>4</sup> <sup>0</sup>）/ エストロゲン（1 7 - エステル）結合体が、2 3 日間の期間に累積の食物摂取量に対しておおよそ影響も判断した。高用量の GLP - 1（1 7 - エステル）/ エストロゲン（1 7 - エステル）結合体を投与したマウスのほうが、GLP - 1 を単独で投与したマウスよりも食物摂取量が少なかった。

40

【0919】

図 2 b および図 2 c は、GLP - 1（A i b <sup>2</sup> A <sup>2</sup> <sup>2</sup> C e x K <sup>4</sup> <sup>0</sup>）/ エストロゲン（1 7 - エステル）結合体が、血中グルコース濃度（m g / d L）に対しておおよそ影響を示している。高用量の GLP - 1（A i b <sup>2</sup> A <sup>2</sup> <sup>2</sup> C e x K <sup>4</sup> <sup>0</sup>）/ エストロゲン（1 7 - エステル）結合体を投与したマウスで、0 日目から 1 4 日目までの間に血中グルコース濃度の下がり方が最も大きかった。

50

実施例 14 . G L P - 1 / エストロゲン 結合体の *in vivo*での作用【0920】

食餌で誘導した肥満 (DIO) マウス (N = 8、1 群あたりマウス 6 匹、平均初期体重 = 58 g) に、以下のうちの 1 つを 4  $\mu$ g / kg、40  $\mu$ g / kg または 400  $\mu$ g / kg か、そうでなければ溶媒を、4 週間にわたって 1 日 1 回、皮下注射した。

(a) G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> E<sup>16</sup> C e x K<sup>40</sup>) (40  $\mu$ g / kg - 日)

(b) G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) (400  $\mu$ g / kg - 日) または

(c) G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17 - エステル) (4、40 または 400  $\mu$ g / kg - 日)

【0921】

25% (v / v) のグルコースを含有する生理食塩水を、7 日目と 21 日目の 0 分の時点で、体重 1 kg あたり 1.5 g の用量で注射した。7 日目と 21 日目の 0 分、15 分、30 分、60 分、120 分の時点で、血糖を測定した (図 3a)。

【0922】

23 日後に体重を測定し、体重の変化、体脂肪量の変化、除脂肪体重の変化を求めた (図 3b ~ 図 3d)。高用量の G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17 - エステル) 結合体を投与したマウスで、体重および体脂肪量の減り方が最も大きく、除脂肪体重の減少が最も少なかった。

【0923】

G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17 - エステル) 結合体が、23 日間の期間に累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も判断した。高用量の G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17 - エステル) を投与したマウスが、食餌の量が最も少なかった。

【0924】

図 3e は、G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17 - エステル) 結合体が、血糖の変化に対しておよぼす影響を示している。高用量の G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17 - エステル) 結合体を投与したマウスで、0 日目から 14 日目までの間に血中グルコース濃度の下がり方が最も大きかった。これらの結果から、A22 を基にした G L P - 1 のアゴニストにエストロゲンを付加すると、用量依存性の有効性も増強されることがわかる。

実施例 15 .【0925】

食餌で誘導した肥満 (DIO) マウス (N = 8、平均初期体重 = 59 g) に、溶媒または以下のうちの 1 つを、4 週間にわたって 1 日 1 回、皮下注射した。

(a) G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> E<sup>16</sup> C e x K<sup>40</sup>) (40 または 400  $\mu$ g / kg - 日)

(b) G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> E<sup>16</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17 - エステル) (40 または 400  $\mu$ g / kg - 日) または

(c) G L P - 1 (A i b<sup>2</sup> E<sup>16</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3 - エーテル) (40 または 400  $\mu$ g / kg - 日)

【0926】

25% (v / v) のグルコースを含有する生理食塩水を、14 日目の 0 分の時点で、体重 1 kg あたり 1.5 g の用量で注射した。0 分、15 分、30 分、60 分、120 分の時点で、血中グルコース濃度を測定した。図 4a に、この実験で得られたデータを示す。

【0927】

21 日後に体重を測定し、総体重と体脂肪量の変化を求めた (図 4b ~ 図 4c)。高用量の G L P - 1 / エストロゲン 結合体を投与したマウスで、総体重の減り方が最も大きかった (図 4b)。体脂肪量は、溶媒処理動物に比して、高用量のエストロゲンエーテル結合体で低下した (図 4c)。エステル結合体のほうがエーテル結合体よりも総体重に対す

10

20

30

40

50

る影響が大きく、エーテル結合体のほうがエステル結合体よりも体脂肪量に対する影響が大きかった。

【 0 9 2 8 】

GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>1-6</sup>Cex-K<sup>4-0</sup>) / エストロゲン結合体が、21日間の期間に累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も判断した。GLP-1 / エストロゲン結合体を投与したマウスのほうが、GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>1-6</sup>Cex-K<sup>4-0</sup>) を単独で投与したマウスよりも、食物摂取量が少なかった。

【 0 9 2 9 】

図 4 d は、GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>1-6</sup>Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン結合体が、血中グルコース濃度 (mg / dL) に対しておよぼす影響を示す。高用量で、いずれかの GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>1-6</sup>Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン結合体を投与したマウスのほうが、GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>1-6</sup>Cex K<sup>40</sup>) を単独で投与したマウスよりも、0 日目から 21 日目までの間の血中グルコース濃度の変化が大きかった。

### 实施例 16 .

【 0 9 3 0 】

9 か月間にわたって糖尿病食を与えたマウス (N = 8、11 月齢、平均体重 60 g) に、溶媒または以下のうちの 1 つを皮下注射した

(a) GLP - 1 (Aib<sup>2</sup> E<sup>1-6</sup> Cex K<sup>4-0</sup>) (40または400 μg / kg / 日)

(b) GLP-1 (Aib<sup>2</sup> E<sup>1-6</sup> Cex K<sup>4-0</sup>) / エストロゲン (3-エーテル)  
(40または400 μg / kg - 日)

(c) dGLP-1 ( $A^1 A i b^2 A^{2,2} C e x K^{4,0}$ ) / エストロゲン (3-エーテル) (40または400  $\mu g / kg$  - 日)

(d) GLP-1 (Aib<sup>2</sup> E<sup>1-6</sup> C<sup>2-4</sup> (PEG-40kDa) Cex K<sup>4-0</sup>) /  
エストロゲン (3-エーテル) (40、400 μg / kg - 日)

(e) GLP-1 (Aib<sup>2</sup> E<sup>1-6</sup> C<sup>2-4</sup> (PEG-40kDa) Cex K<sup>4-0</sup>) /  
エストロゲン (3-エーテル) (40 μg / kg - 週)

(f) GLP-1 (Aib<sup>2</sup> E<sup>1-6</sup> C<sup>2-4</sup> (PEG-40kDa) Cex K<sup>4-0</sup>) (40 μg/kg-週)

【 0 9 3 1 】

7 日後に体重を測定し、体重の変化を求めた (図 5 a)。高用量の G L P - 1 / エストロゲン結合体を投与したマウスで、体重の減り方が最も大きかったが、低一日量の G L P - 1 / エストロゲン結合体を投与したマウスでも、体重が有意に減少した。

【 0 9 3 2 】

GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>K<sup>40</sup>Cex) / エストロゲン (3-エーテル) 結合体、  
dGLP-1 (A<sup>1</sup>Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 結  
合体、GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>C<sup>24</sup>(PEG-40kDa)Cex K<sup>40</sup>) / エ  
ストロゲン (3-エーテル) 結合体が、7日間の期間に累積の食物摂取量に対しておよぼ  
す影響も判断した。高用量または低用量のGLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>K<sup>40</sup>Cex) /  
エストロゲン (3-エーテル) およびGLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>K<sup>40</sup>Cex) または  
低一日量のGLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>C<sup>24</sup>(PEG-40kDa)Cex K<sup>40</sup>)  
を投与したマウスが、食餌の量が最も少なかった。

【 0 9 3 3 】

図5 bは、GLP-1 ( $Aib^2 E^{16} K^{40} Cex$ ) / エストロゲン(3 - エーテル)結合体、dGLP-1 ( $A^1 Aib^2 A^{22} Cex K^{40}$ ) / エストロゲン(3 - エーテル)結合体、GLP-1 ( $Aib^2 E^{16} C^{24}(PEG-40kDa)Cex K^{40}$ ) / エストロゲン(3 - エーテル)結合体が、血中グルコース濃度の変化(mg/dL)に対しておよぼす影響を示す。高用量または低用量のGLP-1 ( $Aib^2 E^{16} K^{40} Cex$ )を投与したマウスで、高用量のGLP-1 ( $Aib^2 E^{16} K^{40} Cex$ )

/ エストロゲン ( 3 - エーテル ) もに血糖の変化が最も大きかった。

#### 実施例 17 .

##### 【 0 9 3 4 】

食餌で誘導した肥満 ( D I O ) マウス ( N = 8 、 平均初期体重 = 6 5 g ) に、以下のうちの 1 つを  $40 \mu\text{g} / \text{kg}$  か、そうでなければ溶媒を、1 週間にわたって 1 日 1 回、皮下注射した。

( a ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> E <sup>1 6</sup> C e x K <sup>4 0</sup> )

( b ) d G L P - 1 ( A <sup>1</sup> A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> )

( c ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> )

( d ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> E <sup>1 6</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 3 - エーテル )

( e ) d G L P - 1 ( A <sup>1</sup> A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 3 - エーテル )

( f ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 3 - エーテル )

( g ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> E <sup>1 6</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 17 - エステル )

( h ) d G L P - 1 ( A <sup>1</sup> A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 17 - エステル ) または

( i ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 17 - エステル )

##### 【 0 9 3 5 】

7 日後に体重を測定し、体重の変化と体脂肪量を求めた ( 図 6 a ~ 図 6 b ) 。 エストロゲン結合体を投与したマウスで、総体重の減り方が最も大きかった。体脂肪量の分析結果 ( 図 6 b ) では、体重の合計減少量の点で比較的一定であった。

##### 【 0 9 3 6 】

図 6 c は、G L P - 1 / エストロゲン結合体が、血糖の変化 ( m g / d L ) に対しておおよそ影響を示している。G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> E <sup>1 6</sup> K <sup>4 0</sup> C e x ) / エストロゲン ( 3 - エーテル ) または G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> E <sup>1 6</sup> K <sup>4 0</sup> C e x ) / エストロゲン ( 17 - エステル ) 結合体を投与したマウスで、0 日目から 7 日目までの間の血糖の変化が最も大きかった。

#### 実施例 18 .

##### 【 0 9 3 7 】

9 か月間にわたって糖尿病食を与えたマウス ( N = 8 、 11 月齢、平均体重 60 g ) に、以下のうちの 1 つを  $400 \mu\text{g} / \text{kg}$  か、そうでなければ溶媒を、1 週間にわたって 1 日 1 回、皮下注射で投与した。

( a ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> E <sup>1 6</sup> C e x K <sup>4 0</sup> )

( b ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> E <sup>1 6</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 3 - エーテル )

( c ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> E <sup>1 6</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 17 - エステル )

( d ) d G L P - 1 ( A <sup>1</sup> A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> )

( e ) d G L P - 1 ( A <sup>1</sup> A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 3 - エーテル )

( f ) d G L P - 1 ( A <sup>1</sup> A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 17 - エステル )

( g ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> )

( h ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 3 - エーテル )

または

( i ) G L P - 1 ( A i b <sup>2</sup> A <sup>2 2</sup> C e x K <sup>4 0</sup> ) / エストロゲン ( 17 - エステル )

)

## 【0938】

7日後に体重を測定し、体重の変化を求めた(図7a)。GLP-1(Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) / エストロゲン結合体を投与したマウスで、総体重の減り方が最も大きかった。GLP-1 / エストロゲン結合体のほうが、エストロゲンに結合していない対応のGLP-1ペプチドよりも、in vivoでの体重の減り方が大きかった。

## 【0939】

GLP-1 / エストロゲン結合体が、7日間の期間に累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も求めた。GLP-1(Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) / エストロゲン結合体を投与したマウスが、食餌の量が最も少なかった。

## 【0940】

図7bは、GLP-1 / エストロゲン結合体が、血糖の変化(mg/dL)に対しておよぼす影響を示している。GLP-1(Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) / エストロゲン結合体を投与したマウスで、0日目から7日目までの間に血糖の変化が最も大きかった。

## 【0941】

ペプチドを含むd-アミノ酸またはA<sup>22</sup>のどちらも、GLP-1(Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) / エストロゲン結合体ほどは低下しなかった。また、GLP-1(Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>)のエストロゲン結合体は、明らかに、同一のペプチド由来の非エストロゲン形態よりも効果的であった。

実施例19.

## 【0942】

マウス(N=8、平均体重55g)に、溶媒または以下のうちの1つを、1週間にわたって1日1回、皮下注射で投与した。

(a) GLP-1(Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) (120または400μg/kg-日)

(b) GLP-1(Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) / エストロゲン(3-エステル) (120または400μg/kg-日)

(c) dGLP-1(A<sup>1</sup>Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) (400または1200μg/kg-日)または

(d) dGLP-1(A<sup>1</sup>Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) / エストロゲン(3-エステル) (400または1200μg/kg-日)

## 【0943】

d-アミノ酸含有ペプチドは、明らかに、有効性に関するすべての測定値が、l-アミノ酸含有ペプチドより劣っていた。7日後に体重を測定し、体重の変化を求めた(図8a)。これらの用量のペプチドでは、エストロゲンの有無を問わず、体重の低下についての顕著な差はわずかしかなかった。

## 【0944】

図8bは、さまざまなGLP-1 / エストロゲン結合体が、血中グルコース濃度の変化(mg/dL)に対しておよぼす影響を示している。GLP-1(Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>Cex<sup>40</sup>K<sup>40</sup>) / エストロゲン(3-エステル)結合体を投与したマウスで、0日目から7日目までの間にin vivoで血中グルコース濃度の変化が最も大きく、同一のペプチドではあるがエストロゲンを持たない処理した動物とはかなりの差であった。このことから、体重の違いとは関係なく、血糖が直接的に改善されることがわかった。

## 【0945】

図8cは、図示のGLP-1結合体を投与して生じた、体脂肪量の変化に対する影響を示している。

実施例20.

## 【0946】

食餌で誘導した肥満マウス(DIO)(N=8、平均体重61g)に、以下のうちの1

つを  $40\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $400\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1200\mu\text{g}/\text{kg}$  または  $4000\mu\text{g}/\text{kg}$  か、そうでなければ溶媒を、1週間または2週間にわたって1日1回、皮下注射で投与した。

(a) GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) ( $40\mu\text{g}/\text{kg}$  - 日)

(b) dGLP-1 (A<sup>1</sup>Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex K<sup>40</sup>) ( $4000\mu\text{g}/\text{kg}$  - 日)

(c) dGLP-1 (A<sup>1</sup>Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エステル) ( $400$ 、 $1200$ 、 $4000\mu\text{g}/\text{kg}$  - 日)

(d) GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>C<sup>24</sup>(PEG-40kDa)Cex K<sup>40</sup>) ( $40\mu\text{g}/\text{kg}$  - 日) 10

(e) GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>C<sup>24</sup>(PEG-40kDa)Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) ( $40\mu\text{g}/\text{kg}$  - 日) または

(f) GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>C<sup>24</sup>(PEG-40kDa)Cex K<sup>40</sup>) / コレステロール ( $40\mu\text{g}/\text{kg}$  - 日)

【0947】

7日後に体重を測定し、体重の変化を求めた。GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体を投与したマウスで、体重の減り方が最も大きく (図9a)、体脂肪量が最も少なかった (図9b)。

【0948】

GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体が、7日間の期間に累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も求めた。GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エステル) 結合体 (PEGなし) を投与したマウスで、GLP-1 を単独で投与したマウスよりも有意に食餌の量が減少した。

【0949】

図9cは、GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体が、血糖の変化に対しておよぼす影響を示している。d-アミノ酸含有GLP-1 / エストロゲン (3-エステル) 結合体には、0日目から7日目までの間に明らかな用量依存性のグルコース低下が認められ、GLP-1 を単独で投与したマウスに比して最高用量で増強された (図9c) 30

## 実施例 21 .

【0950】

糖尿病食を与えたマウス (N = 8、14月齢) に、溶媒または以下のうちの1つを、1週間にわたって1日1回、皮下注射した。

(a) d-GLP-1 (A<sup>1</sup>Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エステル) ( $1200$ 、 $4000\mu\text{g}/\text{kg}$ )

(b) d-GLP-1 (A<sup>1</sup>Aib<sup>2</sup>A<sup>22</sup>Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) ( $1200$ 、 $4000\mu\text{g}/\text{kg}$ ) または

(c) d-GLP-1 (Aib<sup>2</sup>E<sup>16</sup>K<sup>40</sup>Cex) ( $4000\mu\text{g}/\text{kg}$ )

【0951】

7日後に体重を測定し、体重の変化を求めた (図10a)。エストロゲンがin vivoでは不安定である、安定したアミドまたはエステルとして共有結合している、d-アミノ酸含有GLP-1 / エストロゲン結合体を投与したマウス。不安定なエステル結合体で処理した動物で、総体重の減り方が最も大きかった。

【0952】

GLP-1 / エストロゲン結合体が、7日間の期間に累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も求めた。不安定なエステル結合体を投与したマウスは、残りの結合体を投与したマウスよりも食餌の量が有意に少なかった。

【0953】

GLP-1 / エストロゲン結合体が、血中グルコース濃度の変化 (mg / dL) に対し 50

ておよぼす影響も求めた。図10bは、d-アミノ酸含有GLP-1/エストロゲンエステル結合体を投与したマウスのほうが、安定したエストロゲン結合体を持つこと以外はd-アミノ酸含有ペプチドに匹敵するペプチドを投与したマウスよりも0日目から7日目までの間に血中グルコース濃度の変化が大きかったことを示している。

#### 実施例22．活性GLP-1/エストロゲン結合体のin vitroでの受容体アッセイ

##### 【0954】

以下の化合物の段階希釈物を調製した。

(i) エストラジオール

(ii) GLP-1

(iii) 活性かつエストロゲン安定なGLP-1/エストロゲン(3-エーテル)結合体

(iv) 活性かつエストロゲン不安定なGLP-1/エストロゲン(3-エステル)結合体

(v) 活性かつエストロゲン安定なGLP-1/エストロゲン(17-エステル)結合体

(vi) 活性かつ準安定、酸感受性のGLP-1/エストロゲン(17-ヒドラゾン)結合体

(vii) 活性かつ準安定、チオール還元感受性のGLP-1/エストロゲン(17-カルバメートジスルフィド)結合体

(viii) 活性かつ活性化エストロゲン不安定なGLP-1/エストロゲン(3-エステル、17-OAc)

##### 【0955】

GLP-1の活性(cAMP誘導)-(ii)、(iii)、(iv)の段階希釈物を、GLP-1受容体とcAMP応答配列(CRE)に結合させたルシフェラーゼ遺伝子とをコトランスフェクトしたHEK293細胞とインキュベートした。細胞溶解およびルシフェリンを用いたインキュベーション後に、発光を測定した。結果を以下の表に示すが、これらの結果から、GLP-1をエストロゲンに結合しても、GLP-1受容体に対するGLP-1の固有の活性には影響しないことがわかる。

##### 【0956】

GLP-1の結合-シンチレーション測定前に、(ii)、(iii)、(iv)の段階希釈物を、GLP-1受容体細胞膜抽出物、[I125]-GLP-1、アグルチニンコートSPAビーズとインキュベートした。結果を以下の表に示すが、これらの結果から、GLP-1をエストロゲンに結合しても、GLP-1受容体に対するGLP-1の固有の活性には影響しないことがわかる。

| 結合体                  | GLP-1<br>EC <sub>50</sub> (nM) | GLP-1<br>IC <sub>50</sub> (nM) |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| GLP-1                | 0.011 ± 0.002                  | 0.381 ± 0.043                  |
| GLP-1/エストロゲン(3-エーテル) | 0.012 ± 0.003                  | 0.717 ± 0.135                  |
| GLP-1/エストロゲン(3-エステル) | 0.014 ± 0.001                  | 0.627 ± 0.046                  |

##### 【0957】

エストロゲン活性-(i)、(iii)、(iv)の段階希釈物を、エストロゲン応答配列(ERE)に結合させたルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクトしたT47D細胞とインキュベートした。細胞溶解およびルシフェリンを用いたインキュベーション後に、発光を測定した。結果を以下の表に示すが、これらの結果から、エストロゲンがGLP-1に安定に結合すると、エストロゲンの細胞内エストロゲン活性が有意に低下するが、不安定な結合体では高い度合いで細胞内エストロゲン活性が認められることがわかる。

##### 【0958】

ERαの結合-(i)、(iii)、(iv)の段階希釈物を、精製したERαおよび[I125]-エストラジオールとインキュベートした。濾過後、放射性リガンドの結合

をホスホイメーシングで定量化した。結果を以下の表に示すが、これらの結果から、エストロゲンが G L P - 1 に安定に結合すると、エストロゲンがエストロゲン受容体に結合する機能が大幅に低下するのに対し、不安定な結合体では、エストロゲン受容体の結合が認められる（これは、バイオアッセイ条件下でのエステル結合体の不安定性の関数になる）ことがわかる。

| 結合体                  | ER $\alpha$<br>EC <sub>50</sub> (nM) | ER $\alpha$<br>IC <sub>50</sub> (nM) |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| エストラジオール             | 0.004 ± 0.001                        | 12.01 ± 1.832                        |
| GLP-1/エストロゲン(3-エーテル) | 108.2 ± 15.73                        | 1200 ± 301.1                         |
| GLP-1/エストロゲン(3-エステル) | 0.013 ± 0.001                        | 198.0 ± 16.75                        |

