

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-519212  
(P2009-519212A)

(43) 公表日 平成21年5月14日(2009.5.14)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A 61 K 37/02	4 C 076
<b>A61K 47/48</b> (2006.01)	A 61 K 47/48	4 C 084
<b>A61P 43/00</b> (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1
<b>A61P 3/10</b> (2006.01)	A 61 P 3/10	4 H 045
<b>C07K 16/28</b> (2006.01)	C 07 K 16/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願2008-537892 (P2008-537892)	(71) 出願人	594197872 イーライ リリー アンド カンパニー
(86) (22) 出願日	平成18年10月24日 (2006.10.24)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462 85 インディアナポリス リリー コー
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月25日 (2008.4.25)		ポレイト センター (番地なし)
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/041550	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恒生
(87) 國際公開番号	W02007/050651	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 瞳
(87) 國際公開日	平成19年5月3日 (2007.5.3)	(74) 代理人	100076521 弁理士 坪井 有四郎
(31) 優先権主張番号	60/730,291	(74) 代理人	100138900 弁理士 新田 昌宏
(32) 優先日	平成17年10月26日 (2005.10.26)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/740,342		
(32) 優先日	平成17年11月29日 (2005.11.29)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/743,364		
(32) 優先日	平成18年2月28日 (2006.2.28)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】選択的V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト

## (57) 【要約】

本発明はV P A C 2受容体を選択的に活性化し、糖尿病の治療に有用であるペプチドを包含する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストであって、  
配列番号17：HSDAVFTEQY(OMe)TRA<sub>i</sub>bRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY(OMe)LQSIKA<sub>i</sub>bOrn、  
配列番号18：HSDAVFTEK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)Y(OMe)TOrnLR<sub>i</sub>bQVAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>OrnY<sub>i</sub>LQSIOrnK(W)Orn、  
配列番号19：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnK(W)Orn、  
配列番号20：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAAA<sub>i</sub>bK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)YLQSIOrnOrn、  
配列番号21：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAAK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)OrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号22：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVCAAi<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号23：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRCQVAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号24：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号25：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>A<sub>i</sub>bQSIOrnOrn、  
配列番号26：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQA<sub>i</sub>bIOrnOrn、  
配列番号27：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQA<sub>i</sub>bIOrnOrn、  
配列番号28：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQA<sub>i</sub>bIOrnOrn、  
配列番号29：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>A<sub>i</sub>bQA<sub>i</sub>bIOrnOrn、  
配列番号30：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>A<sub>i</sub>bQSIOrnOrn、  
配列番号31：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号32：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>A<sub>i</sub>bQA<sub>i</sub>bIOrnOrn、  
配列番号33：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>A<sub>i</sub>bQSIOrnOrn、  
配列番号34：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(W)QVAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号35：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LK(W)SIOrnOrn、  
配列番号36：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQK(W)AAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号37：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)QVAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号38：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAAA<sub>i</sub>bK(W)YLQSIOrnOrn、  
配列番号39：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQVAAA<sub>i</sub>bCY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、  
配列番号40：HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRA<sub>i</sub>bQLAAA<sub>i</sub>bOrnY<sub>i</sub>LQSIOrnOrn、

bOrnYLQAibIORnOrn、  
配列番号41: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibO  
rnYLQSK(W)OrnOrn、  
配列番号42: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnYLQAibIORnCOrn、  
配列番号43: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnYLQAibCOrnOrn、  
配列番号44: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQCAAbuAi  
bOrnYLQAibIORnOrn、  
配列番号45: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRCQLAAbuAi bO  
rnYLQAIbIORnOrn、  
配列番号94: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVK(CO(CC  
H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)AAibOrnYLQSIOrnOrn、  
配列番号95: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnYLQSIOrnCOrn、  
配列番号96: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnYLQSCOrnOrn、  
配列番号97: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnYLQAibIORnK(CO(CC<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)Orn、  
配列番号98: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnYLQSIOrnK(CO(CC<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)Orn、  
配列番号99: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(W)QLAAbuAi  
bOrnYLQAibIORnOrn、  
配列番号100: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAAib  
OrnYLQSIOrnOrnC、  
配列番号101: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAib  
OrnYLQSIOrnOrnC、  
配列番号102: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnYLQSIOrnOrnC、  
配列番号103: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnY(OMe)LQAibIORnOrn、  
配列番号104: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnY(OMe)LQAibIORnCOrn、  
配列番号105: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQCAAbuAi  
bOrnY(OMe)LQAibIORnOrn、  
配列番号106: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnYLQAibIORnOrnC、  
配列番号107: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnY(OMe)LQSIOrnOrn、  
配列番号108: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQCAAbuAi  
bOrnY(OMe)LQSIOrnOrn、  
配列番号109: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAi  
bOrnY(OMe)LQSIOrnCOrn、  
配列番号110: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLABuAA  
bOrnYLQSIOrnOrn、  
配列番号111: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(CO(CC  
H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)AAbuAi bOrnYLQAIbIORnOrn、及び  
配列番号112: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(W)AA  
buAi bOrnYLQAIbIORnOrn、  
から選択される1つの配列と、C末端延長部分とを含んでなり、

