

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6674258号
(P6674258)

(45) 発行日 令和2年4月1日(2020.4.1)

(24) 登録日 令和2年3月10日(2020.3.10)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 7/08	(2006.01) C07K 7/08
A61K 38/10	(2006.01) A61K 38/10
A61P 1/16	(2006.01) A61P 1/16
A61P 3/10	(2006.01) A61P 3/10
A61P 25/00	(2006.01) A61P 25/00

請求項の数 27 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-561930 (P2015-561930)
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)
(65) 公表番号	特表2016-512205 (P2016-512205A)
(43) 公表日	平成28年4月25日 (2016.4.25)
(86) 國際出願番号	PCT/CN2014/073483
(87) 國際公開番号	W02014/139472
(87) 國際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)
審査請求日	平成29年3月13日 (2017.3.13)
(31) 優先権主張番号	PCT/CN2013/072771
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)

前置審査

(73) 特許権者	515255168 スヘンズヘン ハイタيد バイオファー マシューティカル, エルティーディー. 中華人民共和国 グアングドング 518 057 スヘンズヘン ナンシャン ノ. 19 ガオキン シー. 1スト アベニュ ー スイート エー232
(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(72) 発明者	リピング リウ 中華人民共和国 グアングドング 518 057 スヘンズヘン ナンシャン ノ. 19 ガオキン シー. 1スト アベニュ ー スイート エー232

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脾島新生ペプチド及びその類似体を使用する組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下からなる、糖尿病、又は脾機能障害に伴う他の疾患の治療に有用である、ペプチド

:

【化 1】

IGLHDPSHGTLPGS (配列番号:7);

Ac-IGLHDPSHGTLPGS (配列番号:12);

Ac-IGLHDPSHGTLPGS-NH2 (配列番号:29);

10

Ac-IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号:52);

Ac-IGLHD PTQGT EPAGE-NH2 (配列番号:62);

Ac-IGLHDPSHGTLPGS (配列番号:16); 又は

Ac-IGLHDPTQGTEPNE (配列番号:54)

20

。

【請求項 2】

請求項1記載のペプチドを含む、組成物。

【請求項 3】

医薬として許容し得る担体をさらに含む、請求項2記載の組成物。

【請求項 4】

臍機能障害を治療する、代謝疾患を治療する、神経保護若しくは神経再生を促進する、肝臓再生を促進する、又は炎症を抑制するための、請求項2又は3記載の組成物。

【請求項 5】

請求項1記載のペプチドを含む、臍機能障害に伴う徴候又は症状を改善するための医薬組成物。 10

【請求項 6】

前記臍機能障害が、1型糖尿病、2型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)、空腹時血中ブドウ糖不良、耐糖能障害、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、又は空腹時インスリン値の異常、又はこれらの組み合わせである、請求項5記載の医薬組成物。

【請求項 7】

抗糖尿病薬を更に含む、請求項5又は6記載の医薬組成物。

【請求項 8】

請求項1記載のペプチドを含む、臍島細胞成長を刺激するための医薬組成物。 20

【請求項 9】

臍島細胞の集団を產生する方法であって、1以上の臍島細胞を、請求項1記載のペプチドとインビトロで接触させ、それによって該1以上の臍島細胞の増殖が刺激されて臍島細胞の集団が產生されることを含む、前記方法。

【請求項 10】

前記1以上の臍島細胞が、対象から得られる、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

請求項1記載のペプチドを含む、対象における臍島細胞の数を増加させるための医薬組成物。 30

【請求項 12】

請求項1記載のペプチドを含む、対象における代謝疾患に伴う徴候又は症状を改善するための医薬組成物。

【請求項 13】

前記代謝疾患が、糖尿病、糖尿病前症、又はメタボリックシンドロームである、請求項12記載の医薬組成物。 40

【請求項 14】

請求項1記載のペプチドを含む、糖尿病対象における耐糖能障害、血糖、空腹時血糖、食後血糖、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)、アルギニン刺激性C-ペプチド(AUC)、又はこれらの組み合わせを軽減するための医薬組成物。

【請求項 15】

請求項1記載のペプチドを含む、神経保護又は神経再生を促進するための医薬組成物。

【請求項 16】

請求項1記載のペプチドを含む、肝臓再生を促進するための医薬組成物。

【請求項 17】

請求項1記載のペプチドを含む、炎症を抑制するための医薬組成物。

【請求項 18】

臍機能障害を患うヒト患者を治療するための医薬品の製造のための、請求項1記載のペプチドの使用。

【請求項 19】

50

前記膵機能障害を患うヒト患者が、1型糖尿病、2型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)、空腹時血中ブドウ糖不良、耐糖能障害、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される疾患又は状態を有する、請求項1_8記載のペプチドの使用。

【請求項 2 0】

膵島細胞成長を刺激するための医薬品の製造のための、請求項1記載のペプチドの使用。

【請求項 2 1】

膵島細胞の集団を產生するための医薬品の製造のための、請求項1記載のペプチドの使用。

10

【請求項 2 2】

ヒトにおける膵島細胞の数を増加させるための医薬品の製造のための、請求項1記載のペプチドの使用。

【請求項 2 3】

代謝疾患を患うヒト患者を治療するための医薬品の製造のための、請求項1記載のペプチドの使用。

【請求項 2 4】

前記代謝疾患が、糖尿病、糖尿病前症、又はメタボリックシンドロームである、請求項2_3記載のペプチドの使用。

【請求項 2 5】

糖尿病対象における状態であって、耐糖能障害、血糖の上昇、空腹時血糖の上昇、食後血糖の上昇、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)、アルギニン刺激性C-ペプチド(AUC)、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される前記状態を治療するための医薬品の製造のための、請求項1記載のペプチドの使用。

20

【請求項 2 6】

神経保護を促進する、神経再生を促進する、肝臓再生を促進する、又は炎症を抑制するための医薬品の製造のための、請求項1記載のペプチドの使用。

【請求項 2 7】

部分的膵切開を伴うヒト患者を治療するための医薬品の製造のための、請求項1記載のペプチドの使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の背景)

本発明は、概して、医学及び薬学の分野に、より具体的には糖尿病及び他の疾患を治療するためのペプチド療法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

糖尿病(DM)は、世界中の3億人を超える人々を悩ませている。2つの主な型のDM:1型DM(T1D)及び2型DM(T2D)が存在する。T1Dは、体がインスリンを産生できないことに起因し、患者に毎日インスリンを投与することが必要である。T2Dは、インスリン抵抗性、すなわち、細胞がインスリンを適切に使用できない状態に起因する。T2Dのための承認された多くの非インスリン療法が存在する。しかし、後期段階のT2D患者の大部分は、疾患が進行するにつれて、細胞機能の喪失が原因で、インスリン投与が必要となる。

40

【0 0 0 3】

糖尿病の発症は、膵臓の膵島質量の実質的損失と関連している。診断時には、T1D患者では、90%を超える膵島質量が失われており、T2D患者では、約50%が失われている。T1DとT2Dの両方のための最適治療と考えられている、膵島新生をもたらす刺激の可能性を追求する多くの試みがなされている。

50

【0004】

近年、研究者らは、様々な動物モデルにおいて、ハムスター由来の臍島新生関連タンパク質(INGAP)、ヒト臍島前駆(proIslet)ペプチド(HIP)、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、臍島内分泌神経ペプチド(islet endocrine neuropeptide)、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、上皮成長因子、及びガストリンなどが、臍臓の非内分泌部分に位置する臍臓の前駆細胞を十分に機能する臍島に分化させる能力があることを示している。これらの化合物の中で、INGAPの配列由来のアミノ酸104～118の15-merペプチドであるINGAPペプチド(INGAP-PP)が、複数の動物モデルにおける臍島新生を誘発する、マウスにおけるストレプトゾシン(STZ)誘発糖尿病を逆行させる、T1D患者におけるC-ペプチド分泌を増大させる、また、T2D患者における血糖コントロールを向上させることができることが示されている。細胞質量の拡大の用量依存性刺激、細胞複製、細胞アポトーシスの減少、及びインスリン分泌の増大を含めて、INGAP-PPのさらなる生物学的効果が報告されている。ヒト研究では、T2Dを患う患者における90日でのHbA1c低下によって、また、T1Dを患う患者におけるC-ペプチド分泌の有意な増大によって裏付けられる、グルコースホメオスタシスの向上を伴う効果が見られた。しかし、INGAP-PPの血漿半減期の短さ、及び高用量での投与の必要性によって、このペプチドの臨床適用は、かなり限定される。10

【0005】

HIP、すなわちヒト臍島再生由来3 (human regenerating islet-derived 3 alpha)(REG3A)遺伝子の一部によってコードされる生理活性ペプチドは、INGAPペプチドのヒト相同体である。以前の研究では、HIPでのヒト臍管組織の治療が、インスリンの産生を刺激することが示されている。HIPの投与は、糖尿病マウスにおいて、血糖コントロールを向上させ、臍島数を増加させた。安定型のHIPが、その認容性、安全性、及び薬物動態を調査することを目的にした単回漸増用量臨床試験において試験されている。INGAP-PPと同様に、高用量のHIPが必要とされるので、親HIPペプチドの臨床適用は、かなり限定される。20

【0006】

したがって、糖尿病、又は臍機能障害に伴う他の疾患の治療のための追加の薬物を開発する必要性が存在する。本発明は、この必要性に対処し、その上、関連する利点を提供する。

【発明の概要】**【0007】**

(発明の概要)

本発明は、INGAP及びHIPペプチドのペプチド及び類似体を提供する。これらのペプチド及び類似体は、臍機能障害に伴う様々な疾患及び状態を治療するために、1型糖尿病と2型糖尿病の両方の糖尿病、糖尿病前症、及びメタボリックシンドロームを含めた代謝疾患を治療するために、使用することができる。これらのペプチド及び類似体はまた、臍島の誘導、移植のための拡大及び増殖、神経保護を促進すること、神経再生を促進すること、肝臓再生を促進すること、及び炎症を抑制することのために使用することもできる。

【図面の簡単な説明】**【0008】**

(図面の簡単な説明)

【図1】図1は、100nMのINGAPスクランブル(Scrambled)PP 1(ペプチド3)、INGAP-PP(ペプチド1)、及び選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド7(表2参照)の存在下での、ARIP細胞(ラット臍管細胞株)増殖の比較を示す。40

【0009】

【図2】図2は、INGAP-PP(ペプチド1)、及び選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド7及びペプチド8(表2参照)の、培地中での安定性比較を示す。

【0010】

【図3】図3は、INGAP-PP(ペプチド1)、及び選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド12、ペプチド16、及びペプチド29(表2参照)の、マウス血漿中での安定性比較を示す。

【0011】

50

【図4】図4は、INGAP-PP(ペプチド1)、及び選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド12及びペプチド16(表2参照)の、ヒト血漿中での安定性比較を示す。

【0012】

【図5】図5は、HIP(ペプチド2)、及び選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド52及びペプチド54(表3参照)の、マウス血漿中での安定性比較を示す。

【0013】

【図6A～6C】図6A～6Cは、STZ誘発糖尿病マウスモデルにおける、INGAP-PP(ペプチド1)、INGAPスクランブルPP 1(ペプチド3)、及び選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド7(表2参照)の、有効性比較を示す。図6A:治療の21日後の血糖(BG);図6B:治療の21日後の空腹時インスリン値;図6C:治療の21日後の経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)において測定されるグルコースの曲線下面積(AUC)。

10

【0014】

【図7】図7は、未処置、及びペプチド3、ペプチド1、又はペプチド7で治療された動物についての、ランダムに選択された等しい領域(n=7)に対する、面積範囲(形態計測学的任意単位)によって定義された膵島の数を示す。

【0015】

【図8】図8は、選択されたペプチド(10 μg/mL)、すなわちペプチド12、ペプチド16、及びペプチド1(表2参照)の同時インキュベーションを伴う又は伴わない、膵島のグルコース刺激性インスリン分泌の増加を示す。100nMグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)との同時インキュベーションを、陽性対照として含めた。

20

【0016】

【図9A～9C】図9A～9Cは、INGAP-PP又はINGAP-PP類似体を投与することの生物学的效果を示す。図9Aは、治療の10日後の雌のC57BL/6Jマウスにおける追加的な膵島クラスター(EIC)の数を示す。図9Bは、治療の10日後の雌のC57BL/6JマウスにおけるEICの総面積を示す。図9Cは、INGAP-PPペプチド又はINGAP-PP類似体の投与後の膵臓における代表的な膵管関連のEICを示す。

【0017】

【図10】図10は、膵臓の膵島サイズ分布に反映される通りの膵島新生に対する、INGAP-PPペプチド及びINGAP-PP類似体の効果を示す。

【0018】

30

【図11】図11は、培地中のINGAP-PP及びINGAP-PP類似体の安定性を示す。

【0019】

【図12】図12は、ラット血漿中のINGAP-PP及びINGAP-PP類似体の安定性を示す。

【0020】

【図13】図13は、ラット血漿中のHIP及びHIP類似体の安定性を示す。

【0021】

【図14】図14は、マウス血漿中のINGAP-PP及びINGAP-PP類似体の安定性を示す。

【0022】

【図15】図15は、ヒト血漿中のINGAP-PP及びINGAP-PP類似体の安定性を示す。

【0023】

40

【図16】図16は、Pluronic F127を含有するヒドロゲルの、代表的なインピトロINGAP-PP(ペプチド1)放出曲線を示す。

【0024】

【図17】図17は、Jeffamine ED-2003を含有するヒドロゲルの、代表的なインピトロINGAP-PP(ペプチド1)放出曲線を示す。

【0025】

【図18】図18は、SABERゲルシステムの、代表的なインピトロINGAP-PP(ペプチド1)放出曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

50

(発明の詳細な説明)

本発明は、様々な疾患及び状態、特に糖尿病に関連する疾患及び状態を治療するのに有用な性質を示す化合物、特にペプチド及びペプチド類似体を提供する。本発明のペプチド及び類似体は、さらに、膵機能障害を治療すること、代謝疾患を治療すること、エクスピボ膵島誘導、移植のための拡大及び増殖、インビボでの移植された膵島の生存を増大させること、神経保護又は神経再生を促進すること、肝臓再生を促進すること、及び炎症を抑制することのため有用である。

【0027】

本明細書に開示する通り、本発明は、野生型ペプチド(表2及び3参照)と比較した場合にそれに匹敵する又は向上した安定性及び活性を有する、一連のINGAP-PP及びHIP類似体を提供する。これらのペプチド類似体は、その向上した医薬特性によって、臨床開発に特に適したものとなる。本発明はまた、本発明による化合物を含む医薬組成物、及び、限定はされないが1型糖尿病(T1D)及び2型糖尿病(T2D)を含めた代謝疾患を治療するための医薬品を調製するための本発明による化合物の使用を提供する。本発明は、徐放性製剤を含む適当な製剤の本発明の組成物をさらに提供する。

【0028】

以前に記載されている通り、ハムスタータンパク質は、膵臓の膵島新生を促進することが確認され、膵島新生関連タンパク質(INGAP)と名付けられた(米国特許第5,834,590号参照)。INGAPのペントデカペプチドフラグメント(本明細書ではINGAP-PPという)は、記載されており、マウスモデルにおける糖尿病を逆行させることができ(Rosenbergらの文献、「Ann.Surg.」240:875-884(2004);米国特許公開2006/0009516;米国特許公開2008/0171704も参照;Kapurらの文献、「Islets」4:1-9(2012);Changらの文献、「Mol.Cell.Endocrinol.」335:104-109(2011);Borelliらの文献、「Regulatory Peptides」131:97-102(2005);Dunganらの文献、「Diabetes/Metabolism Res.Rev.」25:558-565(2009);Zhaらの文献、「J.Endocrinol.Invest.」35:634-639(2012);Wangらの文献、「J.Cell.Physiol.」224:501-508(2010);Petropavlovskajaらの文献、「J.Endocrinol.」191:65-81(2006);Taylor-Fishwickらの文献、「Pancreas」39:64-70(2010);Rosenbergの文献、「Diabetologia」39:256-262(1996);Madridらの文献、「Regulatory Peptides」157:25-31(2009);及びTaylor-Fishwickらの文献、「J.Endocrinol.」190:729-737(2006))。ヒト膵島前駆ペプチド(HIP)と呼ばれるヒトペプチドも記載されている(Levetanらの文献、「Endocrin Pract.」14:1075-1083(2008);米国特許公開2011/0280833)。本発明は、限定はされないが表2及び3に列挙したものを含めたINGAP-PP及びHIPペプチドの類似体、或いは親INGAP-PP又はHIPペプチドではない本明細書に開示する式を含めた本明細書に開示する他のものを提供する。本発明のペプチド及び類似体は、親INGAP-PP又はHIPペプチドに勝る予想外かつ有益な特性を示す。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「ペプチド」とは、2以上のアミノ酸のポリマーをいう。ペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸のポリマーを含むのであれば、類似体、誘導体、機能性のミメティクス、偽ペプチドなどを含むように修飾することができる。用語「ペプチド」の意味は、当業者に周知である。一般に、ペプチドは、あるアミノ酸残基のカルボキシル基と隣接するアミノ酸残基のアミノ基との間のアミド結合によって連結された、2以上のアミノ酸を含む。本明細書に記載する場合、ペプチドは、天然に存在するアミノ酸又は天然に存在しないアミノ酸を含むことができる。

【0030】

本明細書で使用する場合、用語「類似体」とは、親分子、例えば、親ペプチドの異型をいう。例えば、親ペプチドの類似体には、親ペプチドに対して1以上のアミノ酸が置換された異型が含まれ得る。類似体は、限定はされないが、本明細書に開示する通り天然に存在しないアミノ酸、Dアミノ酸、修飾されたアミノ-及び/又はカルボキシ-末端(N-又はC-末端)アミノ酸、特にN末端上のアミノ基の修飾及び/又はC末端におけるカルボキシル基の修飾、脂肪酸修飾、エステル化、ペプチドミメティクス、偽ペプチドなどを含めて、親ペ

10

20

30

40

50

ペプチドの修飾も含むことができる。修飾の例を、以下に、より詳細に記載する。

【0031】

本明細書で使用する場合、語句「膵機能障害」とは、膵臓が正常又は健康な個人の機能と比較して機能の低下を示す、膵臓と関連する疾患又は状態をいう。膵機能障害に伴う疾患又は状態の例としては、限定はされないが、1型糖尿病、2型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)、空腹時血中ブドウ糖不良、耐糖能障害、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、損傷若しくは炎症が原因の部分的膵切開、又はこれらの組み合わせが挙げられる。こうした疾患及び状態は、以下に、より詳細に論じる。

【0032】

本明細書に記載する通り、本発明は、INGAP-PP及びHIPペプチドのペプチド類似体を提供する。表1は、INGAP-PP及びHIPペプチド、並びに、本明細書の実験において陰性対照として使用されるか、又は、本発明のINGAP-PP、HIP、又はペプチド類似体を用いる比較研究において陰性対照として使用することができる、様々なスクランブルされた型のペプチドの配列を示す。

表1. INGAP-PP及びHIPペプチド並びに対照スクランブルペプチド。

【表1】

ペプチドID / 配列番号	配列
1	H-IGLHDPSHGTLPNGS-OH
2	H-IGLHDPTQGTEPNGE-OH
3	H-SHPNG SGTIG LHDPL-OH
4	H-SSTGG GDIPP HLLHN-OH
5	H-DGGTP QPGNW IELTH-OH

【0033】

本明細書に記載する通り、本発明のペプチド又は類似体として、INGAP-PPの様々な類似体が提供される。本発明のINGAP-PPペプチド類似体の例を、表2に提供する。

表2. INGAP-PP類似体の例。

10

20

【表2】

ペプチドID / 配列番号	配列	
1	H-IGLHDPSHGTLPNGS-OH	
6	H-IGLHAPSHGTLPNGS-OH	
7	H-IGLHDPSHGTLPAGS-OH	
8	H-IGLHAPSHGTLPAGS-OH	
9	H-IGLHDPSHGTLPAGSK-OH	
10	H-IGLHDPSHGTLP(Aib)GS-OH	10
11	H-IGLHDPSHGTLP(N-メチル-L-アラニン)GS-OH	
12	Ac-IGLHDPSHGTLPAGS-OH	
13	H-(D-イロイシン)GLHDPSHGTLPAGS-OH	
14	H-(L-ノルバリン)GLHDPSHGTLPAGS-OH	
15	H-(L-ノルロイシン)GLHDPSHGTLPAGS-OH	
16	Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-OH	
17	H-(D-イロイシン)GLHDPSHGTLPNGS-OH	
18	H-IGLHDPSHGTEPNNGS-OH	
19	H-IGLHDPSQGTLPNGS-OH	
20	H-IGLHDPTHGTLPNGS-OH	
21	H-IGLHDPSHGTLPNGE-OH	
22	H-IGLHDPSHGTLPNGK-OH	
23	H-IGLHDPSHGTLPAGK-OH	20
24	H-IGLHDPSHGTEPAGS-OH	
25	H-IGLHDPSQGTLPAGS-OH	
26	H-IGLHDPTHGTLPAGS-OH	
27	H-IGLHDPSHGTLPAGE-OH	
28	H-IGLHDPSHGTLPAG-NH2	
29	Ac-IGLHDPSHGTLPAGS-NH2	
30	Ac-IGLHDPSHGTLPAG-NH2	
31	Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-NH2	
32	H-IGLHDPSHGTLPNGS-NH2	
33	H-IGLHDPSHGTLPNGSC-OH	
34	Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC-OH	
35	H-IGLHDPSHGTLPNGSC-NH2	30
36	Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC-NH2	
37	H-IGLHDPSHGTLPNGC-OH	
38	Ac-IGLHDPSHGTLPNGC-OH	
39	H-IGLHDPSHGTLPNGC-NH2	
40	Ac-IGLHDPSHGTLPNGC-NH2	
41	H-IGLHDPSHGTLPAGS-NH2	
42	H-IGLHDPSHGTLPAGSC-OH	
43	Ac-IGLHDPSHGTLPAGSC-OH	
44	H-IGLHDPSHGTLPAGSC-NH2	
45	Ac-IGLHDPSHGTLPAGSC-NH2	
46	H-IGLHDPSHGTLPAGC-OH	
47	Ac-IGLHDPSHGTLPAGC-OH	40
48	H-IGLHDPSHGTLPAGC-NH2	
49	Ac-IGLHDPSHGTLPAGC-NH2	
73	IGLHDPSHGTLPAG	
74	IGLHDPSHGTLPNG	
75	Ac-IGLHDPSHGTLPNG	
76	IGLHDPSHGTLPNG-NH2	
77	Ac-IGLHDPSHGTLPNG-NH2	

78	H-IGLHDPSHGTLPGS-OH
79	H-IGLHDPSHGTLPDGS-OH
80	H-IGLHDPSHGTLPEGS-OH
81	H-IGLHEPSHGTLPNGS-OH
82	H-IGLHQPSHGTLPNGS-OH
83	H-IGLHNPSHGTLPNGS-OH
84	H-IGLHEPSHGTLPAGS-OH
85	H-IGLHQPSHGTLPAGS-OH
86	H-IGLHNPSHGTLPAGS-OH
87	H-IGLHDPSHGTLPGSC-OH
88	H-IGLHDPSHGTLPDGSC-OH
89	H-IGLHDPSHGTLPEGSC-OH
90	H-IGLHEPSHGTLPGSC-OH
91	H-IGLHQPSHGTLPGSC-OH
92	H-IGLHNPSHGTLPGSC-OH
93	H-IGLHDPSHGTLPG-OH
94	H-IGLHDPSHGTLPDG-OH
95	H-IGLHDPSHGTLPEG-OH
96	H-IGLHEPSHGTLPNG-OH
97	H-IGLHQPSHGTLPNG-OH
98	H-IGLHNPSHGTLPNG-OH
99	H-IGLHEPSHGTLPAG-OH
100	H-IGLHQPSHGTLPAG-OH
101	H-IGLHNPSHGTLPAG-OH
102	H-IGLHDPSHGTLPGE-OH
103	H-IGLHDPSHGTLPDGE-OH
104	H-IGLHDPSHGTLPEGE-OH
105	H-IGLHEPSHGTLPNGE-OH
106	H-IGLHQPSHGTLPNGE-OH
107	H-IGLHNPSHGTLPNGE-OH
108	H-IGLHEPSHGTLPAGE-OH
109	H-IGLHQPSHGTLPAGE-OH
110	H-IGLHNPSHGTLPAGE-OH