10

#### 【 0 9 5 9 】

G L P - 1 活性 ( c A M P 誘導 ) - ( i i )、( i i i )、( i v )、( v )、( v i )、( v i i )、( v i i i ) の段階希釈物を、G L P - 1 受容体と c A M P 応答配列 ( C R E ) に結合させたルシフェラーゼ遺伝子とをコトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞とインキュベートした。細胞溶解およびルシフェリンを用いたインキュベーション後に、発光を測定した。活性かつ準安定の G L P - 1 / エストロゲン結合体は、G L P - 1 受容体に対して等しく活性であった ( 図 1 1 a )。

#### 【 0 9 6 0 】

エストロゲンの活性 - ( i )、( i i i )、( i v )、( v )、( v i )、( v i i )、( v i i i ) の段階希釈物を、エストロゲン応答配列 ( E R E ) に結合させたルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクトした T 4 7 D 細胞とインキュベートした。細胞溶解およびルシフェリンを用いたインキュベーション後に、発光を測定した。活性かつ準安定の G L P - 1 / エストロゲン結合体は、エストロゲン受容体に対する活性がまちまちであった ( 図 1 1 b ) これらの活性かつ準安定の結合体を意図的に、たとえば、酸、チオールまたは酵素 ( カテプシンなど ) で処理すると、準安定の G L P - 1 / エストロゲン結合体がほぼ完全なエストロゲン活性状態に戻る。よって、活性かつ準安定の G L P - 1 / エストロゲン結合体は、共有結合の結合体としてはエストロゲン活性が低下し、活性になるのに放出が必要となる。

20

30

#### 実施例 2 3 . 不活性 G L P - 1 / エストロゲン結合体の in vitro での受容体アッセイ

#### 【 0 9 6 1 】

以下の化合物の段階希釈物を調製した。

( i ) 不活性の G L P - 1

( i i ) 不活性かつエストロゲン安定な G L P - 1 / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体

( i i i ) 不活性かつエストロゲン不安定な G L P - 1 / エストロゲン ( 3 - エステル ) 結合体

#### 【 0 9 6 2 】

G L P - 1 の活性 ( c A M P 誘導 ) - ( i )、( i i )、( i i i ) の段階希釈物を、G L P - 1 受容体と c A M P 応答配列 ( C R E ) に結合させたルシフェラーゼ遺伝子とをコトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞とインキュベートした。細胞溶解およびルシフェリンを用いたインキュベーション後に、発光を測定した。結果を以下の表に示す

40



| 結合体                                 | GLP-1<br>EC <sub>50</sub> (nM) |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| 活性 GLP-1                            | 0.028 ± 0.001                  |
| 不活性 GLP-1 (d-アミノ酸含有)                | 480.5 ± 12.76                  |
| 不活性 GLP-1 (d-アミノ酸含有)/エストロゲン(3-エステル) | 562.2 ± 26.87                  |
| 不活性 GLP-1 (d-アミノ酸含有)/エストロゲン(3-エーテル) | 418.3 ± 16.75                  |

10

## 実施例 24 .

## 【0963】

食餌で誘導した肥満マウス (DIO) (N = 8、平均体重 51 g) に、以下のうちの 1 つを 400 μg / kg または 4000 μg / kg が、そうでなければ溶媒を、2 週間にわたって 1 日 1 回、皮下注射で投与した。

(a) d - アミノ酸含有 GLP - 1 (A<sup>1</sup> A i b<sup>2</sup> E<sup>16</sup> K<sup>40</sup> C e x) (4000 μg / kg)

(b) d - アミノ酸含有 GLP - 1 (A<sup>1</sup> A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3 - エステル) (400、4000 μg / kg) または

(c) d - アミノ酸含有 GLP - 1 (A<sup>1</sup> A i b<sup>2</sup> A<sup>22</sup> C e x K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3 - エーテル) (400、4000 μg / kg)。

20

## 【0964】

15 日後に体重を測定し、体重の変化を求めた。不活性かつエストロゲン不安定な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン (3 - エステル) 結合体を投与したマウスで、体重の減り方が最も大きく、高用量のほうがその影響は顕著だった (図 12 a)。

## 【0965】

不活性の GLP - 1 および不活性の GLP - 1 / エストロゲン結合体が、15 日間の期間に累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も求めた。不活性かつエストロゲン不安定な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン (3 - エステル) 結合体を投与したマウスのほうが、不活性の GLP - 1 単独または不活性かつエストロゲン安定な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン (3 - エーテル) 結合体を投与したマウスよりも、食餌の量が有意に少なく、高用量のほうがその影響は顕著だった (図 12 b)。

30

## 【0966】

図 12 c は、不活性の GLP - 1 および不活性な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン結合体が、血糖の変化に対しておよぼす影響を示す。高用量の不活性な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン (3 - エステル) 結合体で、0 日目と 14 日目の間に血糖が低下した。

## 【0967】

15 日後に肝臓重量を測定し、肝臓重量の変化を求めた。エストロゲン不安定かつ不活性な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン (3 - エーテル) 結合体を投与したマウスのほうが、エストロゲン安定かつ不活性な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン (3 - エステル) 結合体を投与したマウスよりも肝臓重量の減り方が大きかった (図 12 d)。

40

## 【0968】

15 日後に子宮重量を測定し、子宮重量の変化を求めた。不活性かつエストロゲン不安定な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン (3 - エステル) 結合体を投与したマウスのほうが、不活性の GLP - 1 単独または不活性かつエストロゲン安定な d - アミノ酸含有 GLP - 1 / エストロゲン (3 - エーテル) 結合体を投与したマウスよりも、子宮重量の増え方が有意に大きかった (図 12 e)。

50

実施例 25 .

## 【0969】

標準的な固形飼料を与えた C57BL/6 マウス (N = 8、平均体重 19.6 g) の卵巣を摘出し、5 日間かけて回復させた後、以下のうちの 1 つを 4000 µg/kg か、そうでなければ溶媒を、7 日間にわたって 1 日 1 回、皮下注射で投与した。

(a) GLP-1 アゴニスト

(b) d-アミノ酸含有 GLP-1 (A<sup>1</sup> Aib<sup>2</sup> A<sup>22</sup> Cex K<sup>40</sup>) / エストロン (3-エステル)

(c) d-アミノ酸含有 GLP-1 (A<sup>1</sup> Aib<sup>2</sup> A<sup>22</sup> Cex K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) または

(d) GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3-エーテル)

## 【0970】

研究の最後でマウスを屠殺し、子宮を回収して秤量した。

## 【0971】

7 日後に体重を測定し、体重の変化を求めた。活性かつエストロゲン安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスのほうが、活性かつ GLP-1 アゴニスト単独 (図 13a)、不活性かつエストロゲン不安定な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロン (3-エステル) 結合体または不活性かつエストロゲン安定な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスよりも、体重の減り方が大きかった。GLP-1 アゴニスト、不活性かつエストロゲン不安定な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロン (3-エステル) 結合体、活性かつエストロゲン安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスでは、体脂肪量の減少が認められた (図 13b)。

## 【0972】

GLP-1 結合体が、7 日間の期間に累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も求めた。活性かつエストロゲン安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスのほうが、活性かつ GLP-1 アゴニスト単独、不活性かつエストロゲン不安定な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロン (3-エステル) 結合体または不活性かつエストロゲン安定な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスよりも、摂取した食餌の量が少なかった (図 13c)。

## 【0973】

図 13d は、GLP-1 結合体が、血糖の変化に対しておよぼす影響を示している。不活性かつエストロゲン不安定な不活性な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロン (3-エステル) 結合体または活性かつ安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスのほうが、溶媒よりも血中グルコース濃度の下がり方が大きかった。不活性かつエストロゲン安定な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスでは、血中グルコース濃度の低下は認められなかった。

## 【0974】

7 日後に子宮重量を測定し、子宮重量の変化を求めた。不活性かつエストロゲン不安定な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロン (3-エステル) 結合体投与したマウスのほうが、GLP-1 を単独で投与したマウス、不活性かつエストロゲン安定な d-アミノ酸含有 GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体または活性かつエストロゲン安定な GLP-1 / エストロゲン (3-エーテル) 結合体を投与したマウスよりも、子宮重量の増え方が有意に大きかった (図 13e)。

実施例 26 .

## 【0975】

標準的な固形飼料を与えたマウス (N = 8、平均体重 19.1 g) の卵巣を摘出し、5 日間かけて回復させた後、以下のうちの 1 つを 4000 µg/kg か、そうでなければ溶媒を、7 日間にわたって 1 日 1 回、皮下注射で投与した。

10

20

30

40

50

- (a) GLP-1 アゴニスト / エストロン (3 - エステル)
- (b) GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (17 - カルバメートジスルフィド)
- (c) GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (17 - ヒドラゾン) または
- (d) GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (17 - カテプシン)

## 【0976】

研究の最後でマウスを屠殺し、子宮を回収して秤量した。

## 【0977】

7日後に体重を測定し、体重の変化を求めた。準安定の GLP-1 アゴニスト / エストロゲン結合体を投与したマウスのほうが、活性の GLP-1 アゴニスト単独または活性かつエストロゲン不安定な GLP-1 アゴニスト / エストロン (3 - エステル) 結合体を投与したマウスよりも、体重および体脂肪量の減り方が大きかった (図 14 a および図 14 b)。準安定の酵素感受性結合体および酸感受性結合体、GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (17 - カテプシン) および GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (17 - ヒドラゾン) を投与したマウスはそれぞれ、最初は体重が大きく減ったが、7日間の研究では、準安定のチオール還元感受性結合体、GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (17 - カルバメートジスルフィド) を投与したマウスで、全体としての体重の減り方が最も大きかった。

10

## 【0978】

図 14 c は、準安定の GLP-1 結合体が、血糖の変化に対しておよぼす影響を示している。準安定のチオール還元感受性結合体および酸感受性結合体、GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (17 - カルバメートジスルフィド) および GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (17 - ヒドラゾン) を投与したマウスではそれぞれ、研究期間をとおして、不安定な GLP-1 アゴニスト / エストロン (3 - エステル) 結合体よりも血中グルコース濃度の下がり方が大きかった。

20

## 【0979】

7日後に子宮重量を測定し、子宮重量の変化を求めた。エストロゲン不安定な GLP-1 / エストロン (3 - エステル) 結合体を投与したマウスでは、準安定の GLP-1 / エストロゲン結合体を投与したマウスよりも子宮重量の増え方が有意に大きかった (図 14 d)。

30

実施例 27 .

## 【0980】

食餌で誘導した肥満マウスに、以下のうちの1つを  $40 \mu\text{g} / \text{kg}$  または  $400 \mu\text{g} / \text{kg}$  か、そうでなければ溶媒を、2週間にわたって1日1回、皮下注射で投与した。

- (a) GLP-1 アゴニスト
- (b) GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エステル) または
- (c) GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エーテル)

## 【0981】

15日後に体重を測定し、体重の変化を求めた。活性かつエストロゲン安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エーテル) 結合体を投与したマウスでは、活性の GLP-1 アゴニスト単独または活性かつエストロゲン不安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エステル) 結合体を投与したマウスよりも、体重の減り方が有意に大きかった (図 15 a)。

40

## 【0982】

活性の GLP-1 および活性の GLP-1 / エストロゲン結合体が、15日間の期間に、累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も求めた。活性かつエストロゲン安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エーテル) 結合体を投与したマウスのほうが、活性の GLP-1 アゴニスト単独または活性かつエストロゲン不安定な GLP-1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エステル) 結合体を投与したマウスよりも、摂取した食餌の量が有意に少なかった (図 15 b)。

実施例 28 . GLP-1 / エストロゲン結合体の安定性の分析

50

## 【0983】

ペプチド結合体（1 mg / mL）を、100%ヒト血漿中、pH 7.4および37℃でインキュベートした。アリコート抜き取り、血漿タンパク質を沈殿させ、微量遠心によって除去した。アリコートを、実施例1で説明したようにして、HPLCおよびMSで分析した。活性でエストロゲン安定なGLP-1/エストロゲン（3-エーテル）結合体（実施例3など）では、72時間にわたってエストロゲンの放出が認められなかったが、活性でエストロゲン不安定なGLP-1/エストロゲン（3-エステル）結合体（実施例6など）では、3時間後に相当なエストロゲン放出が認められ、6時間以内に完全なエストロゲン放出が認められた（図16a）。酸感受性の結合体であるGLP-1/エストロゲン（17-ヒドラゾン）（実施例7など）では、生理的なpHで48時間にわたって血漿中にエストロゲンの放出は見られなかったが、酸（pH 5.0）に曝露すると、3時間以内にエストロゲンが放出され、6時間以内に完全なエストロゲン放出が起こった（図16b）。立体障害のないチオール還元感受性結合体（実施例9など）では、24時間後に相当なエストロゲン放出が生じ48時間には、完全なエストロゲン放出となるが、立体障害のあるチオール還元感受性結合体であるGLP-1/エストロゲン（17-カルバメートジスルフィド）（実施例9など）では、72時間で血漿中へのエストロゲン放出が認められなかった（図16c）。この立体障害のあるチオール還元感受性結合体では、グルタチオンの細胞外濃度（15 μMなど）でもエストロゲン放出が認められなかったが、15 mMの細胞内グルタチオン濃度では6時間以内にエストロゲンが放出された（図16d）。酵素感受性GLP-1/エストロゲン（カテプシン）結合体（実施例10など）では、72時間にわたって血漿中にエストロゲン放出が認められなかった（図16e）。

10

20

実施例29.

## 【0984】

食餌で誘導した肥満マウスに、以下のうちの1つを400 μg / kgか、そうでなければ溶媒を、7日間にわたって1日1回、皮下注射で投与した。

- (a) GLP-1 アゴニスト
- (b) GLP-1 アゴニスト / エストロゲン（3-エーテル）
- (c) GIP アゴニスト
- (d) GIP アゴニスト / エストロゲン（3-エーテル）
- (e) グルカゴン アゴニストまたは
- (f) グルカゴン アゴニスト / エストロゲン（3-エーテル）。

30

## 【0985】

7日後に体重を測定し、体重の変化を求めた（図17a）。GLP-1 アゴニスト / エストロゲン（3-エーテル）結合体を投与したマウスのほうが、GLP-1 アゴニスト単独を投与したマウスよりも、体重の減り方が大きく、体重の減り方が有意に大きかった。GIP アゴニスト単独およびGIP アゴニスト / エストロゲン（3-エーテル）結合体を投与したマウスでは、体重の減り方が似通っていた。GIP アゴニストおよびGIP アゴニスト / エストロゲン（3-エーテル）結合体を投与したマウスでは、溶媒を投与したマウスよりも体重の減り方が大きかった。グルカゴン アゴニスト単独およびグルカゴン アゴニスト / エストロゲン（3-エーテル）結合体を投与したマウスでは、体重の減り方が似通っていた。グルカゴン アゴニストまたはグルカゴン アゴニスト / エストロゲン（3-エーテル）結合体を投与したマウスでの体重の減り方は、溶媒を投与したマウスでの体重の減り方と似通っていた。特定の理論に拘泥することなく、GLP-1 受容体を標的にするペプチドのほうが、エストロゲンを細胞（単数または複数）に標的する機能にすぐれ、これがゆえに体重の意味のある差を生み出すことができる。この実験では、GLP-1 活性のペプチド（GLP-1 アゴニスト）に対する結合体は、主にGIPまたはグルカゴン受容体を標的にするペプチド（GIP アゴニストまたはグルカゴン アゴニスト）よりも体重の減少にうまく作用した。

40

## 【0986】

結合体が、累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も求めた（図17b）。GLP-1

50

、G I P、グルカゴンのエストロゲン結合体を投与したマウスのほうが、それぞれ、G L P - 1 アゴニスト、G I P アゴニストまたはグルカゴンアゴニストを投与したマウスよりも、摂取した食餌の量が少なかった。G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与したマウスで、7 日間にわたって食餌の量が最も少なかった。

【 0 9 8 7 】

結合体が、血糖の変化に対しておよぼす影響も求めた。G L P - 1 アゴニストおよび G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与したマウスでは、どちらも7 日間にわたって血中グルコース濃度の低下が認められ、結合体を投与したマウスのほうが減り方が大きかった。G I P アゴニストおよび G I P アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与したマウスでも、7 日間にわたって血中グルコース濃度の低下が認められた。グルカゴンアゴニストを投与したマウスでは、7 日間にわたって血中グルコース濃度の増加が見られたが、グルカゴンアゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与したマウスでは、7 日間にわたって血中グルコース濃度の低下が認められた ( 図 1 7 c ) 。

10

#### 実施例 3 0

【 0 9 8 8 】

食餌で誘導した肥満の野生型マウス、エストロゲン受容体 $\beta$  ノックアウト ( E R  $\beta$  K O ) マウス、エストロゲン受容体 $\alpha$  ノックアウト ( E R  $\alpha$  K O ) マウスに、以下のうちの1 つを4 0 0  $\mu$  g / k g か、そうでなければ溶媒を、2 週間にわたって1 日1 回、皮下注射で投与した

20

( a ) G L P - 1 アゴニストまたは

( b ) G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル )

【 0 9 8 9 】

1 4 日後に体重を測定し、体重の変化を求めた ( 図 1 8 a ) 。G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与した野生型マウスでは、溶媒または G L P - 1 アゴニストを投与したマウスよりも体重の減り方が大きかった。溶媒を投与した野生型マウスでは、2 週間の期間にわたって体重が約 1 0 % 増加し、G L P - 1 アゴニストを投与すると体重が約 3 % 増加し、G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与すると体重が約 1 0 % 減少した。G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与した E R  $\alpha$  K O マウスでは、溶媒または G L P - 1 アゴニストを投与した場合よりも体重の減り方が大きかった。E R  $\alpha$  K O マウスでは、溶媒を投与した場合には体重の変化は認められず、G L P - 1 アゴニストを投与すると体重が約 1 0 % 減少し、G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与すると体重が約 2 0 % 減少した。G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体を投与した E R  $\beta$  K O マウスでは、G L P - 1 アゴニストを投与したマウスと体重の減り方が似ていた。E R  $\beta$  K O マウスでは、溶媒を投与すると体重が約 2 % 減少し、G L P - 1 アゴニストまたは G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エーテル ) 結合体のいずれかを投与すると体重が約 1 5 % 減少した。特定の理論に拘泥することなく、これらのデータから、E R  $\beta$  受容体が体重をさらに減らす作用を担っているのではないかと考えられる。E R  $\beta$  受容体をノックアウトすると、G L P - 1 アゴニストと G L P - 1 アゴニスト / エ

30

40

【 0 9 9 0 】

G L P - 1 結合体が、野生型マウスおよびノックアウトマウスで、累積の食物摂取量に対しておよぼす影響も求めた ( 図 1 8 b ) 。G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エステル ) 結合体を投与したノックアウトマウスで、食餌の量が最も少なかった。

【 0 9 9 1 】

G L P - 1 結合体が、野生型マウスとノックマウスで血糖の変化に対しておよぼす影響も求めた。G L P - 1 アゴニスト / エストロゲン ( 3 - エステル ) 結合体を投与した E R  $\alpha$  K O マウスで、血中グルコース濃度の減り方が最も大きかった ( 図 1 8 c ) 。

【 0 9 9 2 】

50

## 実施例 3 1

## 【0993】

血中グルコース濃度 500 mg / dl のオスの db / db マウスに、以下のうちの 1 つを 50 nmol / kg か、そうでなければ溶媒を、皮下注射で投与した。

(a) GLP - 1 アゴニスト

(b) GLP - 1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エーテル)

(c) GLP - 1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エステル)

## 【0994】

GLP - 1 アゴニストを投与したマウスで、48 時間で (溶媒を除いて) 血糖の低下作用が最も小さかったのに対し、エストロゲン安定な GLP - 1 アゴニスト / エストロゲン (3 - エーテル) 結合体を投与したマウスは、48 時間で血糖の低下作用が最も大きかった (図 19)。

## 【0995】

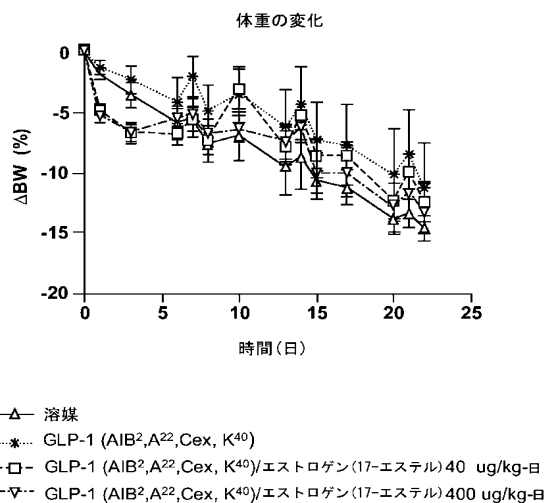
上記の実験の結果は、I 型糖尿病のモデルであるストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルを用いた場合と一致していた。