当該 C 末端延長部分の N 末端が上記ペプチド配列の C 末端と結合し、当該 C 末端延長部分が

式 3 (配列番号 3) :

X a a<sub>1</sub> - X a a<sub>2</sub> - X a a<sub>3</sub> - X a a<sub>4</sub> - X a a<sub>5</sub> - X a a<sub>6</sub> - X a a<sub>7</sub> - X a a<sub>8</sub> - X a a<sub>9</sub> - X a a<sub>10</sub> - X a a<sub>11</sub> - X a a<sub>12</sub>

で表されるアミノ酸配列

(式中、

X a a<sub>1</sub> が G l y 、 C y s 又は存在せず、

X a a<sub>2</sub> が G l y 、 A r g 又は存在せず、

X a a<sub>3</sub> が P r o 、 T h r 又は存在せず、

X a a<sub>4</sub> が S e r 又は存在せず、

X a a<sub>5</sub> が S e r 又は存在せず、

X a a<sub>6</sub> が G l y 又は存在せず、

X a a<sub>7</sub> が A l a 又は存在せず、

X a a<sub>8</sub> が P r o 又は存在せず、

X a a<sub>9</sub> が P r o 又は存在せず、

X a a<sub>10</sub> が P r o 又は存在せず、

X a a<sub>11</sub> が S e r 、 C y s 又は存在せず、及び

X a a<sub>12</sub> が C y s 又は存在せず、

C 末端延長部分の X a a<sub>1</sub> から X a a<sub>12</sub> の少なくとも 5 つが存在し、

X a a<sub>1</sub> 、 X a a<sub>2</sub> 、 X a a<sub>3</sub> 、 X a a<sub>4</sub> 、 X a a<sub>5</sub> 、 X a a<sub>6</sub> 、 X a a<sub>7</sub> 、 X a a<sub>8</sub> 、 X a a<sub>9</sub> 、 X a a<sub>10</sub> 又は X a a<sub>11</sub> が不在である場合、その下流にある次のアミノ酸は C 末端延長部分の次のアミノ酸であり、

C 末端のアミノ酸はアミド化されてもよい)

を含んでなり、

当該ペプチドアゴニストは P E G 分子と共有結合する少なくとも 1 つの C y s 残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストは P E G 分子と共有結合する少なくとも 1 つの L y s 残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストは P E G 分子と共有結合する少なくとも 1 つの K ( W ) を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストは P E G 分子と共有結合する少なくとも 1 つの K ( C O ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> S H ) を含んでなるか若しくは

当該ペプチドアゴニストのカルボキシ末端アミノ酸が P E G 分子と共有結合するか、

又はそれらの組み合わせである、

前記 P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項 2】

前記 C 末端延長部分が以下から選択される、請求項 1 記載の P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニスト。

【表 1】

配列番号 5	G G P S S G A P P P S
配列番号 6	G G P S S G A P P P S - N H <sub>2</sub>
配列番号 7	G G P S S G A P P P C
配列番号 8	G G P S S G A P P P C - N H <sub>2</sub>
配列番号 9	G R P S S G A P P P S
配列番号 10	G R P S S G A P P P S - N H <sub>2</sub>
配列番号 11	G G P S S G A P P P C C
配列番号 12	G G P S S G A P P P C C - N H <sub>2</sub>

【請求項 3】

10

20

20

30

40

50

前記 C 末端延長部分が配列番号 1 1 又は配列番号 1 2 で表される、請求項 2 記載の P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項 4】

少なくとも 1 分子の P E G が前記 C 末端延長部分の残基に共有結合している、請求項 1 記載の P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項 5】

前記 P E G が分岐状の分子である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載の P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項 6】

前記 P E G が直鎖状の分子である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載の P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項 7】

各 P E G 分子が 2 0 , 0 0 0 、 3 0 , 0 0 0 、 4 0 , 0 0 0 又は 6 0 , 0 0 0 D a の分子量である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載の P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項 8】