10

20

30

【 0 0 3 4 】

本明細書に記載する通り、本発明のペプチド又は類似体として、HIPの様々な類似体が提供される。本発明のHIPペプチド類似体の例を、表3に提供する。

表3.HIP類似体の例。

【表3】

ペプチドID / 配列番号	配列
2	H-IGLHDPTQGTEPNGE-OH
50	H-IGLHDPTQGTEPAGE-OH
51	H-IGLHDPTQGTEP(Aib)GE-OH
52	Ac-IGLHDPTQGTEPAGE-OH
53	H-(D-イソロイシン)GLHDPTQGTEPAGE-OH
54	Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-OH
55	H-(D-イソロイシン)GLHDPTQGTEPNGE-OH
56	H-IGLHDPTQGTEPNGS-OH
57	H-IGLHDPTQGTEPAGS-OH
58	H-IGLHDPTQGTLPNGE-OH
59	H-IGLHDPTQGTLPAGE-OH
60	Ac-IGLHDPTQGTEPAG-NH2
61	Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH2
62	Ac-IGLHDPTQGTEPAGE-NH2
63	H-IGLHDPTQGTEPNGE-NH2
64	H-IGLHDPTQGTEPNGC-OH
65	Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-OH
66	H-IGLHDPTQGTEPNGC-NH2
67	Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH2
68	H-IGLHDPTQGTEPAGE-NH2
69	H-IGLHDPTQGTEPAGC-OH
70	Ac-IGLHDPTQGTEPAGC-OH
71	H-IGLHDPTQGTEPAGC-NH2
72	Ac-IGLHDPTQGTEPAGC-NH2

10

20

30

【0035】

本発明は、INGAP-PPの類似体であるペプチド又はその類似体を提供する。一実施態様では、本発明は、

【化1】

IGLHDPSHGTLPAGS (配列番号:7); 及び
IGLHDPSHGTLPAG (配列番号:73)

からなる群から選択される配列を含むペプチド又はその類似体を提供する。例えば、該ペプチド又は類似体は、以下から選択されるペプチド又は類似体を含むことができる。

【化2】

IGLHDPSHGTLPAGS (配列番号:7);
 IGLHDPSHGTLPAG (配列番号:73); IGLHDPSHGTLPAGSK (配列番号:9);
 IGLHDPSHGTLP(Aib)GS (配列番号:10); IGLHDPSHGTLP(N-メチル-L-Ala)GS (配列番号:11); Ac-IGLHDPSHGTLPAGS (配列番号:12); (D-Ile)GLHDPSHGTLPAGS (配列番号:13); (L-NorVal)GLHDPSHGTLPAGS (配列番号:14); (L-NorLeu)GLHDPSHGTLPAGS (配列番号:15); IGLHDPSHGTLPAG-NH2 (配列番号:28); Ac-IGLHDPSHGTLPAGS-NH2 (配列番号:29); Ac-IGLHDPSHGTLPAG-NH2 (配列番号:30); IGLHDPSHGTLPAGS-NH2 (配列番号:41); IGLHDPSHGTLPAGSC (配列番号:42); Ac-IGLHDPSHGTLPAGSC (配列番号:43); IGLHDPSHGTLPAGSC-NH2 (配列番号:44); Ac-IGLHDPSHGTLPAGSC-NH2 (配列番号:45);
 IGLHDPSHGTLPAGC (配列番号:46); Ac-IGLHDPSHGTLPAGC (配列番号:47);
 IGLHDPSHGTLPAGC-NH2 (配列番号:48); 及びAc-IGLHDPSHGTLPAGC-NH2 (配列番号:49)

10

20

【0036】

本発明の特定の実施態様では、ペプチド又はその類似体は、以下からなることができる。

【化3】

IGLHDPSHGTLPAGS (配列番号:7); IGLHDPSHGTLPAG (配列番号:73);
 IGLHDPSHGTLPAGSK (配列番号:9); IGLHDPSHGTLP(Aib)GS (配列番号:10);
 IGLHDPSHGTLP(N-メチル-L-Ala)GS (配列番号:11); Ac-IGLHDPSHGTLPAGS (配列番号:12); (D-Ile)GLHDPSHGTLPAGS (配列番号:13); (L-NorVal)GLHDPSHGTLPAGS (配列番号:14); (L-NorLeu)GLHDPSHGTLPAGS (配列番号:15); IGLHDPSHGTLPAG-NH2 (配列番号:28); Ac-IGLHDPSHGTLPAGS-NH2 (配列番号:29); Ac-IGLHDPSHGTLPAG-NH2 (配列番号:30); IGLHDPSHGTLPAGS-NH2 (配列番号:41); IGLHDPSHGTLPAGSC (配列番号:42); Ac-IGLHDPSHGTLPAGSC (配列番号:43); IGLHDPSHGTLPAGSC-NH2 (配列番号:44); Ac-IGLHDPSHGTLPAGSC-NH2 (配列番号:45); IGLHDPSHGTLPAGC (配列番号:46); Ac-IGLHDPSHGTLPAGC (配列番号:47); IGLHDPSHGTLPAGC-NH2 (配列番号:48); 及びAc-IGLHDPSHGTLPAGC-NH2 (配列番号:49)

30

40

【0037】

本発明の別の実施態様では、追加のINGAP-PP類似体が提供される。本明細書で提供される本発明の一実施態様は、以下からなる群から選択されるペプチド又は類似体を含むペプチド又はその類似体を含む。

【化4】

Ac-

IGLHDPSHGTLPNGS (配列番号:16); (D-Ile)GLHDPSHGTLPNGS (配列番号:17);
 Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号:31); IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号:32); IGLHDPSHGTLPNGSC (配列番号:33); Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC (配列番号:34); IGLHDPSHGTLPNGSC-NH2 (配列番号:35); Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC-NH2 (配列番号:36); IGLHDPSHGTLPNGC (配列番号:37); Ac-IGLHDPSHGTLPNGC (配列番号:38); IGLHDPSHGTLPNGC-NH2 (配列番号:39); Ac-IGLHDPSHGTLPNG (配列番号:74); Ac-IGLHDPSHGTLPNG (配列番号:75); IGLHDPSHGTLPNG-NH2 (配列番号:76); Ac-IGLHDPSHGTLPNG-NH2 (配列番号:77); H-IGLHDPSHGTLQGS-OH (配列番号:78); H-IGLHDPSHGTLPDGS-OH (配列番号:79); H-IGLHDPSHGTLPEGS-OH (配列番号:80); H-IGLHEPSHGTLPNGS-OH (配列番号:81); H-IGLHQPSHGTLPNGS-OH (配列番号:82); H-IGLHNPSHGTLPNGS-OH (配列番号:83); H-IGLHEPSHGTLPAGS-OH (配列番号:84); H-IGLHQPSHGTLPAGS-OH (配列番号:85); H-IGLHNPSHGTLPAGS-OH (配列番号:86); H-IGLHDPSHGTLPGSC-OH (配列番号:87); H-IGLHDPSHGTLPDGSC-OH (配列番号:88); H-IGLHDPSHGTLPEGSC-OH (配列番号:89); H-IGLHEPSHGTLPNGSC-OH (配列番号:90); H-IGLHQPSHGTLPNGSC-OH (配列番号:91); H-IGLHNPSHGTLPNGSC-OH (配列番号:92); H-IGLHDPSHGTLPG-OH (配列番号:93); H-IGLHDPSHGTLPDG-OH (配列番号:94); H-IGLHDPSHGTLPEG-OH (配列番号:95); H-IGLHEPSHGTLPNG-OH (配列番号:96); H-IGLHQPSHGTLPNG-OH (配列番号:97); H-IGLHNPSHGTLPNG-OH (配列番号:98); H-IGLHEPSHGTLPAG-OH (配列番号:99); H-IGLHQPSHGTLPAG-OH (配列番号:100); H-IGLHNPSHGTLPAG-OH (配列番号:101); H-IGLHDPSHGTLPQGE-OH (配列番号:102); H-IGLHDPSHGTLPDGE-OH (配列番号:103); H-IGLHDPSHGTLPEGE-OH (配列番号:104); H-IGLHEPSHGTLPNGE-OH (配列番号:105); H-IGLHQPSHGTLPNGE-OH (配列番号:106); H-IGLHNPSHGTLPNGE-OH (配列番号:107); H-IGLHEPSHGTLPAGE-OH (配列番号:108); H-IGLHQPSHGTLPAGE-OH (配列番号:109); 及び H-IGLHNPSHGTLPAGE-OH (配列番号:110)

【0038】

本発明の特定の実施態様では、ペプチド又はその類似体は、以下からなる。

【化5】

Ac-IGLHDPSHGTLPNGS (配列番号: 16); (D-Ile)GLHDPSHGTLPNGS (配列番号: 17); Ac-IGLHD PSHGT LPNGS-NH2 (配列番号: 31); IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号: 32); IGLHDPSHGTLPNGS (配列番号: 33); Ac-IGLHDPSHGTLPNGS (配列番号: 34); IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号: 35); Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号: 36); IGLHDPSHGTLPNGS (配列番号: 37); Ac-IGLHDPSHGTLPNGS (配列番号: 38); IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号: 39); Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号: 40); IGLHDPSHGTLPN (配列番号: 74); Ac-IGLHDPSHGTLPN (配列番号: 75); IGLHDPSHGTLPN-NH2 (配列番号: 76); Ac-IGLHDPSHGTLPN-NH2 (配列番号: 77); H-IGLHDPSHGTLQGS-OH (配列番号: 78); H-IGLHDPSHGTLPDGS-OH (配列番号: 79); H-IGLHDPSHGTLPEGS-OH (配列番号: 80); H-IGLHEPSHGTLPNGS-OH (配列番号: 81); H-IGLHQPSHGTLPNGS-OH (配列番号: 82); H-IGLHNPSHGTLPNGS-OH (配列番号: 83); H-IGLHEPSHGTLPAGS-OH (配列番号: 84); H-IGLHQPSHGTLPAGS-OH (配列番号: 85); H-IGLHNPSHGTLPAGS-OH (配列番号: 86); H-IGLHDPSHGTLQGSC-OH (配列番号: 87); H-IGLHDPSHGTLPDGSC-OH (配列番号: 88); H-IGLHDPSHGTLPEGSC-OH (配列番号: 89); H-IGLHEPSHGTLPNSC-OH (配列番号: 90); H-IGLHQPSHGTLPNSC-OH (配列番号: 91); H-IGLHNPSHGTLPNSC-OH (配列番号: 92); H-IGLHDPSHGTLPG-OH (配列番号: 93); H-IGLHDPSHGTLPDG-OH (配列番号: 94); H-IGLHDPSHGTLPEG-OH (配列番号: 95); H-IGLHEPSHGTLPN-OH (配列番号: 96); H-IGLHQPSHGTLPN-OH (配列番号: 97); H-IGLHNPSHGTLPN-OH (配列番号: 98); H-IGLHEPSHGTLPAG-OH (配列番号: 99); H-IGLHQPSHGTLPAG-OH (配列番号: 100); H-IGLHNPSHGTLPAG-OH (配列番号: 101); H-IGLHDPSHGTLQGE-OH (配列番号: 102); H-IGLHDPSHGTLPDGE-OH (配列番号: 103); H-IGLHDPSHGTLPEGE-OH (配列番号: 104); H-IGLHEPSHGTLPNGE-OH (配列番号: 105); H-IGLHQPSHGTLPNGE-OH (配列番号: 106); H-IGLHNPSHGTLPNGE-OH (配列番号: 107); H-IGLHEPSHGTLPAGE-OH (配列番号: 108); H-IGLHQPSHGTLPAGE-OH (配列番号: 109); 又は H-IGLHNPSHGTLPAGE-OH (配列番号: 110)

【0039】

本明細書では、さらなるINGAP-PPペプチド類似体が提供される。さらに別の実施態様では、本発明は、以下からなる群から選択される配列を含むペプチド又はその類似体を提供する。

【化6】

IGLHAPSHGTLPGNS (配列番号:6);
 IGLHAPSHGTLPAGS (配列番号:8); IGLHDPSHGTEPNNGS (配列番号:18);
 IGLHDPSQGTLPNNGS (配列番号:19); IGLHDPTHGTLPNNGS (配列番号:20);
 IGLHDPSHGTLPNGE (配列番号:21); IGLHDPSHGTLPNGK (配列番号:22);
 IGLHDPSHGTLPAGK (配列番号:23); IGLHDPSHGTPEPAGS (配列番号:24);
 IGLHDPSQGTLPAGS (配列番号:25); 及び IGLHDPTHGTLPAGS (配列番号:26);
 IGLHDPSHGTLPAGE (配列番号:27)

10

【0040】

例えば、本発明は、以下から選択されるペプチド又は類似体を含むペプチド又はその類似体を提供する。

【化7】

IGLHAPSHGTLPNNGS (配列番号:6);
 IGLHAPSHGTLPAGS (配列番号:8); IGLHDPSHGTEPNNGS (配列番号:18);
 IGLHDPSQGTLPNNGS (配列番号:19); IGLHDPTHGTLPNNGS (配列番号:20);
 IGLHDPSHGTLPNGE (配列番号:21); IGLHDPSHGTLPNGK (配列番号:22);
 IGLHDPSHGTLPAGK (配列番号:23); IGLHDPSHGTPEPAGS (配列番号:24);
 IGLHDPSQGTLPAGS (配列番号:25); IGLHDPTHGTLPAGS (配列番号:26); 及び
 IGLHDPSHGTLPAGE (配列番号:27)

20

別の実施態様では、本発明は、以下からなるペプチド又はその類似体を提供する。

【化8】

IGLHAPSHGTLPNNGS (配列番号:6);
 IGLHAPSHGTLPAGS (配列番号:8); IGLHDPSHGTEPNNGS (配列番号:18);
 IGLHDPSQGTLPNNGS (配列番号:19); IGLHDPTHGTLPNNGS (配列番号:20);
 IGLHDPSHGTLPNGE (配列番号:21); IGLHDPSHGTLPNGK (配列番号:22);
 IGLHDPSHGTLPAGK (配列番号:23); IGLHDPSHGTPEPAGS (配列番号:24);
 IGLHDPSQGTLPAGS (配列番号:25); IGLHDPTHGTLPAGS (配列番号:26); 又は
 IGLHDPSHGTLPAGE (配列番号:27)

30

【0041】

本発明は、HIP類似体をさらに提供する。本発明の一実施態様では、本発明は、配列
 【化9】

40

IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号:50)

を含むペプチド又はその類似体を提供する。本発明の一実施態様では、該ペプチド又は類似体は、以下から選択されるペプチド又は類似体を含むことができる。

【化10】

IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号 :50); IGLHDPTQGTEP(Aib)GE (配列番号 :51); Ac-IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号 :52); (D-Ile)GLHDPTQGTEPAGE (配列番号 :53); Ac-IGLHDPTQGTEPAG-NH2 (配列番号 :60); Ac-IGLHD PTQGT EPAGE-NH2 (配列番号 :62); IGLHDPTQGTEPAGE-NH2 (配列番号 :68); IGLHDPTQGTEPAGC (配列番号 :69); Ac-IGLHDPTQGTEPAGC (配列番号 :70); IGLHDPTQGTEPAGC-NH2 (配列番号 :71); 及び Ac-IGLHDPTQGTEPAGC-NH2 (配列番号 :72)

10

特定の実施態様では、該ペプチド又はその類似体は、以下からなる。

【化11】

IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号 :50); IGLHDPTQGTEP(Aib)GE (配列番号 :51); Ac-IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号 :52); (D-Ile)GLHDPTQGTEPAGE (配列番号 :53); 及び Ac-IGLHDPTQGTEPAG-NH2 (配列番号 :60); Ac-IGLHD PTQGT EPAGE-NH2 (配列番号 :62); IGLHDPTQGTEPAGE-NH2 (配列番号 :68); IGLHDPTQGTEPAGC (配列番号 :69); Ac-IGLHD PTQGT EPAGC (配列番号 :70); IGLHD PTQGT EPAGC-NH2 (配列番号 :71); 又は Ac-IGLHD PTQGT EPAGC-NH2 (配列番号 :72)

20

【0042】

別の実施態様では、本発明は、追加のHIPペプチド類似体を提供する。例えば、本発明は、以下からなる群から選択されるペプチド又は類似体を含むペプチド又はその類似体を提供する。

【化12】

Ac-IGLHDPTQGTEPNGE (配列番号 :54); (D-Ile)GLHDPTQGTEPNGE (配列番号 :55); Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH2 (配列番号 :61); IGLHDPTQGTEPNGE-NH2 (配列番号 :63); IGLHDPTQGTEPNGC (配列番号 :64); Ac-IGLHDPTQGTEPNGC (配列番号 :65); IGLHDPTQGTEPNGC-NH2 (配列番号 :66); 及び Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH2 (配列番号 :67)

30

特定の実施態様では、該ペプチド又はその類似体は、以下からなることができる。

【化13】

Ac-IGLHDPTQGTEPNGE (配列番号 :54); (D-Ile)GLHDPTQGTEPNGE (配列番号 :55); Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH2 (配列番号 :61); IGLHDPTQGTEPNGE-NH2 (配列番号 :63); IGLHDPTQGTEPNGC (配列番号 :64); Ac-IGLHDPTQGTEPNGC (配列番号 :65); IGLHDPTQGTEPNGC-NH2 (配列番号 :66); 又は Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH2 (配列番号 :67)

40

【0043】

本発明の別の実施態様では、ペプチド又はその類似体は、以下からなる群から選択される配列を含むことができる。

50

【化14】

IGLHDPTQGTEPNGS (配列番号:56);
 IGLHDPTQGTEPAGS (配列番号:57); IGLHDPTQGTLPNGE (配列番号:58); 及び
 IGLHDPTQGTLPAGE (配列番号:59)

例えば、該ペプチド又はその類似体は、以下から選択されるペプチド又は類似体を含むことができる。

【化15】

IGLHDPTQGTEPNGS (配列番号:56);
 IGLHDPTQGTEPAGS (配列番号:57); IGLHDPTQGTLPNGE (配列番号:58); 及び
 IGLHDPTQGTLPAGE (配列番号:59)

特定の実施態様では、ペプチド又はその類似体は、以下からなることができる。

【化16】

IGLHDPTQGTEPNGS (配列番号:56); IGLHDPTQGTEPAGS
 (配列番号:57); IGLHDPTQGTLPNGE (配列番号:58); 又は IGLHDPTQGTLPAGE
 (配列番号:59)

【0044】

特定の実施態様では、本発明は、

【化17】

Ac-IGLHDPSHGTLPAGS (配列番号:12)

を含むペプチド又はその類似体を提供する。別の特定の実施態様では、本発明は、

【化18】

Ac-IGLHDPSHGTLPAGS (配列番号:12)

からなるペプチド又はその類似体を提供する。一層さらなる実施態様では、本発明は、

【化19】

Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号:31)

を含むペプチド又はその類似体を提供する。別の一層さらなる実施態様では、本発明は、

【化20】

Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号:31)

からなるペプチド又はその類似体を提供する。親INGAP-PPペプチドと比較すると、配列番号:12及び配列番号:31のペプチドは、血漿及び培地中での有意に向上した安定性、有意に向上した薬物動態特性、グルコース刺激性インスリン分泌に対する有意に強い効果、膵島細胞の有意に効率的な誘導、及び有意に強い膵島新生効果を有する。本明細書に開示する通り、配列番号:12及び配列番号:31のペプチドは、親INGAP-PPペプチドよりも高い有効性を示した(実施例VIII参照)。配列番号:12及び配列番号:31のペプチドを用いると、親INGAP-PPペプチドの用量の1/100で、小さい膵島サイズへの変化が実現した(実施例IX参照)。配列番号:12及び配列番号:31のペプチドは、さらに、親INGAP-PPペプチドに対する、AU_C及びC_{max}の有意な増大によって、また、血漿及び膵臓濃度の増大によって裏付けられる通りの、薬物動態特性の向上を示した(実施例X参照)。配列番号:12及び配列番号:31のペ

10

20

30

40

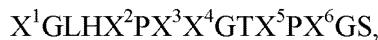
50

プチドはまた、培地中、また、ラット、マウス、及びヒト血漿中での安定性の増大を示した(実施例XI参照)。したがって、配列番号:12及び配列番号:31のペプチドは、親INGAP-PPペプチドに勝る有意な利点を有する。本発明のペプチド又は類似体は、限定はされないが、膵島細胞成長を刺激すること、エクスピボ若しくはインビボで膵島細胞の集団を產生すること、ヒトにおける膵島細胞の数を増加させること、及び、糖尿病などの膵機能障害を伴う疾患又は状態を治療することを含めて、様々な用途に有用である。より具体的には、膵機能障害を伴う疾患又は状態としては、限定はされないが、1型糖尿病、2型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)、空腹時血中ブドウ糖不良、耐糖能障害、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、及び損傷若しくは炎症が原因の部分的膵切開が挙げられる。本発明のペプチド又は類似体は、親INGAP-PPペプチドよりもかなり少ない投薬レベルで患者に投与し、治療の過程にわたって、有効性の向上及び/又は副作用の軽減をもたらすことができる。好ましい実施態様では、本発明のペプチド又は類似体は、各回、多くとも10mg/kg、多くとも5mg/kg、多くとも1mg/kg、多くとも0.5mg/kg、又は多くとも0.1mg/kg、患者に投与される。他の好ましい実施態様では、本発明のペプチド又は類似体は、0.1~100mg/日、1~50mg/日、5~100mg/日、5~50mg/日、0.1~10mg/日、又は0.1~1mg/日の用量範囲で、患者に投与される。
10

【0045】

別の実施態様では、本発明は、次式を有するペプチド又は類似体を提供する：

【化21】



20

。式中、 X^1 は、イソロイシン(I)、D-イソロイシン、L-ノルバリン、又はL-ノルロイシンから選択され; X^2 は、アラニン(A)又はアスパラギン酸(D)から選択され; X^3 は、セリン(S)又はトレオニン(T)から選択され; X^4 は、ヒスチジン(H)又はグルタミン(Q)から選択され; X^5 は、ロイシン(L)又はグルタミン酸(E)から選択され;かつ、 X^1 がイソロイシン(I)であり、かつ X^2 がアスパラギン酸(D)であり、かつ X^3 がセリン(S)であり、かつ X^4 がヒスチジン(H)であり、かつ X^5 がロイシン(L)である場合には、 X^6 は、アラニン(A)、-アミノ-イソ酪酸、又はN-メチル-L-アラニンから選択され、そうではない場合には、 X^6 は、アラニン(A)、アスパラギン(N)、-アミノ-イソ酪酸、又はN-メチル-L-アラニンから選択される。特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、
30

【化22】

H-IGLHAPSHGTLNGS-OH(配列番号：6), H-IGLHDPSHGTL(Aib)GS-OH(配列番号：10), H-IGLHDPSHGTL(N-メチル-L-アラニン)GS-OH(配列番号：11), H-(D-イソロイシン)GLHDPSHGTLNGS-OH(配列番号：17), H-IGLHDPSHGTEPNNGS-OH(配列番号：18), H-IGLHDPSQGTLNGS-OH(配列番号：19), 及び H-IGLHDPTHGTLNGS-OH(配列番号：20)

から選択することができる。別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、
40

【化23】

H-IGLHDPSHGTLPGS-OH (配列番号: 7), H-IGLHAPSHGTLPGS-OH (配列番号: 8), H-(D-イソロイシン)GLHDPSHGTLPGS-OH (配列番号: 13), H-(L-ノルバリン)GLHDPSHGTLPGS-OH (配列番号: 14), H-(L-ノルロイシン)GLHDPSHGTLPGS-OH (配列番号: 15), H-IGLHDPSHGTEPAGS-OH (配列番号: 24), H-IGLHDPSQGTLPGS-OH (配列番号: 25), 及び H-IGLHDPTHGTLPGS-OH (配列番号: 26)

10

から選択することができる。

【0046】

さらに別の実施態様では、本発明は、次式を有するペプチド又は類似体を提供する:

【化24】



。式中、mは、0又は1であり;R¹は、-H又は-Acから選択され;R²は、-OH又は-NH₂から選択され;かつ、R¹が-Hであり、かつR²が-OHであり、かつmが0である場合には、X¹は、グルタミン酸(E)、システイン(C)、又はリシン(K)から選択され;そうではない場合には、X¹は、セリン(S)、グルタミン酸(E)、システイン(C)、又はリシン(K)から選択される。特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

20

【化25】

H-IGLHDPSHGTLPNGE-OH (配列番号: 21), 及び
H-IGLHDPSHGTLPNGK-OH (配列番号: 22)

から選択することができる。別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化26】

30

Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-NH₂ (配列番号: 31), H-IGLHDPSHGTLPNGS-NH₂ (配列番号: 32), 及び Ac-IGLHDPSHGTLPNGS-OH (配列番号: 16)

から選択することができる。さらなる別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化27】

H-IGLHDPSHGTLPNGC-OH (配列番号: 37), Ac-IGLHDPSHGTLPNGC-OH (配列番号: 38), H-IGLHDPSHGTLPNGC-NH₂ (配列番号: 39), 及び Ac-IGLHDPSHGTLPNGC-NH₂ (配列番号: 40)

40

から選択することができる。一層さらなる特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化 2 8】

H-IGLHDPSHGTLPNGSC-OH (配列番号：33), Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC-OH (配列番号：34), H-IGLHDPSHGTLPNGSC-NH₂ (配列番号：35), 及び Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC-NH₂ (配列番号：36)

から選択することができる。さらに別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化 2 9】

H-IGLHDPSHGTLPNG-OH (配列番号：74), Ac-IGLHDPSHGTLPNG-OH (配列番号：75), H-IGLHDPSHGTLPNG-NH₂ (配列番号：76), 及び Ac-IGLHDPSHGTLPNG-NH₂ (配列番号：77)