10

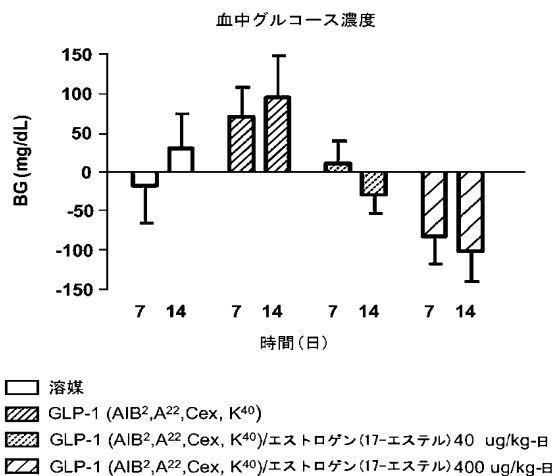
## 【図 1】

|                                  |                                                 |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| アミノ酸配列とグルカゴンスーパーファミリーペプチドのアライメント |                                                 |
| GHRH                             | YADAIFNRSYRKVLGQLSARKLLQDIMSR-----29            |
| PHI                              | HADGVFTSDFSKLLGQLSARKYLESLM-----27              |
| VIP                              | HSDAVFTDNYTFLRKQMAVKKYLNSILN-----28             |
| PACAP-38                         | HSDGIFTDSYRKQMAVKKYLAAVL-----27                 |
| Exendin-4                        | HSGGFTSLSKQMEEAVALFIEMKNGSPSGAPPPS-----39       |
| GLP-1                            | HAEGETSDVSYLEGGQAKKEFIANLVKRG-----31            |
| Glucagon                         | HSQGTFTSDYSKYLDSRAQDFVQWLMT-----29              |
| Oxyntomodulin                    | HSQGTFTSDYSKYLDSRAQDFVQWLMTKRNNTA-----37        |
| GIP                              | YAEGETFSDSIAMDKIHQDDFVNMLLAQKGNKNDWRHNTQ-----42 |
| GLP-2                            | HADGFSDEMNTIIDNLAARDFINNLIQTITD-----33          |
| Secretin                         | HSDGFTFSELSRLREGARLQRLQGIV-----27               |

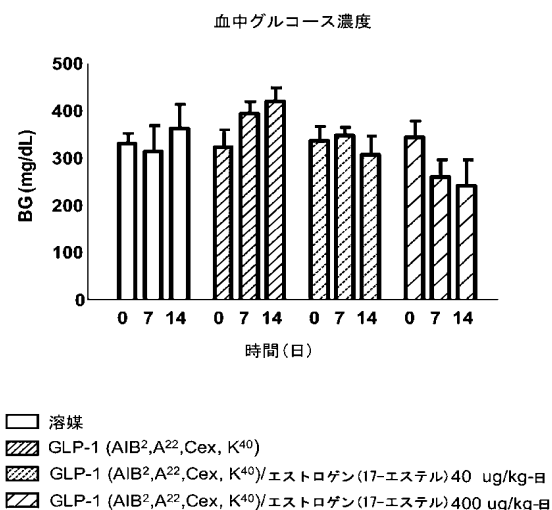
## 【図 2 a】



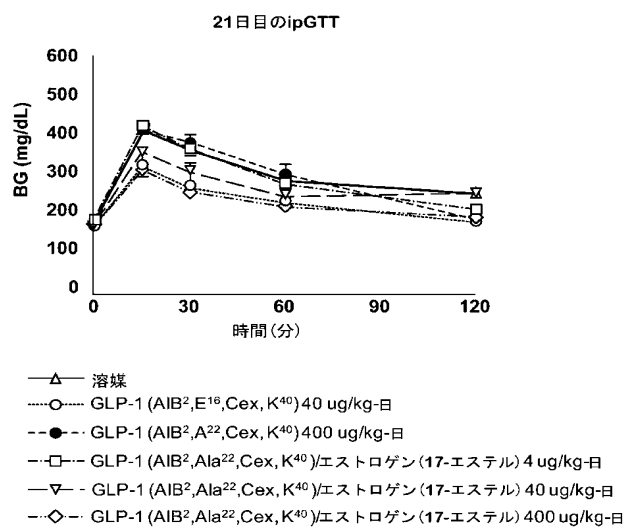
【 図 2 b 】



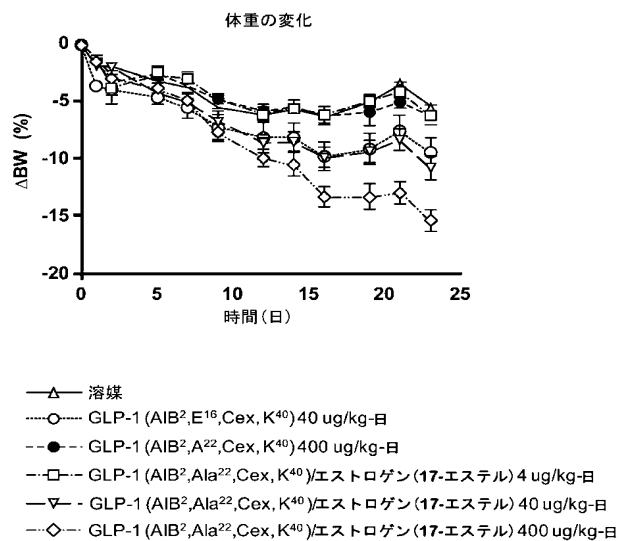
【 図 2 c 】



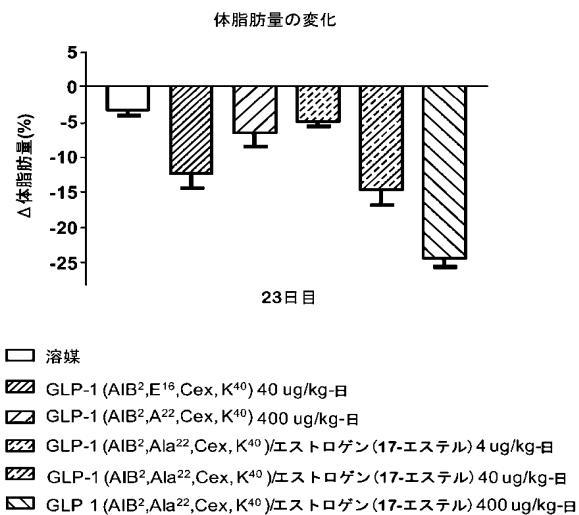
【 図 3 a 】



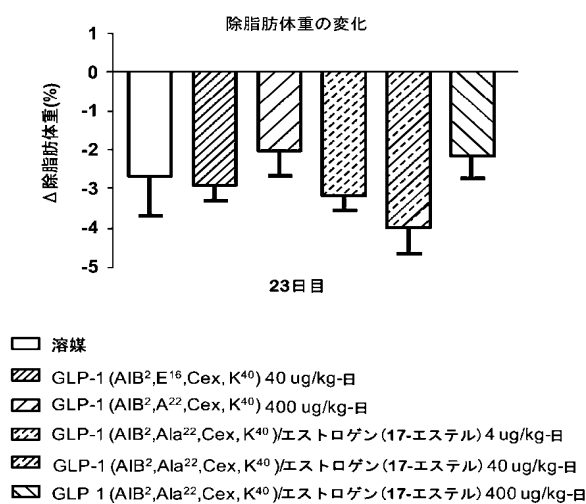
【 図 3 b 】



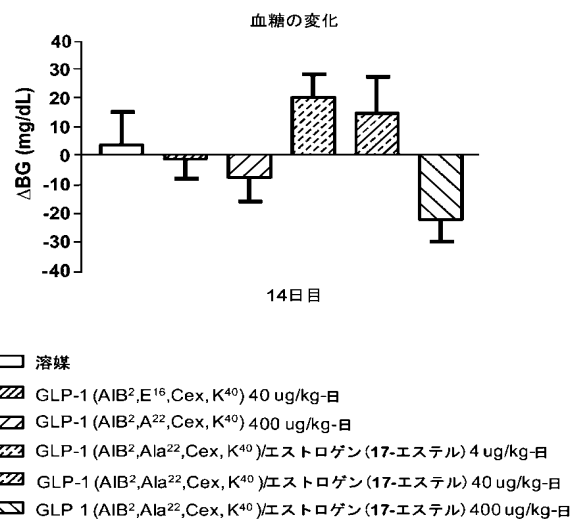
【図 3 c】



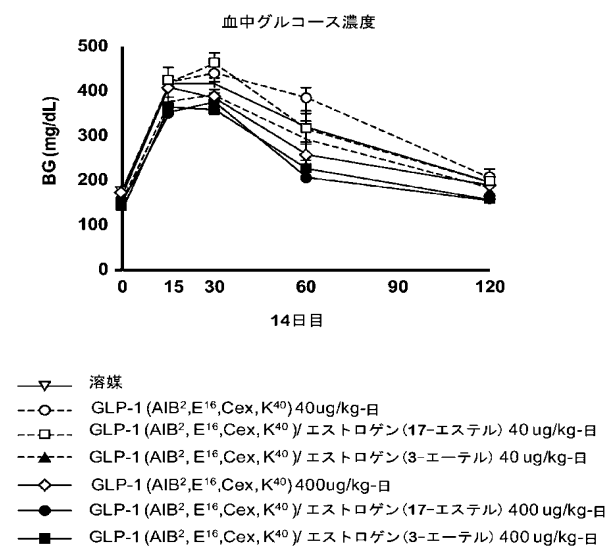
【図 3 d】



【図 3 e】

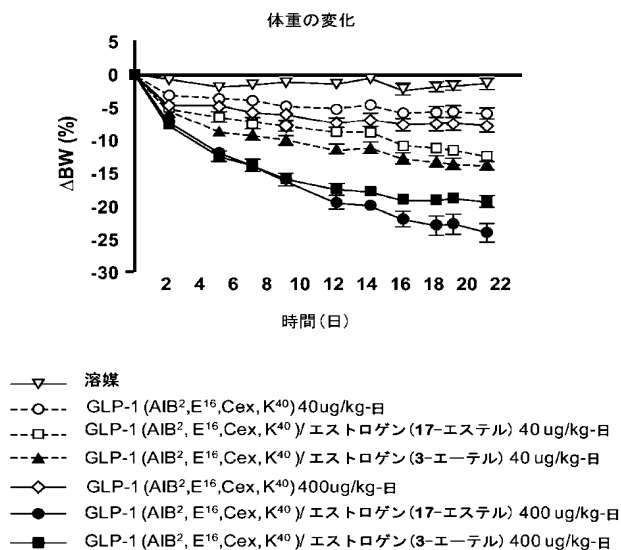


【図 4 a】

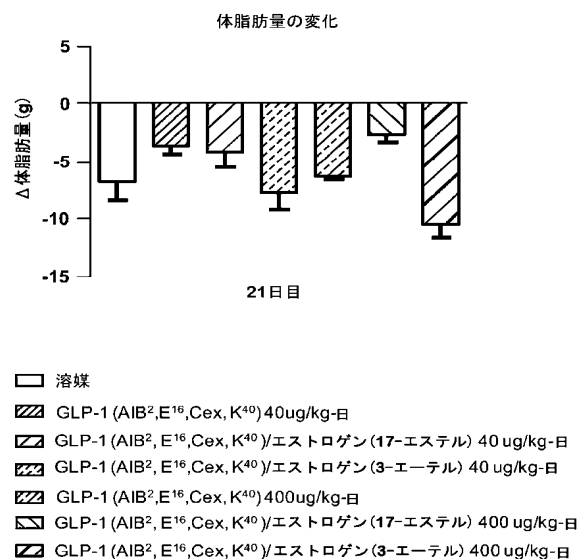




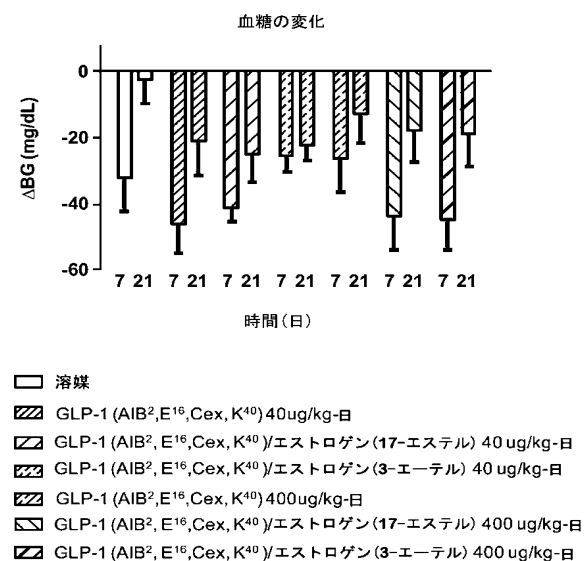
【図 4 b】



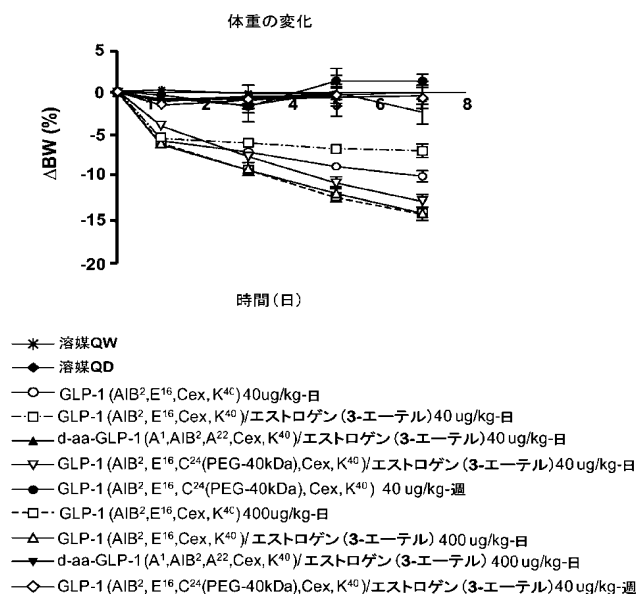
【図 4 c】



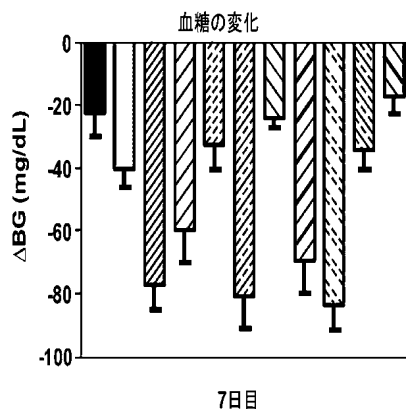
【図 4 d】



【図 5 a】



【図 5 b】

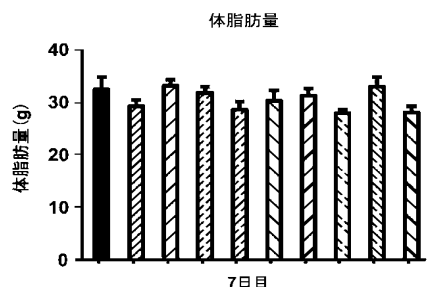


■ 溶媒QW

□ 溶媒QD

▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) 40 ug/kg-週▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 400ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 400 ug/kg-日▨ d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 400 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-週

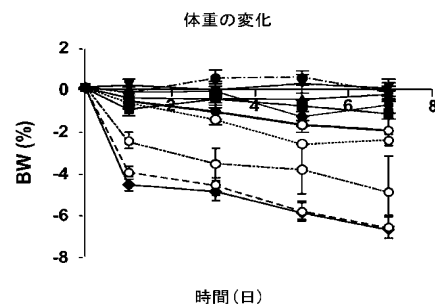
【図 6 b】



■ 溶媒

▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40ug/kg-日▨ d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日▨ d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日

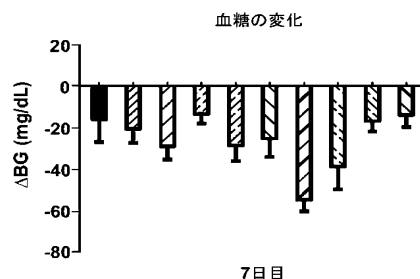
【図 6 a】



—●— 溶媒

—○— GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40ug/kg-日—■— d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40 ug/kg-日—▲— GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40ug/kg-日—◆— GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日—●— d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日—○— GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日—○— GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日—●— d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日—○— GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日

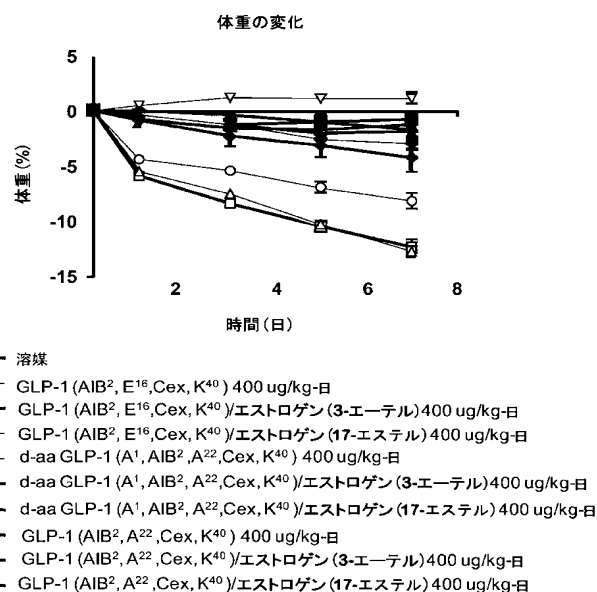
【図 6 c】



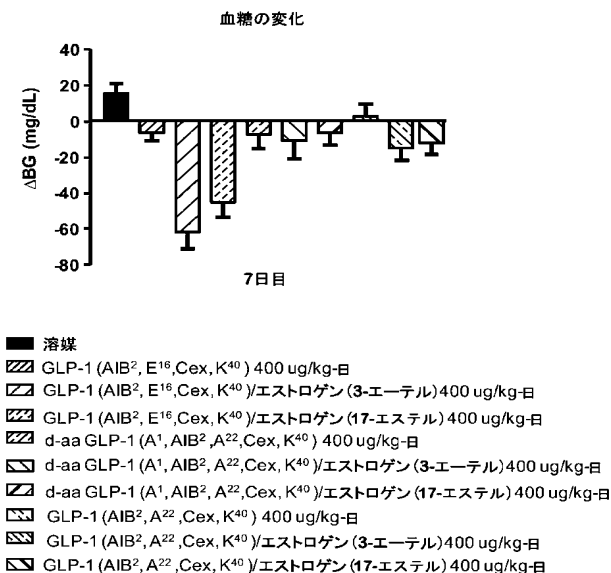
■ 溶媒

▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40ug/kg-日▨ d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 40ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日▨ d-aa-GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) / エストロゲン (17-エステル) 40 ug/kg-日

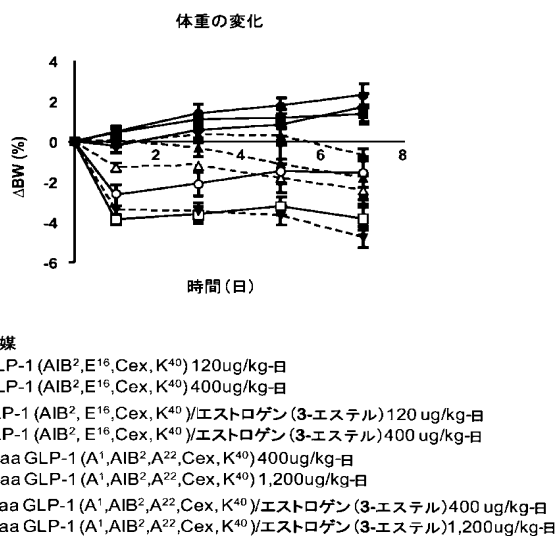
【図 7 a】



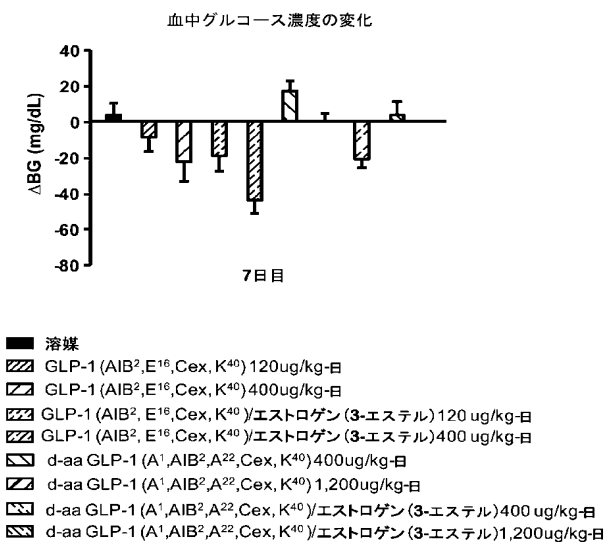
【図 7 b】



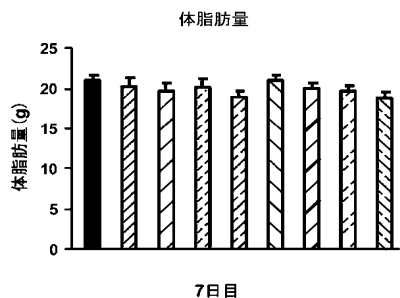
【図 8 a】



【図 8 b】

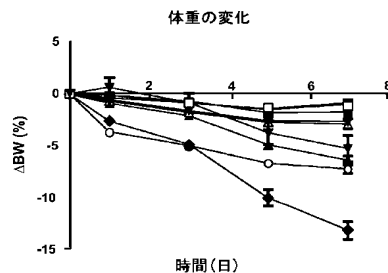


【 図 8 c 】



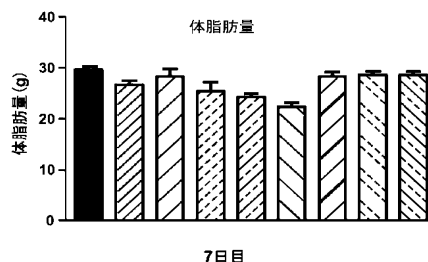
- 溶媒  
 ▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 120ug/kg-日  
 ▩ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 400ug/kg-日  
 ▪ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 120 ug/kg-日  
 ▫ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 400 ug/kg-日  
 ▬ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 400ug/kg-日  
 ▮ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 1,200ug/kg-日  
 ▯ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 400 ug/kg-日  
 ▰ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 1,200ug/kg-日