前記ペプチドアゴニストの N 末端に更に N 末端修飾を有してなる、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項記載の P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストであって、当該 N 末端修飾が以下から選択される、V P A C 2 受容体ペプチドアゴニスト：

( a ) D - ヒスチジン、イソロイシン、メチオニン又はノルロイシンの付加、

( b ) S e r - T r p - C y s - G l u - P r o - G l y - T r p - C y s - A r g (配列番号 9 3 ) の配列を含んでなるペプチドの付加 ( 式中、 A r g がペプチドアゴニストの N 末端と結合する ) 、

( c ) 独立にアリール、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルコキシ、 - N H <sub>2</sub> 、 - O H 、ハロゲン及び - C F <sub>3</sub> 基から選択される 1 つ以上の置換基で任意に置換されてもよい C <sub>1</sub> - C <sub>16</sub> アルキルの付加、

( d ) - C ( O ) R <sup>1</sup> の添加 ( 式中、 R <sup>1</sup> は、 C <sub>1</sub> - C <sub>16</sub> アルキル ( アリール、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルコキシ、 - N H <sub>2</sub> 、 - O H 、ハロゲン - S H 及び - C F <sub>3</sub> から独立に選択される 1 つ以上の置換基で任意に置換されてもよい ) であるか、アリール ( C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルキル、 C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> アルケニル、 C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> アルキニル、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルコキニル、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルコキシ、 - N H <sub>2</sub> 、 - O H 、ハロゲン及び - C F <sub>3</sub> から独立に選択される 1 つ以上の置換基で任意に置換されてもよい ) であるか、アリール C <sub>1</sub> - C <sub>4</sub> アルキル ( C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルキル、 C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> アルケニル、 C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> アルキニル、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルコキシ、 - N H <sub>2</sub> 、 - O H 、ハロゲン及び - C F <sub>3</sub> から独立に選択される 1 つ以上の置換基で任意に置換されてもよい ) であるか、 - N R <sup>2</sup> R <sup>3</sup> ( 式中、 R <sup>2</sup> 及び R <sup>3</sup> は独立に水素、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルキル、アリール又はアリール C <sub>1</sub> - C <sub>4</sub> アルキルである ) であるか、 - O R <sup>4</sup> ( R <sup>4</sup> は C <sub>1</sub> - C <sub>16</sub> アルキル ( アリール、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルコキシ、 - N H <sub>2</sub> 、 - O H 、ハロゲン及び - C F <sub>3</sub> から独立に選択される 1 つ以上の置換基で任意に置換されてもよい ) 、アリール ( C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルキル、 C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> アルケニル、 C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> アルキニル、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルコキシ、 - N H <sub>2</sub> 、 - O H 、ハロゲン及び - C F <sub>3</sub> から独立に選択される 1 つ以上の置換基で任意に置換されてもよい ) 、又はアリール C <sub>1</sub> - C <sub>4</sub> アルキル ( C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルキル、 C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> アルケニル、 C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> アルキニル、 C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルコキシ、 - N H <sub>2</sub> 、 - O H 、ハロゲン及び - C F <sub>3</sub> から独立に選択される 1 つ以上の置換基で任意に置換されてもよい ) であるか、又は 5 - ピロリジン - 2 - オンである ) 、

( e ) - S O <sub>2</sub> R <sup>5</sup> の付加 ( 式中、 R <sup>5</sup> はアリール、アリール C <sub>1</sub> - C <sub>4</sub> アルキル又は C <sub>1</sub> - C <sub>16</sub> アルキルである ) 、

( f ) C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルキル又は - S R <sup>6</sup> で任意に置換されてもよいスクシンイミド基の形成 ( 式中、 R <sup>6</sup> は水素又は C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> アルキルである ) 、

( g ) メチオニンスルホキシドの付加、

( h ) ピオチニル - 6 - アミノヘキサン酸 ( 6 - アミノカプロン酸 ) の付加及び

( i ) - C ( = N H ) - N H <sub>2</sub> の付加。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9】

前記 N 末端修飾がアセチル、プロピオニル、ブチリル、ペントノイル、ヘキサノイル、メチオニン、メチオニンスルホキシド、3 - フェニルプロピオニル、フェニルアセチル、ベンゾイル、ノルロイシン、D - ヒスチジン、イソロイシン、3 - メルカプトプロピオニル、ビオチニル - 6 - アミノヘキサン酸 ( 6 - アミノカプロン酸 ) 及び - C ( = N H ) - NH<sub>2</sub> から選択される基の付加である、請求項 8 記載の PEG 化 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニスト。