から選択することができる。

【0 0 4 7】

さらに別の実施態様では、本発明は、次式を有するペプチド又は類似体を提供する：

【化 3 0】



10

20

;式中、mは、0又は1であり;R¹は、-H又は-Acから選択され;R²は、-OH又は-NH₂から選択され;かつ、R¹が-Hであり、かつR²が-OHであり、かつmが1である場合には、X¹は、グルタミン酸(E)、システイン(C)、又はリシン(K)から選択され;そうではない場合には、X¹は、セリン(S)、グルタミン酸(E)、システイン(C)、又はリシン(K)から選択される。特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化 3 1】

H-IGLHDPSHGTLPAGE-OH (配列番号：27), 及び
H-IGLHDPSHGTLPAGK-OH (配列番号：23)

30

から選択することができる。別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化 3 2】

Ac-IGLHDPSHGTLPAGS-NH₂ (配列番号：29), H-IGLHDPSHGTLPAGS-NH₂ (配列番号：41), 及び Ac-IGLHDPSHGTLPAGS-OH (配列番号：12)

から選択することができる。さらなる別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化 3 3】

H-IGLHDPSHGTLPAGC-OH (配列番号：46), Ac-IGLHDPSHGTLPAGC-OH (配列番号：47), H-IGLHDPSHGTLPAGC-NH₂ (配列番号：48), 及び Ac-IGLHDPSHGTLPAGC-NH₂ (配列番号：49)

40

から選択することができる。さらに別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化34】

H-IGLHDPSHGTLTPAG-OH (配列番号: 73),
 H-IGLHDPSHGTLTPAG-NH₂ (配列番号: 28), 及び
 Ac-IGLHDPSHGTLTPAG-NH₂ (配列番号: 30)

から選択することができる。

【0048】

別の実施態様では、本発明は、次式を有するペプチド又は類似体を提供する:

【化35】

10



。式中、X²は、リシン(K)又はシステイン(C)から選択され、R¹は、-H又は-Acから選択され、R²は、-OH又は-NH₂から選択される。特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化36】

H-IGLHDPSHGTLTPAGSK-OH (配列番号: 9), H-IGLHDPSHGTLTPAGSC-OH (配列番号: 42), Ac-IGLHDPSHGTLTPAGSC-OH (配列番号: 43), H-IGLHDPSHGTLTPAGSC-NH₂ (配列番号: 44), 及び Ac-IGLHDPSHGTLTPAGSC-NH₂ (配列番号: 45)

20

から選択することができる。

【0049】

別の実施態様では、本発明は、次式を有するペプチド又は類似体を提供する:

【化37】



。式中、X¹は、イソロイシン(I)又はD-イソロイシンから選択され; X²は、グルタミン酸(E)又はロイシン(L)から選択され; かつ、X¹がイソロイシン(I)であり、かつX²がグルタミン酸(E)である場合には、X³は、アラニン(A)又は-D-アミノ-イソ酪酸から選択され; そうではない場合には、X³は、アラニン(A)、アスパラギン(N)、又は-D-アミノ-イソ酪酸から選択される。特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

30

【化38】

H-IGLHDPTQGTEP(Aib)GE-OH (配列番号: 51), H-(D-イソロイシン)GLHDPTQGTEPNGE-OH (配列番号: 55), 及び H-IGLHDPTQGTLPNGE-OH (配列番号: 58)

から選択することができる。別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化39】

40

H-IGLHDPTQGTEPAGE-OH (配列番号: 50), H-(D-イソロイシン)GLHDPTQGTEPAGE-OH (配列番号: 53), 及び H-IGLHDPTQGTLPAGE-OH (配列番号: 59)

から選択することができる。

【0050】

別の実施態様では、本発明は、次式を有するペプチド又は類似体を提供する:

【化40】



。式中、R¹は、-H又は-Acから選択され;R²は、-OH又は-NH₂から選択され;かつ、R¹が-HでありかつR²が-OHである場合には、X¹は、セリン(S)又はシステイン(C)から選択され;そうではない場合には、X¹は、セリン(S)、グルタミン酸(E)、又はシステイン(C)から選択される。特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化41】

Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-OH (配列番号: 54), Ac-
IGLHDPTQGTEPNGE-NH₂ (配列番号: 61), 及び H-IGLHDPTQGTEPNGE-NH₂ (配列
番号: 63)

から選択することができる。別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化42】

H-IGLHDPTQGTEPNGS-OH (配列番号: 56), H-IGLHDPTQGTEPNGC-
OH (配列番号: 64), Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-OH (配列番号: 65), H-
IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂ (配列番号: 66), 及び Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂ (配列
番号: 67)

から選択することができる。

【0051】

別の実施態様では、本発明は、次式を有するペプチド又は類似体を提供する:

【化43】



。式中、R¹は、-H又は-Acから選択され;R²は、-OH又は-NH₂から選択され;nは、0又は1で
あり;X¹は、セリン(S)又はシステイン(C)から選択される。特定の実施態様では、該式の
ペプチド又は類似体は、

【化44】

H-IGLHDPTQGTEPAGS-OH (配列番号: 57), Ac-IGLHDPTQGTEPAG-
NH₂ (配列番号: 60), H-IGLHDPTQGTEPAGC-OH (配列番号: 69), Ac-
IGLHDPTQGTEPAGC-OH (配列番号: 70), H-IGLHDPTQGTEPAGC-NH₂ (配列
番号: 71), 及び Ac-IGLHDPTQGTEPAGC-NH₂ (配列番号: 72)

から選択することができる。別の特定の実施態様では、該式のペプチド又は類似体は、

【化45】

Ac-IGLHDPTQGTEPAGE-OH (配列番号: 52), Ac-IGLHDPTQGTEPAGE-NH₂ (配列
番号: 62), 及び H-IGLHDPTQGTEPAGE-NH₂ (配列番号: 68)

から選択することができる。

【0052】

本明細書に記載する場合、本発明のペプチド又は類似体としては、標準の20種の天然に
存在するアミノ酸並びに他の天然に存在する及び/又は天然に存在しないアミノ酸を有す
るペプチドであり得るINGAP-PP及びHIPの類似体が挙げられる。本明細書に記載するペプ

10

20

30

40

50

チドは、一般に、従来の命名法を使用する。例えば、あるペプチドは、H-XXX-OHと称され、これは、修飾されていないアミノ-(H-)又はカルボキシ-(-OH)末端を称することができる。アミノ酸配列は、アミノ-又はカルボキシ-末端上の修飾を示さずに表すこともできる。本明細書に記載するペプチドは、N又はC末端上の具体的な修飾が示されない限り、指定されたアミノ酸配列又はペプチド類似体を含むペプチド上の修飾されていない及び修飾されたアミノ-及び/又はカルボキシ-末端を含むことができる。これが、当業者に理解される。したがって、指定されたアミノ酸配列を含むペプチド又は類似体は、指定された配列の修飾されたアミノ酸だけでなく、N及び/又はC末端上の追加のアミノ酸を含むことができる。指定されたペプチド又は類似体を含むペプチド又は類似体は、同様に、N及び/又はC末端が、例えばペプチド結合を介するアミノ酸の付加を妨げる修飾を含まない限り、修飾されたアミノ酸及び/又は追加のアミノ酸を含むことができる。こうした修飾には、例えば、N末端のアセチル化及び/又はC末端のアミド化が含まれ得る。

【0053】

本明細書に記載する場合、本発明のペプチド又は類似体は、修飾を含むことができる。あるペプチド又は類似体に、いくつかの修飾を施すことができる。これが、当業者に理解される。修飾の例としては、限定はされないが、N末端のアセチル化、C末端のアミド化、Dアミノ酸、修飾されたアミノ酸、脂肪酸修飾、エステル化、又はこれらの組み合わせが挙げられる。ペプチド又はアミノ酸の、いくつかの周知の修飾のいずれかを、本発明のペプチド又は類似体に含めることができる。例えば、誘導体は、エステル化、アルキル化、アシル化、カルバミル化、ヨウ素化、又はポリペプチドを誘導体化するあらゆる修飾などの、ポリペプチドの化学修飾を含むことができる。ペプチド又は類似体の修飾には、修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン又はカルボキシグルタミン酸を含むことができる、また、ペプチド結合によって連結されていないアミノ酸を含むことができる。

【0054】

いくつかの周知の方法のいずれかを用いて、本発明のペプチド又は類似体を生成することができる。これが、当業者に理解される(例えば、「タンパク質エンジニアリング:実用手法(Protein Engineering:A practical approach)」(IRL Press 1992);Bodanszkyの文献、「ペプチド合成の原則(Principles of Peptide Synthesis)」(Springer-Verlag 1984)、Lydon-Williamsらの文献、「Tetrahedron」49:11065-11133(1993);Kentの文献、「Ann.Rev.Biochem.」57:957-989(1988);Merrifieldの文献、「J.Am.Chem.Soc.」85:2149-2154(1963);Merrifieldの文献、「Methods Enzymol.」289:3-13(1997)を参照のこと)。本発明のペプチド又は類似体を生成するための特に有用な方法は、ペプチド合成の周知の方法を使用する化学合成を介するものである。化学合成は、天然に存在しないアミノ酸、修飾されたアミノ酸、及び/又は修飾されたN及び/又はC末端を導入するのに特に有用である。例えば、本発明のペプチド又は類似体を調製するために化学合成を使用する利点は、所望される場合、(L)-アミノ酸を、(D)-アミノ酸で置き換えることができる。1以上の(D)-アミノ酸の導入によって、例えば、インビトロ、又は特にインビボでのペプチドのさらなる安定性を付与することができる。これは、内在性のエンドプロテアーゼが、一般に、(D)-アミノ酸を含有するペプチドに対して無効であるからである。Dアミノ酸を有するペプチドは、本明細書では、あるアミノ酸に対する対応する1文字記号に対する小文字という周知の命名法を使用して名付けることもできる。

【0055】

所望される場合、本発明のペプチド又は類似体における1以上のアミノ酸の反応性の側基を、修飾することができ、又はアミノ酸誘導体を該ペプチドに組み込むことができる。ペプチド又は類似体の反応性の基の選択的修飾によって、ペプチド又は類似体に対して所望の特性を付与することができる。こうした修飾を含めることの選択は、ある程度、ペプチドに求められる特性によって決定される。例えば、ペプチド又は類似体は、遊離のカルボキシル末端を有することもできるし、C末端がアミド化されるように修飾することもできる(表2及び3参照)。同様に、ペプチド又は類似体は、遊離のアミノ末端を有することも

10

20

30

40

50

できるし、N末端がアセチル化されるように修飾することもできる(表2及び3参照)。さらに、本発明のペプチド又は類似体は、任意に、C末端上でアミド化及びN末端上でアセチル化することができる。ペプチド又は類似体のN及び/又はC末端の他の修飾も、修飾の意味の範囲内に含まれ得る。

【0056】

本発明のペプチド又は類似体の他の修飾としては、限定はされないが、2-アミノアジピン酸(Aad);3-アミノアジピン酸(bAad);-アラニン、-アミノプロピオン酸(bAla);2-アミノ酪酸(Abu);4-アミノ酪酸、ピペリジン酸(4Abu);6-アミノカプロン酸(Acp);2-アミノヘプタン酸(Ahe);2-アミノイソ酪酸(Aib);3-アミノイソ酪酸(bAib);2-アミノピメリン酸(Apm);2,4ジアミノ酪酸(Dbz);デスモシン(Des);2,2'-ジアミノピメリン酸(Dpm);2,3-ジアミノプロピオン酸(Dpr);N-エチルグリシン(EtGly);N-エチルアスパラギン(EtAsn);ヒドロキシリシン(Hyl);アロ-ヒドロキシリシン(aHyl);3-ヒドロキシプロリン(3Hyp);4-ヒドロキシプロリン(4Hyp);イソデスモシン(Ide);アロ-イソロイシン(alle);N-メチルグリシン(MeGly;サルコシン);N-メチルイソロイシン(MeIle);6-N-メチルリシン(MeLys);N-メチルバリン(MeVal);ノルバリン(Nva);ノルロイシン(Nle);及びオルニチン(Orn)が含まれ得る。すべての修飾された-アミノ酸を、対応する-、-、又は-アミノ酸で置換することができることが理解されよう。

【0057】

本発明のペプチド又は類似体の別の修飾には、脂肪酸修飾が含まれる。したがって、本発明のペプチド又は類似体は、C2、C4、C6、C8、C10、C12、C14、C16、C18、C20、又はそれよりも長い鎖を含む脂肪族基を用いるアシル化によって修飾することもできる。ペプチド又は類似体は、イソプレニル化及び/又はホスファチジルイノシトール(PI)によって修飾することもできる。本発明のペプチド又は類似体の追加の修飾には、エステル化が含まれる。例えば、カルボキシル基は、酸触媒によるエステル化又はアルコールとの縮合によって修飾することができる。逆に、アルコール基は、カルボン酸又は他の酸との縮合によって修飾することができる。本発明のペプチド又は類似体の追加の修飾には、環化が含まれ得る。例えば、頭部と尾部をつなぐ構造的拘束の導入による環化は、その線状対応物よりもペプチド安定性を向上させ、それによってペプチド作用の期間を延長させる。構造的柔軟性を制限することによって、環状ペプチドは、天然のタンパク質に現れる活性な配列の構造を、より厳密に模倣する構造を取ると考えられる(例えば、Duttaの文献「Chem.Br.」25:159(1989);Koppleの文献、「J.Am.Chem.Soc.」94:973-981(1972);Bruggheらの文献、「Int.J.Peptide Protein Res.」43:166-170(1994)を参照のこと)。これらの及び他のアミノ酸、ペプチド、又はタンパク質修飾は、当業者に周知である(例えば、Glazerらの文献、「タンパク質の化学修飾:選択された方法及び分析手順(Chemical modification of proteins:Selected methods and analytical procedures)」、Elsevier Biomedical Press社、Amsterdam(1975)を参照のこと)。本発明のペプチド又は類似体には、あるペプチド又は類似体分子における、単一の修飾としての、又は1以上の修飾の組み合わせとしての、こうした修飾が含まれ得ることが理解されよう。

【0058】

本発明はまた、ペプチドミメティクスとも呼ばれる、本明細書に開示されるペプチド又は類似体のミメティクスを含む。ミメティクスは、ペプチドの機能を模倣する化学部分を含有する化学物質を包含する。例えば、ペプチドが、機能活性を有する2つの帯電した化学部分を含有する場合、ミメティクスは、2つの帯電した化学部分を、3次元空間における帯電した化学的機能が維持されるような空間的定位及び拘束構造に配置する。したがって、ミメティクスは、本発明のペプチド又は類似体の官能基を、ペプチド又は類似体の機能活性が保持されるように方向付ける。

【0059】

ミメティクス又はペプチドミメティクスは、化学的に修飾されたペプチド、天然に存在しないアミノ酸を含有するペプチド様分子、ペプトイドなどを含むことができ、また、そのペプチドミメティクスが誘導されるペプチド又は類似体の機能活性を有する(例えば、

「Burgerの医薬品化学及び創薬(Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery)」第5版、第1~3巻(M.E.Wolff編;Wiley Interscience 1995)を参照のこと)。ペプチドミメティクスを特定するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、潜在的ペプチドミメティクスのライブラリを含有するデータベースのスクリーニング(Allenらの文献、「Acta Crystallogr.」Section B,35:2331(1979))、又は分子モデリングを使用すること(Rusinkoらの文献、「J.Chem.Inf.Comput.Sci.」29:251(1989))が挙げられる。ミメティクス又はペプチドミメティクスは、例えば、対象に投与された場合の、例えば、消化管を通過中の、より大きい安定性などの所望の性質を提供することができ、したがって、経口投与のために有用であり得る。

【0060】

10

限定はされないが、制約された(constrained)アミノ酸、ペプチド二次構造を模倣する非ペプチド成分、又はアミド結合アイソスターを含有するペプチド様分子を含めて、様々なミメティクス又はペプチドミメティクスが当技術分野で公知である。制約された、天然に存在しないアミノ酸を含有するミメティクス又はペプチドミメティクスには、限定はされないが、-メチル化アミノ酸;-, -ジアルキルグリシン若しくは -アミノシクロアルカンカルボン酸; ^N-C-環化アミノ酸; ^N-メチル化アミノ酸; -又は -アミノシクロアルカンカルボン酸; -, -不飽和アミノ酸; -, -ジメチル又は -メチルアミノ酸; -置換-2,3-メタノアミノ酸; N--C 又は ^C-C 環化アミノ酸; 置換プロリン、又は別のアミノ酸ミメティクスが含まれ得る。ペプチド二次構造を模倣するミメティクス又はペプチドミメティクスは、限定はされないが、非ペプチド性の -ターン模倣体; -ターン模倣体; 又はヘリックス構造の模倣体(これらはそれぞれ、当技術分野で周知である)を含有することができる。非限定的な例としては、ペプチドミメティクスはまた、レトロ-インベルソ(retro-inverso)修飾などのアミド結合アイソスター; 還元されたアミド結合; メチレンチオエーテル又はメチレン-スルホキシド結合; メチレンエーテル結合; エチレン結合; チオアミド結合; トランス-オレフィン又はフルオロオレフィン結合; 1,5-二置換テトラゾール環; ケトメチレン又はフルオロケトメチレン結合、又は別のアミドアイソスター; を含有するペプチド様分子であり得る。当業者は、本発明のペプチド又は類似体のこれらの及び他のミメティクス又はペプチドミメティクスも使用することができることを理解する。

【0061】

20

本発明はまた、本発明のペプチド又は類似体の偽ペプチド誘導体を提供する。偽ペプチドは、ペプチド中のペプチド結合(アミド結合)がアミド結合代替物に改変されたペプチドとして当技術分野で公知である(例えば、Cudic及びStawikowskiの文献、「Mini-Rev Organic Chem.」4:268-280(2007);Andersonの文献、「神経ペプチドプロトコル(Neuropeptide Protocols)」中、Brent及びCarvello編、73:49-60(1996)を参照のこと)。アミド結合代替物の例としては、限定はされないが、ペプチドスルホンアミド、ホスホノペプチド、デブシド及びデブシペプチド、オリゴ尿素、アザペプチド、及びペプトイド(Cudic及びStawikowski、上記、2007を参照のこと)、並びにメチレンアミノ、チオエーテル、及びヒドロキシエチレン誘導体などが挙げられる(Anderson、上記、1996)。

【0062】

30

本発明のペプチド又は類似体は、本明細書に記載する通りの、ペプチド合成の周知の方法を使用するペプチド又は類似体の化学合成を含めた当業者に周知の方法を使用して生成することができる。したがって、ペプチド又は類似体が、1以上の非標準アミノ酸を含む場合、化学合成方法によって生成することになる可能性が高い。ペプチド又は類似体の化学合成を使用すること以外に、ペプチド又は類似体は、コードする核酸からの発現によって産生することができる。これは、天然に存在するアミノ酸のみを含むペプチド又は類似体にとって特に有用である。こうした場合、ペプチド配列をコードする核酸は、周知の方法を使用して調製することができる(Sambrookらの文献、「分子クローニング:実験マニュアル(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)」、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory、New York(2001);Ausubelらの文献、「分子生物学のカレントプロトコル(Recent Protocols in Molecular Biology)」、John Wiley and Sons社、Baltimore,MD(1999)を参照

40

50

のこと)。一般に、こうした核酸は、細菌、酵母、哺乳類、又は昆虫細胞などの適切な宿主生物中で組み換えによって発現されることとなる。細菌中の産生は、本発明のペプチド又は類似体の大規模産生にとって、特に有用であり得る。ペプチドは、生物中で発現させ、周知の精製技術を使用して精製することができる。

【0063】

本発明のペプチド又は類似体をコードする核酸分子は、適切なベクター、特に発現ベクターにクローニングすることができ、コードされるペプチド又は類似体を、宿主細胞中で、又はインビトロ転写/翻訳反応を使用して、発現させることができ、それによって、大量のペプチド又は類似体を得るための手段が提供される。任意に、Hisタグなどのタグとの融合体として組み換えペプチドを生成し、同定及び精製を容易にすることができる。適切なベクター、宿主細胞、インビトロ転写/翻訳システム、及びタグ配列は、当技術分野で周知であり、市販品として入手できる。

10

【0064】

ペプチド又は類似体は、ポリリストロン性発現ベクターで単一のコピーとして発現させることもできるし、任意に、ペプチド配列の多重コピーを有する単一のオープンリーディングフレームとして発現させることもできる。こうした場合、ペプチドは、ペプチド配列の多重コピーを含有するオープンリーディングフレームを発現させることによって得ることができ、ペプチドの多重コピーを有するポリペプチドを発現させることができる。ポリペプチドは、例えば、ペプチドのコピーの間に適切なタンパク質分解切断部位を組み込み、ポリペプチドを本発明のペプチド又は類似体に切断することによって、翻訳後に、本発明のペプチド又は類似体にプロセシングすることができる。こうした組み換え法は、一般に、本発明のペプチド又は類似体が、天然に存在するアミノ酸のみを含有するペプチドである場合に使用されることとなるが、こうした方法を、天然に存在しないアミノ酸を発現するように適切に操作した発現宿主と共に用いることも理解されたい。さらに、組み換えによって発現されたペプチド又は類似体を任意に化学的に修飾して、所望のアミノ酸修飾又はN-及び/又はC-末端修飾を、周知の化学修飾方法(Glazerらの文献、上記、1975を参照)を使用して導入することができることを理解されたい。

20

【0065】

したがって、本発明は、本発明のペプチド又は類似体をコードする核酸をさらに提供する。こうした核酸としては、例えば、配列番号:6~73のアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸が挙げられる。したがって、類似体が、標準のアミノ酸を有する1以上の置換のみを含む場合、類似体は、本明細書に開示する通りの周知の方法を使用して、発現ベクターから発現させることができる。

30

【0066】

本発明のペプチド又は類似体は、本明細書に開示する通りの配列又はペプチド若しくは類似体を含むことができる。あるアミノ酸配列又はペプチドを含むペプチド又は類似体の場合、ペプチドは、一般に、20アミノ酸以下の長さを有することとなる。例えば、ペプチド又は類似体は、19アミノ酸以下、18アミノ酸以下、17アミノ酸以下の長さを有することができる。したがって、本明細書に開示する、本発明のペプチド又は類似体は、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸(ペプチド73、ペプチド74を参照)、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、又は20アミノ酸の長さを有することができる。より短いペプチドの場合、より短いペプチドは、限定はされないが本明細書に開示する通りの本発明のペプチド及び類似体の1以上の生物活性を含めた機能活性を保持する、開示されたペプチド又は類似体のフラグメント(例えば、開示されたペプチド又は類似体のN及び/又はC末端での1以上のアミノ酸の欠失による)を含むことが当業者に理解される。とは言え、ペプチドが、ペプチド又は類似体の機能活性が保持される限り、より長いアミノ酸の長さを含むこともできることが理解される。したがって、ペプチド又は類似体は、150残基未満、130残基未満、120残基未満、110残基未満、100残基未満、90残基未満、80残基未満、70残基未満、60残基未満、50残基未満、45残基未満、40残基未満、35残基未満、30残基未満、25残基未満、24残基未満、23残基未満、22残基未満

40

50

満、21残基未満、20残基未満、19残基未満、18残基未満、又は17残基未満の長さを有することができる。本発明のペプチド又は類似体が、野生型の完全長タンパク質などの、公知の、より長い配列内に見られる配列を含む場合、本発明のペプチド又は類似体は、こうした完全長配列を、特別に除外することが当業者に理解される。

【0067】

本発明はまた、当業者に周知である医薬として許容し得る塩の形態の、本発明のペプチド及び類似体を提供する。特に有用な塩の形態は、酢酸塩又は塩酸塩の形態である。とは言え、いくつかの適切な塩の形態のいずれかを利用できることが当業者に理解される。本発明のペプチド又は類似体が、酸又は塩基部分を含有する場合、これは、医薬として許容し得る塩として提供することができる(例えば、Bergeらの文献、「J.Pharm.Sci.」1977, 6 10, 11-19; 及び「医薬の塩、性質、及び使用のハンドブック(Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, and Use)」; Stahl及びWermuth編; Wiley-VCH及びVHCA社:Zurich, Switzerland, 2002を参照のこと)。

【0068】

医薬として許容し得る塩の調製において使用するのに適した酸としては、限定はされないが、酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アシル化アミノ酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸、L-アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、ホウ酸、(+)-ショウノウ酸、カンファースルホン酸、(+)-(1s)-カンファー-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カブリル酸、ケイ皮酸、クエン酸、シクラミン酸、シクロヘキサンスルファミン酸、デオキシコール酸、ドデシル硫酸、ドコサヘキサエン酸、エイコサパンテマクニオク酸(eicosapentemacnioc acid)、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクタル酸、ゲンチジン酸、グルコヘプトン酸、D-グルコン酸、D-グルクロン酸、L-グルタミン酸、-オキソグルタル酸、グリコール酸、馬尿酸、臭化水素酸、塩酸、ヨウ化水素酸、(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、(-)-L-リンゴ酸、マロン酸、(±)-DL-マンデル酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフト工酸、ニコチン酸、硝酸、オレイン酸、オロト酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、過塩素酸、リン酸、L-ピログルタミン酸、糖酸、サリチル酸、4-アミノ-サリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、硫酸、タンニン酸、(+)-L-酒石酸、チオシアノ酸、p-トルエンスルホン酸、ウンデシレン酸、ウルソール酸、及び吉草酸が挙げられる。