【 図 9 a 】



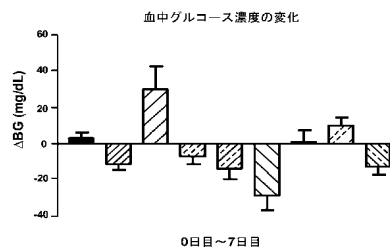
- ◆ 溶媒  
 ○ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日  
 ■ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 4000 ug/kg-日  
 ▲ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 400 ug/kg-日  
 ▼ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 1200 ug/kg-日  
 ◆ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 4000 ug/kg-日  
 ☆ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) 40 ug/kg-日  
 □ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日  
 ▽ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) /コレステロール (3-エーテル) 40 ug/kg-日

【 図 9 b 】



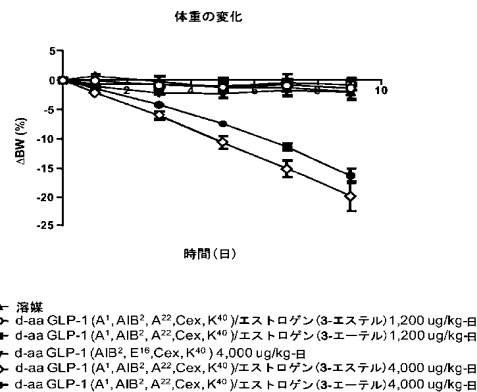
- 溶媒  
 ▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日  
 ▩ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 4000 ug/kg-日  
 ▪ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 400 ug/kg-日  
 ▫ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 1200 ug/kg-日  
 ▬ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 4000 ug/kg-日  
 ▮ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) 40 ug/kg-日  
 ▯ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日  
 ▰ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) /コレステロール (3-エーテル) 40 ug/kg-日

【 図 9 c 】

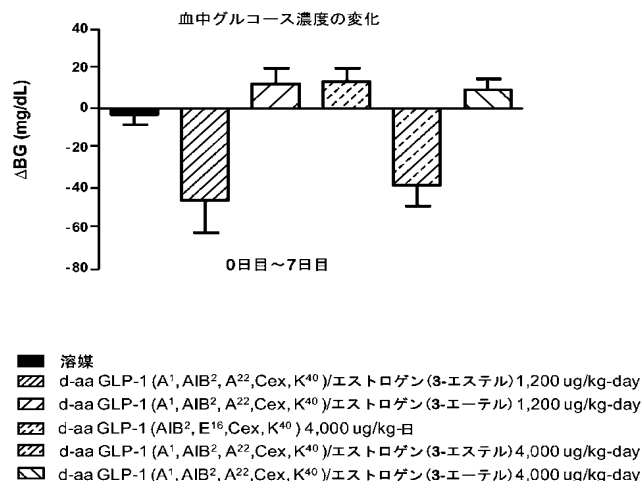


- 溶媒  
 ▨ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日  
 ▩ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) 4000 ug/kg-日  
 ▪ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 400 ug/kg-日  
 ▫ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 1200 ug/kg-日  
 ▬ d-aa GLP-1 (A<sup>1</sup>, AIB<sup>2</sup>, A<sup>22</sup>, Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エステル) 4000 ug/kg-日  
 ▮ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) 40 ug/kg-日  
 ▯ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) /エストロゲン (3-エーテル) 40 ug/kg-日  
 ▰ GLP-1 (AIB<sup>2</sup>, E<sup>16</sup>, C<sup>24</sup>(PEG-40kDa), Cex, K<sup>40</sup>) /コレステロール (3-エーテル) 40 ug/kg-日