## 【請求項 10】

前記 N 末端修飾がアセチル又はヘキサノイルの付加である、請求項 9 記載の PEG 化 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニスト。

10

## 【請求項 11】

以下から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 記載の PEG 化 V PAC 2 ペプチド受容体アゴニスト。

## 【表 2】

アゴニスト #	配列番号	配列
P410	46	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAibK(W-PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P417	47	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TRAibRAibQLAAibOrnY(OMe)LQSIKAibOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P451	48	C6-HSDAVFTEK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG40K)Y(OMe)TOrnLRAibQVA AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>

20

【表3】

P454	49	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO <sub>n</sub> LRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnK(W PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P460	50	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO <sub>n</sub> LRAibQVAAAibC(PEG40K)YLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P472	51	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO <sub>n</sub> LRAibQVAAAibK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )S PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P473	52	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO <sub>n</sub> LRAibQVAAAibK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )S PEG20K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P475	53	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO <sub>n</sub> LRAibQVAAK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )SPEG 40K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P478	54	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO <sub>n</sub> LRAibQVC(PEG40K)AAibOrnYLQ SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P483	55	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO <sub>n</sub> LRC(PEG40K)QVAAAibOrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P485	56	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO <sub>n</sub> LRK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )SPEG40K)QVAAAib OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P507	57	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TO <sub>n</sub> LRAibQVAAAibOrnYAibQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P509	58	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TO <sub>n</sub> LRAibQVAAAibOrnYLQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P511	59	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TO <sub>n</sub> LRAibQVAAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P513	60	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TO <sub>n</sub> LRAibQLAAAibOrnYAibQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P515	61	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TO <sub>n</sub> LRAibQLAAAibOrnYLQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P517	62	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TO <sub>n</sub> LRAibQLAAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P519	63	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TO <sub>n</sub> LRAibQLAAAibOrnYAibQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>

10

20

30

【表4】

P521	64	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P523	65	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P525	66	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P529	67	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRK(WPEG40K)QVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P531	68	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLK(WPEG40K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P533	69	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQK(WPEG40K)AAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P535	70	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSK(WPEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P537	71	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnC(PEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P541	72	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibC(PEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P545	73	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQC(PEG40K)AabuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P547	74	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRC(PEG40K)QLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P480	113	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG40K)AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P481	114	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P539	115	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P543	116	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSC(PEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P549	117	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P551	118	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>

10

20

30

【表5】

P555	119	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P557	120	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(WPEG40K)QLAAbuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P560	121	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAAbiOrnYLQSIOrn OrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P562	122	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAbiOrnYLQSIOrnOrn C(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P564	123	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P566	124	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P572	125	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P574	126	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAi bIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P576	127	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAi bIOrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P578	128	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG40K)AAbuAib OrnY(OMe)LQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P580	129	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P582	130	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P584	131	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSI OrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P586	132	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG40K)AAbuAib OrnY(OMe)LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P588	133	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSI OrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P590	134	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAbuAAibOrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>

10

20

30

【表6】

P597	135	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P599	136	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG40K)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P601	137	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(WPEG40K)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P469	139	C6-HSDAVFTEK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)Y(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P486	140	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)QVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P553	141	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P570	144	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH <sub>2</sub>
P595	146	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P476	147	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P602	148	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH <sub>2</sub>

10

20

【請求項12】

以下から選択されるアミノ酸配列を含んでなるPEG化V PAC 2ペプチド受容体アゴニスト。

【表7】

アゴニスト#	配列番号	配列
P470	75	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)RAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P490	76	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLYK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P492	77	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)AibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>

30

【表8】

P495	78	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQ K(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P497	79	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQS K(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P499	80	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnK( CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P501	81	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLC(PEG 20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P503	82	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSC (PEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P505	83	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnC( PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P402	138	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOr nGGPSSGAPPPK(W-PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P558	142	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAAibOrnYL QSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P568	143	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAAibOrnYL QSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P593	145	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQ AibOrnOrnGGPSSGAPPPK(WPEG40K)-NH <sub>2</sub>