【0069】

医薬として許容し得る塩の調製において使用するのに適した塩基としては、限定はされないが、無機塩基、例えば、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム、水酸化カリウム、水酸化亜鉛、又は水酸化ナトリウムなど; 及び有機塩基、例えば、以下を含めた、第一級、第二級、第三級、及び第四級の脂肪族及び芳香族アミン:L-アルギニン、ベネタミン、ベンザチン、コリン、デアノール、ジエタノールアミン、ジエチルアミン、ジメチルアミン、ジプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、2-(ジエチルアミノ)-エタノール、エタノールアミン、エチルアミン、エチレンジアミン、イソプロピルアミン、N-メチル-グルカミン、ヒドラバミン、1H-イミダゾール、L-リシン、モルホリン、4-(2-ヒドロキシエチル)-モルホリン、メチルアミン、ピペリジン、ピペラジン、プロピルアミン、ピロリジン、1-(2-ヒドロキシエチル)-ピロリジン、ピリジン、キヌクリジン、キノリン、イソキノリン、第二級アミン、トリエタノールアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、N-メチル-D-グルカミン、2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール、及びトロメタミンが挙げられる。

【0070】

本発明はまた、組成物中の本発明のペプチド及び類似体を提供する。例えば、表2又は3のペプチド又は類似体、又は、本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式は、本明細書に開示する通りの組成物に入れて提供することができる。特定の実施態様では、該組成物は、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を

10

20

30

40

50

含むことができる。該組成物は、任意に、医薬として許容し得る担体と共に製剤化して、ヒト又は他の哺乳類であり得る個体に投与することができる医薬組成物を生成することができる。医薬として許容し得る担体は、例えば、水、リン酸ナトリウム緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、通常の生理食塩水又はリンゲル液又は他の生理学的に緩衝した生理食塩水、或いは他の溶媒又はビヒクリ(例えば、グリコール、グリセロール、オリーブ油などの油、又は注射可能な有機エステルなど)であり得る。

【0071】

医薬として許容し得る担体は、例えば、本発明のペプチド又は類似体の吸収を安定化又は増大させるように作用する、生理的に許容し得る化合物を含有することができる。こうした生理的に許容し得る化合物としては、例えば、グルコース、スクロース、若しくはデキストランなどの炭水化物;アスコルビン酸若しくはグルタチオンなどの酸化防止剤;微生物膜を破壊するエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などのキレート剤;カルシウム若しくはマグネシウムなどの二価の金属イオン;低分子量のタンパク質;又は他の安定剤若しくは賦形剤が挙げられる。当業者は、生理的に許容し得る化合物を含めた、医薬として許容し得る担体の選択が、例えば、組成物の投与経路に依存することを理解しているであろう。適切な担体及びその製剤は、当技術分野で周知である(例えば、レミントン:薬学の科学と実践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)、第19版、A.R.Gennaro編、Mack Publishing Company)、Easton,PA(1995);及びレミントンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第18版、Mack Publishing Company、Easton PA(1990)を参照のこと)。
一般的に、医薬として許容し得る適切な量の塩が、製剤中に使用されて、製剤に等張性が与えられる。溶液のpHは、一般に、約4から約8.5、例えば、約4から約5、約5から約6、約6から約7、約4.5から約8、約5から約8、約5から約7.5、約5.5から約8、約5.5から約7.5、約6から約8、約6.5から約8、約7から約8、約7.5から約8、又は約7から約7.5である。

【0072】

医薬担体は、当業者に公知である。これらは、最も一般的には、先に記載した通りの、生理的pHの滅菌水、生理食塩水、及び緩衝溶液などの溶液を含めた、ヒトへの薬物の投与のための標準の担体であろう。医薬組成物は、本発明のペプチド又は類似体などの選択分子に加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝液、保存剤、界面活性剤などを含むことができる。医薬組成物はまた、抗菌剤、抗炎症剤、麻酔剤などの1以上の活性成分を含むことができる。

【0073】

さらなる担体としては、ペプチド又は類似体と共有結合的又は非共有結合的に結合させた固体の疎水性ポリマーの半透性マトリクスなどの、持続又は制御放出調製物が挙げられる。マトリクスは、成形物、例えば、フィルム、リポソーム、非リポソーム脂質複合体若しくは微粒子など、又は当業者に周知の他の生体適合性のあるポリマーの形態である(例えば、米国特許第6,824,822号及び第8,329,648号を参照のこと)。リポソームは、リン脂質又は他の脂質からなり、比較的に製造及び投与しやすい、非毒性の生理的に許容し得る代謝可能な担体である(Gregoriadisの文献、「リポソーム技術(Liposome Technology)」、Vol.1(CRC Press、Boca Raton Fla.,1984)。様々な薬物送達方法が、当業者に周知である(Langerの文献、「Nature」392(Suppl):5-10(1998);Langerらの文献、「Nature」428:487-492(2004))。例えば、投与される組成物の投与経路及び濃度に応じて、ある種の担体を選択することができるが、当業者には明らかであろう。

【0074】

本明細書に開示する通り、本発明のペプチド又は類似体は、徐放性又は制御放出製剤として調製することができる。実施例XIIに記載する通り、本発明のペプチド又は類似体の長時間作用型徐放性製剤の実現性を示す、様々な徐放性組成物を作製することができる。製剤の例としては、限定はされないが、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、非イオン性の界面活性剤ポリオール(ポリオキシプロピレンとポリオキシエチレン(ポリ(エチレンオキシド))との共重合体であるポロキサマーとしても公知である)、ポリエーテルアミン(エチレンオキシド(E0)、プロピレンオキシド(PO)、EO/PO混合物、又はポリテトラメチレン

10

20

30

40

50

リコール(PTMEG)をベースにすることができる)、ポリエーテルジアミン(主にPEG骨格をベースにする)などを含有するポリマーを含めた、生体適合性のあるポリマーが挙げられる。ポロキサマーの例としては、限定はされないが、Pluronic(登録商標)F127、Pluronic(登録商標)F38、Pluronic(登録商標)F68、Pluronic(登録商標)F87、Pluronic(登録商標)F108、Pluronic(登録商標)10R5、Pluronic(登録商標)17R2、Pluronic(登録商標)17R4、Pluronic(登録商標)25R2、Pluronic(登録商標)25R4、Pluronic(登録商標)31R1、Pluronic(登録商標)F 108 Cast Solid Surfacta、Pluronic(登録商標)F 108 NF、Pluronic(登録商標)F 108 Pastille、Pluronic(登録商標)F 108NF Prillポロキサマー-338、Pluronic(登録商標)F 127 NF、Pluronic(登録商標)F 127 NF 500 BHT Prill、Pluronic(登録商標)F 127 NF Prillポロキサマー-407、Pluronic(登録商標)F 38 Pastille、Pluronic(登録商標)F 68 LF Pastille、Pluronic(登録商標)F 68 NF、Pluronic(登録商標)F 68 NF Prillポロキサマー-188、Pluronic(登録商標)F 68 Pastille、Pluronic(登録商標)F 77、Pluronic(登録商標)F 77 Micropastille、Pluronic(登録商標)F 87 NF、Pluronic(登録商標)F 87 NF Prillポロキサマー-237、Pluronic(登録商標)F 88、Pluronic(登録商標)F 88 Pastille、Pluronic(登録商標)F 98、Pluronic(登録商標)FT L 61、Pluronic(登録商標)L 10、Pluronic(登録商標)L 101、Pluronic(登録商標)L 121、Pluronic(登録商標)L 31、Pluronic(登録商標)L 35、Pluronic(登録商標)L 43、Pluronic(登録商標)L 61、Pluronic(登録商標)L 62、Pluronic(登録商標)L 62 LF、Pluronic(登録商標)L 62D、Pluronic(登録商標)L 64、Pluronic(登録商標)L 81、Pluronic(登録商標)L 92、Pluronic(登録商標)L44 NF INH界面活性剤ポロキサマー-124、Pluronic(登録商標)N 3、Pluronic(登録商標)P 103、Pluronic(登録商標)P 104、Pluronic(登録商標)P 105、Pluronic(登録商標)P 123界面活性剤、Pluronic(登録商標)P 65、Pluronic(登録商標)P 84、Pluronic(登録商標)P 85などが挙げられる。ポリエーテルアミンの例としては、限定はされないが、Jeffamine(登録商標)ED-2003、Jeffamine(登録商標)D-2000、Jeffamine(登録商標)D-230、Jeffamine(登録商標)D-400、Jeffamine(登録商標)EDR-176、Jeffamine(登録商標)SD-2001、Jeffamine(登録商標)T-403、Jeffamine(登録商標)T-5000が挙げられる。追加の成分は、例えば、-、-、及び-シクロデキストリンなどのシクロデキストリンを含むことができる。当技術分野で周知の方法を使用して、徐放性製剤を作製することができる。成分を、限定はされないが、組成物の最終重量の0.1%から30%、例えば、0.5%w/wから20%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%などの濃度(w/w)を含めて、所望の濃度及び割合で製剤化することができる。当技術分野で公知の他の徐放性ペプチド送達システムとしては、例えば、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)(PLGA)、ポリラクチド(PLA)、PEG/PLGAを含むナノ粒子製剤、及びリポソーム(これも徐放性製剤を作製するために使用することができる)が挙げられる。徐放性製剤は、当技術分野で周知である(例えば、レミントンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第18版、Mack Publishing Company、Easton PA(1990)を参照のこと)。徐放性製剤は、本発明のペプチド又は類似体の一定の及び/又は連続的な投薬を提供するのに、及び/又は反復投与を回避するのに有用である。

【 0 0 7 5 】

該医薬組成物は、局所治療か全身治療のいずれが望ましいかということに、及び治療されることとなる部位に応じて、いくつかの方式で投与することができる。本発明のペプチド、類似体、及び方法にとって、様々な投与経路が有用であることが理解される。こうした経路は、全身及び局所投与を含めし、限定はされないが、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、経皮送達、経皮拡散又はエレクトロフォレーシス、吸入投与、経口投与、局所注射、腔内、及び持続放出送達装置(生体内分解性又はリザーバー主体の埋め込み体などの、局所的に埋め込まれた持続放出装置を含む)が挙げられる。投与は、局所的に(眼内、膣内、直腸内、鼻腔内を含めて)、経口的に、吸入によって、又は非経口的に(例えば点滴、皮下、腹腔内、又は筋肉内注射によって)であり得る。徐放性製剤は、インサイチュー形成型の埋め込み体を介して送達することができる。さらに、本発明のペプチド又は類似体は、所望の効果を得るよう、単回投与で毎日、複数回の毎日投与で、徐放

性製剤で、連続的又は断続的な非連続的投与で、毎日連続ではなく断続的に、及びその他の方式で投与することができることが理解される。

【0076】

非経口投与のための調製物は、無菌の水性又は非水性の溶液、懸濁液、及び乳濁液を含む。非水性の溶媒の例は、プロピレン glycole、ポリエチレン glycole、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性の担体としては、水、アルコール性/水性溶液、乳濁液又は懸濁液(生理食塩水及び緩衝培地を含む)が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖加リンガー溶液、ブドウ糖及び塩化ナトリウム溶液、乳酸加リンガー溶液、又は不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体及び栄養補充液(nutrient replenisher)、電解質補充液(electrolyte replenisher)(例えば、ブドウ糖加リンガー溶液に基づくもの)などが挙げられる。例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、及び不活性ガスなどの、保存剤及び他の添加剤も、存在することができる。インスリンは、周知のペプチド治療薬であるので、インスリンの送達のために使用される方法は、本発明のペプチド又は類似体のための送達方法として特に適しており、限定はされないが、シリンジ、ペン型注入器、注入ポンプ、吸入器、口腔スプレー、丸剤などが挙げられる。

【0077】

本発明のペプチド又は類似体の適切な用量に関する指示は、Dunganらの文献、「Diabetes Metab.Res.Rev.」、25:558-565(2009)に提供されている。特に、INGAPペプチドを用いたヒト臨床試験によって、本発明のペプチド又は類似体に関する適切な可能な用量の指示が提供されている。本発明のペプチド又は類似体は、親INGAPペプチドよりも向上した有効性を示すので(実施例参照)、本発明のペプチド又は類似体は、INGAPに使用されるよりも低い有効用量で投与することができる。本発明のペプチド又は類似体の用量の例としては、限定はされないが、0.01～1000mg/日、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、又は1000mg/日が挙げられる。特定の実施態様では、ペプチド用量は、約1～100mg/日、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100mg/日である。用量範囲の例としては、限定はされないが、0.01～1000、0.1～1000、1～1000、10～1000、100～1000、0.01～500、0.1～500、1～500、10～500、100～500、0.01～400、0.1～400、1～400、10～400、100～400、0.01～300、0.1～300、1～300、10～300、100～300、0.01～200、0.1～200、1～200、10～200、100～200、0.01～100、0.1～100、1～100、10～100、1～90、1～80、1～70、1～60、1～50、1～40、1～30、1～20、1～10、5～100、5～90、5～80、5～70、5～60、5～50、5～40、5～30、5～20、5～10、10～100、10～90、10～80、10～70、10～60、10～50、10～40、10～30、10～20、15～100、15～90、15～80、15～70、15～60、15～50、15～40、15～30、15～20、20～100、20～90、20～80、20～70、20～60、20～50、20～40、20～30、25～100、25～90、25～80、25～70、25～60、25～50、25～40、25～30、30～100、30～90、30～80、30～70、30～60、30～50、30～40、35～100、35～90、35～80、35～70、35～60、35～50、35～40、35～30、40～100、40～90、40～80、40～70、40～60、40～50、45～100、45～90、45～80、45～70、45～60、45～50、50～100、50～90、50～80、50～70、50～60、55～100、55～90、55～80、55～70

10

20

30

40

50

、55～60、60～100、60～90、60～80、60～70、65～100、65～90、65～80、65～70、70～100、70～90、70～80、75～100、75～90、75～80、80～100、80～90、90～100など、又は先に列挙した用量の任意の用量増分が挙げられる。本発明のペプチド及び類似体の用量は、一般に、対象に1日あたりに投与されることとなる用量として提供されることが当業者に理解される。用量は、当技術分野に熟達した医師又は臨床医に周知である通り、対象の応答性、対象の体重などに応じて、用量を増大又は低下することによって調節することができることが、さらに当業者に理解される。表2又は3のペプチド又は類似体、又は、本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式は、本明細書に開示する通りの、指示された用量の組成物に入れて提供することができる。特定の実施態様では、該組成物は、指示された用量の配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を含むことができる。10

【0078】

本明細書に記載する場合、本発明のペプチド及び類似体は、ある種の疾患及び障害を治療するのに特に有用である。例えば、本発明のペプチド又は類似体は、膵機能障害を治療すること、代謝疾患を治療すること、神経保護又は神経再生を促進すること、肝臓再生を促進すること、又は炎症を抑制することのために使用することができる。したがって、本発明は、さらに、膵機能障害を治療すること、代謝疾患を治療すること、神経保護又は神経再生を促進すること、肝臓再生を促進すること、又は炎症を抑制することのための、本発明の組成物を提供する。こうした組成物は、表2又は3内の本明細書に開示したものなどのペプチド又は類似体、又は、本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含むことができる。特定の実施態様では、該組成物は、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を含むことができる。こうした治療用途における本発明のペプチド及び類似体の使用を、下に、より詳細に記載する。20

【0079】

所望される場合、本発明のペプチド又は類似体は、組み合わせて投与することができる。例えば、本発明のペプチド又は類似体(本明細書に開示したもの及び表2及び3に示したもの、又は、本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式、又は、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体、を含む)の2以上の組み合わせを、本明細書に開示する通りの治療の方法のために投与することができる。こうした組み合わせは、投与されるペプチド、及び本発明のペプチド又は類似体に対する製剤の適合性に応じて、別の製剤で、又は同じ製剤に組み合わせて、同時に投与することができる。或いは、2以上の本発明のペプチド又は類似体を、連続的に(同じ日に、又は別の日に時差的に、を含めて)投与することができる。30

【0080】

さらに、本発明のペプチド及び類似体は、任意に、ある状態を治療するための薬物又は治療薬と共に投与することができるが当業者に理解される。例えば、糖尿病又は関連する状態を治療する場合、本発明のペプチド又は類似体と共に、他の抗糖尿病薬を投与することができる。こうした共投与は、投与される薬物、及び本発明のペプチド又は類似体に対する製剤の適合性に応じて、別の製剤で、又は同じ製剤に組み合わせて、同時にを行うことができるが理解される。或いは、共投与は、連続的に(同じ日に、又は別の日に時差的に、を含めて)行うことができる。当業者は、別の薬物又は治療薬を伴う本発明のペプチド又は類似体の有効な送達に適した適切な投与レジメンを理解するであろう。ペプチド又は類似体の投与は、断続的であり得ることがさらに理解される。40

【0081】

インスリン又は関連する障害を治療する場合、適切な抗糖尿病薬としては、限定はされないが、インスリン、プラムリンチド、GLP-1受容体作動薬、経口抗糖尿病薬などが挙げられる。抗糖尿病薬の例としては、限定はされないが、インスリン、メグリチニド、例えば、レパグリニド(Prandin(商標))及びナテグリニド(Starlix(商標));スルホニル尿素、例えば、グリピジド(Glucotrol(商標))、グリメピリド(Amaryl(商標))、及びグリブリド(DiaBeta(商標)、Glynase(商標));ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP-4)阻害剤、例えば、50

サクサグリプチン(Onglyza(商標))、シタグリプチン(Januvia(商標))、及びリナグリプチン(Tadjenta(商標));ビグアナイド、例えば、メトホルミン(Fortamet(商標)、Glucophage(商標));チアゾリジンジオン、例えば、ロシグリタゾン(Avandia(商標))及びピオグリタゾン(Actos(商標));-ゲルコシダーゼ阻害剤、例えば、アカルボース(Precose(商標))及びミグリトール(Glyset(商標));アミリンミメティクス、例えばプラムリンチド(Symlin(商標));及びインクレチンミメティクス、例えば、エキセナチド(Byetta(商標))及びリラグルチド(Victoza(商標))が挙げられる。したがって、糖尿病又は関連する状態を治療するための本発明の方法及び使用においては、本発明のペプチド又は類似体と共に、抗糖尿病薬を投与することができる。2型糖尿病については、本発明のペプチド又は類似体などの膵島新生薬を、生活様式の変更による良好なレベルのグルコースコントロールと共に、又は、先に記載した通りのメトホルミン、チアゾリジンジオン、GLP-1、インスリンなどの抗糖尿病剤の組み合わせと共に、患者において利用して、新たに形成された膵島の成熟を可能にすることができる。10

【0082】

1型糖尿病と成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)は、どちらも自己免疫疾患である。したがって、1型糖尿病又はLADAを有する対象の場合、本発明のペプチド又は類似体と共に投与することができる別の治療薬は、例えば、免疫調節性薬剤であり得る。免疫調節薬は、新生膵島又は自己免疫に関係する細胞の破壊を阻止する又は低下させるために使用することができる。免疫調節薬の例としては、限定はされないが、シロリムス(ラパマイシン、Rapamune(商標))、タクロリムス(FK 506、Prograf(商標))、リソフィリン、抗胸腺細胞グロブリン、バシリキシマブ(Simullect(商標))、DiaPep277(商標)などが挙げられる。膵島は、グルコース毒性、脂肪毒性、及び(T1Dについては)免疫攻撃を受けることが知られている。1型糖尿病については、本発明のペプチド又は類似体などの膵島新生薬を、良好な血糖コントロール、及び新たに発生した膵島を免疫攻撃から保護するための免疫調節剤の組み合わせと共に、患者において利用することができる。20

【0083】

本明細書に記載する場合、親INGAP-PP又はHIPペプチドではない表2及び3のペプチド及び類似体を含めた、本発明のペプチド及び類似体は、親INGAP-PP及びHIPペプチドの性質に勝る予想外の性質を示す。本明細書に開示する通り、本発明のペプチド及び類似体は、培地及び血漿中での、親ペプチドの安定性よりも向上した安定性を示す(実施例III及びXI参照)。本発明のペプチド類似体はまた、血糖、空腹時インスリン、及び経口ブドウ糖負荷を有意に向上させるのに有効であった(実施例IV参照)。本発明のペプチド類似体はまた、親ペプチドよりも有意に増大した膵島新生効果を示す(実施例V、実施例VIII、及び実施例IX参照)。さらに、本発明のペプチド類似体は、初期の膵島細胞におけるインスリン分泌を刺激する、有意に増大した能力を示す(実施例VI参照)。さらに、本発明のペプチド類似体は、優れた薬物動態特性を示した(実施例VII及びX参照)。本発明のペプチド及び類似体の多数の予想外の及び優れた性質は、親INGAP-PP又はHIPペプチドではない、本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含めた、本発明のペプチド及び類似体(表2及び3のペプチド及び類似体を含む)、例えば、配列番号:12又は配列番号:31を、治療用途で利用することができることを示唆している。30

【0084】

さらに、本発明のペプチド及び類似体は、追加的な膵島インスリンポジティブ細胞クラスターを誘発することが判明した(実施例VIII参照)。該ペプチド類似体は、親INGAP-PPペプチドの1/10の用量で有効であった。また、膵臓の膵島サイズ分布に反映するものとして、ペプチド類似体の膵島新生効果を決定した(実施例IX参照)。該ペプチド類似体は、親INGAP-PPペプチドの1/100の用量で有効であった。このように、本発明のペプチド及び類似体は、親INGAP-PP又はHIPペプチドよりも大きな効力を示すことができる。新生膵島は、膵管又は腺房細胞に由来し得ることが、当技術分野で知られている(Yatohらの文献、「Diabetes」56:1802-1809(2007);Lipsett及びFinegoodの文献、「Diabetes」51:1834-1841(2002)を参照のこと)。したがって、本発明のペプチド及び類似体を使用して、膵管及び/40

又は腺房細胞から新生臍島を産生することができる。

【0085】

さらなる実施態様では、本発明は、臍機能障害に伴う徵候又は症状を改善するための方法であって、本発明のペプチド又は類似体を投与することを含む前記方法を提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、臍機能障害に伴う徵候又は症状を改善するための方法であって、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を投与することを含む前記方法を提供する。臍機能障害に伴う疾患又は状態としては、限定はされないが、1型糖尿病、2型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)、空腹時血中ブドウ糖不良、耐糖能障害、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、又は空腹時インスリン値の異常、又はこれらの組み合わせが挙げられる。臍臓は、血糖の調節のために、インスリンを産生する。1型及び2型糖尿病及びLADAなどの状態では、体は、グルコース産生に、普通には応答できず、いくつかの関連する状態に至る(「セシル内科学(Cecil Textbook of Medicine)」、Bennett及びPlum編、第20版、W.B.Saunders社、Philadelphia(1996);「ハリソン内科学(Harrison's Principles of Internal Medicine)」、Fauciら編、第14版、McGraw-Hill社、New York(1998)を参照のこと)。臍臓の機能の低下と相関関係があるこうした状態は、臍機能障害の意味に含まれることが当業者に理解される。

【0086】

糖尿病は、慢性的に上昇した濃度の血糖(高血糖)の存在によって定義される重篤な代謝疾患である。高血糖の状態は、ペプチドホルモン、すなわちインスリンの活性の相対的又は絶対的欠如の結果である。インスリンは、臍臓の細胞によって産生及び分泌される。インスリンは、グルコース利用、タンパク質合成、及びグリコーゲンとしての炭水化物エネルギーの形成及び貯蔵を促進する。グルコースは、グリコーゲン、すなわち重合したグルコースの形態として体内に貯蔵され、これは、グルコースに戻って、代謝要求を満たすことができる。正常な条件下では、インスリンは、グルコース刺激後に、基本速度と上昇速度の両方で分泌され、グルコースのグリコーゲンへの変換によって、代謝ホメオスタシスが維持できるようになる。

【0087】

用語「糖尿病」は、数種類の異なる高血糖状態を包含する。これらの状態には、1型(インスリン依存型糖尿病又はIDDM)及び2型(インスリン非依存型糖尿病又はNIDDM)糖尿病が含まれる。1型糖尿病を患う個人に存在する高血糖は、生理的範囲内の血糖濃度を維持するのに不十分である、不足した、低下した、又は存在しないレベルのインスリンと関連している。1型糖尿病の治療は、一般に非経口経路による、補充用量のインスリンの投与を含む。2型糖尿病を患う個人に存在する高血糖は、最初は、正常又は上昇したレベルのインスリンと関連している;しかし、これらの個人は末梢組織及び肝臓におけるインスリン抵抗性の状態が原因で、また、疾患が進行するにつれて、インスリンの分泌を担う臍臓細胞の進行性の衰退が原因で、代謝ホメオスタシスを維持する能力がなくなる。したがって、2型糖尿病の初期療法は、スルホニル尿素などの経口血糖降下薬を用いる治療法によって増強される、食事制限及び生活習慣の変化に基づくことができる。しかし、特に疾患の後期段階では、高血糖のいくらかのコントロールをもたらす、また、疾患の合併症を最小限にするために、インスリン療法がしばしば必要とされる。2型糖尿病では、細胞は、グルコース毒性、脂肪毒性、慢性的な酸化ストレス、及びこれらの組み合わせを受けやすく;1型糖尿病では、細胞は、主として免疫攻撃及びグルコース毒性を受けることが公知である。比較的に安定な血糖及び脂質値は、2型糖尿病患者については、発達して成熟する新生臍島及び機能している臍島にとって、より健康的な環境を提供することができ;1型糖尿病については、追加の免疫調節剤が、新生臍島の発達にとって、所望の生理的環境を提供することができる。