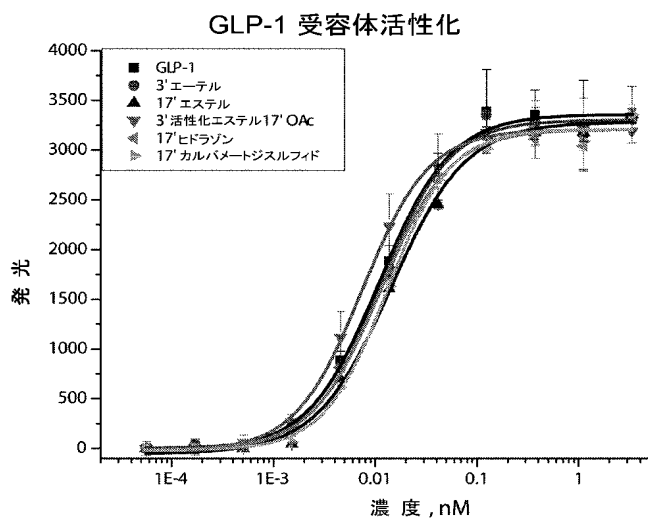
【図 1 0 a】



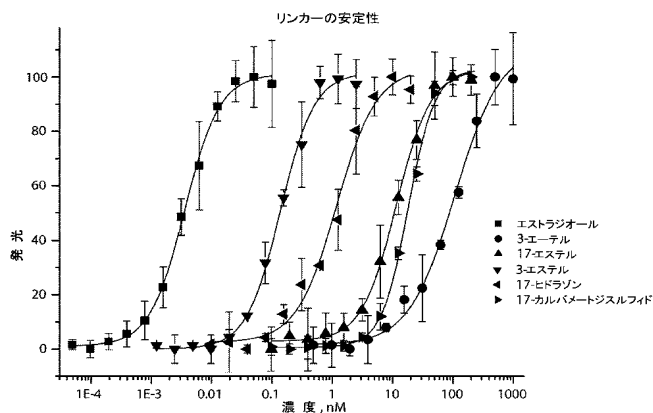
【図 1 0 b】



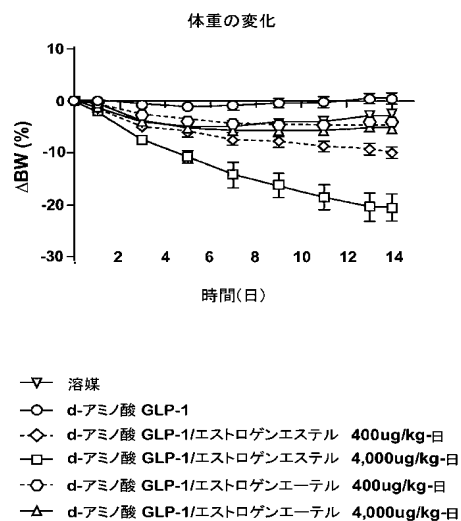
【図 1 1 a】



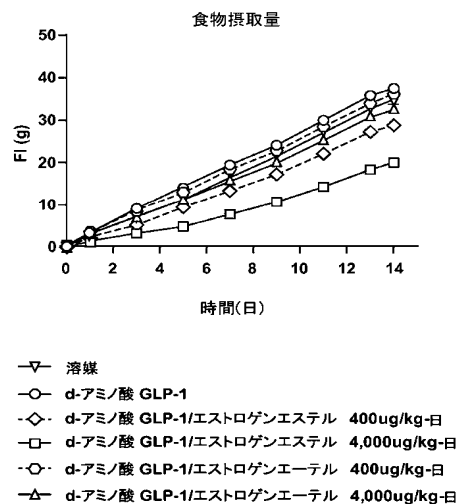
【図 1 1 b】



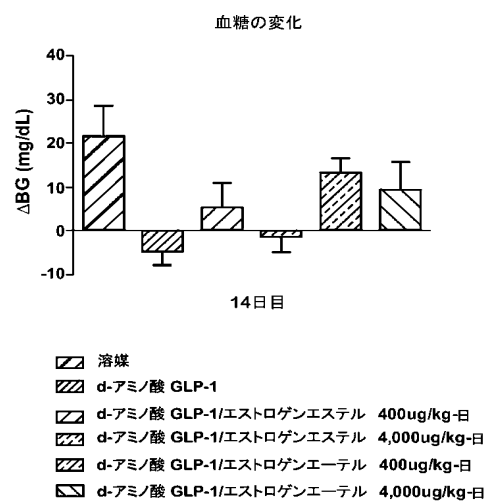
【図 1 2 a】



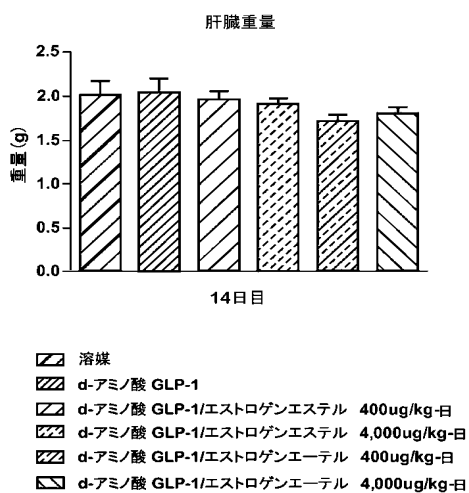
【図 1 2 b】



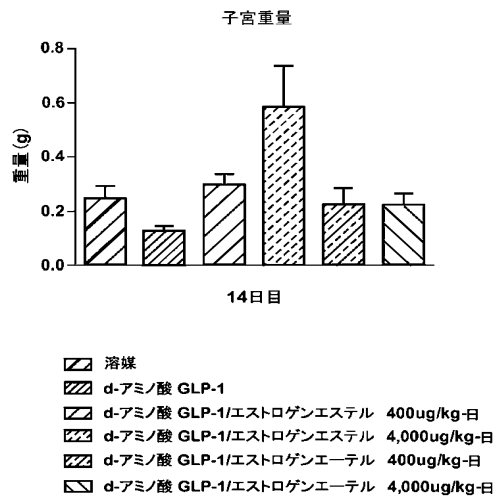
【図 1 2 c】



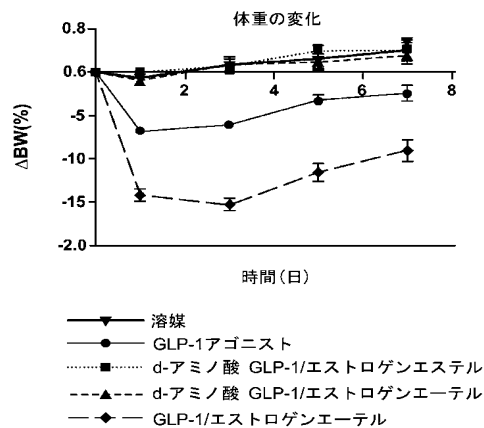
【図 1 2 d】



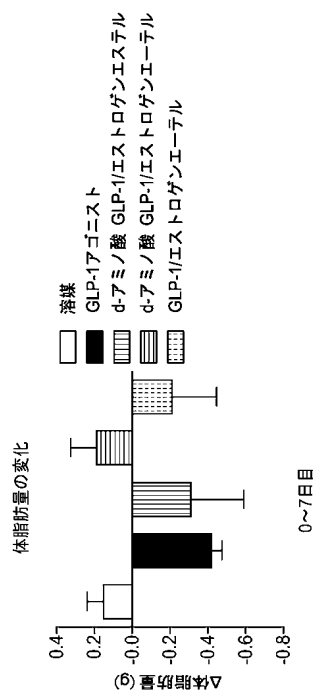
【図 1 2 e】



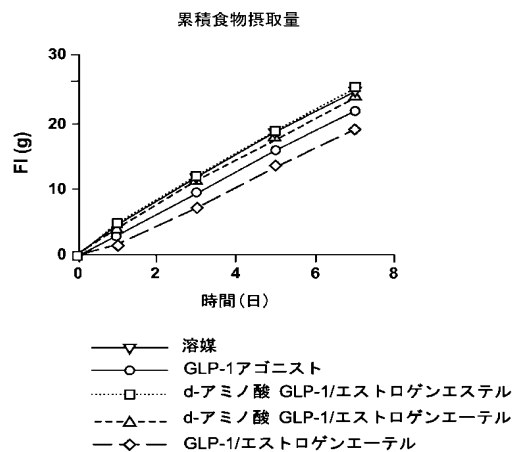
【図 1 3 a】



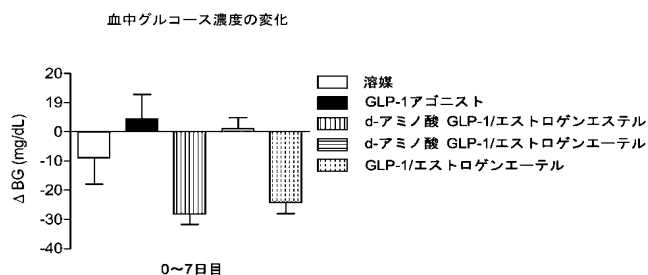
【図 1 3 b】



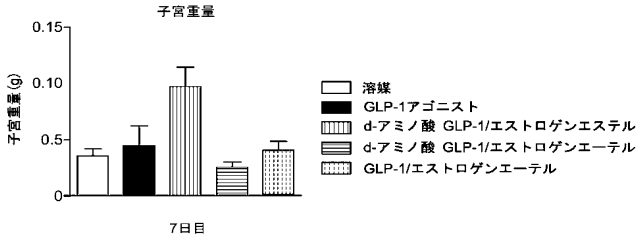
【図 1 3 c】



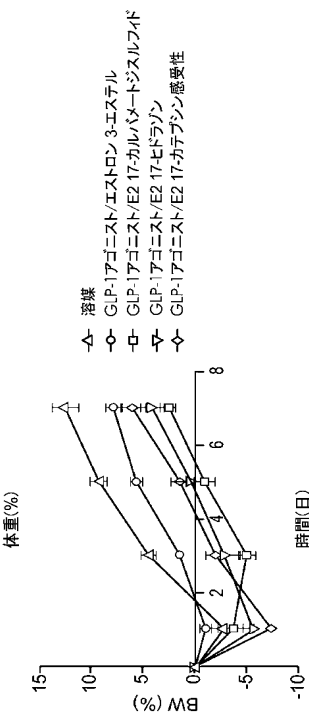
【図 1 3 d】



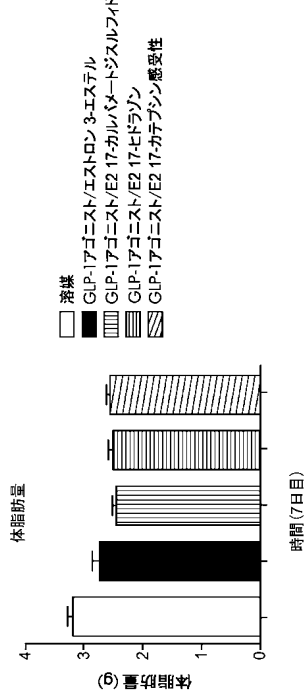
【 図 1 3 e 】



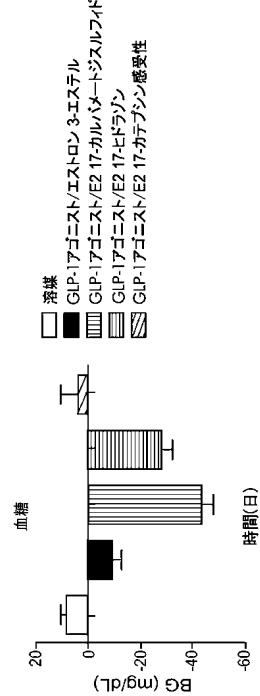
【 図 1 4 a 】



【 図 1 4 b 】



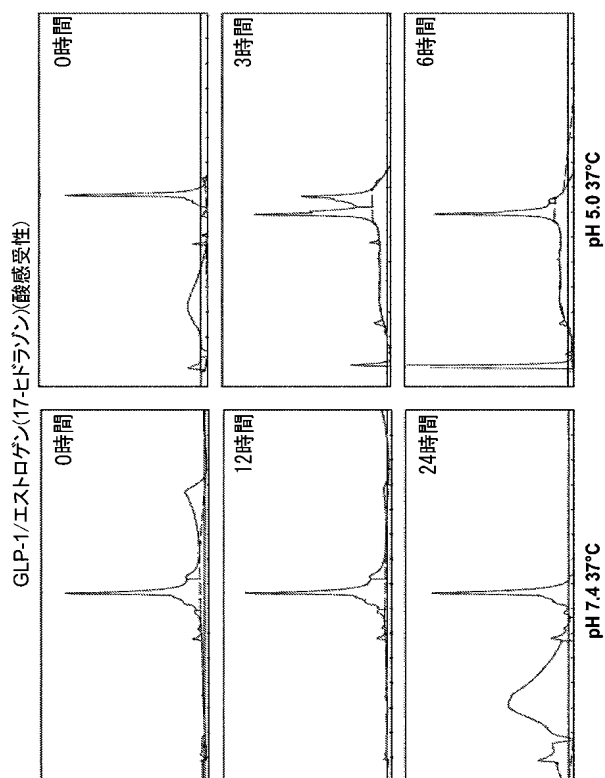
【 図 1 4 c 】



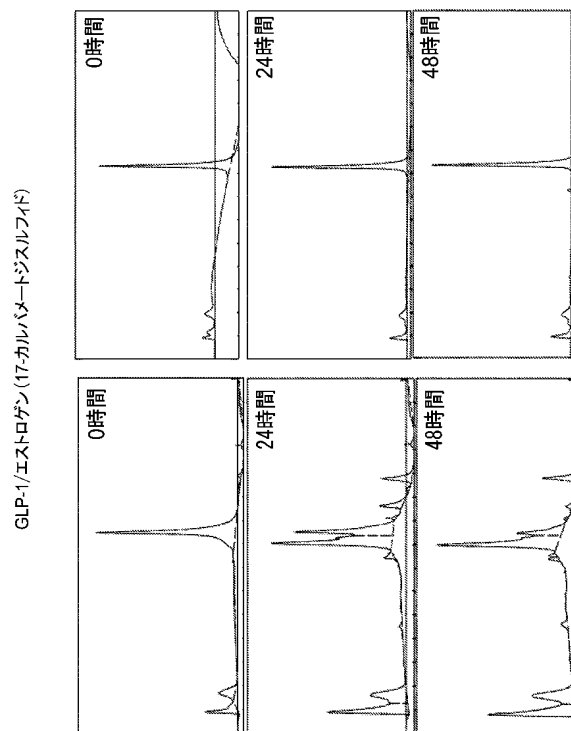




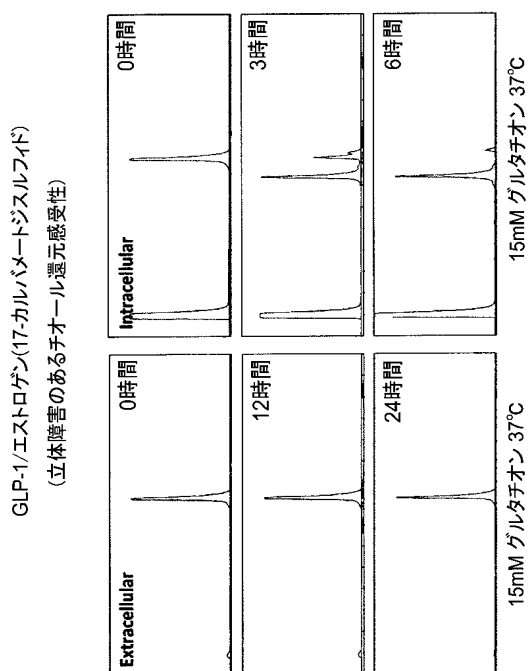
【 図 1 6 b 】



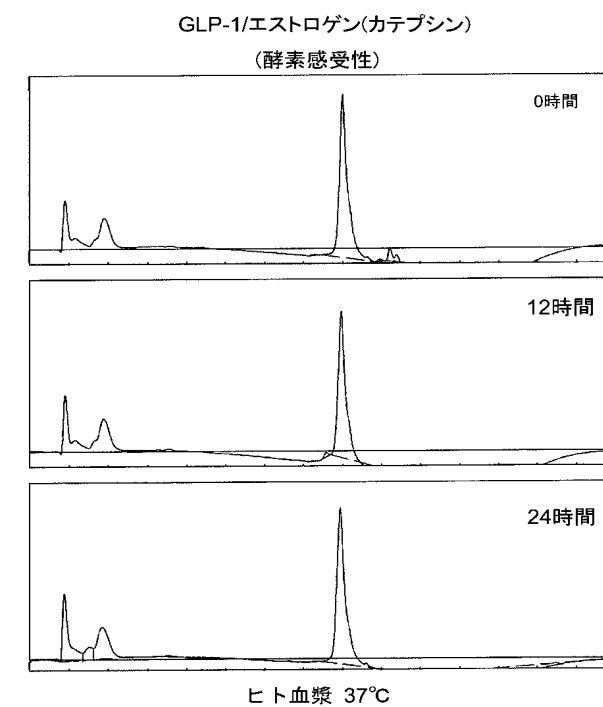
【 図 1 6 c 】



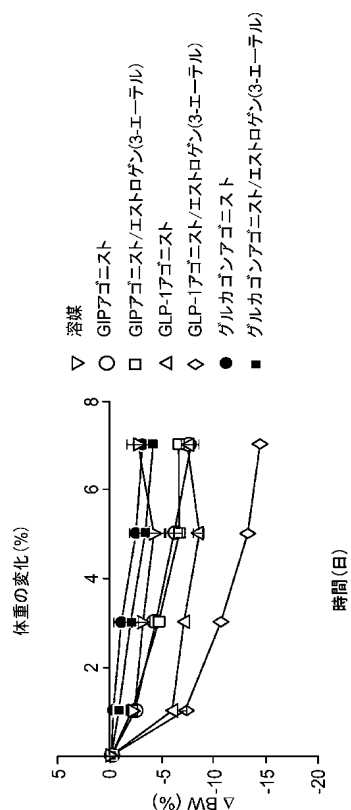
【 図 1 6 d 】



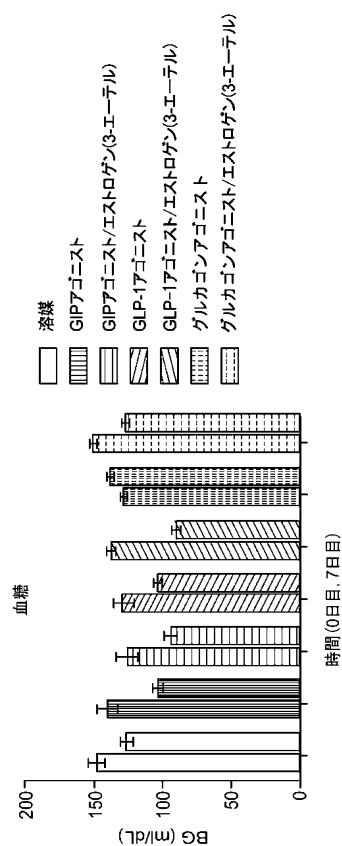
【 図 1 6 e 】



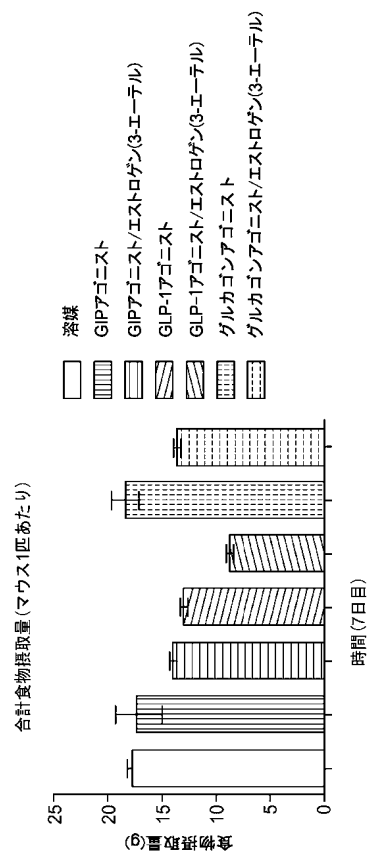
【図 17 a】



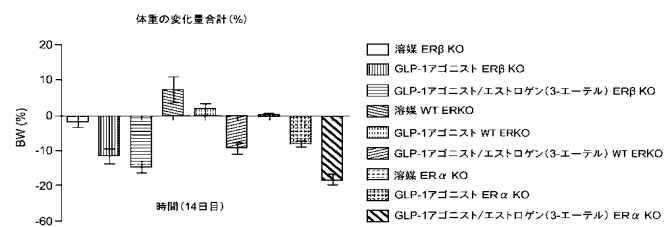
【図 17 c】



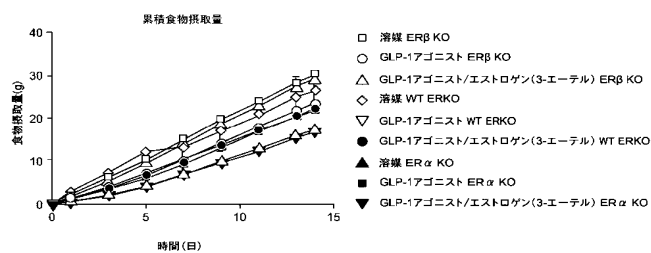
【図 17 b】



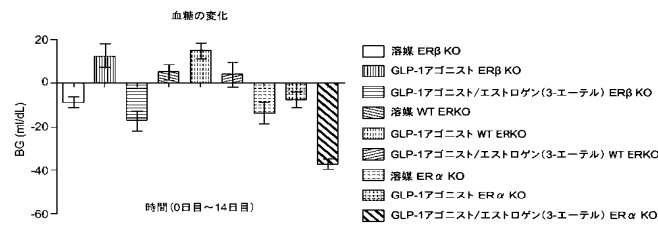
【図 18 a】



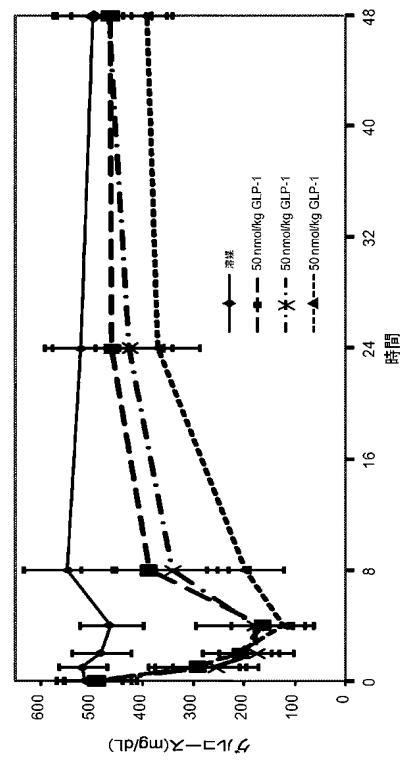
【図 18 b】



【 図 1 8 c 】



【 図 1 9 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/35913

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61K 38/26; A61K 38/28 (2011.01)<br>USPC - 514/7.2; 530/308<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>USPC: 514/7.2; 530/308<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>USPC: 514/7.2; 530/308 (text search)<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Electronic data bases: PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB); Google Scholar Search terms: Glucagon superfamily peptide: glucagon, GLP-1, GLP-2, Glucant, GRPP, oxyntomodulin, Incretin; nuclear hormone receptor ligand: corticosteroid, glucocorticoid, estrogen, progesterone, androgen, steroid, conjugate, linker, partial agonist                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                            |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                            |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No.                                                                      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2009/058734 A1 (DIMARCHI et al.) 7 May 2009 (07.05.2009). Especially pg 76 ln 6-13, pg 111 table 11, pg 127 table 19.                                                                                                                                                                                                       | 1-3                                                                                        |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | GROSSMANN et al. Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. Eur J Endocrinol. September 2004, Vol 151, No 3, Pages 397-406. Especially pg 399 table 1, pg 401 table 2. | 1-3                                                                                        |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                            |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"G" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                            |
| Date of the actual completion of the international search<br>8 July 2011 (08.07.2011)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Date of mailing of the international search report<br><b>22 AUG 2011</b>                   |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/35913

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-44  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

| (51) Int. Cl.                   | F I           | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|---------------|-------------|
| <b>A 6 1 P 3/10 (2006. 01)</b>  | A 6 1 P 3/10  |             |
| <b>A 6 1 P 25/28 (2006. 01)</b> | A 6 1 P 25/28 |             |
| <b>A 6 1 P 43/00 (2006. 01)</b> | A 6 1 P 43/00 | 1 2 3       |
|                                 | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1       |

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

( 特許庁注 : 以下のものは登録商標 )

- 1 . T E F L O N
- 2 . Q n e x a
- 3 . C o n t r a v e
- 4 . T o l i n a s e
- 5 . A c t o s
- 6 . G l u c o p h a g e
- 7 . A v a n d i a
- 8 . B y e t t a
- 9 . S t a r l i x
- 1 0 . A m a r y l

(72) 発明者 ディマルキ , リチャード , ディー .  
アメリカ合衆国・インディアナ州 4 6 0 3 3 ・カメル・ウィルミントン ドライブ 1 0 8 9  
0

(72) 発明者 ヤン , ビン  
アメリカ合衆国・インディアナ州 4 7 4 0 1 ・ブルーミントン・クリークス エッジ ドライブ  
イースト 2 8 6 9

(72) 発明者 フィナン , ブライアン  
アメリカ合衆国・インディアナ州 4 7 4 0 8 ・ブルーミントン・1 5 番 ストリート イースト  
5 0 8

F ターム( 参考) 4C076 CC01 CC21 EE07 EE09 EE16 EE23 EE30 EE31 EE32 EE41  
EE59 FF70  
4C084 AA01 AA02 BA44 DB35 NA05 NA14 NA15 ZA151 ZA152 ZA701  
ZA702 ZC331 ZC332 ZC351 ZC352  
4HD45 AA10 AA30 BA10 CA40 DA30 EA20 FA10



Espacenet

JP2017503784A 抗HER3抗体-薬物コンジュゲート

Applicants: ウー・3・ファルマ・ゲー・エム・ペー・ハー・U3 PHARMA, 第一三共株式会社

Inventors: ザビーネ・ブルーム, トーレ・ヘットマン, ライマー・アブラハム, 上野 傑

Classifications:

IPC A61K31/4375; A61P1/02; A61P1/04; A61P1/16; A61P1/18; A61P11/00; A61P13/02; A61P13/08; A61P13/10; A61P13/12; A61P15/00; A61P17/00; A61P25/00; C07K16/40; A61K39/395; A61P35/00;

CPC A61K31/535 (RU); A61K31/5377 (US); A61K39/395 (RU); A61K39/39558 (EP,CN,US); A61K45/06 (CN); A61K47/64 (RU); A61K47/6803 (EP,US); A61K47/6851 (EP,US); A61K47/6855 (EP,KR,US); A61K47/6857 (EP,US); A61K47/6861 (EP,US); A61K47/6863 (EP,US); A61K47/6869 (EP,US); A61K47/6889 (KR); A61P1/02 (EP); A61P1/04 (EP); A61P1/16 (EP); A61P1/18 (EP); A61P11/00 (EP); A61P13/02 (EP); A61P13/08 (EP); A61P13/10 (EP); A61P13/12 (EP); A61P15/00 (EP); A61P17/00 (EP); A61P25/00 (EP); A61P35/00 (EP,RU); A61P43/00 (EP); C07K16/28 (RU); C07K16/2863 (EP,CN,US); C07K16/30 (CN); C07K16/3015 (EP,US); C07K16/3023 (EP,US); C07K16/32 (EP,US); C07K16/40 (CN); A61K2039/505 (EP,US); C07K2317/21 (EP,US); C07K2317/24 (EP,US); C07K2317/56 (CN); C07K2317/565 (US); C07K2317/76 (EP,US); C07K2317/77 (EP,US); C07K2319/00 (CN);

C-sets A61K39/39558, A61K2300/00 (EP,US);

Priorities: JP2014081454A 2014-04-10; JP2015002020W 2015-04-10

Application: JP2017503784A 2015-04-10

Publication: JP2017503784A 2017-02-02

Published as: AU2015245122A1; AU2015245122B2; AU2020200227A1; BR112016017893A2; CA2939802A1; CN106163559A; CN106163559B; CN111228511A; EP3129063A1; WO2015155998A1; JP2017503784A; JP6105171B2; JP2017197515A; JP6148422B1; JP2017222638A; JP6513128B2; JP2019135248A; JP6707696B2; KR20160144396A; KR101937549B1; KR20190004837A; MX2016010533A; PH12016501711A1; RU2016143351A; RU2016143351A3; RU2711640C2; RU2019143766A; SG10201907607XA; SG11201608309PA; TW201542230A; US2017021031A1; US10303978B2; US2019151328A1

抗HER3抗体-薬物コンジュゲート

Abstract

[Subject] Offer of antineoplastic agents which is excellent in anticancer efficacy and a safety viewpoint and which has the outstanding curative effect.

[Means for Solution] Following formula:[Formula 1]About the anticancer compound and anti-HER3 antibody which are come out of and shown, it is a following formula:-L1-L2-LP-NH-(CH2)n1-La-(CH2)n2-C(=O)- or -L1-L2-LP-Antibody \* medicine conjugate having come out and making it join together via the linker of the structure shown (anti-HER3 antibody is L1)Joining together in End of , an anticancer compound makes a binding site the nitrogen atom of the amino group of the 1st place. -(CH2)n2-The carbonyl group of C(=O)-portion, or LPa of C end -- joining together -- it provides.

[Chosen drawing] Nothing



(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2017-503784

(P2017-503784A)

(43) 公表日 平成29年2月2日(2017.2.2)

| (51) Int. Cl.                      | F I                 | テーマコード (参考) |
|------------------------------------|---------------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>    | A 6 1 K 39/395 L    | 4 C O 8 5   |
| <b>C O 7 K 16/40 (2006.01)</b>     | C O 7 K 16/40 Z N A | 4 C O 8 6   |
| <b>A 6 1 K 31/4375 (2006.01)</b>   | A 6 1 K 39/395 C    | 4 H O 4 5   |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>     | A 6 1 K 31/4375     |             |
| <b>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</b>     | A 6 1 P 35/00       |             |
| 審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 191 頁) 最終頁に続く |                     |             |

(21) 出願番号 特願2016-540705 (P2016-540705)  
 (86) (22) 出願日 平成27年4月10日 (2015. 4. 10)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年6月16日 (2016. 6. 16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/002020  
 (87) 国際公開番号 W02015/155998  
 (87) 国際公開日 平成27年10月15日 (2015. 10. 15)  
 (31) 優先権主張番号 特願2014-81454 (P2014-81454)  
 (32) 優先日 平成26年4月10日 (2014. 4. 10)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 307010166  
 第一三共株式会社  
 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号  
 (71) 出願人 507107992  
 ウー3・ファルマ・ゲー・エム・ペー・ハ  
 ー  
 U 3 P H A R M A  
 ドイツ国、8 2 1 5 2・マルティンスリー  
 ト、フラウンホーファースユトラーセ・2  
 2  
 (74) 代理人 230104019  
 弁護士 大野 聖二  
 (74) 代理人 100105991  
 弁理士 田中 玲子

最終頁に続く

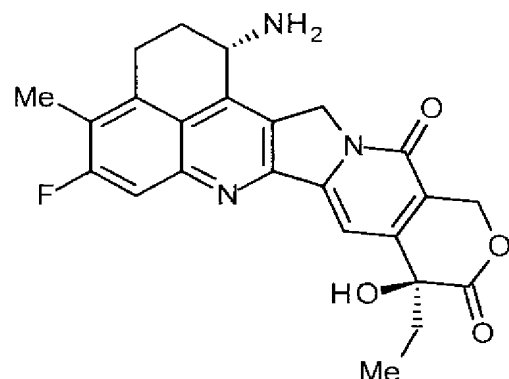
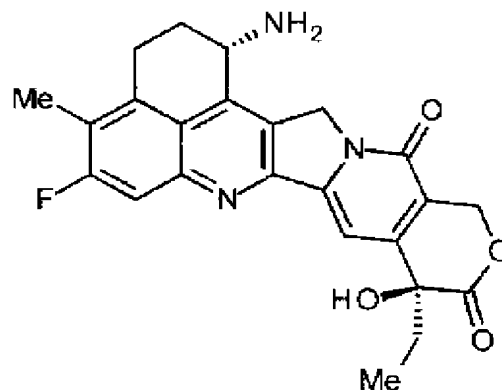
(54) 【発明の名称】 抗HER3抗体-薬物コンジュゲート

## (57) 【要約】

【課題】 抗腫瘍効果と安全性面に優れる、優れた治療効果を有する抗腫瘍薬の提供。

【解決手段】 次式：

【化1】



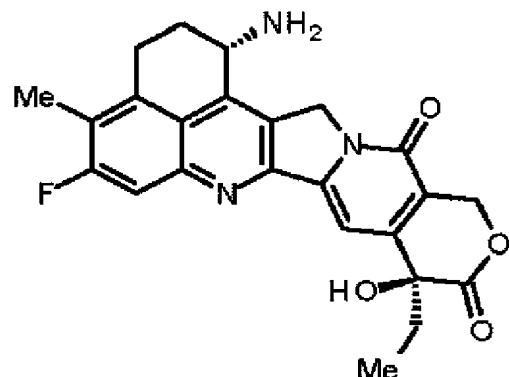
で示される抗腫瘍性化合物と抗HER3抗体とを、次式

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次式

## 【化 1】



10

で示される抗腫瘍性化合物と抗HER3抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ 又は $-L^1-L^2-L^P-$

で示される構造のリンカーを介して、抗HER3抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合によって結合させたことを特徴とする抗体-薬物コンジュゲート。

20

(ここで、抗HER3抗体は、 $L^1$ の末端において結合する。

抗腫瘍性化合物は、1位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、 $-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ 部分のカルボニル基又は $L^P$ のC末端に結合する。

式中、 $n^1$ は、0から6の整数を示し、

$n^2$ は、0から5の整数を示し、

$L^1$ は、 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)_{n^3}-C(=O)-$ を示し、

ここで、 $n^3$ は、2から8の整数を示し、

$L^2$ は、 $-NH-(CH_2CH_2-O)_{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$ 又は単結合を示し、

ここで、 $n^4$ は、1から6の整数を示し、

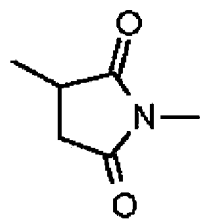
30

$L^P$ は、2から7個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

$L^a$ は、 $-O-$ 又は単結合を示し、

$-(Succinimid-3-yl-N)-$ は次式：

## 【化 2】



40

で示される構造であり、このものの3位で抗HER3抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。)

## 【請求項 2】

$L^P$ のペプチド残基が、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるペプチド残基である請求項1記載の抗体-薬物コンジュゲート。

## 【請求項 3】

$L^P$ が、以下の群から選ばれるペプチド残基である請求項1又は2に記載の抗体-薬物コ

50

ンジュゲート。

-GGF-

-DGGF-

-(D-)D-GGF-

-EGGF-

-GGFG-

-SGGF-

-KGGF-

-DGGFG-

-GGFGG-

-DDGGFG-

-KDGGFG-

-GGFGGGF-

(ここで『(D-)D』はD-アスパラギン酸を示す。)

【請求項 4】

$L^P$  が、4 又は 5 個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である請求項 1 又は 2 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 5】

$L^P$  が、-GGFG-又は-DGGFG-である請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 6】

$L^P$  が、-GGFG-である請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 7】

$n^3$  が 2 から 5 の整数であって、 $L^2$  が単結合である請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 8】

リンカーが、 $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ である請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 9】

$n^3$  が 2 から 5 の整数であって、 $L^2$  が $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ であり、 $n^4$  が 2 又は 4 である請求項 8 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 10】

$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、4 から 7 原子の鎖長を有する部分構造である請求項 8 又は 9 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 11】

$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、5 又は 6 原子の鎖長を有する部分構造である請求項 8 又は 9 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 12】

$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、以下のいずれかである請求項 10 又は 11 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 。

【請求項 13】

$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、以下のいずれかである請求項 12 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

10

20

30

40

50

-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-、  
-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-。

【請求項 14】

-L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>P</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sup>2</sup>-C(=O)-又は-L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>P</sup>-に薬物を結合させた薬物-リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物-リンカー構造である請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)

10

、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)

、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

20

- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、

- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

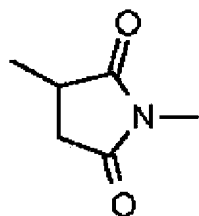
- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、

- (Succinimid-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)；

30

(ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

【化3】

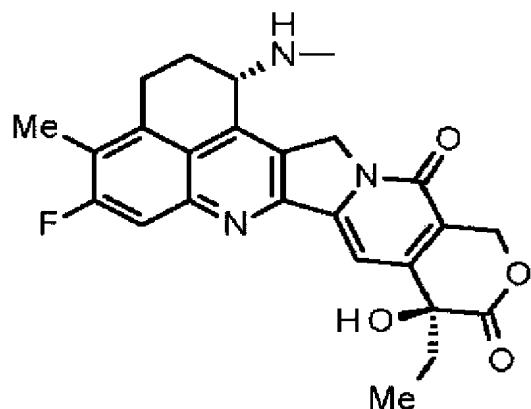


40

で示される構造であり、このものの3位で抗HER3抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

-(NH-DX)は次式：

## 【化 4】



10

で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基、-DGGFG-は、-Asp-Gly-Gly-Phe-Gly-のペンタペプチド残基を示す。）