【0088】

本発明は、対象における代謝疾患に伴う徵候又は症状を改善するための方法であって、

10

20

30

40

50

本発明のペプチド又は類似体を対象に投与することを含む前記方法を、さらに提供する。こうした代謝疾患としては、限定はされないが、糖尿病、糖尿病前症、又はメタボリックシンドロームが挙げられる。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、対象における代謝疾患に伴う徴候又は症状を改善するための方法であって、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を投与することを含む前記方法を提供する。

【 0 0 8 9 】

糖尿病前症は、血糖値が正常よりも高いが、2型糖尿病と分類されるのにはまだ十分に高くない状態である。メタボリックシンドロームは、冠状動脈疾患、脳卒中、及び2型糖尿病を共に発症する、及びこれらのリスクを増大させる危険因子の群に対する名前である。メタボリックシンドロームの2つの最も重要な危険因子は、体の胸部及び上腹部の周囲の過剰体重(中心性肥満、いわゆる「リンゴ型」)と、体が正常よりも有効性が低いインスリンを使用するインスリン抵抗性である。インスリンは、体内の糖の量を制御するのを助けるために必要とされる。結果として、血糖及び脂質値が上昇する。メタボリックシンドロームは、対象が、以下の徴候のうちの3つ以上を有する場合に、存在するとみなされる: 130/85mmHg以上の血圧; 100mg/dL以上の空腹時血糖(グルコース); 大きな腹囲(ウエスト周りの長さ)(男性、40インチ以上; 女性、35インチ以上); 低HDLコレステロール(男性、40mg/dL未満; 女性、50mg/dL未満); 150mg/dL以上のトリグリセリド。

【 0 0 9 0 】

当業者は、膵機能障害及び/又は代謝疾患に伴う状態又は疾患に関連する徴候又は症状を改善するにあたる、本発明のペプチド又は類似体の有効性の適切な指標を容易に理解し、かつ、これらを容易に決定することができる。例えば、1型糖尿病と2型糖尿病はどちらも、疾患の進行を診断する及び/又はモニタリングするための、及び/又は治療法の有効性をモニタリングするための、いくつかの公知のパラメータを有する十分に特徴付けられた疾患である。こうしたパラメータとしては、限定はされないが、血漿グルコース濃度、空腹時グルコース濃度、経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)、インスリン値、空腹時インスリン値、グリコヘモグロビン濃度などが挙げられる。

【 0 0 9 1 】

したがって、本発明のペプチド又は類似体を使用して、膵機能障害及び/又は代謝疾患に伴う徴候又は症状のいずれか1つ又はそれ以上を改善することができる。糖尿病の場合、こうした徴候又は症状としては、限定はされないが、耐糖能障害、血糖の上昇(特に200mg/dL超)、空腹時血糖の上昇(特に140mg/dL超)、食後(食事の後の)血糖の上昇、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)の上昇などが挙げられる。こうした徴候又は症状は、当業者に周知であり、医療検査機関を通して利用できる試験を含めて、当業者によって慣行的に決定することができる。本発明の一実施態様では、本発明は、糖尿病などの状態に伴う徴候又は症状を軽減する方法、例えば、本発明のペプチド又は類似体を投与することによって、耐糖能障害、血糖、特に一日平均血糖濃度、空腹時血糖、食後(食事の後の)血糖、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)、アルギニン刺激性C-ペプチド、終末糖化産物(AGE)、又はこれらの組み合わせを軽減する方法を提供する。該方法は、本発明のペプチド又は類似体を利用する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含めて)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、糖尿病などの状態に伴う徴候又は症状を軽減する方法、例えば、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を投与することによって、耐糖能障害、血糖、特に一日平均血糖濃度、空腹時血糖、食後(食事の後の)血糖、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)、アルギニン刺激性C-ペプチド、終末糖化産物(AGE)、又はこれらの組み合わせを軽減する方法を提供する。糖尿病を治療するための薬物の有

10

20

30

40

50

効性をモニタリングする方法は、当業者に周知である(例えば、「セシル内科学(Cecil Textbook of Medicine)」、上記;「ハリソン内科学(Harrison's Principles of Internal Medicine)」、上記;Dunganらの文献、「Diabetes/Metabolism Res.Rev.」25:558-565(2009);米国特許第8,329,648号を参照のこと)。したがって、本発明は、対象に本発明のペプチド又は類似体を投与することによって、糖尿病対象における耐糖能障害、血糖、空腹時血糖、食後血糖、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)、アルギニン刺激性C-ペプチド、終末糖化産物(AGE)、又はこれらの組み合わせを軽減する方法を提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含めて)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を投与することによって、糖尿病対象における耐糖能障害、血糖、空腹時血糖、食後血糖、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)、アルギニン刺激性C-ペプチド、終末糖化産物(AGE)、又はこれらの組み合わせを軽減する方法を提供する。

【 0 0 9 2 】

本明細書に開示する通り、本発明のペプチド及び類似体は、膵島細胞成長及び細胞クラスターの誘導を刺激するのに特に有効であった(実施例V、実施例VIII、及び実施例IXを参照のこと)。本発明のペプチド及び類似体の例は、親ペプチドに対する膵島新生効果の向上を示した(実施例V、実施例VIII、及び実施例IX)。

【 0 0 9 3 】

したがって、本発明は、膵島細胞をインビトロで本発明のペプチド又は類似体と接触させ、それによって膵島細胞の増殖を刺激することによって、膵島細胞成長を刺激するための方法を、さらに提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、膵島細胞をインビトロで配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体と接触させることによって、膵島細胞成長を刺激するための方法を提供する。別の実施態様では、本発明は、膵島細胞の集団を產生する方法であって、1以上の膵島細胞をインビトロで本発明のペプチド又は類似体と接触させ、それによって1以上の膵島細胞の増殖を刺激し、膵島細胞の集団を產生することを含む前記方法を提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、膵島細胞の集団を產生する方法であって、1以上の膵島細胞をインビトロで配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体と接触させることを含む前記方法を提供する。本発明の方法は、本発明のペプチド又は類似体を利用する、移植のための、及び、インビボでの移植された膵島の生存を増大させるための、エクスピボ膵島誘導、拡大、及び増殖のために使用することができる。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を使用して改善する、移植のための、及び、インビボでの移植された膵島の生存を増大させるための、エクスピボ膵島誘導、拡大、及び増殖のための方法を提供する。

【 0 0 9 4 】

本発明の方法は、さらに、本発明のペプチド又は類似体を使用して、単離された膵島細胞を保存するために使用することができる。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を使用して、単離された膵島細胞を保存する方法を提供する。したがって、本発明は、膵島細胞をインビトロで接触させること、膵島

10

20

30

40

50

細胞数を増加させること、及び、任意に該細胞を移植のために使用することによる、本発明のペプチド又は類似体を使用する、移植のためのエクスピボ臍島拡大及び増殖の方法を提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、臍島細胞を配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体と接触させることによって、臍島細胞をインビトロで接触させること、臍島細胞数を増加させること、及び、任意に該細胞を移植のために使用することによる、本発明のペプチド又は類似体を使用する、移植のためのエクスピボ臍島拡大及び増殖の方法を提供する。本発明はまた、対象に、本発明のペプチド又は類似体を投与することによる、インビボでの移植された臍島の生存を増大させる方法を提供する。ここでは、対象は、移植された臍島細胞のレシピエントである。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、対象に、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を投与することによって投与する、インビボでの移植された臍島の生存を増大させる方法を提供する。本発明のペプチド又は類似体を、このように使用して、インビトロ及びエクスピボ方法を使用する、移植のための細胞を作製する、並びに、移植された臍島細胞の生存を増大させることができる。こうした移植された細胞は、本発明のペプチド又は類似体を使用するインビトロ方法から、又は、屍体などの臍島細胞の従来の移植源から得ることができる。本発明の方法は、さらに、本発明のペプチド又は類似体を投与することによって、臍機能の喪失又は障害を患う患者を治療するために使用することができる。こうした臍機能の喪失又は障害は、例えば部分的臍切除(例えば、損傷、炎症、新生物、高インスリン性低血糖などが原因の)によって、又は、囊胞性線維症などの臍機能に影響を与える状態によって起こり得る。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を投与することによって、臍機能の喪失又は障害を患う患者を治療する方法を提供する。

【0095】

特定の実施態様では、1以上の臍島細胞は、対象から得ることができる。臍島細胞の増殖を刺激することによって産生された臍島細胞の集団を、例えば対象への移植及び臍島細胞機能の回復のために使用することができる。したがって、本発明の方法は、臍島細胞の集団を対象に移植するステップをさらに含むことができる。特定の実施態様では、1以上の臍臓細胞は、臍島細胞の集団が移植されることとなる対象から得られる。或いは、移植されることとなる臍島細胞は、適合する血液型を有する適切なドナーから得られる。

【0096】

臍島の移植は、以前に記載されている(例えば、Shapiroらの文献、「N. Engl. J. Med.」343:230-238(2000)を参照のこと)。臍島細胞は、対象から、又はその代わりに適切なドナーから(屍体から採取された臍島細胞を含めて)得ることができる。一般に、移植レシピエントには、臍島細胞の拒絶反応を低下させるための免疫抑制薬が投与される(例えば、本明細書に記載されている免疫抑制薬を参照のこと)。適切な免疫抑制薬の使用は、臓器又は細胞移植の分野において周知である。したがって、臍島細胞がインビトロで増殖して臍島細胞の集団を産生するように刺激される本発明の方法では、こうした集団は、臍島細胞移植の周知の方法を使用して、対象に移植することができる。さらに、本発明のペプチド又は類似体を使用して、臍管細胞の、臍島細胞、特に 細胞への分化を誘発することができる(Yatohらの文献、「Diabetes」56:1802-1809(2007)を参照のこと)。したがって、本発明は、臍管細胞を本発明のペプチド又は類似体と接触させることによって、臍管細胞を臍島細胞に分化させる方法を、さらに提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、臍管細胞を配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体と接触させることによって、

10

20

30

40

50

臍管細胞を臍島細胞に分化させる方法を提供する。該方法が、臍管細胞がインビトロで接觸させる場面で実施される場合、分化した臍管細胞の集団は、本明細書に記載する通りに、產生され、移植のために使用することができる。

【 0 0 9 7 】

本発明は、対象における臍島細胞の数を増加させるための方法であって、本発明のペプチド又は類似体を対象に投与することを含む前記方法を、さらに提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、対象における臍島細胞の数を増加させるための方法であって、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を投与することを含む前記方法を提供する。本発明のペプチド又は類似体を使用する治療的処置のこうした方法を使用して、個人から臍臓細胞を採取するする又は適切なドナーを特定する必要なく、かつ、対象に複雑な移植手順、及び患者から得たのではないドナー細胞を使用する場合にしばしば必要とされる免疫抑制剤の使用を負わせる必要なく、個人における臍島細胞を増加させることができる。

10

【 0 0 9 8 】

以前に記載されている通り、INGAPペプチドは、神経機能を向上させるかつ糖尿病マウスモデルにおける神経再生を増強することが示されている(Tamらの文献、「FASEB J.」18:1767-1769(2004))。INGAPペプチドはまた後根神経節ニューロンにおける神経突起伸長を増強することが示された(Tamらの文献、「Biochem.Biophys.Res.Communic.」291:649-654(2002); Tamらの文献、「NeuroReport」17:189-193(2006))。本明細書に記載する通り、本発明のペプチド及び類似体は、INGAP親ペプチドよりも有意に活性が高く、かつ、INGAPと同等以上のより強力な活性を有することが期待されている。したがって、本発明は、神経細胞を本発明のペプチド又は類似体と接觸させ、それによって神経保護及び/又は神経再生を刺激することによって、神経保護又は神経再生を促進するための方法を提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、神経細胞を配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体と接觸させることによって、神経保護又は神経再生を促進するための方法を提供する。神経細胞と接觸させることは、インビボ又はインビトロで行うことができる。神経細胞がインビボで接觸される場合、本発明のペプチド又は類似体は、本明細書に開示する他の治療方法と同様に、対象に投与される。神経細胞がインビトロで接觸される場合、神経保護された細胞を、エクスピボ適用で使用し、これらの細胞を対象に投与することができる。神経細胞を移植によって導入するこうした方法は、当業者に周知である(例えば、Dunnnettらの文献、「Brit.Med.Bulletin」53:757-776(1997)を参照のこと)。こうした移植は、パーキンソン病及びハンチントン病などの神経学的状態を治療するために実施された。

20

【 0 0 9 9 】

HIPペプチドは、肝臓再生を加速させると記載されている(Lieuらの文献、「Hepatol.」42:618-626(2005))。本明細書に記載する通り、本発明のペプチド及び類似体は、HIP親ペプチドよりも有意に活性が高く、かつHIPと同等以上のより強力な活性を有することが期待されている。したがって、本発明はまた、肝細胞を本発明のペプチド又は類似体と接觸させ、それによって肝臓再生を促進することによって、肝臓再生を促進するための方法を提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、肝細胞を配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体と接觸させることによって、肝臓再生を促進するための方法を提供する。肝細胞と接觸させることは、インビボ又はインビトロで行うことができる。肝細胞がインビボで接觸される場合、本発明のペプチド又は類似体は、本明細書に開示する他の治療方法と同様に、対象に投与される。肝細胞がインビトロで接觸される場合、肝細胞を、増

30

40

50

殖して、例えば肝細胞の集団を産生するように、誘導することができる。肝細胞の集団を、エクスピリオで使用し、これらの細胞を対象に投与することができる。肝細胞を対象の肝臓に移植する又はグラフトするための方法は、当業者に周知である。これらの移植された細胞を使用して、損傷した又は代謝的に欠陥がある肝臓組織を再構築することができる。肝細胞は、門脈又は脾臓に注入することができ、そこから、細胞は肝臓に移動し、永久にとどまり、正常な肝臓代謝機能を果たす(例えば、Khanらの文献、「Cell Transplant.」19:409-418(2010)を参照のこと)。

【0100】

HIPタンパク質(脾炎関連タンパク質(PAP)とも言う)は、インビオ及びインビトロで抗炎症活性を示すことが判明している(Closaらの文献、「World J.Gastroenterol.」13:170-174(2007))。したがって、本発明のペプチド及び類似体は、抗炎症活性を示すことが予想される。したがって、本発明は、本発明のペプチド又は類似体を投与することによって、炎症を抑制するための方法を、さらに提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体を投与することによって、炎症を抑制するための方法を提供する。

【0101】

本発明はまた、対象における、脾機能障害を治療する、代謝疾患を治療する、神経保護又は神経再生を促進する、肝臓再生を促進する、又は炎症を抑制するための医薬品の調製のための本発明のペプチド又は類似体の使用を提供する。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、対象における、脾機能障害を治療する、代謝疾患を治療する、神経保護又は神経再生を促進する、肝臓再生を促進する、又は炎症を抑制するための医薬品の調製のための、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体の使用を提供する。

【0102】

本発明は、対象における、脾機能障害を治療する、代謝疾患を治療する、神経保護又は神経再生を促進する、肝臓再生を促進する、又は炎症を抑制するための医薬品の調製のための本発明のペプチド又は類似体の使用を、さらに提供する。こうした使用は、例えば、本明細書に開示した本発明の方法を実施するためであり得る。こうした本発明のペプチド又は類似体は、例えば、表2又は3のペプチド又は類似体(本明細書に開示した他のペプチド若しくは類似体又は本明細書に開示した式を含む)であり得る。特定の実施態様では、本発明は、対象における、脾機能障害を治療する、代謝疾患を治療する、神経保護又は神経再生を促進する、肝臓再生を促進する、又は炎症を抑制するための医薬品の調製のための、配列番号:12又は配列番号:31のペプチド又は類似体の使用を提供する。

【0103】

本明細書に記載する通り、本発明のペプチド及び類似体は、様々な方法において使用することができる。こうした方法としては、限定はされないが、脾機能障害を治療すること、代謝疾患を治療すること、神経保護又は神経再生を促進すること、肝臓再生を促進すること、又は炎症を抑制することが挙げられる。治療用途のための本発明の多くの適用では、本発明のペプチド又は類似体が投与される。しかし、代替方式が、本発明のペプチドをコードする核酸を含有する適切な遺伝子治療ベクターを対象に投与することによって本発明のペプチドを発現させるための、遺伝子治療を使用することであることが理解される。こうした遺伝子治療方法は、以下に、より詳細に記載するし、また、これらは、当業者に周知である(例えば、Andersonの文献、「Nature」392(Supp.):25-30(1998)を参照のこと)。

【0104】

遺伝子送達ビヒクルとは、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞に運ぶことができる分子をいう。遺伝子送達ビヒクルの例は、様々な真核及び原核生物宿主における発現につ

10

20

30

40

50

いて記載されており、かつ、単純なタンパク質発現のためにだけでなく遺伝子治療のために使用することができる、リポソーム、ミセル、生体適合性のポリマー(天然ポリマー及び合成ポリマーを含む);リポタンパク質;ポリペプチド;多糖;リポ多糖;人工ウイルスエンベロープ;金属粒子;及び細菌、又はウイルス、例えば、バキュロウイルス、アデノウイルス、及びレトロウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌のベクター、及び当技術分野で一般的に使用される他の組み換えビヒクルである。

【0105】

本発明のペプチド又は類似体は、遺伝子送達ビヒクルを使用して、細胞又は組織に送達することができる。本明細書で使用する場合、遺伝子送達、遺伝子導入、伝達などは、導入のために使用される方法にかかわらず、外来性のポリヌクレオチド(導入遺伝子と呼ばれることがある)の宿主細胞への導入を指す用語である。こうした方法としては、様々な周知の技術、例えば、ベクターが仲介する遺伝子導入(例えば、ウイルス感染/トランスフェクション、又は様々な他のタンパク質主体若しくは脂質主体の遺伝子送達複合体による)、並びに「裸の(naked)」ポリヌクレオチドの送達を容易にする技術(電気穿孔、「遺伝子銃」送達、及び、ポリヌクレオチドの導入のために使用される様々な他の技術など)が挙げられる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞中で、安定的に又は一時的に維持されることができる。安定な維持は、一般的に、導入されたポリヌクレオチドが、宿主細胞と適合性のある複製開始点を含有する、又は、宿主細胞のレプリコン、例えば、染色体外レプリコン(例えばプラスミド)又は核若しくはミトコンドリア染色体に組み込むことを必要とする。当技術分野で公知の通り、いくつかのベクターは、遺伝子の哺乳類細胞への導入を仲介する能力があることが公知である。

10

【0106】

ウイルスベクターとは、インビボ、エクスピボ、又はインビトロで宿主細胞に送達されることとなるポリヌクレオチドを含む、組み換えによって產生されたウイルス又はウイルス粒子をいう。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクターなどが挙げられる。セムリキ森林ウイルス(Semliki Forest)ウイルス系ベクター及びシンドビスウイルス系ベクターなどのアルファウイルスベクターも、遺伝子治療及び免疫療法における使用のために開発されている(Schlesinger及びDubenskyの文献「Curr.Opin.Biotechnol.」5:434-439(1999)及びYingらの文献「Nat.Med.」5(7):823-827(1999)を参照のこと)。

20

【0107】

遺伝子導入がレトロウイルスベクターによって仲介される態様では、ベクター構築物とは、レトロウイルスゲノム又はその一部と治療遺伝子とを含むポリヌクレオチドをいう。本明細書で使用する場合、レトロウイルスが仲介する遺伝子導入又はレトロウイルス伝達は、同じ意味を持ち、ウイルスが細胞に入り込むこと、及びそのゲノムを宿主細胞ゲノムに組み込むことのおかげで、遺伝子又は核酸配列が宿主細胞に安定的に伝達されるプロセスを指す。ウイルスは、その感染の通常の機構を介して宿主細胞に入り込むことができる、又は、ウイルスが改変された結果、異なる宿主細胞表面の受容体又はリガンドと結合して、細胞に入り込むことができる。本明細書で使用する場合、レトロウイルスベクターとは、ウイルス又はウイルス様進入機構を通して外来性の核酸を細胞に導入する能力があるウイルス粒子をいう。レトロウイルスは、RNAの形態で、その遺伝情報を有している;しかし、ウイルスがいったん細胞に感染すると、そのRNAは、DNA形態に逆転写されて、感染した細胞のゲノムDNAに組み込まれる。組み込まれたDNA形態は、プロウイルスと呼ばれる。

30

【0108】

遺伝子導入がアデノウイルス(Ad)又はアデノ随伴ウイルス(AAV)などのDNAウイルスベクターによって仲介される態様では、ベクター構築物とは、ウイルスゲノム又はその一部と導入遺伝子とを含むポリヌクレオチドをいう。アデノウイルス(Ad)は、比較的良好く特徴付けられた、50超の血清型を含めた、同種の群のウイルスである(例えばWO 95/27071を参照)。Adは、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。組み換え型のAd由来のベクター、特に、野生型ウイルスの組み換え及び產生の可能性を低下させるものも、構築されてい

40

50

る(例えばWO 95/00655及びWO 95/11984を参照のこと)。野生型AAVは、宿主細胞のゲノムに組み込まれる高い感染力及び特異性を有する(例えば、Hermonat及びMuzyczkaの文献、「Proc.Natl.Acad.Sci.USA」81:6466-6470(1984)及びLebkowskiらの文献、「Mol.Cell.Biol.」8:3988-3996(1988)を参照のこと)。

【0109】

プロモーターとクローニング部位(これにポリヌクレオチドを作動可能に連結することができる)とを含有するベクターは、当技術分野で周知である。こうしたベクターは、RNAをインビトロ又はインビボで転写する能力があり、また、Stratagene社(La Jolla, CA)及びPromega Biotech社(Madison, WI)などの供給業者から市販品として入手できる。こうしたベクターは、発現及び/又はインビトロ転写を最適化するために、クローンの5'及び/又は3'非翻訳部分を除去、付加、又は変更して、余分な適当でない潜在的選択的翻訳開始コドン、又は転写又は翻訳の段階で発現を妨げる又は低下させる可能性のある他の配列を除去することが必要である可能性がある。或いは、コンセンサスなリポソーム結合部位を、開始コドンのすぐ5'側に挿入して、発現を増強することができる。

【0110】

遺伝子送達ビヒクルとしては、DNA/リポソーム複合体、ミセル、及び標的ウイルスタンパク質-DNA複合体も挙げられる。ターゲティング抗体又はそのフラグメントも含むリポソームを、本発明の方法において使用することができる。細胞への送達を増強するために、本発明の核酸又はタンパク質を、細胞表面抗原、例えば膵島細胞上に見られる細胞表面マーカーと結合する抗体又はその結合フラグメントと複合体形成させることができる。

【0111】

さらに別の実施態様では、本発明は、細胞を本発明のペプチド又は類似体をコードする核酸と接触させることによって、本発明のペプチド又は類似体を対象に導入する方法を提供する。細胞を核酸と接触させることは、インビトロで、エクスピボ適用のために、又はインビボで行うことができる。こうした方法は、しばしば、遺伝子治療方法と呼ばれる。細胞が、インビトロで接触される場合、ポリヌクレオチドを発現する細胞を、対象に投与することができる。こうした方法は、治療用途のための、本発明のペプチド又は類似体などの治療用タンパク質又はペプチドの発現を可能にする。こうした治療用途は、限定はされないが、本明細書に開示する通りの、膵機能障害を治療すること、代謝疾患を治療すること、神経保護又は神経再生を促進すること、肝臓再生を促進すること、又は炎症を抑制することを含めて、様々な疾患及び状態を治療するために使用することができる。

【0112】

本発明の種々の実施態様の働きに実質的に影響を与えない改変も、本明細書に提供される本発明の定義内で提供されることが理解される。したがって、次の実施例は、本発明を限定するのではなく、例示することを意図するものである。

【実施例】

【0113】

(実施例I)

(ペプチド及びペプチド類似体の生成)

この実施例は、ペプチド及びペプチド類似体の生成を記載する。

【0114】

この試験で使用するペプチドはすべて、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)化学を使用するペプチド固相合成法によって合成した。簡潔に述べると、あらかじめ計量した量の2-クロロトリチルクロリド樹脂(1.6mmol/g)を、ジクロロメタン(DCM)中で膨潤させた。アミド化されたC末端を有するペプチドについては、2-クロロトリチルクロリド樹脂の代わりにRinkアミド樹脂を使用した。あらかじめ活性化されたFmocアミノ酸を、ヒドロキシベンゾトリアゾール(Sigma Chemical社、St.Louis, MO, USA)のジメチルホルムアミド(DMF)溶液の存在下で、カップリング反応のために使用した。合成全体を通して、過剰なアミノ酸を使用した。鎖伸長反応を実施し、それに続いて、20%ピペリジンのDMF溶液中で、Fmoc脱保護を行った。鎖伸長反応が終了したら、25%ピペリジンのDMF溶液によって、ペプチ