## 【請求項 15】

薬物—リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物—リンカー構造である請求項14に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

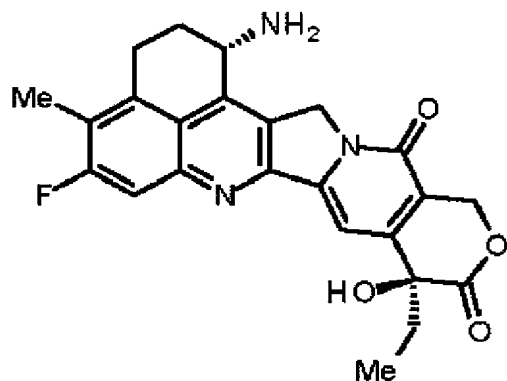
- (Succinimid-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(=O)-GGFG-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 -(Succinimid-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(=O)-DGGFG-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 -(Succinimid-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 -(Succinimid-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 -(Succinimid-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)。

20

## 【請求項 16】

次式

## 【化 5】



30

で示される抗腫瘍性化合物と抗HER3抗体とを次式：

-L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>p</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n<sup>1</sup></sub>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n<sup>2</sup></sub>-C(=O)-

で示される構造のリンカーを介して、抗HER3抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合を介して結合させたことを特徴とする抗体—薬物コンジュゲート。

(ここで、抗HER3抗体はL<sup>1</sup>の末端において結合する。

抗腫瘍性化合物は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n<sup>2</sup></sub>-C(=O)-部分のカルボニル基に結合する。

式中、n<sup>1</sup>は、0から6の整数を示し、

n<sup>2</sup>は、0から5の整数を示し、

L<sup>1</sup>は、-(Succinimid-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n<sup>3</sup></sub>-C(=O)-を示し、

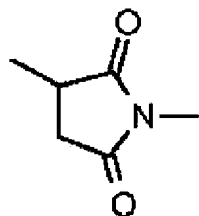
40

50

ここで、 $n^3$ は、2から8の整数を示し、  
 $L^2$ は、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 又は単結合を示し、

ここで、 $n^4$ は、1から6の整数を示し、  
 $L^3$ は、 $-\text{GGFG}-$ のテトラペプチド残基を示し、  
 $L^a$ は、 $-\text{O}-$ 又は単結合を示し、  
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ は次式：

【化6】



10

で示される構造であり、このものの3位で抗HER3抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。)

【請求項17】

$n^1$ が3であり、 $n^2$ が0であり、 $n^3$ が2であり、 $L^2$ が $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ であって、 $n^4$ が2であり、 $L^a$ が単結合であるか、

$n^1$ が1であり、 $n^2$ が1であり、 $n^3$ が5であり、 $L^2$ が単結合であり、 $L^a$ が $-\text{O}-$ であるか、又は

$n^1$ が2であり、 $n^2$ が1であり、 $n^3$ が5であり、 $L^2$ が単結合であり、 $L^a$ が $-\text{O}-$ である、請求項16に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項18】

$n^3$ が2又は5であって、 $L^2$ が単結合である請求項16又は17に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項19】

$n^3$ が2又は5であって、 $L^2$ が $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ であり、 $n^4$ が2又は4である請求項16又は17に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項20】

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$ が、以下のいずれかである請求項16～19のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

【請求項21】

選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が1から10個の範囲である請求項1～20のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項22】

選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が2から8個の範囲である請求項1～20のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項23】

選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が3から8個の範囲である請求項1～20のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項24】

請求項1～23のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

【請求項25】

請求項1～23のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、又はそれ

20

30

40

50

らの水和物を含有する抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

【請求項 26】

肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための請求項 25 記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

【請求項 27】

請求項 1～23 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

10

【請求項 28】

肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための請求項 27 記載の医薬組成物。

【請求項 29】

請求項 1～23 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を投与することを特徴とする腫瘍及び/又は癌の治療方法。

【請求項 30】

他の薬剤と組み合わせて投与される、請求項 24 記載の医薬、請求項 25 もしくは 26 記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬、請求項 27 もしくは 28 記載の医薬組成物、又は請求項 29 記載の治療方法。

20

【請求項 31】

他の薬剤をも活性成分として含有する、請求項 27 又は 28 記載の医薬組成物。

【請求項 32】

U1-49、U1-53、U1-59、U1-7 又は U1-9 の CDRH1 乃至 H3 及び CDR L1 乃至 L3 を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 33】

U1-49、U1-53、U1-59、U1-7 又は U1-9 の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項 1～23 及び 32 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

30

【請求項 34】

配列番号 42 及び 44、54 及び 56、70 及び 72、92 及び 94、若しくは、96 及び 98 で示されるか又は含むアミノ酸配列を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項 1～23、32 及び 33 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 35】

配列番号 583 及び 584（図 1 及び 2）を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項 1～23 及び 32～34 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

40

【請求項 36】

請求項 32～35 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

【請求項 37】

請求項 32～35 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

【請求項 38】

肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、

50

子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための、請求項 36 に記載の医薬組成物又は請求項 37 に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗HER3抗体と抗腫瘍性薬物とをリンカー構造部分を介して結合させた、抗腫瘍薬として有用な抗体-薬物コンジュゲートに関する。

【背景技術】

【0002】

癌細胞表面に発現し、かつ細胞に内在化できる抗原に結合する抗体（該抗原に結合した該抗体も細胞に内在化できる）に、細胞毒性を有する薬物を結合させた抗体-薬物コンジュゲート（Antibody-Drug Conjugate; ADC）は、癌細胞に選択的に薬物を送達できることによって、癌細胞内に薬物を蓄積させ、癌細胞を死滅させることが期待できる（非特許文献1～3参照）。ADCとして例えば、抗CD33抗体にカリチアマイシンを結合させたMylotarg（登録商標；ゲムツズマブオゾガマイシン）が急性骨髄性白血病の治療薬として認可されている。また、抗CD30抗体にオーリスタチンEを結合させたAdcetris（登録商標；プレントキシマブベドティン）がホジキンリンパ腫と未分化大細胞リンパ腫の治療薬として最近認可された（非特許文献4参照）。これまでに認可されたADCに含有される薬物は、DNA又はチューブリンを標的としている。

10

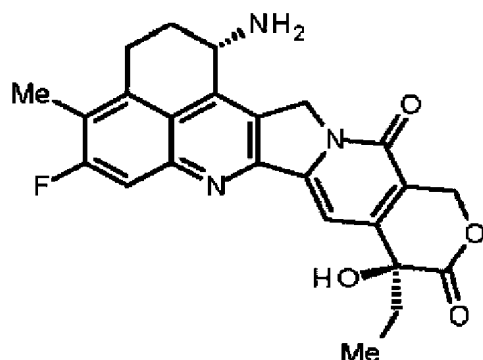
【0003】

抗腫瘍性の低分子化合物としてトポイソメラーゼIを阻害して抗腫瘍作用を発現する化合物であるカンプトテシン誘導体が知られている。その中で下式：

20

【0004】

【化1】



30

【0005】

で示される抗腫瘍性化合物（エキサテカン、化学名：(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン）は、水溶性のカンプトテシン誘導体である（特許文献1、2）。この化合物は、現在臨床で用いられているイリノテカンとは異なり、抗腫瘍効果の発現には酵素による活性化を必要としない。また、イリノテカンの薬効本体であるSN-38や、同じく臨床で用いられているトポテカンよりもトポイソメラーゼI阻害活性が強く、in vitroで種々の癌細胞に対して、より強い殺細胞活性を有している。特にP-glycoproteinの発現によってSN-38等に耐性を示す癌細胞に対しても効果を示した。また、マウスのヒト腫瘍皮下移植モデルでも強い抗腫瘍効果を示し、臨床試験が行われたものの、上市には至っていない（非特許文献5～10参照）。エキサテカンがADCとして有効に作用するかについては明らかではなかった。

40

【0006】

DE-310は、生分解性のカルボキシメチルデキストランポリアルコールポリマーにエキサテカン、GGFGペプチドスパーサーを介して結合させた複合体である（特許文献3）。エ

50



キサテカンを高分子プロドラッグ化することによって、高い血中滞留性を保持させ、さらに腫瘍新生血管の透過性の亢進と腫瘍組織滞留性を利用して、受動的に腫瘍部位への指向性を高めたものである。DE-310は、酵素によるペプチドスパーサーの切断によって、活性本体であるエキサテカン、及びグリシンがアミノ基に結合しているエキサテカンが持続的に遊離され、その結果薬物動態が改善される。非臨床試験における種々の腫瘍の評価モデルにおいて、DE-310は、ここに含まれるエキサテカンの総量がエキサテカン単剤の投与時よりも減少しているのにも拘らず、単剤の投与時よりもより高い有効性を示した。DE-310に関しては臨床試験が実施され、有効例も確認され、活性本体が正常組織よりも腫瘍に集積することが確認されたとの報告がある一方、腫瘍へのDE-310及び活性本体の集積は正常組織への集積と大差なく、ヒトでは受動的なターゲティングは見られなかったとの報告もある（非特許文献11～14参照）。結果としてDE-310も上市には至らず、エキサテカンがこの様なターゲティングを指向した薬物として有効に機能するかについては明らかではなかった。

10

## 【0007】

DE-310の関連化合物として、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$ で示される構造部分を-GGFG-スパーサーとエキサテカンの間に挿入し、 $-\text{GGFG}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$ をスパーサー構造とする複合体も知られているが（特許文献4）、同複合体の抗腫瘍効果については全く知られていない。

## 【0008】

ヒト上皮増殖因子受容体3（HER3、ErbB3としても知られる）は、受容体蛋白質チロシンキナーゼであり、HER1（EGFR、上皮増殖因子受容体としても知られる）、HER2及びHER4（非特許文献15～17参照）とともに受容体蛋白質チロシンキナーゼのEGFRサブファミリーに属する。典型的な上皮増殖因子受容体と同様に、膜貫通受容体HER3は、細胞外リガンド結合ドメイン（ECD）、ECD内の二量体化ドメイン、膜貫通ドメイン、及びカルボキシル末端リン酸化ドメインからなる。これらのドメインに加えてHER1、HER2、HER4は細胞内蛋白質チロシンキナーゼドメイン（TKD）を保持するが、HER3はこのドメインを欠損しており自己リン酸化能を持たない。

20

リガンドであるヘレグリン（Heregulin, HRG）は、HER3の細胞外ドメインに結合し、他のヒト上皮増殖因子受容体（HER）ファミリーメンバーとの二量体化と細胞内ドメインのリン酸転移を促進することにより、受容体を介したシグナル経路を活性化する。HERファミリーメンバーとの二量体形成は、HER3のシグナルポテンシャルを増大させ、シグナルの多様化のみならずシグナルの増幅のための手段となる。例えば、HER2/HER3ヘテロダイマーは、HERファミリーのうちで最も重要な増殖シグナルの一つを誘導する。HER3は乳癌、胃腸癌及び膵臓癌等、いくつかの種類の癌において過剰発現している。興味深いことに、HER2/HER3の発現と非浸潤性段階から浸潤性段階への進行との間に相関が示されている（非特許文献18～20参照）。したがって、HER3を介したシグナルを阻害する物質が望まれている。抗HER3抗体及びその免疫コンジュゲートが、特許文献5～10等でそれぞれ報告されている。

30

## 【先行技術文献】

40

## 【特許文献】

## 【0009】

【特許文献1】特開平5-59061号公報

【特許文献2】特開平8-337584号公報

【特許文献3】国際公開第1997/46260号

【特許文献4】国際公開第2000/25825号

【特許文献5】米国特許第5968511号公報

【特許文献6】米国特許第5480968号公報

【特許文献7】国際公開第2003/013602号

【特許文献8】国際公開第2007/077028号

50

【特許文献 9】国際公開第 2008/100624 号

【特許文献 10】国際公開第 2012/019024 号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献 1】Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

【非特許文献 2】Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

【非特許文献 3】Damle N.K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.

【非特許文献 4】Senter P. D., et al., Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.

【非特許文献 5】Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632. 10

【非特許文献 6】Mitsui, I., et al., Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-786.

【非特許文献 7】Takiguchi, S., et al., Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769.

【非特許文献 8】Joto, N. et al., Int J Cancer (1997) 72, 680-686.

【非特許文献 9】Kumazawa, E. et al., Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220.

【非特許文献 10】De Jager, R., et al., Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273.

【非特許文献 11】Inoue, K. et al. Polymer Drugs in the Clinical Stage, Edited by Maeda et al., (2003) 145-153.

【非特許文献 12】Kumazawa, E. et al., Cancer Sci (2004) 95, 168-175. 20

【非特許文献 13】Soepenbergh, O. et al., Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711.

【非特許文献 14】Wente M. N. et al., Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.

【非特許文献 15】Plowman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1990) 87, 4905-4909.

【非特許文献 16】Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1989) 86, 9193-9197.

【非特許文献 17】Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1993) 90, 2900-2904. 30

【非特許文献 18】Alimandi et al., Oncogene (1995) 10, 1813-1821.

【非特許文献 19】deFazio et al., Int. J. Cancer (2000) 87, 487-498.

【非特許文献 20】Naidu et al., Br. J. Cancer (1998) 78, 1385-1390.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

抗体による腫瘍の治療においては、抗体が抗原を認識して腫瘍細胞に結合しても抗腫瘍効果が十分でない場合が観察されることもあり、より効果の高い抗腫瘍抗体が必要とされる場合がある。また、抗腫瘍性の低分子化合物においては、抗腫瘍効果に優れていても副作用や毒性面等、安全性上の問題を有するものが多く、安全性をより高めてより優れた治療効果を獲得することが課題となっている。すなわち、本発明は、抗腫瘍効果と安全性面に優れる、優れた治療効果を有する抗腫瘍薬を獲得して提供することが課題である。 40

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、抗HER3抗体が腫瘍細胞を標的にできる抗体であること、すなわち、腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、腫瘍細胞に内在化できる特性、或は腫瘍細胞に対する殺細胞活性等を備えた抗体であることから、抗腫瘍性化合物であるエキサテカン、リンカー構造部分を介して同抗体に結合させた抗体-薬物コンジュゲートに変換することによって、抗腫瘍性化合物を腫瘍細胞により確実に移動させて当該化合物の抗腫瘍効果を腫瘍細胞で特異的に発揮させることができること、したがって抗腫瘍効 50

果の確実な発揮とともに抗HER3抗体の殺細胞効果の増強が期待できること、さらには抗腫瘍性化合物の投与量を当該化合物の単体投与時よりも減少させることができること、すなわちこれらによって通常細胞への抗腫瘍性化合物の影響を緩和させることができるのでより高い安全性を達成できること、が可能と考えた。

このために本発明者らは特定の構造のリンカーを創出し、このリンカーを介して抗HER3抗体とエキサテカンとを結合させた抗体-薬物コンジュゲートを獲得することに成功し、同コンジュゲートが優れた抗腫瘍効果を発揮することを見出して本発明を完成させたのである。

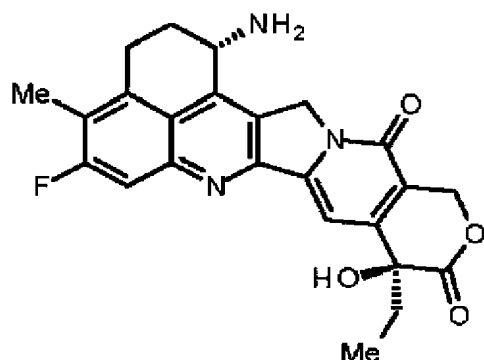
#### 【0013】

すなわち本願発明は、

10

#### 〔1〕次式

#### 【化2】



20

で示される抗腫瘍性化合物と抗HER3抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ 又は $-L^1-L^2-L^P-$

で示される構造のリンカーを介して、抗HER3抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合によって結合させたことを特徴とする抗体-薬物コンジュゲートに関するものである。

#### 【0014】

ここで、抗HER3抗体は $L^1$ の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は、1位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、 $-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ 部分のカルボニル基又は $L^P$ のC末端に結合する。

30

式中、 $n^1$ は、0から6の整数を示し、

$n^2$ は、0から5の整数を示し、

$L^1$ は、 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-(CH_2)_{n^3}-C(=O)-$ を示し、

ここで、 $n^3$ は、2から8の整数を示し、

$L^2$ は、 $-NH-(CH_2CH_2-O)_{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$ 又は単結合を示し、

ここで、 $n^4$ は、1から6の整数を示し、

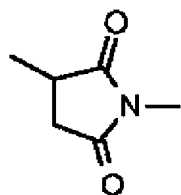
$L^P$ は、2から7個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

$L^a$ は、 $-O-$ 又は単結合を示し、

40

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ は次式：

#### 【化3】



で示される構造であり、このものの3位で抗HER3抗体と結合し、1位の窒素原子上で

50

これを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

【0015】

さらに本願発明は以下の各々に関するものでもある。

〔2〕 $L^P$ のペプチド残基が、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるペプチド残基である〔1〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔3〕 $L^P$ が、以下の群から選ばれるペプチド残基である〔1〕又は〔2〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート：

-GGF-、  
-DGGF-、  
-(D-)D-GGF-、  
-EGGF-、  
-GGFG-、  
-SGGF-、  
-KGGF-、  
-DGGFG-、  
-GGFGG-、  
-DDGGFG-、  
-KDGGFG-、及び  
-GGFGGGF-；

10

20

ここで『(D-)D』はD-アスパラギン酸を示す。

〔4〕 $L^P$ が、4又は5個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である〔1〕又は〔2〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔5〕 $L^P$ が、-GGFG-又は-DGGFG-である〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔6〕 $L^P$ が、-GGFG-である〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【0016】

〔7〕 $n^3$ が2から5の整数であって、 $L^2$ が単結合である〔1〕から〔6〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

30

〔8〕リンカーが、 $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ である〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔9〕 $n^3$ が2から5の整数であって、 $L^2$ が $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ であり、 $n^4$ が2又は4である〔8〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔10〕 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、4から7原子の鎖長を有する部分構造である〔8〕又は〔9〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔11〕 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、5又は6原子の鎖長を有する部分構造である〔8〕又は〔9〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔12〕 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、

$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、  
 $-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、  
 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、  
 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、  
 $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 、又は  
 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ である〔10〕又は〔11〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

40

〔13〕 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、  
 $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 、又は  
 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$

50

である [ 1 2 ] に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[ 1 4 ] リンカーが、 $-L^1-L^2-L^P-$ である [ 1 ] から [ 5 ] のいずれかに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[ 1 5 ]  $L^P$  が、 $-DGGFG-$ である [ 1 4 ] に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[ 1 6 ]  $n^3$  が 2 から 5 の整数であって、 $L^2$  が単結合である [ 1 5 ] に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【 0 0 1 7 】

[ 1 7 ]  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ 又は $-L^1-L^2-L^P-$ に薬物を結合させた薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる 1 種の薬物－リンカー構造である [ 1 ] に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$

10

、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$

20

、  
 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX))$ 、

30

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX))$ 、

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX))$ 、

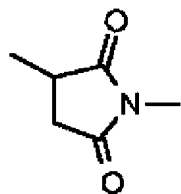
$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX))$ 、

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX))$ 。

【 0 0 1 8 】

ここで、 $-(Succinimid-3-yl-N)-$ は次式：

【化 4】

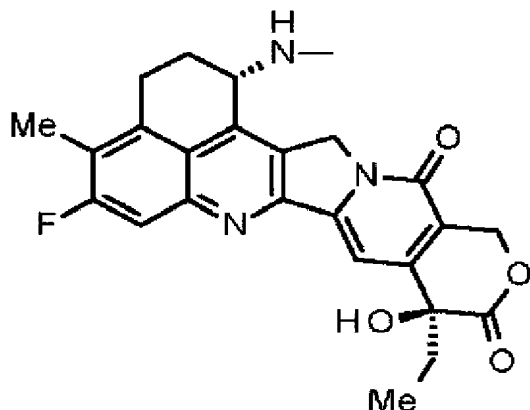


40

で示される構造であり、このものの 3 位で抗 H E R 3 抗体と結合し、1 位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

$-(NH-DX)$  は次式：

## 【化 5】



10

で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基、-DGGFG-は、-Asp-Gly-Gly-Phe-Gly-のペンタペプチド残基を示す。

## 【0019】

[18]  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ に薬物を結合させた薬物-リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物-リンカー構造である[1]に記載の抗体-薬物コンジュゲート：

20

- (Succinimid-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 、  
 -(Succinimid-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 、  
 -(Succinimid-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 、  
 -(Succinimid-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 、  
 -(Succinimid-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)$ 。