10

20

30

40

50

ドのN末端からFmoc保護基を除去し、それに続いて、DMFで4回洗浄した。アセチル化されたN末端を有するペプチドについては、トリフルオロ酢酸(TFA)切断の前に、20%無水酢酸をDMFに溶解した溶液を、樹脂1gにつき7mLの割合で添加し、30分間反応させ、それに続いて、DMF及びDCMで4回洗浄した。DMF及びDCMでの4回の洗浄後、樹脂を真空中で乾燥させた。続いて、調製されたペプチドを、5% H₂Oを含むTFA中で、標準のTFA切断手順を使用して、樹脂から切断し、それに続いて、複数回のエーテル抽出を行った。すべての合成ペプチドを、液体クロマトグラフを用いて実施される逆相高速液体クロマトグラフィーによって、> 95%まで精製した。ペプチドを、質量分析法によって分析し、同一性及び純度を確認した。

【0115】

10

インビトロ及びエクスピボ試験については、先に調製されたペプチドを、再蒸留水に溶解して、ストック溶液を作製し、インビボ有効性試験では、これを滅菌した通常の生理食塩水で再構成して、所望の濃度にした。最終のペプチド溶液を、0.22 μmメンブレンを通して濾過して滅菌した。

【0116】

ペプチド及び類似体はまた、ペプチド合成の方法を使用してペプチドを製造すること、又は、所望のペプチド又はペプチド類似体をコードする核酸を発現させることを含めて、他の周知の方法を使用して生成することもできる。したがって、類似体が、1以上の非標準アミノ酸を含む場合、化学合成方法によって生成することになる可能性が高い。ペプチドが、標準のアミノ酸を有する1以上の置換のみを含む場合、ペプチドは、周知の発現方法を使用して、発現ベクターから発現させることができる。

20

【0117】

下の実験で使用する特定のペプチドは、表1~3に載せている。

【0118】

(実施例11)

(細胞増殖に対するペプチドの刺激効果)

この実施例は、臍臓細胞成長に対するペプチド及び類似体の効果を記載する。

【0119】

30

細胞増殖を測定するために、プロモデオキシウリジン(BrdU)ELISA分析を実施した。簡潔に述べると、ラット臍管細胞株であるARIP細胞(ATCC(米国培養細胞系統保存機関)、Massachusetts VA USA)を、細胞インキュベータ内で、10%ウシ胎児血清(FBS; HyClone、Thermo Fisher Scientific社; Waltham MA USA)、100 μg/mlストレプトマイシン、及び100 μg/mlペニシリンを含有するF-12K培地(Gibco-BRL社、Gaithersburg, MD, USA)で培養した。ARIP細胞を、96ウェル培養プレートの、50 μlの体積の細胞培養培地中に、8000又は0(プランク対照として)細胞/ウェルで播種し、その後の実験のために、一晩インキュベートした。2日目に、培地を血清を含まない培地と交換した後、一連の濃度(最終濃度は10 μM、5 μM、1 μM、500nM、100nM、50nM、10nM、及び1nMであった)の試験ペプチドを含有する50 μl無血清細胞培養培地を、播種された細胞に添加した。化合物を含まない培地を、陰性対照及びバックグラウンド対照ウェルに添加した。培地を、24時間と48時間の時点で、それぞれ新鮮培地で交換した。69時間の時点で、培地に、BrdU細胞増殖ELISAキット(Roche Applied Science社; Indianapolis IN USA)の10 μlプロモデオキシウリジン(BrdU)標識溶液を(バックグラウンド対照ウェルを除いて)添加し、さらに3時間インキュベートした。72時間の時点で、標識培地を除去し、200 μl/ウェルのFixDenat溶液を添加した。30分のインキュベーション時間後、FixDenat溶液を完全に除去し、100 μl/ウェルの抗BrdU抗体のワーキング溶液を添加し、室温(RT)で90分間インキュベートした。抗体複合体を除去し、ウェルを、250 μl/ウェルの洗浄溶液(1X PBS)で3回すすいだ。洗浄溶液を除去した後、100 μl/ウェルの基質溶液を添加し、RTで15分間インキュベートし、次いで、25 μl/ウェルの1M H₂S₄を添加し、プレートを約1分間、振盪機上でインキュベートして、十分に混合した。停止溶液の添加後5分以内に、En Vision(商標)プレートリーダー(Perkin Elmer社、Boston MA)上で、450nm(リファレンス波長690nm)での吸光度を測定した。

40

50

【0120】

細胞生存率について試験するために、CellTiter-Glo(商標)(CTG)検定(Promega社、Madison WI)を実施した。簡潔に述べると、ARIP細胞(ATCC、cat# CRL-1674)を、細胞インキュベータ内で、10%ウシ胎児血清(FBS;HyClone)、100 μ g/mLストレプトマイシン、及び100 μ g/mLペニシリンを含有するF-12K培地(Gibco-BRL社)で培養した。ARIP細胞を、96ウェル培養プレートの、50 μ Lの体積の細胞培養培地中に、8000及び0(プランク対照として)細胞/ウェルで播種し、その後の実験のために、一晩インキュベートした。2日目に、培地を血清を含まない培地と交換した後、一連の濃度(最終濃度は10 μ M、5 μ M、1 μ M、500nM、100 nM、50nM、10nM、及び1nMであった)の試験ペプチドを含有する50 μ L無血清細胞培養培地を、播種された細胞に添加した。化合物を含まない培地を、陰性対照及びバックグラウンド対照ウェルに添加した。培地を、24時間と48時間の時点で、それぞれ新鮮培地と置き換えた。72時間の時点で、25 μ LのCellTiter-Glo(登録商標)試薬を各ウェルに添加し、オービタルシェーカー上で2分間混合した。室温での10分のインキュベーション後、En Vision(商標)プレートリーダー上で発光シグナルを定量化した。

10

【0121】

図1は、100nMのINGAPスクランブルPP 1(ペプチド3)、INGAP-PP(ペプチド1)、及びペプチド7(表2に示したペプチド)の存在下でのARIP細胞増殖の比較を示す。図1は、100nMのペプチド濃度で細胞数の増加が見られたことを示す。ペプチド7は、陰性対照であるINGAPスクランブルペプチド、及びINGAP-PPペプチドと比較して、有意に高い割合の細胞数の増加を示した。

20

【0122】

(実施例III)

(ペプチド安定性試験)

この実施例は、様々な条件でのペプチドの安定性試験を記載する。

【0123】

培地におけるペプチドの安定性を決定するために、特定量の選択されたペプチドを、正確に計量し、蒸留水に溶解して5mg/mLとし、ストック溶液とした。このストック溶液を、F-12K培地(Gibco-BRL社、Gaithersburg, MD, USA)で0.25mg/mLに希釈し、ワーキング溶液とした。100 μ Lの体積のそれぞれのワーキング溶液を、個々の試料バイアルに移した。これらの試料バイアルを、37 のインキュベータ内で、0、24、48、及び72時間の間、インキュベートし、その後HPLCによって分析及び定量化した。

30

【0124】

図2は、培地中での化合物の安定性を示す。具体的には、図2は、INGAP-PP(ペプチド1)、並びに選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド7及びペプチド8(表2参照)の、培地中での安定性比較を示す。図2に示す通り、ペプチド類似体ペプチド7及びペプチド8は、培地において、INGAP-PPペプチドよりも有意に安定性が高かった。

【0125】

マウス及びヒト血漿中でのペプチドの安定性も試験した。簡潔に述べると、特定量の、ペプチド及びユーカトロピン粉末(陽性対照)を正確に計量した。試験化合物は、50%メタノール水溶液に溶解して20mg/mLに希釈し、ユーカトロピンは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して10mMに希釈し、ストック溶液とした。ユーカトロピンストック溶液を、DMSOで0.2mMに希釈して、ワーキング溶液とした。アセトニトリル中に200ng/mLミダゾラム及びトルブタミドを含有する停止試薬を調製した。300 μ Lの体積の停止溶液を、あらかじめ氷上に置いた96ウェルディープウェルプレートの各ウェルに添加した。

40

【0126】

安定性試験のために、ペプチドとユーカトロピンを、それぞれ、血漿に添加し、十分に混合し、次いで、100 μ Lの各混合物溶液を、あらかじめ冷却した停止試薬に移して、0時点での試料とした。残りの混合物を、100rpmで振盪する37 の水浴中でインキュベートした(n=2)。最終のインキュベーション濃度は、ユーカトロピンについては1 μ M、すべての試験化合物については100 μ g/mLであった。

50

【0127】

所望の時点で、100 μLのインキュベーション混合物を、停止試薬に移して、タンパク質を沈殿させた。試料をボルテックス処理し、RCF 5000 × gで10分間、遠心分離し、上清をテストプレートに移した。試料をLC-MS/MSによって分析した。

【0128】

試験化合物の残量の割合の自然対数と時間とをプロットすることによって、勾配を算出し、次の式に従って、 $T_{1/2}$ を算出した。

【数1】

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{\text{勾配}} \quad 10$$

【0129】

マウス血漿中での安定性については、インキュベーション時間は、ペプチド1及びユーカトロピンについては0、5、15、30、及び60分；ペプチド12、ペプチド16、及びペプチド29については0、15、30、60、120、240、及び480分であった。図3は、マウス血漿中での化合物の安定性を示す。具体的には、図3は、INGAP-PP(ペプチド1)、並びに選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド12、ペプチド16、及びペプチド29(表2参照)の、マウス血漿中での安定性比較を示す。図3に示す通り、ペプチド類似体ペプチド12、ペプチド16、及びペプチド29は、マウス血漿において優れた安定性を示し、INGAP-PP(ペプチド1)よりも安定していた。 20

【0130】

マウス血漿中での別の安定性試験では、インキュベーション時間は、ペプチド2及びユーカトロピンについては0、30、60、及び120分；ペプチド52及びペプチド54については0、30、60、120、240、及び960分であった。図5は、マウス血漿中での化合物の安定性を示す。具体的には、図5は、HIP(ペプチド2)、並びに選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド52及びペプチド54(表3参照)の、マウス血漿中での安定性比較を示す。図5に示す通り、ペプチド類似体ペプチド52及びペプチド54は、マウス血漿において優れた安定性を示し、HIP(ペプチド2)よりも有意に安定性が高かった。 30

【0131】

ヒト血漿中での安定性については、インキュベーション時間は、ペプチド1、ペプチド12、ペプチド16、及びユーカトロピンについて0、30、60、及び120分であった。図4は、ヒト血漿中での化合物の安定性を示す。具体的には、図4は、INGAP-PP(ペプチド1)、並びに選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド12及びペプチド16(表2参照)の、ヒト血漿中での安定性比較を示す。図4に示す通り、ペプチド類似体ペプチド12及びペプチド16は、ヒト血漿において優れた安定性を示し、INGAP-PP(ペプチド1)よりも有意に安定性が高かった。

【0132】

これらの結果は、様々なペプチド類似体が、培地並びにマウス及びヒト血漿を含めた様々な条件下で優れた安定性を示し、かつ、INGAP-PP及びHIPペプチドよりも優れた安定性を示すことを実証する。 40

【0133】

(実施例IV)

(糖尿病マウスモデルにおけるペプチド類似体の有効性)

この実施例は、ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病マウスモデルを使用するインビボ有効性試験を記載する。

【0134】

動物施設における1週間の順化の後、6~8週齢のC57BL/6Jマウスに、40mg/kgの低用量STZ(クエン酸緩衝液中)を、5日間連続で投与し、T1D動物モデルを確立した。最後のSTZ注射 50

の5日後に血糖が16.7mmol/L超であるマウスを、この試験に含めた。次いで、これらのマウスを、5mg/kg(2.5mg/kg、bid(1日2回))又は25mg/kg(12.5mg/kg、bid)の用量のINGAP-PP(ペプチド1)又はペプチド7で、20日間処置し、その後屠殺した。2つの追加の群の糖尿病マウスに、生理食塩水又はペプチド1のアミノ酸のスクランブル配列から構成されるペプチド(ペプチド3)を投与し、対照群とした。血糖及びインスリン値を測定し、試験薬剤の最後の投薬の20日後、6時間絶食した動物に経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を実施して、ペプチド1及びペプチド7の効果を決定した。グルコース決定のためにテールカットにより得られた血液試料を、ACCU-CHEK(商標)グルコメーター(glucometer)(Roche社、ACCU-CHEK(登録商標)Active)を用いて検出し、Rat/Mouse Insulin Elisaキット(Millipore社、Billerica, MA USA)を用いてインスリン値を決定した。OGTTについては、基礎グルコース濃度(T_{-30} 分)の測定後に、マウスは、2g/kgの経口グルコース負荷を受け、グルコメーターによって、0、15、30、60、90、及び120分で、グルコース値を決定した。

【0135】

図6は、STZ誘発糖尿病マウスモデルにおける、INGAP-PP(ペプチド1)、INGAP スクランブルPP 1(ペプチド3)、及びペプチド7の有効性比較を示す。図6Aは、治療の21日目の血糖(BG、mM)を示す。図6Bは、治療の21日目の空腹時インスリン値(ng/ml)を示す。図6Cは、治療の21日目の経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)において測定されたグルコース($T_{0 \sim 120}$ 分)の曲線下面積(AUC)を示す。

【0136】

20日間のペプチド1及びペプチド7(5mg/kg又は25mg/kg)の投与は、体重又は臍臓重量に影響を与えたなかった。ペプチド7を投与されたマウス群と、生理食塩水対照群との間の、血糖値の有意な差が実証された(図6A)。さらに、最も注目すべき結果の一つは、20日の期間の最後の、ペプチド7で処置された動物(25mg/kg用量群)の血漿インスリン値が、生理食塩水対照とは有意に異なっており、未処置群のレベルにほぼ回復していたことであった(図6B)。さらに、ペプチド7で処置された群は、耐糖能の向上も示した(図6C)。

【0137】

これらの結果は、代表的なペプチド類似体、ペプチド7が、糖尿病マウスモデルにおける糖尿病の徴候及び症状を改善するのに有効であったことを実証する。

【0138】

(実施例V)

(小さい 細胞クラスターの誘導に対するペプチドの効果)

この実施例は、正常なC57BL/6Jマウスにおける、小さい 細胞クラスターの誘導に対するペプチドの効果を記載する。

【0139】

C57BL/6J雌マウスを、1週間の順化後、ランダムに4群に分けた。2つの対照群には、10日間、皮下注射によって、10mL/kgの滅菌した通常の生理食塩水(n=4)又はスクランブルペプチド(ペプチド3、25mg/kg)(n=5)を与えた。他の2つの群には、INGAP-PP(ペプチド1)又はINGAP-PP類似体ペプチド7を、同じ期間、それぞれ(n=7/群)、1日あたり25mg/kgの用量で与えた。体重及び6時間空腹時血糖を、処置前と、処置の最終投薬の後に測定した。試験の最後に、血漿及び臍臓のインスリンも測定した。11日目に、各動物から臍臓を取り出し、脂肪とリンパ節を取り除き、計量し、10%中性緩衝ホルマリン(NBF)中で24時間を超えない時間固定し、その後形態学的分析のために処理した。

【0140】

正常なマウスへの10日間のペプチド3、ペプチド1、又はペプチド7の投与は、生理食塩水群と比較して、体重、血糖、血漿インスリン、臍臓インスリン、又は臍臓重量に影響を与えたなかった。免疫組織化学分析を使用して、臍島サイズ分布を決定した。図7は、ペプチド処置の10日目の雌C57BL/6Jマウスにおける臍島サイズ分布を示す。4.9から2.3の範囲の臍島サイズ(Log[μm^2]として表される)については、各群についての差はなかったのに対して、2.1から0.7の範囲の臍島サイズについては、ペプチド7で処置したマウスにおいて数が有意に増加した(未処置/対照群に対してp<0.05又は0.01)(図7)。ペプチド1で処置

10

20

30

40

50

されたマウスにおける増加は、2.1の臍島サイズにおいてのみ観察された(未処置/対照群に対して $p < 0.05$)。

【0141】

これらの結果によって、設計されたINGAP-PP類似体の臍島新生効果の向上が示された。測定されたすべてのパラメータの中には、通常の生理食塩水又はスクランブルペプチドで処置したマウスに対する差は存在しなかったことに留意すべきである。

【0142】

(実施例VI)

(グルコース刺激性インスリン分泌に対するペプチドの効果)

この実施例は、グルコース刺激性インスリン分泌(GSIS)に対するペプチドの効果を記載する。 10

【0143】

臍臓は、大人の雄のSprague-Dawley(SD)ラットから入手した。7日の順化の後、動物を、頸椎脱臼によって屠殺し、臍臓全体を取り出し、コラゲナーゼで消化して臍島を単離した。消化後、臍島を、下の表4にまとめた通り、いずれの化合物も添加せずに(対照)、又は100nMグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1);又は10 μ g/mLペプチド1、ペプチド12、若しくはペプチド16を添加して、多湿雰囲気(5% CO_2 /95% O_2)中で、10%(v/v)ウシ胎児血清と、1%ペニシリン/ストレプトマイシンと、10mMグルコースとを含有するRPMI 1640(Carlsbad CA, USA)pH 7.4中で、37 $^{\circ}\text{C}$ に維持した。

表4. グルコース刺激性インスリン分泌(GSIS)について試験される様々な群についてのパラメータ 20

【表4】

	1	2	3	4	5	6
A	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
B	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
C	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
D	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16
	1.5mM グルコース	12mM グルコース	12mM グルコース; 100nM GLP-1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 1	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 12	12mM グルコース; 10 μ g/ml ペプチド 16

【0144】

培養した臍島を、クレブス-リングル炭酸水素緩衝液(KRB)(pH 7.4)中ですすぎ、 CO_2/O_2 50

(5/95%)の混合物をあらかじめ満たし、0.5%(w/v)BSAと1.5mMグルコースとを含有する1.0mLのKRB中で、37℃で45分間、プレインキュベートした。この期間の後、5臍島の群を、1.5又は12.0mMグルコースを添加し、ペプチドを添加する又は添加せずに、60分間、0.6mL KRB中でインキュベートした。インキュベーション期間の最後に、インスリン定量のために、培地の一定分量を収集した。

【0145】

インスリン定量の結果を、図8に示す。図8は、選択されたペプチド(10 μg/mL)、すなわちペプチド12、ペプチド16、及びペプチド1の共インキュベーションを伴う又は伴わない、臍島のグルコース刺激性インスリン分泌の増大を示す。100nMグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)との共インキュベーションを、陽性対照として含めた。12.0mMのグルコース濃度では、ペプチドGLP-1、ペプチド12、及びペプチド16と共に培養した臍島は、ペプチドを添加せずに培養した臍島よりも有意に多いインスリンを放出した。具体的には、INGAP-PP類似体ペプチド12及びペプチド16は、GLP-1よりも2~3倍高いインスリン分泌の刺激を示した。対照的に、INGAP-PP(ペプチド1)の添加では、刺激は観察されなかった(図8)。

10

【0146】

これらの結果は、INGAP-PP類似体が、臍島細胞からのインスリン分泌を刺激したことを見証する。

【0147】

(実施例VII)

(ラット及びマウスにおけるペプチドの薬物動態特性)

20

この実施例は、ラット及びマウスにおけるペプチドのインビボ薬物動態(PK)特性を記載する。

【0148】

健康状態の良い体重210~250gの雄のSprague-Dawley(SD)ラット、又は体重19~24gの雄のC57BL/6マウスを、7日の順化の後、この試験に使用した。ペプチド1、ペプチド12、及びペプチド16を、滅菌した通常の生理食塩水に溶解し、次いで、これらを、25mg/kgの用量レベルで、皮下(sc)ボーラス又は静脈内(iv)ボーラスによって注射した。各群における3匹の動物を、投与の5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、及び24時間後の時点での血液採取のために使用した。血液試料(約400 μL)を収集し、EDTA-K2を含有する管に入れ、4℃で6分間、8000rpmで遠心分離して、試料から血漿を分離した。得られた血漿を、分析されるまで、-80℃で冷凍保管した。

30

【0149】

ペプチドの血漿濃度を、タンデム質量分析(LC-MS/MS)分析を使用して決定した。WinNonlin(登録商標)Professional 5.2(Pharsight社;St.Louis MO)のノンコンパートメントモデルを使用して、PKパラメータを算出した。選択したPKパラメータを、下の表5に示す。略語AUC_(0-t)は、投薬の時点から最後の観察の時点までの曲線下面積を表し、AUC_(0-∞)は、投薬の時点から無限大までの曲線下面積を表し、C_{max}は、検出された最大濃度を表す。

表5. 処置されたマウス及びラットにおける薬物動態パラメータ

【表5】

40

研究	マウス(SC)			ラット(SC)			ラット(IV)		
	AUC _(0-t) μg/L*時間	AUC _(0-∞) μg/L*時間	C _{max} μg/L	AUC _(0-t) μg/L*時間	AUC _(0-∞) μg/L*時間	C _{max} μg/L	AUC _(0-t) μg/L*時間	AUC _(0-∞) μg/L*時間	C _{max} μg/L
ペプチド1	54.5	58.3	140.9	298.5	305.1	1238.0	21.9	27.1	48.7
ペプチド12	5873.1	5888.2	11600.7	8423.3	8480.0	14024.2	12632.5	12633.8	44312.7
ペプチド16	11350.6	11354.4	14376.4	12127.1	12202.7	18907.7	12191.6	12192.7	45194.9

【0150】

ペプチド類似体、すなわちペプチド12及びペプチド16は、INGAP-PP(ペプチド1)と比較

50

して、マウス及びラットにおける血漿濃度-時間・曲線下面積(AUC)及び最大濃度(Cmax)の有意な増大によって証明される、著しいPK特性の向上を示した。

【0151】

これらの結果は、これらのINGAP-PPペプチド類似体が、INGAP-PPよりも有意に向上した薬物動態特性を示したことを実証する。

【0152】

(実施例VIII)

(追加的な膵島インスリンポジティブ 細胞クラスターの誘導に対するペプチドの効果)

この実施例は、正常なC57BL/6J マウスにおける追加的な膵島インスリンポジティブ 細胞クラスターの誘導に対するペプチドの効果を記載する。

10

【0153】

雌のC57BL/6Jマウスを、1週間の順化後、ランダムに6群に分けた(n=5/群)。対照群には、10日間連続で、皮下注射によって、10mL/kgの滅菌した通常の生理食塩水を与えた。他の5つの群には、INGAP-PP(ペプチド1)、又はINGAP-PP類似体、すなわちペプチド12、ペプチド16、ペプチド29、又はペプチド31を、同じ期間、それぞれ、1日あたり50mg/kg又は5mg/kgの用量で与えた。11日目に、各動物から膵臓を取り出し、脂肪とリンパ節を取り除き、計量し、10%中性緩衝ホルマリン(NBF)中で24時間を超えない時間固定し、その後形態学的分析のために処理した。

【0154】

免疫組織化学分析を使用し、10日間の処置の後に個々の群から採取した膵臓組織の追加的な膵島インスリンポジティブ 細胞クラスター(EIC)の数及び面積を測定することによって、ペプチドの膵島新生活性を評価した。EICは、Lipsett及びFinegood(「Diabetes」5 1:1834-1841(2002))によって以前に記載されている通り、膵島新生の指標である。

20

【0155】

生理食塩水処置群と比較すると、ペプチド処置群では、EICの数及び面積の有意な増大が見られた。図9Aは、10日間の処置の後雌のC57BL/6JマウスにおけるEICの数を示す。図9Bは、10日間の処置の後の雌のC57BL/6JマウスにおけるEICの総面積を示す。図9Cは、INGAP-PPペプチド又はINGAP-PP類似体の投与後の膵臓における代表的な膵管関連のEICを示す。INGAP-PP又はINGAP-PP類似体処置群は、生理食塩水処置群と比較して、EIC数及びEIC面積の有意な増大を示した。特筆すべきは、ペプチド31(5mg/kg)処置群におけるEIC数及び面積が、INGAP-PP(ペプチド1)(50mg/kg)処置群よりも統計的に大きいことである(p<0.05)。

30

【0156】

これらの結果は、10日間の処置の後の正常なマウスにおける膵島新生を刺激することにおけるINGAP-PP及びその類似体の生物活性を実証した。重要なことに、ペプチド12又はペプチド31処置群については、INGAP-PPの10分の1の用量で、同等又は向上した有効性が実現し、INGAP-PP類似体の効力の向上が示唆された。

【0157】

(実施例IX)

(膵島サイズ分布に反映される膵島新生に対するペプチドの効果)

40

この実施例は、正常なC57BL/6J マウスにおける、膵島サイズ分布に反映される、ペプチドの膵島新生効果を記載する。

【0158】

雌のC57BL/6Jマウスを、1週間の順化後、ランダムに4群に分けた(n=6/群)。対照群には、10日間連続で、皮下注射によって、10mL/kgの滅菌した通常の生理食塩水を与えた。他の3つの群には、それぞれ、25mg/kg/日の用量のINGAP-PP(ペプチド1)、又は0.25mg/kg/日の用量のINGAP-PP類似体、すなわちペプチド12又はペプチド31を、同じ期間与えた。この試験では、当技術分野で公知のINGAP-PPの効果的な用量、及びINGAP-PP類似体の薬物動態特性の特徴付けに基づいて、異なる用量のINGAP-PP又はINGAP-PP類似体を使用した。11日目に、各動物から膵臓を取り出し、脂肪とリンパ節を取り除き、10%中性緩衝ホルマリン(

50

NBF) 中で24時間を超えない時間固定し、その後免疫組織化学分析のために処理した。画像分析ソフトウェア(ビデオカメラによって、Image-Pro Plusソフトウェアversion 6.0を搭載したコンピュータと接続されたOlympus DP70顕微鏡)を使用して、染色されたインスリンポジティブのセクションをトレース及び定量し、臍島サイズ分布分析を実施した。

【0159】

生理食塩水処置群と比較して、INGAP-PP又はINGAP-PP類似体で10日間処置したマウスは、図10に示される小さい臍島サイズへの変化を示した。具体的には、ペプチド処置群では、1000 μm^2 よりも小さい臍島サイズについて、約50%の増加が見られるのに対して(ペプチド処置群では臍島集団の60%、それに対して生理食塩水群では40%)、1000から5000 μm^2 までの臍島サイズについては差が見られず、5000 μm^2 を超える臍島サイズについては、約50%の減少が見られる(ペプチド処置群では臍島集団の約10%、それに対して生理食塩水群では20%)。

【0160】

これらの結果は、INGAP-PP及びINGAP-PP類似体が、小さい臍島サイズへの変化を示したことを示す。さらに、試験されたINGAP-PP類似体は、INGAP-PPの1/100の用量で活性を示した。

【0161】

(実施例X)

(SDラットにおけるペプチドの薬物動態特性)

この実施例は、SDラットへの単回皮下(sc)投与後のペプチドのインビボ薬物動態(PK)特性を記載する。

【0162】

健康状態の良い合計15匹の雄のSprague-Dawley(SD)ラット(体重:230から270g)(Sino-British SIPP/BK Lab Animal社、Shanghaiより)を、7日の順化の後、この試験に使用した。すべてのペプチド、すなわちペプチド1、ペプチド12、ペプチド16、ペプチド29、又はペプチド31を、滅菌した通常の生理食塩水に溶解して、それぞれ所望の最終濃度をもたらし、単回皮下(sc)用量で投与した。薬物動態試験に関する詳細な情報を、表6に表す。

表6. 薬物動態(PK)試験に関する群及び投薬情報

【表6】

群番号	性別	動物の数	試験物質	用量レベル(mg/kg)
1	雄	3	ペプチド1	25
2	雄	3	ペプチド12	25
3	雄	3	ペプチド16	25
4	雄	3	ペプチド29	25
5	雄	3	ペプチド31	25

10

20

30

40

【0163】

各群において3匹の動物を、投与の5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、及び24時間後の時点での血液採取のために使用した。血液試料(約400 μL)を収集し、EDTA-K2(エチレンジアミン四酢酸二カリウム)を含有するチューブに入れ、4℃で6分間、8000rpmで遠心分離して、試料から血漿を分離した。得られた血漿を、分析されるまで-80℃で冷凍保管した。

【0164】

ペプチドの血漿濃度を、タンデム質量分析(LC-MS/MS)分析を使用して決定した。WinNonlin(登録商標)Professional 5.2(Pharsight社;St.Louis MO)のノンコンパートメントモジ

50

ュールを使用して、PKパラメータを算出した。選択したPKパラメータを、下の表7に示す。AUC_(0-t)は、投薬の時点から最後の観察の時点までの曲線下面積を表し、AUC_(0-∞)は、投薬の時点から無限大までの曲線下面積を表し、C_{max}は、検出された最大濃度を表す。

表7. 皮下投与後のSprague-Dawleyラットにおける選択された薬物動態パラメータ

【表7】

被験 ペプチド	性別 雄 / 雌	用量 レベル mg/kg	AUC _(0-t)	AUC _(0-∞)	C _{max}
			μg/L*時間	μg/L*時間	μg/L
ペプチド 1	雄	25	294.13±124.80	297.86±122.41	1188.86±609.56
ペプチド 12	雄	25	11063.21±1366.62	11160.28±1211.17	21363.99±1354.43
ペプチド 16	雄	25	11177.17±1884.33	11179.40±1883.66	22055.34±5872.06
ペプチド 29	雄	25	14432.93±1005.09	14435.76±1003.61	16285.43±2522.07
ペプチド 31	雄	25	15562.38±1529.00	15563.32±1528.94	25975.89±3098.76

【0165】

類似体、すなわちペプチド12、ペプチド16、ペプチド29、及びペプチド31は、INGAP-PP(ペプチド1)と比較して、同じ性別かつ同じ用量レベルのSDラットにおけるAUC及びCmaxの有意な増大によって証明される通りの、PK特性の向上を示した。

【0166】

ペプチドの薬物動態(PK)特性をさらに特徴付けるために、投与の30分後の脾臓-標的器官におけるペプチド濃度を決定した。簡潔に述べると、INGAP-PP(ペプチド1)、ペプチド12、又はペプチド31を、滅菌した通常の生理食塩水に溶解し、次いで、雄のSprague-Dawley(SD)ラットに、25mg/kgの用量レベルで、皮下(sc)ボーラスによって投与した。各群において5匹の動物を、投与の30分後の時点での血液及び脾臓採取のために使用した。血液試料(約400 μL)を収集し、EDTA-K2を含有するチューブに入れ、4℃で6分間、8000rpmで遠心分離して、試料から血漿を分離した。血液抽出及び動物屠殺後に、各動物から脾臓を直ちに取り出し、脂肪とリンパ節を取り除き、計量し、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Merck Millipore社、catalogue # 539137)を含む5倍体積の氷冷した滅菌した通常の生理食塩水に入れ、ホモジナイザーで均質化した。

【0167】

直ちにタンデム質量分析(LC-MS/MS)分析を使用して、血漿及び脾臓のホモジネートのペプチド濃度を決定した。結果を表8に示す。

表8. 血漿及び脾臓におけるペプチド濃度

【表8】

試料 種類	ペプチド濃度 (ng/mL)		
	ペプチド 1	ペプチド 12	ペプチド 31
血漿	209.81±107.08	5374.81±980.67	15356.49±3516.52
脾臓	NA	877.22±261.07	1633.48±339.93

NA: 定量下限(LLOQ) 2.5ng/mL未満

【0168】

ペプチド類似体、すなわちペプチド12及びペプチド31は、INGAP-PP(ペプチド1)と比較して、血漿及び脾臓濃度の有意な増大によって証明される、PK特性の向上を示した。

【0169】

これらの結果は、これらのINGAP-PPペプチド類似体が、INGAP-PPと比較して、有意に向上したインビボ薬物動態特性を示すことを実証した。

10

20

30

40

50

【0170】

(実施例XI)

(ペプチド安定性試験)

この実施例は、様々な条件でのペプチドの安定性試験を記載する。

【0171】

培地におけるペプチドの安定性を決定するために、特定量の選択されたペプチドを、正確に計量し、蒸留水に溶解して5mg/mLとし、ストック溶液とした。このストック溶液を、F-12K培地(Gibco-BRL社、Gaithersburg, MD, USA)で0.25mg/mLに希釈し、ワーキング溶液とした。100 μLの体積のそれぞれのワーキング溶液を、個々の試料バイアルに移した。これらの試料バイアルを、37 のインキュベータ内で、0、24、48、及び72時間の間、インキュベートし、その後HPLCによって分析及び定量した。

【0172】

図11は、培地中での化合物の安定性を示す。具体的には、図11は、INGAP-PP(ペプチド1)、並びに選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド12及びペプチド16の、培地中での安定性比較を示す。図11に示す通り、ペプチド類似体ペプチド12及びペプチド16は、培地において、INGAP-PPペプチドよりも有意に安定性が高かった。

【0173】

ラット、マウス及びヒト血漿中でのペプチドの安定性も試験した。簡潔に述べると、特定量の、ペプチド及びユーカトロピン粉末(陽性対照)を正確に計量した。試験化合物は、50%メタノール水溶液に溶解して20mg/mLに希釈し、ユーカトロピンは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して10mMに希釈し、ストック溶液とした。ユーカトロピンストック溶液を、DMSOで0.2mMに希釈して、ワーキング溶液とした。アセトニトリル中に200ng/mLミダゾラム及びトルブタミドを含有する停止試薬を調製した。300 μLの体積の停止溶液を、あらかじめ氷上に置いた96ウェルディープウェルプレートの各ウェルに添加した。

【0174】

安定性試験のために、ペプチドとユーカトロピンを、それぞれ、血漿に添加し、十分に混合し、次いで、100 μLの各混合物溶液を、あらかじめ冷却した停止試薬に移して、0時点での試料とした。残りの混合物を、100rpmで振盪する37 の水浴中でインキュベートした(n=2)。最終のインキュベーション濃度は、ユーカトロピンについては1 μM、すべての試験化合物については100 μg/mLであった。

【0175】

所望の時点で、100 μLのインキュベーション混合物を、停止試薬に移して、タンパク質を沈殿させた。試料をボルテックス処理し、RCF 5000 × gで10分間、遠心分離し、上清をテストプレートに移した。試料をLC-MS/MSによって分析した。

【0176】

試験化合物の残量の割合の自然対数と時間とをプロットすることによって、勾配を算出し、次の式に従って、T_{1/2}を算出した。

【数2】

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{\text{- 勾配}}$$

【0177】

ラット血漿中での安定性については、インキュベーション時間は、ペプチド1及びユーカトロピンについては0、15、30、60、及び120分、ペプチド12、ペプチド16、ペプチド29、及びペプチド31については0、15、30、60、120、及び240分であった。図12は、ラット血漿中での化合物の安定性を示す。具体的には、図12は、INGAP-PP(ペプチド1)、並びに選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド12、ペプチド16、ペプチド29、及びペプチド31の、ラット血漿中での安定性比較を示す。図12に示す通り、ペプチド類似体ペプチド

12、ペプチド16、ペプチド29、及びペプチド31は、ラット血漿において優れた安定性を示し、INGAP-PP(ペプチド1)よりも安定していた。

【0178】

ラット血漿中での別の安定性研究では、インキュベーション時間は、ペプチド2、ペプチド52、ペプチド64、及びユーカトロピンについて、0、30、60、120、及び240分であった。図13は、ラット血漿中の化合物の安定性を示す。具体的には、図13は、HIP(ペプチド2)、並びに選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド52及びペプチド62の、ラット血漿中の安定性比較を示す。図13に示す通り、ペプチド類似体ペプチド52及びペプチド62は、ラット血漿において優れた安定性を示し、HIP(ペプチド2)よりも有意に安定性が高かった。

10

【0179】

マウス血漿中の安定性については、インキュベーション時間は、ペプチド1及びユーカトロピンについては0、15、30、60、及び120分；ペプチド31については0、15、30、60、120、及び240分であった。図14は、マウス血漿中の化合物の安定性を示す。具体的には、図14は、INGAP-PP(ペプチド1)及びペプチド31の、マウス血漿中の安定性比較を示す。図14に示す通り、ペプチド31は、マウス血漿において優れた安定性を示し、INGAP-PP(ペプチド1)よりも安定していた。

【0180】

ヒト血漿中の安定性については、インキュベーション時間は、ペプチド1、ペプチド29、ペプチド31、及びユーカトロピンについて0、15、30、60、120、及び240分であった。図15は、ヒト血漿中の化合物の安定性を示す。具体的には、図15は、INGAP-PP(ペプチド1)、並びに選択されたペプチド類似体、すなわちペプチド29及びペプチド31の、ヒト血漿中の安定性比較を示す。図15に示す通り、ペプチド類似体ペプチド29及びペプチド31は、ヒト血漿において優れた安定性を示し、INGAP-PP(ペプチド1)よりも有意に安定性が高かった。

20

【0181】

緩衝液中のペプチド安定性を、INGAP-PP及び選択された類似体について試験した。10 mg/mLのペプチド1、ペプチド12、ペプチド16、ペプチド29、又はペプチド31を、pHが4.0から8.0の範囲の等張緩衝液に溶解した。ペプチド1、ペプチド16、及びペプチド31が、pHが4.0から6.0の範囲の緩衝液中で、より安定であることが判明したのと同様に、それに対して、ペプチド12及びペプチド29は、pHが6.0から8.0の範囲の緩衝液中で、より安定であった。緩衝液中のペプチド安定性を評価するためのさらなる試験によって、ペプチド16及びペプチド31が、等張の酢酸塩緩衝液(pH 5.0)中で、4 で最大90日、また、25 で7日未満の間、安定であることが判明した。ペプチド12及びペプチド29は、等張のリン酸緩衝液(pH 7.4)中で、4 で90日よりも長い間(90日の試料チェックポイントで分解の徴候がなかった)、また、25 で60日間、安定であった。

30

【0182】

これらの結果は、様々なペプチド類似体が、培地、ラット、マウス、及びヒト血漿を含めた様々な条件下で、優れた安定性を示し、かつ、INGAP-PP及びHIPペプチドよりも優れた安定性を示すことを実証する。

40

【0183】

(実施例XII)

(長時間作用型送達のための徐放性システム)

この実施例は、INGAP-PP及び類似体の臨床適用のための、INGAP-PP及び類似体の徐放性システムを開発するための、様々な生体適合性及び生分解性の材料の使用法を記載する。

【0184】

組成物の最終重量の0.5% w/wから20% w/wの濃度のポリ(エチレングリコール)(PEG)セグメント、組成物の最終重量の5% w/wから15% w/wの濃度の -シクロデキストリン、組成物の最終重量の0.1% w/wから20% w/wの濃度のINGAP-PP及び/又はその類似体、及びリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含有する生体適合性のポリマーを評価した。PEGセグメント、例えば

50

、Pluronic F127、Pluronic F38、Pluronic F68、Pluronic F87、Pluronic F108、Jeffamine ED-2003、及び類似化合物を含有する生体適合性のポリマーを組み込んで、超分子ヒドロゲルシステムを形成することができる。PEG、すなわちPEGセグメントを含有する生体適合性のあるポリマーと、-シクロデキストリンを、単独で、又はあらかじめ混合した形で溶解することができ、INGAP-PP及び/又はその類似体を、PBSに直接分散させることができ、次いで、PEG混合物と混合することができる。次いで、混合溶液を超音波処理して、ヒドロゲルを形成する。図16は、Pluronic F127を含有するヒドロゲルの、代表的なインビトロINGAP-PP(ペプチド1)放出曲線を示す。図17は、Jeffamine ED-2003を含有するヒドロゲルの、代表的なインビトロINGAP-PP(ペプチド1)放出曲線を示す。

【0185】

10

イソ酪酸酢酸スクロース(SAIB)と、INGAP-PP及び/又はその類似体と、溶媒との組成物を含む徐放性システムも評価した。有用な製剤は、組成物の最終重量の45% w/wから85% w/wの濃度のSAIBと、組成物の最終重量の0.1% w/wから20% w/wの濃度のINGAP-PP及び/又はその類似体とを含み、残りは溶媒である。溶媒は、エタノール、アセトン、酢酸エチル、又は、SAIBを溶解することができる任意の他の溶媒から選択することができる。図18は、SABERゲルシステムの代表的なインビトロINGAP-PP(ペプチド1)放出曲線を示す。

【0186】

先に記載した徐放性システムは、INGAP-PP又はその類似体の長時間作用型放出製剤の実現性を実証した。

【0187】

20

本願全体を通して、様々な刊行物を参照として記載してきた。これらの刊行物の開示の全体を、本発明が関連する技術の状況を、より十分に説明するために、参照により本出願に組み込む。本発明を、先に提供した実施例に関して記載してきたが、本発明の趣旨を逸脱せずに、様々な改変を行うことができることを理解するべきである。

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成1)

以下からなる群から選択される配列を含む、ペプチド又はその類似体：

(化1)

IGLHDPSHGTLPGS (配列番号：7); 及び

30

IGLHDPSHGTLPAG (配列番号：73)

。

(構成2)

前記ペプチド又はその類似体が、以下から選択されるペプチド又は類似体を含む、構成1記載のペプチド又は類似体：

(化2)

IGLHDPSHGTLTPAGS (配列番号：7);

IGLHDPSHGTLTPAG (配列番号：73);

IGLHDPSHGTLTPAGSK (配列番号：9);

IGLHDPSHGTLTP(Aib)GS (配列番号：10);

IGLHDPSHGTLTP(N-メチル-L-Ala)GS (配列番号：11);

10

Ac-IGLHDPSHGTLTPAGS (配列番号：12);

(D-Ile)GLHDPSHGTLTPAGS (配列番号：13);

(L-NorVal)GLHDPSHGTLTPAGS (配列番号：14);

(L-NorLeu)GLHDPSHGTLTPAGS (配列番号：15);

IGLHDPSHGTLTPAG-NH2 (配列番号：28);

20

Ac-IGLHDPSHGTLTPAGS-NH2 (配列番号：29);

Ac-IGLHDPSHGTLTPAG-NH2 (配列番号：30);

IGLHDPSHGTLTPAGS-NH2 (配列番号：41);

IGLHDPSHGTLTPAGSC (配列番号：42);

30

Ac-IGLHDPSHGTLTPAGSC (配列番号：43);

IGLHDPSHGTLTPAGSC-NH2 (配列番号：44);

Ac-IGLHDPSHGTLTPAGSC-NH2 (配列番号：45);

IGLHDPSHGTLTPAGC (配列番号：46);

Ac-IGLHDPSHGTLTPAGC (配列番号：47);

40

IGLHDPSHGTLTPAGC-NH2 (配列番号：48); 及び

Ac-IGLHDPSHGTLTPAGC-NH2 (配列番号：49)

。

(構成3)

前記ペプチド又はその類似体が、以下からなる、構成1又は2のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体：

(化3)

50

IGLHDPSHGTLPGS (配列番号：7);

IGLHDPSHGTLPAG (配列番号：73);

IGLHDPSHGTLPGSK (配列番号：9);

IGLHDPSHGTLP(Aib)GS (配列番号：10);

IGLHDPSHGTLP(N-メチル-L-Ala)GS (配列番号：11);

Ac-IGLHDPSHGTLPGS (配列番号：12);

(D-Ile)GLHDPSHGTLPGS (配列番号：13);

(L-NorVal)GLHDPSHGTLPGS (配列番号：14);

(L-NorLeu)GLHDPSHGTLPGS (配列番号：15);

IGLHDPSHGTLPAG-NH2 (配列番号：28);

Ac-IGLHDPSHGTLPGS-NH2 (配列番号：29);

Ac-IGLHDPSHGTLPAG-NH2 (配列番号：30);

IGLHDPSHGTLPGS-NH2 (配列番号：41);

IGLHDPSHGTLPAGSC (配列番号：42);

Ac-IGLHDPSHGTLPAGSC (配列番号：43);

IGLHDPSHGTLPAGSC-NH2 (配列番号：44);

Ac-IGLHDPSHGTLPAGSC-NH2 (配列番号：45);

IGLHDPSHGTLPAGC (配列番号：46);

Ac-IGLHDPSHGTLPAGC (配列番号：47);

IGLHDPSHGTLPAGC-NH2 (配列番号：48); 又は

Ac-IGLHDPSHGTLPAGC-NH2 (配列番号：49)

IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号: 50)

を含む、ペプチド又はその類似体。

(構成 5)

前記ペプチド又はその類似体が、以下から選択されるペプチド又は類似体を含む、構成4記載のペプチド又は類似体：

(化 5)

IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号: 50);

10

IGLHDPTQGTEP(Aib)GE (配列番号: 51);

Ac-IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号: 52);

(D-Ile)GLHDPTQGTEPAGE (配列番号: 53);

Ac-IGLHDPTQGTEPAG-NH2 (配列番号: 60);

Ac-IGLHD PTQGT EPAGE-NH2 (配列番号: 62);

20

IGLHDPTQGTEPAGE-NH2 (配列番号: 68);

IGLHDPTQGTEPAGC (配列番号: 69);

Ac-IGLHDPTQGTEPAGC (配列番号: 70);

IGLHDPTQGTEPAGC-NH2 (配列番号: 71); 及び

30

Ac-IGLHD PTQGT EPAGC-NH2 (配列番号: 72)

。

(構成 6)

前記ペプチド又はその類似体が、以下からなる、構成4又は5のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体：

(化 6)

IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号：50);

IGLHDPTQGTEP(Aib)GE (配列番号：51);

Ac-IGLHDPTQGTEPAGE (配列番号：52);

(D-Ile)GLHDPTQGTEPAGE (配列番号：53);

Ac-IGLHDPTQGTEPAG-NH2 (配列番号：60);

10

Ac-IGLHD PTQGT EPAGE-NH2 (配列番号：62);

IGLHDPTQGTEPAGE-NH2 (配列番号：68);

IGLHDPTQGTEPAGC (配列番号：69);

Ac-IGLHDPTQGTEPAGC (配列番号：70);

IGLHDPTQGTEPAGC-NH2 (配列番号：71); 又は

20

Ac-IGLHDPTQGTEPAGC-NH2 (配列番号：72)

（構成 7）

以下からなる群から選択されるペプチド又は類似体を含む、ペプチド又はその類似体：
（化 7）

Ac-IGLHDPSHGTLPNGS (配列番号：16);

30

(D-Ile)GLHDPSHGTLPNGS (配列番号：17);

Ac-IGLHD PSHGT LPNGS-NH2 (配列番号：31);

IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号：32);

IGLHDPSHGTLPNGSC (配列番号：33);

Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC (配列番号：34);

40

IGLHDPSHGTLPNGSC-NH2 (配列番号：35);

Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC-NH2 (配列番号：36);

IGLHDPSHGTLPNGC (配列番号：37);

Ac-IGLHDPSHGTLPNGC (配列番号：38);

IGLHDPSHGTLPNGC-NH2 (配列番号：39);

Ac-IGLHDPSHGTLPNGC-NH2 (配列番号：40);

10

IGLHDPSHGTLPNG (配列番号：74);

Ac-IGLHDPSHGTLPNG (配列番号：75);

IGLHDPSHGTLPNG-NH2 (配列番号：76);

Ac-IGLHDPSHGTLPNG-NH2 (配列番号：77);

20

H-IGLHDPSHGTLPQGS-OH (配列番号：78);

H-IGLHDPSHGTLPDGS-OH (配列番号：79);

H-IGLHDPSHGTLPEGS-OH (配列番号：80);

H-IGLHEPSHGTLPNGS-OH (配列番号：81);

H-IGLHQPSHGTLPNGS-OH (配列番号：82);

30

H-IGLHNPSHGTLPNGS-OH (配列番号：83);

H-IGLHEPSHGTLPAGS-OH (配列番号：84);

H-IGLHQPSHGTLPAGS-OH (配列番号：85);

H-IGLHNPSHGTLPAGS-OH (配列番号：86);

H-IGLHDPSHGTLPGSC-OH (配列番号：87);

40

H-IGLHDPSHGTLPDGSC-OH (配列番号：88);

H-IGLHDPSHGTLPEGSC-OH (配列番号：89);

H-IGLHEPSHGTLPNGSC-OH (配列番号：90);

H-IGLHQPSHGTLPNGSC-OH (配列番号：91);

H-IGLHNPSHGTLPNGSC-OH (配列番号：92);

H-IGLHDPSHGTLPGQ-OH (配列番号：93);

H-IGLHDPSHGTLPDG-OH (配列番号：94);

10

H-IGLHDPSHGTLPEG-OH (配列番号：95);

H-IGLHEPSHGTLPNG-OH (配列番号：96);

H-IGLHQPSHGTLPNG-OH (配列番号：97);

H-IGLHNPSHGTLPNG-OH (配列番号：98);

20

H-IGLHEPSHGTLPAG-OH (配列番号：99);

H-IGLHQPSHGTLPAG-OH (配列番号：100);

H-IGLHNPSHGTLPAG-OH (配列番号：101);

H-IGLHDPSHGTLPQGE-OH (配列番号：102);

30

H-IGLHDPSHGTLPEGE-OH (配列番号：103);

H-IGLHEPSHGTLPNGE-OH (配列番号：105);

H-IGLHQPSHGTLPNGE-OH (配列番号：106);

H-IGLHNPSHGTLPNGE-OH (配列番号：107);

H-IGLHEPSHGTLPAGE-OH (配列番号：108);

40

H-IGLHQPSHGTLPAGE-OH (配列番号：109); 及び

H-IGLHNPSHGTLPAGE-OH (配列番号：110)

。

(構成8)

前記ペプチド又はその類似体が、以下からなる、構成7記載のペプチド又は類似体：
(化8)

Ac-IGLHDPSHGTLPNGS (配列番号：16);