## 【0020】

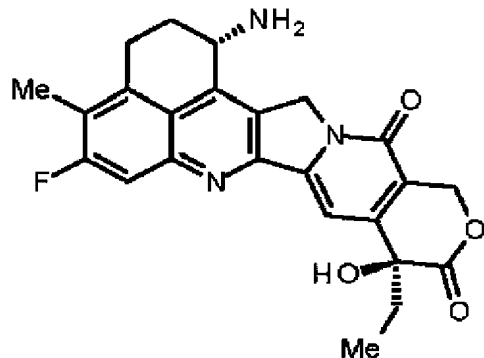
ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-、-(NH-DX)、-GGFG-、及び-DGGFG-は、上記の通りである。

## 【0021】

30

[19] 次式：

## 【化 6】



40

で示される抗腫瘍性化合物と抗HER3抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$

で示される構造のリンカーを介して、抗HER3抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合を介して結合させたことを特徴とする抗体-薬物コンジュゲート。

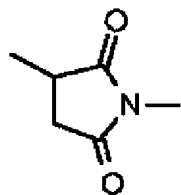
ここで、抗HER3抗体は $L^1$ の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は $-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ 部分のカルボニル基に結合する。

50

式中、 $n^1$ は、0から6の整数を示し、  
 $n^2$ は、0から5の整数を示し、  
 $L^1$ は、 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-$ を示し、  
 ここで、 $n^3$ は、2から8の整数を示し、  
 $L^2$ は、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 又は単結合を示し、  
 ここで、 $n^4$ は、1から6の整数を示し、  
 $L^p$ は、 $-\text{GGFG-}$ のテトラペプチド残基を示し、  
 $L^a$ は、 $-\text{O-}$ 又は単結合を示し、  
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ は次式：

【化7】

10



で示される構造であり、このものの3位で抗HER3抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

【0022】

20

〔20〕 $n^1$ が3であり、 $n^2$ が0であり、 $n^3$ が2であり、 $L^2$ が $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ であって、 $n^4$ が2であり、 $L^a$ が単結合であるか、

$n^1$ が1であり、 $n^2$ が1であり、 $n^3$ が5であり、 $L^2$ が単結合であり、 $L^a$ が $-\text{O-}$ であるか、又は

$n^1$ が2であり、 $n^2$ が1であり、 $n^3$ が5であり、 $L^2$ が単結合であり、 $L^a$ が $-\text{O-}$ である〔19〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔21〕 $n^3$ が2又は5であって、 $L^2$ が単結合である〔19〕又は〔20〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔22〕 $n^3$ が2又は5であって、 $L^2$ が $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ であり、 $n^4$ が2又は4である〔19〕又は〔20〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

30

〔23〕 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ が、

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

である〔19〕から〔22〕のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【0023】

〔24〕 $-L^1-L^2-L^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ に薬物を結合させた薬物-リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物-リンカー構造である〔19〕から〔23〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート：

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、

40

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$

、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{C}$

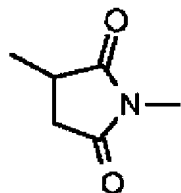
50

$\text{H}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、  
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、  
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ ；

【0024】

ここで、 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ は次式：

【化8】

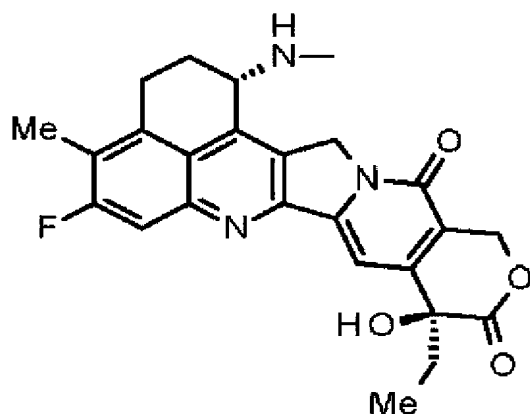


10

で示される構造であり、このものの3位で抗HER3抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

$-(\text{NH}-\text{DX})$ は次式：

【化9】



20

30

で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

$-\text{GGFG}-$ は、 $-\text{Gly-Gly-Phe-Gly}-$ のテトラペプチド残基を示す。

【0025】

〔25〕 $-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ に薬物を結合させた薬物-リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物-リンカー構造である〔19〕から〔23〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート：

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、  
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、  
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 。

40

ここで、 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ 、 $-(\text{NH}-\text{DX})$ 、及び $-\text{GGFG}-$ は、上記の通りである。

【0026】

〔26〕選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が1から10個の範囲である〔1〕から〔25〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔27〕選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が2から8個の範囲である〔1〕から〔25〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔28〕選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が3から8個の範囲である〔1〕から〔25〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【0027】

50



〔29〕〔1〕から〔28〕のいずれかに記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

〔30〕〔1〕から〔28〕のいずれかに記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

〔31〕肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための〔30〕に記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

〔32〕〔1〕から〔28〕のいずれかに記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

10

〔33〕肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための〔32〕に記載の医薬組成物。

〔34〕〔1〕から〔28〕のいずれかに記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を投与することを特徴とする腫瘍及び/又は癌の治療方法。

〔35〕他の薬剤と組み合わせて投与される、〔29〕記載の医薬、〔30〕もしくは〔31〕記載の抗腫瘍薬及び/若しくは抗癌薬、〔32〕もしくは〔33〕記載の医薬組成物、又は〔34〕記載の治療方法。

20

〔36〕他の薬剤をも活性成分として含有する、〔32〕又は〔33〕記載の医薬組成物。

#### 【0028】

〔35〕次式で示される化合物：

$(\text{maleimid-N-yl})-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-\text{L}^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$  又は  $(\text{maleimid-N-yl})-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-\text{L}^p-(\text{NH-DX})$

を抗HER3抗体又はその反応性誘導体と反応させ、該抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させる方法によって薬物－リンカー部分を該抗体に結合させることを特徴とする抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

30

#### 【0029】

式中、 $n^3$ は、整数の2から8を示し、

$\text{L}^2$ は、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 又は単結合を示し、

ここで、 $n^4$ は、1から6の整数を示し、

$\text{L}^p$ は、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれる2から7個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

$n^1$ は、0から6の整数を示し、

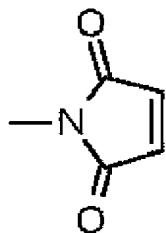
$n^2$ は、0から5の整数を示し、

$\text{L}^a$ は、 $-\text{O}-$ 又は単結合を示し、

$(\text{maleimid-N-yl})-$ は、次式：

40

## 【化 1 0】

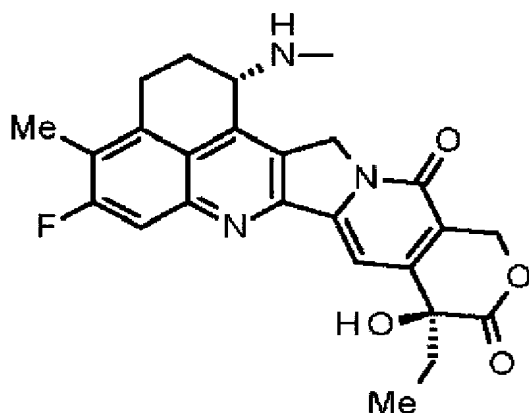


で示される、窒素原子が結合部位である基である。

10

-(NH-DX)は、次式

## 【化 1 1】



20

で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

## 【0030】

〔36〕薬物—リンカー部分を抗HER3抗体に結合させる方法が、該抗体を還元処理して反応性誘導体に変換する方法である〔35〕に記載の製造方法。

## 【0031】

〔37〕選択された1種の薬物—リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が1から10個の範囲である〔35〕又は〔36〕に記載の製造方法。

30

〔38〕選択された1種の薬物—リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が2から8個の範囲である〔35〕又は〔36〕に記載の製造方法。

〔39〕選択された1種の薬物—リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が3から8個の範囲である〔35〕又は〔36〕に記載の製造方法。

〔40〕〔35〕から〔39〕のいずれかの製造方法によって得られる抗体—薬物コンジュゲート。

## 【0032】

〔41〕抗HER3抗体を還元条件で処理した後に以下の化合物群から選ばれる化合物を反応させることを特徴とする、該抗体のヒンジ部のジスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて得られる抗体—薬物コンジュゲート：

40

(maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

50

(maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、又は  
 (maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)。

【 0 0 3 3 】

ここで、(maleimid-N-yl)-は、次式：

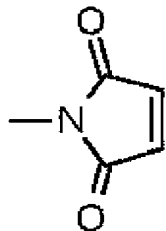
10

20

30

40

## 【化 1 2】

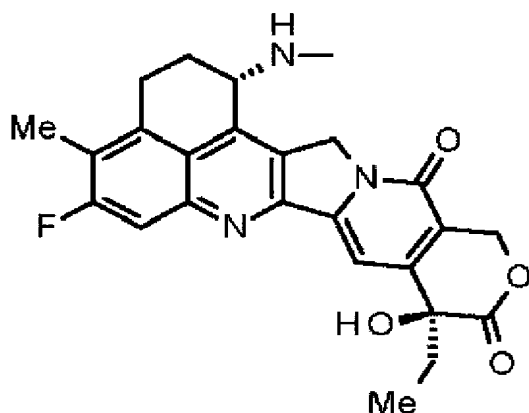


で示される、窒素原子が結合部位である基である。

10

-(NH-DX)は、次式

## 【化 1 3】



20

で示される、1 位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基、-DGGFG-は、-Asp-Gly-Gly-Phe-Gly-のペンタペプチド残基を示す。

## 【0034】

〔42〕抗HER3抗体を還元条件で処理した後に以下の化合物群から選ばれる化合物を反応させることを特徴とする、該抗体のヒンジ部のジスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて得られる抗体-薬物コンジュゲート：

30

(maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

(maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、又は

(maleimid-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

ここで、(maleimid-N-yl)-、-(NH-DX)、及び-GGFG-は、上記の通りである。

## 【0035】

〔43〕選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が1から10個の範囲である〔41〕又は〔42〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔44〕選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が2から8個の範囲である〔41〕又は〔42〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

40

〔45〕選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が3から8個の範囲である〔41〕又は〔42〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔46〕〔40〕から〔45〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

〔47〕〔40〕から〔45〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

〔48〕肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直

50

腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための〔47〕に記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

〔49〕〔40〕から〔45〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

〔50〕肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための〔49〕に記載の医薬組成物。

10

〔51〕〔40〕から〔45〕のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を投与することを特徴とする腫瘍及び/又は癌の治療方法。

〔52〕他の薬剤と組み合わせて投与される、〔46〕記載の医薬、〔47〕もしくは〔48〕記載の抗腫瘍薬及び/若しくは抗癌薬、〔49〕もしくは〔50〕記載の医薬組成物、又は〔51〕記載の治療方法。

〔53〕他の薬剤をも活性成分として含有する、〔49〕又は〔50〕記載の医薬組成物。

#### 【発明の効果】

##### 【0036】

特定の構造のリンカーを介して抗腫瘍性化合物エキサテカンを結合させた抗HER3抗体-薬物コンジュゲートによって、優れた抗腫瘍効果及び安全性を達成することができる。

20

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0037】

【図1】抗HER3ヒト抗体U1-59重鎖の全長アミノ酸配列（配列番号583）を示す。

【図2】抗HER3ヒト抗体U1-59軽鎖の全長アミノ酸配列（配列番号584）を示す。

【図3】U1-59又は抗体-薬物コンジュゲートの連続希釈液で処理したHCC1569の平均蛍光強度を示す。GraphPad Prism Softwareにより、KDとBmax値を算出した。

30

【図4】A549細胞を2日間、U1-59又は種々の抗体-薬物コンジュゲートと共に培養した。HER3又はリン酸化HER3をウェスタンブロッティングにより評価した。泳動コントロールとして、pan-Actinを検出した。

【図5】U1-59又は抗体-薬物コンジュゲート処理（37℃，1時間）によるHCC1569細胞表面のHER3発現低下の平均値を示す。

【図6】ヒト乳癌株（HCC1569）における、HER3抗体-薬物コンジュゲートによる増殖・生存シグナルの抑制試験の結果を示す。A：10％ FBS存在下での抗体-薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。縦軸は各サンプルのATP活性となる発光値を示し、横軸は各抗体-薬物コンジュゲートの濃度を示す。B：無処理群を100％とした場合の抗体-薬物コンジュゲート処理による発光低下率を示す。

40

【図7】ヒト乳癌株（MDA-MB453）における、HER3抗体-薬物コンジュゲートによる増殖・生存シグナルの抑制試験の結果を示す。A：10％ FBS存在下での抗体-薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存を示す。縦軸は各サンプルのATP活性となる発光値を示し、横軸は各抗体-薬物コンジュゲートの濃度を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。B：無処理群を100％とした場合の抗体-薬物コンジュゲート処理による発光低下率を示す。

【図8】ヒトメラノーマ株（A375）における、HER3抗体-薬物コンジュゲートによる増殖・生存シグナルの抑制試験の結果を示す。A：10％ FBS存在下での抗体-

50

薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存を示す。縦軸は各サンプルの A T P 活性となる発光値を示し、横軸は各抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。B：無処理群を 100%とした場合の抗体－薬物コンジュゲート処理による発光低下率を示す。

【図 9】ヒト大腸癌株（H T 29）における、H E R 3 抗体－薬物コンジュゲートによる増殖・生存シグナルの抑制試験の結果を示す。A：10% F B S 存在下での抗体－薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存を示す。縦軸は各サンプルの A T P 活性となる発光値を示し、横軸は各抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。B：無処理群を 100%とした場合の抗体－薬物コンジュゲート処理による発光低下率を示す。

10

【図 10】ヒト肺癌株（A 549）における、H E R 3 抗体－薬物コンジュゲートによる増殖・生存シグナルの抑制試験の結果を示す。A：10% F B S 存在下での抗体－薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存を示す。縦軸は各サンプルの A T P 活性となる発光値を示し、横軸は各抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。B：無処理群を 100%とした場合の抗体－薬物コンジュゲート処理による発光低下率を示す。

【図 11】抗体－薬物コンジュゲート（3）と抗体－薬物コンジュゲート（4）の細胞増殖・生存阻害率の比較結果を示す。左図は、10% F B S 存在下での抗体－薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存阻害率を示す。縦軸は各サンプルの A T P 活性を示す発光を示し、横軸は各抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。右図は、無処理群を 100%とした場合の抗体－薬物コンジュゲート処理による発光低下率を高ドラッグローディング（H D L）と中ドラッグローディング（M D L）で比較した。

20

【図 12】抗体－薬物コンジュゲート（10）と抗体－薬物コンジュゲート（11）の細胞増殖・生存阻害率の比較結果を示す。左図は、10% F B S 存在下での抗体－薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存阻害率を示す。縦軸は各サンプルの A T P 活性を示す発光を示し、横軸は各抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。右図は、無処理群を 100%とした場合の抗体－薬物コンジュゲート処理による発光低下率を高ドラッグローディング（H D L）と中ドラッグローディング（M D L）で比較した。

30

【図 13】抗体－薬物コンジュゲート（13）と抗体－薬物コンジュゲート（14）の細胞増殖・生存阻害率の比較結果を示す。左図は、10% F B S 存在下での抗体－薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存阻害率を示す。縦軸は各サンプルの A T P 活性を示す発光を示し、横軸は各抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。右図は、無処理群を 100%とした場合の抗体－薬物コンジュゲート処理による発光低下率を高ドラッグローディング（H D L）と中ドラッグローディング（M D L）で比較した。

【図 14】抗体－薬物コンジュゲート（3）、（10）、又は（13）を用いたヒト乳癌（H C C 1569）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積及び初期マウス重量は記述的データ（平均及び標準誤差）を用いて、M i c r o s o f t E x c e l 2009を用いて解析された。

40

【図 15】抗体－薬物コンジュゲート（3）、（10）、又は（13）を用いたヒトメラノーマ（H T-144）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積及び初期マウス重量は記述的データ（平均及び標準誤差）を用いて、M i c r o s o f t E x c e l 2009を用いて解析された。

【図 16】抗体－薬物コンジュゲート（3）、（10）、又は（13）を用いたヒト乳癌（M D A-M B-453）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は投与からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積及び初期マウス

50

重量は記述的データ（平均及び標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図17】抗体-薬物コンジュゲート（3）、（10）、又は（13）を用いたヒト大腸癌株（HT-29）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は投与からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積及び初期マウス重量は記述的データ（平均及び標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図18】抗体-薬物コンジュゲート（3）、（10）、又は（13）を用いたヒト肺癌株（A549）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積及び初期マウス重量は記述的データ（平均及び標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

10

【図19】抗体-薬物コンジュゲート（13）を用いたヒトトリプルネガティブ乳癌株（MDA-MB-468）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積及び初期マウス重量は記述的データ（平均及び標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図20】抗体-薬物コンジュゲート（16a）を用いたヒトルミナル乳癌株（MCF-7）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ（平均および標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

20

【図21】抗体-薬物コンジュゲート（16a）を用いたヒトメラノーマ株（WM-266-4）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ（平均および標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図22】抗体-薬物コンジュゲート（16a）を用いたヒト卵巣癌株（OVCAR-8）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ（平均および標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

30

【図23】抗体-薬物コンジュゲート（16a）を用いたヒト膀胱癌株（SW-780）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ（平均および標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図24】抗体-薬物コンジュゲート（16a）を用いたヒト乳癌株（MDA-MB-453）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ（平均および標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

40

【図25】抗体-薬物コンジュゲート（16a）を用いたヒト乳癌株（MDA-MB-453）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ（平均および標準誤差）を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図26】抗体-薬物コンジュゲート（15）を用いたヒト乳癌株（JIMT-1）抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ

50

(平均および標準誤差)を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図27】抗体-薬物コンジュゲート(16a)を用いたヒト肺癌株(PC9)抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ(平均および標準誤差)を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図28】抗体-薬物コンジュゲート(16a)を用いたヒトトリプルネガティブ乳癌株(MDA-MB-468)抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ(平均および標準誤差)を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

10

【図29】抗体-薬物コンジュゲート(16a)を用いたヒト頭頸部癌株(Fadu)抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ(平均および標準誤差)を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

【図30】抗体-薬物コンジュゲート(16a)を用いたヒト胃癌患者由来腫瘍片(NIBIO-G016)を用いた抗腫瘍試験の結果を示す。縦軸は平均腫瘍体積を、横軸は細胞移植からの日数を示す。全ての値は平均±標準誤差で示される。初期腫瘍体積および初期マウス重量は記述的データ(平均および標準誤差)を用いて、Microsoft Excel 2009を用いて解析された。

20

【発明を実施するための形態】

【0038】

以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これによって本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【0039】

本発明はHER3結合蛋白質-薬物コンジュゲートを提供する。本発明のHER3結合タンパク質は、好適には、抗体様結合活性を有する足場タンパク質又は抗体、すなわち、抗HER3抗体である。

30

【0040】

本発明の抗HER3抗体-薬物コンジュゲートは、抗HER3抗体に、リンカー構造部分を介して抗腫瘍性化合物を結合させた抗腫瘍性薬物であり、以下に詳細に説明する。

本発明の文脈内で、本明細書において使用される「足場タンパク質」という用語は、アミノ酸の挿入、置換又は欠失が高度に許容される露出された表面を有するポリペプチド又はタンパク質を意味する。本発明に従って使用することができる足場タンパク質の例は、スタフィロコッカス・オーレウス(*Staphylococcus aureus*)から得られるプロテインA、ピエリス・ブラッシッカエ(*Pieris brassicae*)から得られるビリン結合タンパク質又はその他のリボカリン、アンキリン反復タンパク質及びヒトフィブロネクチンである(Binz and Pluckthun, Curr Opin Biotechnol, 16, 459-69中に概説されている。)。足場タンパク質の操作は、安定に折り畳まれたタンパク質の構造的フレームワーク上に又は構造的フレームワーク中に親和性機能を移植し、又は組み込むこととみなすことができる。親和性機能とは、本発明に従うタンパク質結合親和性を意味する。足場は、結合特異性を付与するアミノ酸配列から構造的に分離可能である。一般に、この様な人工的親和性試薬の開発に適していると思われるタンパク質は、推論によって、又は最も一般的にはHER3(精製されたタンパク質又は細胞表面上にディスプレイされたタンパク質の何れか)に対するパニング等の、インビトロでディスプレイされた人工的足場ライブラリーの結合剤に対するコンビナトリアルタンパク質工学技術(これらの技術は、本分野において公知であ

40

50



る (Skerra, J. Mol. Recogn., 2000; Binz and Pluckthun, 2005)) によって取得され得る。さらに、抗体様結合活性を有する足場タンパク質は、足場ドメインを含有するアクセプターポリペプチドに由来することができ、アクセプターポリペプチドを含有する足場ドメイン上にドナーポリペプチドの結合特異性を付与するために、アクセプターポリペプチドには、ドナーポリペプチドの結合ドメインを移植することができる。前記挿入された結合ドメインは、例えば、抗体、特に、抗HER3抗体の相補性決定領域(CDR)であり得る。挿入は、例えば、当業者に周知の組み換え法の様々な形態による、ポリペプチド合成、コードするアミノ酸の核酸合成等、当業者に公知の様々な方法によって達成することが可能である。