(D-Ile)GLHDPSHGTLPNGS (配列番号：17);

Ac-IGLHD PSHGT LPNGS-NH2 (配列番号：31);

IGLHDPSHGTLPNGS-NH2 (配列番号：32);

IGLHDPSHGTLPNGSC (配列番号：33);

10

Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC (配列番号：34);

IGLHDPSHGTLPNGSC-NH2 (配列番号：35);

Ac-IGLHDPSHGTLPNGSC-NH2 (配列番号：36);

IGLHDPSHGTLPNGC (配列番号：37);

Ac-IGLHDPSHGTLPNGC (配列番号：38);

20

IGLHDPSHGTLPNGC-NH2 (配列番号：39);

Ac-IGLHDPSHGTLPNGC-NH2 (配列番号：40);

IGLHDPSHGTLPNG (配列番号：74);

Ac-IGLHDPSHGTLPNG (配列番号：75);

30

IGLHDPSHGTLPNG-NH2 (配列番号：76);

Ac-IGLHDPSHGTLPNG-NH2 (配列番号：77);

H-IGLHDPSHGTLQGS-OH (配列番号：78);

H-IGLHDPSHGTLPDGS-OH (配列番号：79);

H-IGLHDPSHGTLPEGS-OH (配列番号：80);

40

H-IGLHEPSHGTLPNGS-OH (配列番号：81);

H-IGLHQPSHGTLPGS-OH (配列番号：82);

H-IGLHNPSHGTLPGS-OH (配列番号：83);

H-IGLHEPSHGTLPGS-OH (配列番号：84);

H-IGLHQPSHGTLPGS-OH (配列番号：85);

H-IGLHNPSHGTLPGS-OH (配列番号：86);

10

H-IGLHDPSHGTLPGSC-OH (配列番号：87);

H-IGLHDPSHGTLPDGSC-OH (配列番号：88);

H-IGLHDPSHGTLPEGSC-OH (配列番号：89);

H-IGLHEPSHGTLPGSC-OH (配列番号：90);

H-IGLHQPSHGTLPGSC-OH (配列番号：91);

20

H-IGLHNPSHGTLPGSC-OH (配列番号：92);

H-IGLHDPSHGTLPG-OH (配列番号：93);

H-IGLHDPSHGTLPDG-OH (配列番号：94);

H-IGLHDPSHGTLPEG-OH (配列番号：95);

30

H-IGLHEPSHGTLPG-OH (配列番号：96);

H-IGLHQPSHGTLPG-OH (配列番号：97);

H-IGLHNPSHGTLPG-OH (配列番号：98);

H-IGLHEPSHGTLPAG-OH (配列番号：99);

H-IGLHQPSHGTLPAG-OH (配列番号：100);

40

H-IGLHNPSHGTLPAG-OH (配列番号：101);

H-IGLHDPSHGTLPG-OH (配列番号：102);

H-IGLHDPSHGTLPDGE-OH (配列番号：103);

H-IGLHDPSHGTLPEGE-OH (配列番号：104);

H-IGLHEPSHGTLPNGE-OH (配列番号：105);

H-IGLHQPSHGTLPNGE-OH (配列番号：106);

H-IGLHNPSHGTLPNGE-OH (配列番号：107);

10

H-IGLHEPSHGTLPAGE-OH (配列番号：108);

H-IGLHQPSHGTLPAGE-OH (配列番号：109); 又は

H-IGLHNPSHGTLPAGE-OH (配列番号：110)

◦
(構成 9)

以下からなる群から選択されるペプチド又は類似体を含む、ペプチド又はその類似体：
(化 9)

20

Ac-IGLHDPTQGTEPNGE (配列番号：54);

(D-Ile)GLHDPTQGTEPNGE (配列番号：55);

Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH2 (配列番号：61);

IGLHDPTQGTEPNGE-NH2 (配列番号：63);

30

IGLHDPTQGTEPNGC (配列番号：64);

Ac-IGLHDPTQGTEPNGC (配列番号：65);

IGLHDPTQGTEPNGC-NH2 (配列番号：66); 及び

Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH2 (配列番号：67)

◦
(構成 10)

前記ペプチド又はその類似体が、以下からなる、構成9記載のペプチド又は類似体：
(化 10)

40

Ac-IGLHDPTQGTEPNGE (配列番号：54);

(D-Ile)GLHDPTQGTEPNGE (配列番号：55);

Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH2 (配列番号：61);

IGLHDPTQGTEPNGE-NH2 (配列番号：63);

IGLHDPTQGTEPNGC (配列番号：64);

10

Ac-IGLHDPTQGTEPNGC (配列番号：65);

IGLHDPTQGTEPNGC-NH2 (配列番号：66); 又は

Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH2 (配列番号：67)

—
(構成 1 1)

以下からなる群から選択される配列を含む、ペプチド又はその類似体：
(化 1 1)

20

IGLHAPSHGTLPNGS (配列番号：6);

IGLHAPSHGTLPAGS (配列番号：8);

IGLHDPSHGTEPNNGS (配列番号：18);

IGLHDPSQGTLPNGS (配列番号：19);

IGLHDPTHGTLPNGS (配列番号：20);

10

IGLHDPSHGTLPNNGE (配列番号：21);

IGLHDPSHGTLPNGK (配列番号：22);

IGLHDPSHGTLPAGK (配列番号：23);

IGLHDPSHGTEPAGS (配列番号：24);

IGLHDPSQGTLPAGS (配列番号：25);

20

IGLHDPTHGTLPAGS (配列番号：26);

IGLHDPSHGTLPAGE (配列番号：27);

IGLHDPTQGTEPNNGS (配列番号：56);

IGLHDPTQGTEPAGS (配列番号：57);

30

IGLHDPTQGTLPNNGE (配列番号：58); 及び

IGLHDPTQGTLPAGE (配列番号：59)

（構成 1 2）

前記ペプチド又はその類似体が、以下から選択されるペプチド又は類似体を含む、構成
11記載のペプチド又は類似体：

（化 1 2）

40

IGLHAPSHGTLPNGS (配列番号 : 6);

IGLHAPSHGTLPAGS (配列番号 : 8);

IGLHDPSHGTEPNNGS (配列番号 : 18);

IGLHDPSQGTLPNNGS (配列番号 : 19);

IGLHDPTHGTLPNNGS (配列番号 : 20);

10

IGLHDPSHGTLPNGE (配列番号 : 21);

IGLHDPSHGTLPNGK (配列番号 : 22);

IGLHDPSHGTLPAGK (配列番号 : 23);

IGLHDPSHGTEPAGS (配列番号 : 24);

IGLHDPSQGTLPAGS (配列番号 : 25);

20

IGLHDPTHGTLPAGS (配列番号 : 26);

IGLHDPSHGTLPAGE (配列番号 : 27);

IGLHDPTQGTEPNNGS (配列番号 : 56);

IGLHDPTQGTEPAGS (配列番号 : 57);

30

IGLHDPTQGTLPNGE (配列番号 : 58); 及び

IGLHDPTQGTLPAGE (配列番号 : 59)

。

(構成 1 3)

前記ペブチド又はその類似体が、以下からなる、構成11又は12のいずれか1項記載のペ
ブチド又はその類似体：

(化 1 3)

IGLHAPSHGTLPNGS (配列番号:6);

IGLHAPSHGTLPAGS (配列番号:8);

IGLHDPSHGTEPNNGS (配列番号:18);

IGLHDPSQGTLPNNGS (配列番号:19);

IGLHDPTHGTLPNNGS (配列番号:20);

10

IGLHDPSHGTLPNNGE (配列番号:21);

IGLHDPSHGTLPNNGK (配列番号:22);

IGLHDPSHGTLPAGK (配列番号:23);

IGLHDPSHGTEPAGS (配列番号:24);

20

IGLHDPSQGTLPAGS (配列番号:25);

IGLHDPTHGTLPAGS (配列番号:26);

IGLHDPSHGTLPAGE (配列番号:27);

IGLHDPTQGTEPNNGS (配列番号:56);

IGLHDPTQGTEPAGS (配列番号:57);

30

IGLHDPTQGTLPNNGE (配列番号:58); 又は

IGLHDPTQGTLPAGE (配列番号:59)

。

(構成14)

前記ペプチド又はその類似体が、修飾を含む、構成1、2、4、5、7、9、11、又は12のいずれか1項記載のペプチド又は類似体。

(構成15)

前記修飾が、N末端のアセチル化、C末端のアミド化、Dアミノ酸、修飾されたアミノ酸、脂肪酸修飾、エステル化、又はこれらの組み合わせから選択される、構成14記載のペプチド又は類似体。

(構成16)

前記ペプチド又はその類似体が、20アミノ酸以下の長さを有する、構成1、2、4、5、7、9、11、又は12のいずれか1項記載のペプチド又は類似体。

(構成17)

構成1～16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体を含む、組成物。

(構成18)

医薬として許容し得る担体をさらに含む、構成17記載の組成物。

40

50

(構成 19)

臍機能障害を治療する、代謝疾患を治療する、神経保護若しくは神経再生を促進する、肝臓再生を促進する、又は炎症を抑制するための、構成17又は18記載の組成物。

(構成 20)

臍機能障害に伴う徵候又は症状を改善するための方法であって、構成1～16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体を投与することを含む、前記方法。

(構成 21)

前記臍機能障害が、1型糖尿病、2型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)、空腹時血中ブドウ糖不良、耐糖能障害、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、又は空腹時インスリン値の異常、又はこれらの組み合わせである、構成20記載の方法。

10

(構成 22)

抗糖尿病薬が投与される、構成20又は21記載の方法。

(構成 23)

臍島細胞成長を刺激する方法であって、臍島細胞を、構成1～16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体と接触させ、それによって臍島細胞の増殖が刺激されることを含む、前記方法。

(構成 24)

臍島細胞の集団を產生する方法であって、1以上の臍島細胞を、構成1～16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体とインビトロで接触させ、それによって1以上の臍島細胞の増殖が刺激されて臍島細胞の集団が產生されることを含む、前記方法。

20

(構成 25)

前記1以上の臍島細胞が、対象から得られる、構成24記載の方法。

(構成 26)

前記臍島細胞の集団を対象に移植するステップをさらに含む、構成24又は25記載の方法。

(構成 27)

前記1以上の臍臓細胞が、臍島細胞の集団が移植されることとなる対象から得られる、構成26記載の方法。

(構成 28)

30

対象における臍島細胞の数を増加させるための方法であって、構成1～16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体を投与することを含む、前記方法。

(構成 29)

対象における代謝疾患に伴う徵候又は症状を改善するための方法であって、構成1～16のいずれか1項記載のペプチドを投与することを含む、前記方法。

(構成 30)

前記代謝疾患が、糖尿病、糖尿病前症、又はメタボリックシンドロームである、構成29記載の方法。

(構成 31)

糖尿病対象に構成1～16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体を投与することにより、該対象における耐糖能障害、血糖、空腹時血糖、食後血糖、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)、アルギニン刺激性C-ペプチド(AUC)、又はこれらの組み合わせを軽減する方法。

40

(構成 32)

神経保護又は神経再生を促進するための方法であって、神経細胞を、構成1～16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体と接触させることを含む、前記方法。

(構成 33)

肝臓再生を促進するための方法であって、肝細胞を、構成1～16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体と接触させることを含む、前記方法。

(構成 34)

50

前記接触させることが、インビトロで行われる、構成32又は33記載の方法。

(構成35)

前記接触させることが、インビオで行われる、構成32又は33記載の方法。

(構成36)

炎症を抑制するための方法であって、構成1~16のいずれか1項記載のペプチド又は類似体を投与することを含む、前記方法。

(構成37)

以下からなる群から選択される配列を含む、ペプチド又はその類似体：

(化14)

Ac-IGLHDPSHGTL PAGS (配列番号:12); 及び

10

Ac-IGLHDPSHGTL PNGS-NH2 (配列番号:31)

。

(構成38)

前記ペプチド又はその類似体が、以下からなる、構成37記載のペプチド又はその類似体

:

(化15)

Ac-IGLHDPSHGTL PAGS (配列番号:12); 又は

20

Ac-IGLHDPSHGTL PNGS-NH2 (配列番号:31)

。

(構成39)

前記ペプチド又はその類似体が、修飾を含む、構成37記載のペプチド又は類似体。

(構成40)

構成37~39のいずれか1項記載のペプチド又は類似体と、医薬として許容し得る担体とを含む、医薬組成物。

(構成41)

膵機能障害を患うヒト患者を治療するための医薬品の製造のための、構成1~16又は37~39のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体の使用。

30

(構成42)

前記膵機能障害を患うヒト患者が、1型糖尿病、2型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病(LADA)、空腹時血中ブドウ糖不良、耐糖能障害、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される疾患又は状態を有する、構成41記載のペプチド又は類似体の使用。

(構成43)

膵島細胞成長を刺激するための医薬品の製造のための、構成1~16又は37~39のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体の使用。

(構成44)

膵島細胞の集団を産生するための医薬品の製造のための、構成1~16又は37~39のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体の使用。

40

(構成45)

ヒトにおける膵島細胞の数を増加させるための医薬品の製造のための、構成1~16又は37~39のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体の使用。

(構成46)

代謝疾患を患うヒト患者を治療するための医薬品の製造のための、構成1~16又は37~39のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体の使用。

(構成47)

前記代謝疾患が、糖尿病、糖尿病前症、又はメタボリックシンドロームである、構成46

50

記載のペプチド又は類似体の使用。(構成 48)

糖尿病対象における状態であって、耐糖能障害、血糖の上昇、空腹時血糖の上昇、食後血糖の上昇、インスリン欠乏、空腹時高インスリン血症、インスリン抵抗性、空腹時インスリン値の異常、グリコヘモグロビン(HbA1c)、アルギニン刺激性C-ペプチド(AUC)、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される前記状態を治療するための医薬品の製造のための、構成1～16又は37～39のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体の使用。

(構成 49)

神経保護を促進する、神経再生を促進する、肝臓再生を促進する、又は炎症を抑制するための医薬品の製造のための、構成1～16又は37～39のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体の使用。

10

(構成 50)

部分的臍切開を伴うヒト患者を治療するための医薬品の製造のための、構成1～16又は37～39のいずれか1項記載のペプチド又はその類似体の使用。

【図1】

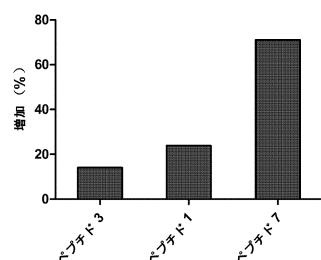


図1

【図3】

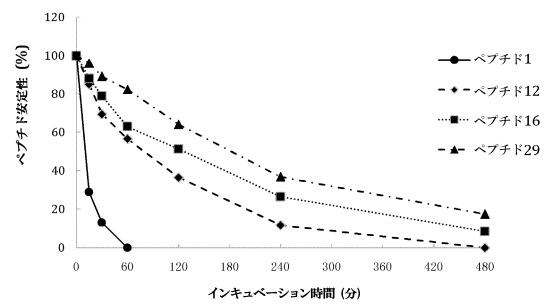


図3

【図2】

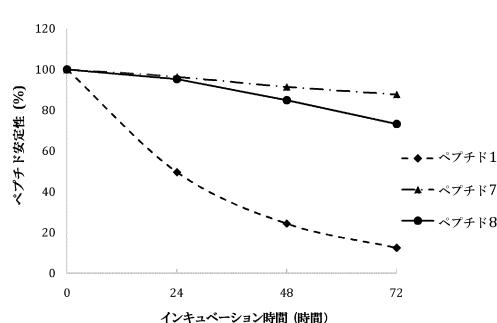


図2

【図4】

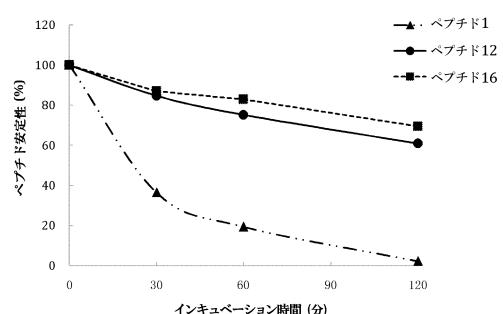


図4

【図5】

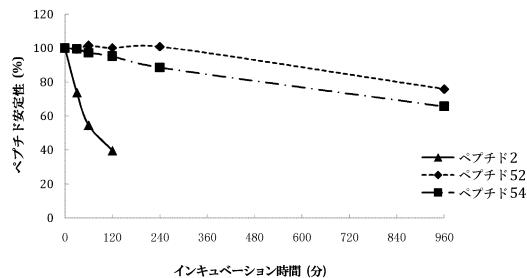


図5

【図6B】

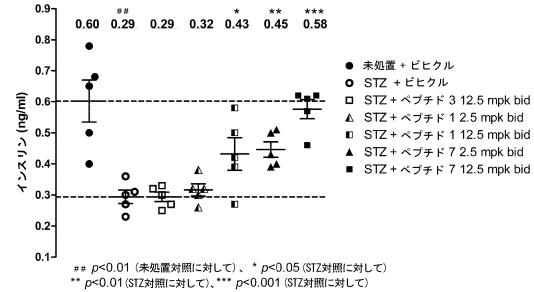


図6B

【図6A】

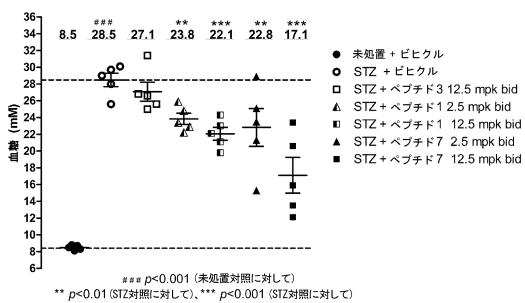


図6A

【図6C】

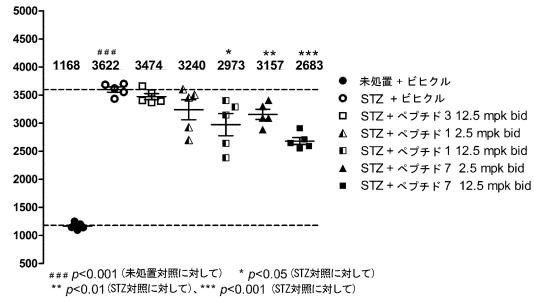


図6C

【図7】

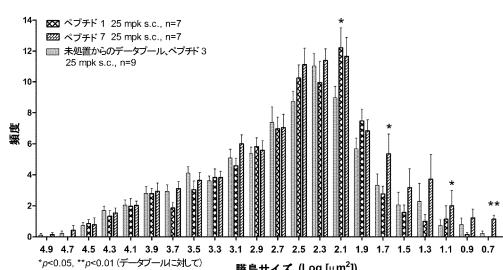


図7

【図8】

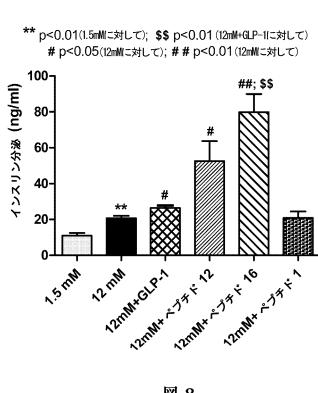


図8

【図9A】

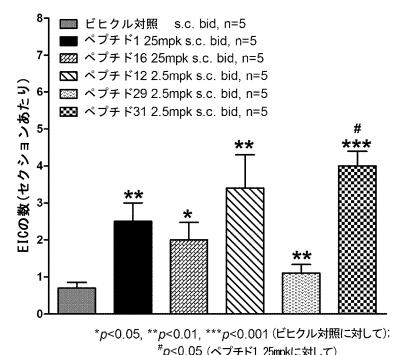


図9A

【図9B】

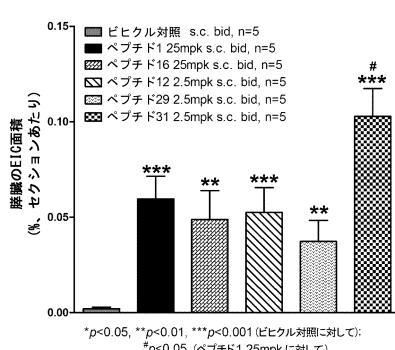


図9B

【図 9 C】

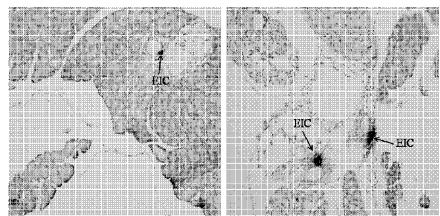


FIGURE 9C

【図 10】

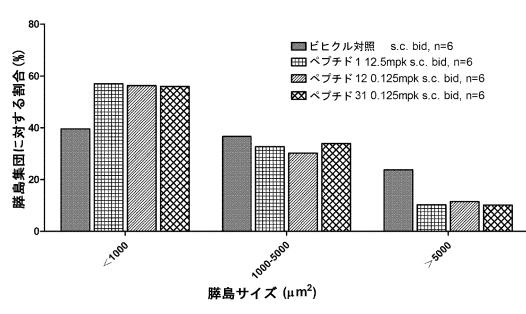


図 10

【図 11】

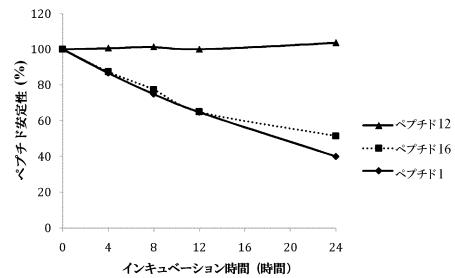


図 11

【図 12】

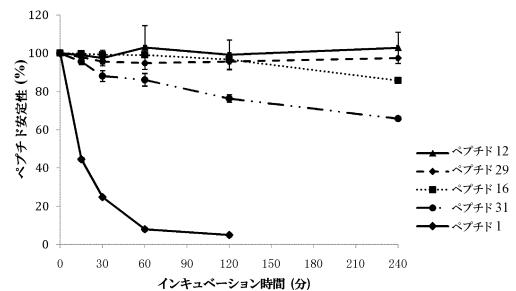


図 12

【図 13】

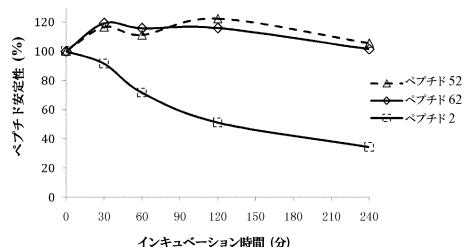


図 13

【図 15】

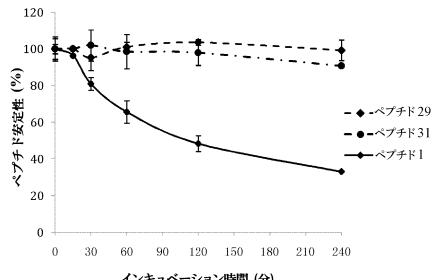


図 15

【図 14】

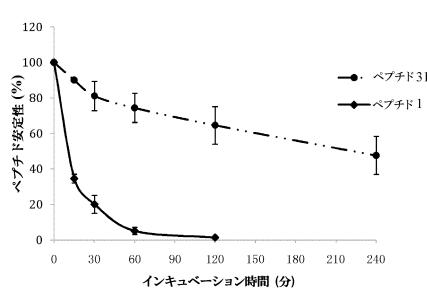


図 14

【図 16】

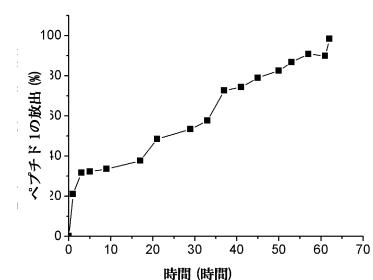


図 16

【図17】

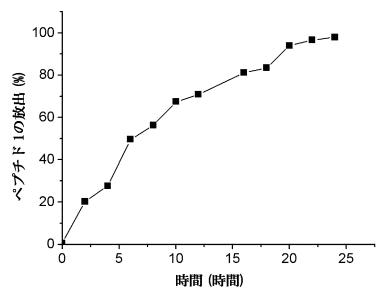


図17

【図18】

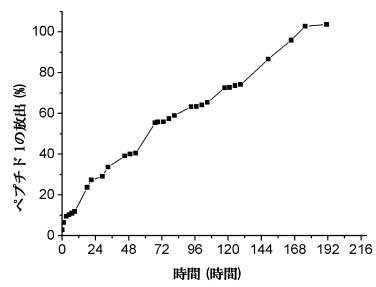


図18

【配列表】

0006674258000001.app

フロントページの続き

(51)Int.CI.

F I

A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02

Z N A

(72)発明者 ル バイ

中華人民共和国 グアングドング 518057 スヘンズヘン ナンシャン ノ.19 ガオキン
シ.1スト アベニュー スイート エ-232

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第2003/033808 (WO, A1)

国際公開第2008/064306 (WO, A1)

国際公開第2008/118948 (WO, A1)

国際公開第2009/049222 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C 0 7 K 7 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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