#### 【0041】

10

##### 〔抗体〕

さらに、本明細書において使用される「抗体」又は「抗HER3抗体」という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト化抗体 (Jones et al., Nature 321 (1986), 522-525; Riechmann et al., Nature 332 (1988), 323-329; and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 (1992), 593-596)、キメラ抗体 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81 (1984), 6851-6855)、ヒト抗体と完全ヒト抗体、(Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p. 133-143, ; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999. ; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p. 722-727、国際公開第2007/077028号等)、少なくとも2つの抗体から形成された多重特異的抗体 (例えば、二重特異的抗体) 又はこれらの抗体断片を意味する。「抗体断片」という用語は、上記抗体のあらゆる一部、好ましくはそれらの抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、ダイアボディ (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 (1993), 6444-6448)、一本鎖抗体分子 (Pluckthun in: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113, Rosenberg and Moore, EDS, Springer Verlag, N. Y. (1994), 269-315) 及びHER3への所望の結合能を示す限り他の断片が含まれる。

20

30

#### 【0042】

さらに、本明細書において使用される「抗体」又は「抗HER3抗体」という用語は、抗体の加工されたサブドメインを含有する抗体様分子又は天然に存在する抗体変種を含み得る。これらの抗体様分子は、ラクダ科の動物 (camelid) 等の天然の取得源から得られた (Muyldermans et al., Reviews in Molecular Biotechnology 74, 277-302)、又は、ヒト、ラクダ科の動物若しくはその他の種から得たライブラリーのインビトロディスプレイを通じて得られた (Holt et al., Trends Biotechnol., 21, 484-90) VHのみ又はVLのみのドメイン等の単ドメイン抗体であり得る。

40

#### 【0043】

本発明において、「Fv断片」は、完全な抗原認識及び結合部位を含有する最低の抗体断片である。これらの領域は、緊密に非共有会合した1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。各可変ドメインの3つのCDRが、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体の表面上の抗原結合部位を規定するために相互作用するのは、この立体配置中である。一括

50

して、6つのCDRが抗体への抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）でさえ、一般に、完全な結合部位より低い親和性であるが、抗原を認識及び結合する能力を有する。

「Fab断片」は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一の定常ドメイン（CH1）も含有する。「Fab断片」は、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域由来の1つ又はそれ以上のシステイン等、数個の残基が付加されている点で、「Fab'断片」と異なる。「F(ab')<sub>2</sub>断片」は、当初、ヒンジシステインをその間に有する「Fab断片」の対として作製される。パパイン又はペプシン消化等、このような抗体断片を調製する方法は、当業者に公知である。

#### 【0044】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明の抗HER3抗体は、HER3の細胞外ドメイン（ECD）に対して誘導された抗HER3抗体である。

#### 【0045】

本発明の抗HER3抗体-薬物コンジュゲートに使用される抗HER3抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、ラット、マウス、及びウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

抗HER3抗体は腫瘍細胞を標的にできる抗体であり、すなわち腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性、そして腫瘍細胞に対する殺細胞活性等を備えており、抗腫瘍活性を有する化合物を、リンカーを介して結合させて抗体-薬物コンジュゲートとすることができる。

抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みは、（1）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアッセイ（Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761）、（2）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアッセイ（Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004）、又は（3）治療抗体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというMab-ZAPアッセイ（Bio Techniques 28:162-165, January 2000）を用いて確認できる。イムノトキシンとしては、ジフテテリア毒素の触媒領域とプロテインGとのリコンビナント複合蛋白質も使用可能である。

抗体の抗腫瘍活性は、in vitroでは、細胞の増殖の抑制活性で測定することで確認できる。例えば、抗体の標的蛋白質を過剰発現している癌細胞株を培養し、培養系に種々の濃度で抗体を添加し、フォーカス形成、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。In vivoでは、例えば、標的蛋白質を高発現している腫瘍細胞株を移植したヌードマウスに抗体を投与し、当該癌（腫瘍）細胞の変化を測定することによって、抗腫瘍活性を確認できる。

抗体-薬物コンジュゲートは抗腫瘍効果を発揮する化合物を結合させてあるので、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。抗腫瘍性化合物の細胞障害性を腫瘍細胞において特異的・選択的に発揮させる目的からは、抗体が内在化して腫瘍細胞内に移行する性質のあることが重要であり、好ましい。

#### 【0046】

抗HER3抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature(1975)256, p.495-497、Kennet, R.ed., Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press, N.Y.(1980))に従って

10

20

30

40

50

、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

なお、抗原は抗原蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、抗原遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現した抗原を精製すればよい。上記の遺伝子操作による抗原発現細胞、或は抗原を発現している細胞株、を動物に免疫する方法を用いることによって抗体を取得できる。

抗HER3抗体は、公知の手段によって取得することができる。

#### 【0047】

本発明で使用する抗HER3抗体は、特に制限はないが、例えば、以下の特性を有するものが望ましい。

10

(1) 以下の特性を有することを特徴とする抗HER3抗体；

(a) HER3に特異的に結合する。

(b) HER3と結合することによってHER3発現細胞に内在化する活性を有する。

(2) HER3の細胞外ドメインに結合する上記(1)に記載の抗体。

(3) モノクローナル抗体である上記(1)又は(2)に記載の抗体。

(4) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有する上記(1)乃至(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体又はヒト若しくは完全ヒト(モノクローナル)抗体である上記(1)乃至(4)のいずれかに記載の抗体。

20

(6) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記(1)乃至(5)のいずれかに記載の抗体。

(7) 重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している上記(1)乃至(6)のいずれかに記載の抗体。

(8) 配列番号70に記載のアミノ酸配列で示される重鎖可変領域及び配列番号72に記載のアミノ酸配列で示される軽鎖可変領域を含んでなる上記(7)に記載の抗体。

(9) 上記(1)乃至(8)のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養する工程及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体を採取する工程を含む当該抗体の製造方法によって得られる抗体。

30

#### 【0048】

以下に、本発明において使用される抗HER3抗体について説明する。

本明細書において、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。

本明細書において、「遺伝子」という語には、DNAのみならずそのmRNA、cDNA及びそのcRNAも含まれる。

本明細書において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれる。

本明細書においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。

40

本明細書において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

本明細書において、「HER3」は、HER3蛋白質と同じ意味で用いている。

本明細書における「CDR」とは、相補性決定領域(CDR: Complementarity determining region)を意味する。抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所のCDRがあることが知られている。CDRは、超可変領域(hypervariable domain)とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ3ヶ所に分離している。本明細書においては、抗体のCDRについて、重鎖のCDRを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖のCDRを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1

50

、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ExpressHyb Hybridization Solution（クオンテック社製）中、68℃でハイブリダイズすること、又はDNAを固定したフィルターを用いて0.7-1.0MのNaCl存在下、68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1-2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度SSCとは150mM NaCl、15mMクエン酸ナトリウムからなる）を用い、68℃で洗浄することによって同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

#### 【0049】

10

##### 1. HER3

HER3はヒト上皮増殖因子受容体3で、HER3、ErbB3とも呼ばれ、受容体蛋白質チロシンキナーゼであり、HER1、HER2及びHER4とともに受容体蛋白質チロシンキナーゼの上皮増殖因子受容体サブファミリーに属する。HER3は膜貫通受容体であり、細胞外リガンド結合ドメイン（ECD）、ECD内の二量体化ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内蛋白質チロシンキナーゼドメイン（TKD）及びカルボキシル末端リン酸化ドメインを含む。HER3は乳癌、胃腸癌及び膵臓癌等、いくつかの種類の癌において過剰発現している。HER2-HER3の発現と非浸潤性段階から浸潤性段階への進行との間に相関が見られる。

本発明で用いるHER3蛋白質は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス等）のHER3発現細胞から直接精製して使用するか、或は当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、HER3をin vitroにて合成する、或は遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、HER3 cDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、或は他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってHER3を発現させることによって、該蛋白質を得ることができる。また、前記の遺伝子操作によるHER3発現細胞、或はHER3を発現している細胞株をHER3蛋白質として使用することも可能である。

20

HER3のRNA配列、cDNA配列及びアミノ酸配列は公的データベース上に公開されており、例えばAAA35979（アミノ末端19アミノ酸残基からなるシグナル配列を含む前駆体）、M34309（NCBI）等のアクセッション番号により参照可能である。

30

また、上記HER3のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、当該蛋白質と同等の生物活性を有する蛋白質もHER3に含まれる。

#### 【0050】

##### 2. 抗HER3抗体の製造

本発明のHER3に対する抗体は、この分野で通常実施される方法に従って、HER3又はHER3のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原となるHER3の生物種はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来するHER3を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種HER3に結合する抗体とヒトHER3との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

40

また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)）に従って、HER3に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

50

なお、抗原となる H E R 3 は H E R 3 遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に発現させることによって得ることができる。

具体的には、H E R 3 遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現した H E R 3 を精製すればよい。

また、上記の遺伝子操作による H E R 3 発現細胞、或は H E R 3 を発現している細胞株を H E R 3 蛋白質として使用することも可能である。以下、具体的に H E R 3 に対する抗体の取得方法を説明する。

#### 【0051】

##### (1) 抗原の調製

抗 H E R 3 抗体を作製するための抗原としては H E R 3 又はその少なくとも 6 個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、或はこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。

H E R 3 は、ヒトの腫瘍組織或は腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、H E R 3 を *in vitro* にて合成する、或は遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

遺伝子操作では、具体的には、H E R 3 の c D N A を発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、或は他の原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換して H E R 3 を発現させることによって、抗原を得ることができる。

また、膜蛋白質である H E R 3 の細胞外領域と抗体の定常領域とを連結した融合蛋白質を適切な宿主・ベクター系において発現させることによって、分泌蛋白質として抗原を得ることも可能である。

H E R 3 の c D N A は例えば、H E R 3 の c D N A を発現している c D N A ライブラリーを鋳型として、H E R 3 c D N A を特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「P C R」という；S a i k i , R . K . , e t a l . , S c i e n c e ( 1 9 8 8 ) 2 3 9 , p . 4 8 7 - 4 8 9 参照）を行う、いわゆる P C R 法によって取得することができる。

ポリペプチドのイン・ビトロ (*in vitro*) 合成としては、例えばロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレクションシステム (R T S) を挙げることができるが、これに限定されない。

原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌 (*E s c h e r i c h i a c o l i*) や枯草菌 (*B a c i l l u s s u b t i l i s*) 等を挙げることができる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞である C O S 細胞 (G l u z m a n , Y . C e l l ( 1 9 8 1 ) 2 3 , p . 1 7 5 - 1 8 2、A T C C C R L - 1 6 5 0 ; A T C C : A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n)、マウス線維芽細胞 N I H 3 T 3 (A T C C N o . C R L - 1 6 5 8) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (C H O 細胞、A T C C C C L - 6 1) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (U r l a u b , G . a n d C h a s i n , L . A . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A ( 1 9 8 0 ) 7 7 , p . 4 1 2 6 - 4 2 2 0) 等がよく用いられているが、これらに限定されない。

上記の様にして得られる形質転換体は、この分野で通常実施される方法に従い培養することができ、該培養によって細胞内又は細胞外に目的のポリペプチドが産生される。

該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、大腸菌であれば、例えば、L B 培地に必要に応じて、アンピシリン等の抗生物質や I P M G を添加して用いることができる。

上記培養によって、形質転換体の細胞内又は細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法によって分離・精製することができる。

該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

また、発現させる組換え蛋白質に6残基からなるヒスチジンタグを繋げることによって、ニッケルアフィニティークラムで効率的に精製することができる。或は、発現させる組換え蛋白質にIgGのFc領域を繋げることによって、プロテインAカラムで効率的に精製することができる。

上記方法を組合せることによって容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

上記に述べた形質転換体自体を抗原として使用することも可能である。また、HER3を発現する細胞株を抗原として使用することも可能である。

#### 【0052】

##### （2） 抗HER3モノクローナル抗体の製造

HER3と特異的に結合する抗体の例としてHER3と特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記の様な作業工程が必要である。

すなわち、

- （a）抗原として使用する生体高分子の精製、又は抗原発現細胞の調製、
- （b）抗原を動物に注射することによって免疫した後、血液を採取してその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、
- （c）骨髓腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、
- （d）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
- （e）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、
- （f）単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
- （g）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、
- （h）この様にして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその結合特異性の検討、或は標識試薬としての特性の検定等である。

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

#### 【0053】

##### （a）抗原の精製

抗原としては、前記した様な方法で調製したHER3又はその一部を使用することができる。

また、HER3発現組換え体細胞によって調製した膜画分、又はHER3発現組換え体細胞自身、さらに、当業者に周知の方法を用いて、化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

さらに、HER3発現細胞株を抗原として使用することもできる。

#### 【0054】

##### （b）抗体産生細胞の調製

工程（a）で得られた抗原と、フロインドの完全又は不完全アジュバント、或はカリミョウバンの様な助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。この他に、抗原発現細胞を免疫原として実験動物に免疫する方法もある。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法で用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、例えばマウス、ラ

ット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。

また、実際に使用するマウス及びラットの系統には特に制限はなく、マウスの場合には、例えば各系統 A、A K R、B A L B / c、B D P、B A、C E、C 3 H、5 7 B L、C 5 7 B L、C 5 7 L、D B A、F L、H T H、H T 1、L P、N Z B、N Z W、R F、R I I I、S J L、S W R、W B、1 2 9 等が、またラットの場合には、例えば、W i s t a r、L o w、L e w i s、S p r a g u e、D a w l e y、A C I、B N、F i s c h e r 等を用いることができる。

これらのマウス及びラットは例えば日本クレア株式会社、日本チャールス・リバー株式会社等の実験動物飼育販売業者より入手することができる。

被免疫動物としては、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは B A L B / c 系統が、ラットでは W i s t a r 及び L o w 系統が特に好ましい。

また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ましい。

なお、これらのマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは 5 ～ 1 2 週齢、さらに好ましくは 6 ～ 8 週齢である。

H E R 3 又はこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、W e i r, D. M., H a n d b o o k o f E x p e r i m e n t a l I m m u n o l o g y V o l. I. I I. I I I., B l a c k w e l l S c i e n t i f i c P u b l i c a t i o n s, O x f o r d (1987); K a b a t, E. A. a n d M a y e r, M. M., E x p e r i m e n t a l I m m u n o c h e m i s t r y, C h a r l e s C T h o m a s P u b l i s h e r S p r i n g f i e l d, I l l i n o i s (1964) 等に詳しく記載されている公知の方法を用いることができる。

これらの免疫法のうち、本発明において好適な方法を具体的に示せば、例えば以下の通りである。

すなわち、まず、抗原である膜蛋白質画分、又は抗原を発現させた細胞を動物の皮内又は腹腔内に投与する。ただし、免疫効率を高めるためには両者の併用が好ましく、前半は皮内投与を行い、後半又は最終回のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。

抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等によって異なるが、一般には、抗原投与回数 3 ～ 6 回、投与間隔 2 ～ 6 週間が好ましく、投与回数 3 ～ 4 回、投与間隔 2 ～ 4 週間がさらに好ましい。

また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等によって異なるが、一般には 0. 0 5 ～ 5 m g、好ましくは 0. 1 ～ 0. 5 m g 程度とする。

追加免疫は、以上の通りの抗原投与の 1 ～ 6 週間後、好ましくは 1 ～ 4 週間後、さらに好ましくは 1 ～ 3 週間後に行う。免疫原が細胞の場合には、 $1 \times 10^6$  乃至  $1 \times 10^7$  個の細胞を使用する。

なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等によって異なるが、一般に、例えばマウスの場合には 0. 0 5 ～ 5 m g、好ましくは 0. 1 ～ 0. 5 m g、さらに好ましくは 0. 1 ～ 0. 2 m g 程度とする。免疫原が細胞の場合には、 $1 \times 10^6$  乃至  $1 \times 10^7$  個の細胞を使用する。

上記追加免疫から 1 ～ 1 0 日後、好ましくは 2 ～ 5 日後、さらに好ましくは 2 ～ 3 日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞又はリンパ球を無菌的に取り出す。その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、R I A 法又は E L I S A 法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。本発明における抗体価の測定は、例えば E L I S A 法によれば、以下に記載する様な手順によって行うことができる。

まず、精製又は部分精製した抗原を E L I S A 用 9 6 穴プレート等の固相表面に吸着さ

10

20

30

40

50

せ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）によって覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗体を結合させる。

さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することによって、抗体価を算出する。

被免疫動物の脾臓細胞又はリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法（例えば、Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977) 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Wallsh, Nature, (1977) 266, p. 495）に従って行うことができる。例えば、脾臓細胞の場合には、脾臓を細切して細胞をステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地（MEM）に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的方法を採用することができる。

10

#### 【0055】

（c）骨髓腫細胞（以下、「ミエローマ」という）の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているHGPRT（Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase）欠損株を用いるのが好ましい。

20

すなわち、マウス由来のX63-Ag8（X63）、NS1-ANS/1（NS1）、P3X63-Ag8.U1（P3U1）、X63-Ag8.653（X63.653）、SP2/0-Ag14（SP2/0）、MPC11-45.6TG1.7（45.6TG）、FO、S149/5XXO、BU.1等、ラット由来の210.RSY3.Ag.1.2.3（Y3）等、ヒト由来のU266AR（SKO-007）、GM1500・GTG-A12（GM1500）、UC729-6、LICR-LOW-HMy2（HMy2）、8226AR/NIP4-1（NP41）等である。これらのHGPRT欠損株は例えば、ATCC等から入手することができる。

これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地（RPMI-1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清（以下「FBS」という）を加えた培地に8-アザグアニンを加えた培地）、イスコフ改変ダルベッコ培地（Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下「DMEM」という）で継代培養するが、細胞融合の3乃至4日前に正常培地（例えば、10% FCSを含むASF104培地（味の素株式会社製））で継代培養し、融合当日に $2 \times 10^7$ 以上の細胞数を確保しておく。

30

#### 【0056】

（d）細胞融合

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法（Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964)等）に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。

40

その様な方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下の通りである。

50



すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量1500～6000、好ましくは2000～4000のポリエチレングリコール溶液中で、30～40℃、好ましくは35～38℃の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを1～10分間、好ましくは5～8分間混合する。

#### 【0057】

##### (e) ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合によって得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常HAT（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法（Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977) 266, p. 550）が用いられる。

10

この方法は、アミノプテリンで生存し得ないHGPR T欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマをHAT培地で培養することによって、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

#### 【0058】

##### (f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる（例えばBarbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980) 参照）。これらの方法のうち、特にメチルセルロース法等の三次元培養法が好適である。例えば、細胞融合によって形成されたハイブリドーマ群をClonaCell-HY Selection Medium D（StemCell Technologies社製 #03804）等のメチルセルロース培地に懸濁して培養し、形成されたハイブリドーマコロニーを回収することでモノクローンハイブリドーマの取得が可能である。回収された各ハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清中に安定して抗体価の認められたものを抗HER3モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

20

#### 【0059】

##### (g) ハイブリドーマの培養によるモノクローナル抗体の調製

30

この様にして選択されたハイブリドーマは、これを培養することによって、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。

このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

本発明における抗体価の測定は、例えば上記（b）の項目で説明したELISA法によって行うことができる。

以上の方法によって得たハイブリドーマは、液体窒素中又は－80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。

40

大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、或はスピナー培養で行われる。この大量培養における上清から、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することによって、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

また、同系統のマウス（例えば、上記のBALB/c）、或はNu/Nuマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることによって、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。

腹腔内に投与する場合には、事前（3～7日前）に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane; プリスタン）等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。

例えば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、T細胞

50

を不活性化した後、20日後に $10^6 \sim 10^7$ 個のハイブリドーマ・クローン細胞を、血清を含まない培地中に浮遊（0.5 mL）させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水がたまったところでマウスより腹水を採取する。この方法によって、培養液中に比べて約100倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

上記方法によって得たモノクローナル抗体は、例えばWeir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)に記載されている方法で精製することができる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、HER3に対して高い抗原特異性を有する。

【0060】

(h) モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの設定は以下の様に行うことができる。

まず、同定法としてはオクテルロニー（Ouchterlony）法、ELISA法、又はRIA法を挙げることができる。

オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。

一方、ELISA法又はRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることによって、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット（例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製）等を利用することもできる。

さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280 nmにおける吸光度（ $1.4 \text{ (OD 280)} = \text{イムノグロブリン } 1 \text{ mg/mL}$ ）より算出する方法によって行うことができる。

さらに、(2)の(a)乃至(h)の工程を再度実施して別途に独立してモノクローナル抗体を取得した場合においても、抗HER3抗体と同等の細胞傷害活性を有する抗体を取得することが可能である。この様な抗体の一例として、抗HER3抗体と同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。新たに作製されたモノクローナル抗体が、抗HER3抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該モノクローナル抗体が抗HER3抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、抗HER3抗体のHER3に対する結合に対して該モノクローナル抗体が競合する（即ち、該モノクローナル抗体が、抗HER3抗体とHER3の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該モノクローナル抗体が抗HER3抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該モノクローナル抗体が抗HER3抗体と同等の抗原結合能又は生物活性を有していることが強く期待される。

【0061】

(3) その他の抗体

本発明の抗体には、上記HER3に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト化（Humanized）抗体、ヒト抗体等も含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984)参照）。

ヒト化抗体としては、相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Nat

10

20

30

40

50