10

20

30

40

50

## 【請求項13】

以下の式で表される配列：

式4(配列番号4) : X a a<sub>1</sub> - X a a<sub>2</sub> - X a a<sub>3</sub> - X a a<sub>4</sub> - X a a<sub>5</sub> - X a a<sub>6</sub> - T h r  
- X a a<sub>8</sub> - X a a<sub>9</sub> - X a a<sub>10</sub> - T h r - X a a<sub>12</sub> - X a a<sub>13</sub> - X a a<sub>14</sub> - X a a<sub>15</sub> - X  
a a<sub>16</sub> - X a a<sub>17</sub> - X a a<sub>18</sub> - A b u - X a a<sub>20</sub> - X a a<sub>21</sub> - X a a<sub>22</sub> - X a a<sub>23</sub> - X  
a a<sub>24</sub> - X a a<sub>25</sub> - X a a<sub>26</sub> - X a a<sub>27</sub> - X a a<sub>28</sub> - X a a<sub>29</sub> - X a a<sub>30</sub> - X a a<sub>31</sub> - X  
a a<sub>32</sub> - X a a<sub>33</sub> - X a a<sub>34</sub> - X a a<sub>35</sub> - X a a<sub>36</sub> - X a a<sub>37</sub> - X a a<sub>38</sub> - X a a<sub>39</sub> - X  
a a<sub>40</sub>

[式中、

X a a<sub>1</sub>はH i s、d Hであるか又は存在せず、X a a<sub>2</sub>はd A、S e r、V a l、G l y、T h r、L e u、d S、P r o又はA i b  
であり、X a a<sub>3</sub>はA s p又はG l uであり、X a a<sub>4</sub>はA l a、I l e、T y r、P h e、V a l、T h r、L e u、T r p、G l  
y、d A、A i b又はN M e Aであり、X a a<sub>5</sub>はV a l、L e u、P h e、I l e、T h r、T r p、T y r、d V、A i b  
又はN M e Vであり、X a a<sub>6</sub>はP h e、I l e、L e u、T h r、V a l、T r p又はT y rであり、X a a<sub>8</sub>はA s p、G l u、A l a、L y s、L e u、A r g又はT y rであり、X a a<sub>9</sub>はA s n、G l n、A s p、G l u、S e r、C y s、L y s又はK (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であり、X a a<sub>10</sub>はT y r、T r p、T y r (O M e)、S e r、C y s又はL y sであり、X a a<sub>12</sub>はA r g、L y s、G l u、h R、O r n、L y s(イソプロピル)、A i b  
、C i t、A l a、L e u、G l n、P h e、S e r又はC y sであり、X a a<sub>13</sub>はL e u、P h e、G l u、A l a、A i b、S e r、C y s、L y s又はK  
(C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であり、X a a<sub>14</sub>はA r g、L e u、L y s、A l a、h R、O r n、L y s(イソプロピル)

、Phe、Gln、Aib、Cit、Ser又はCysであり、  
Xaa<sub>15</sub>はLys、Ala、Arg、Glu、Leu、hR、Orn、Lys(イソプロピル)、Phe、Gln、Aib、K(Ac)Cit、Ser、Cys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、

Xaa<sub>16</sub>はGln、Lys、Glu、Ala、hR、Orn、Lys(イソプロピル)、Cit、Ser、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>17</sub>はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Nle、Lys、Aib、Ser、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>18</sub>はAla、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)K(W)、Abu又はNleであり、

Xaa<sub>20</sub>はLys、Gln、hR、Arg、Ser、His、Orn、Lys(イソプロピル)、Ala、Aib、Trp、Thr、Leu、Ile、Phe、Tyr、Val、K(Ac)Cit、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>21</sub>はLys、His、Arg、Ala、Phe、Aib、Leu、Gln、Orn、hR、K(Ac)、Cit、Ser、Cys、Val、Tyr、Ile、Thr、Trp、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、

Xaa<sub>22</sub>はTyr、Trp、Phe、Thr、Leu、Ile、Val、Tyr(OMe)Ala、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、

Xaa<sub>23</sub>はLeu、Phe、Ile、Ala、Trp、Thr、Val、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、

Xaa<sub>24</sub>はGln、Glu、Asn、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>25</sub>はSer、Asp、Phe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp、Gln、Asn、Tyr、Aib、Glu、Cys、Lys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>26</sub>はIle、Leu、Thr、Val、Trp、Tyr、Phe、Aib、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>27</sub>はLys、hR、Arg、Gln、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Met、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr、Lys(イソプロピル)、Cys、Leu、Orn、dK、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、

Xaa<sub>28</sub>はAsn、Asp、Gln、Lys、Arg、Aib、Orn、hR、Cit、Pro、dK、Ser、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>29</sub>はLys、Ser、Arg、Asn、hR、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Thr、Val、Trp、Tyr、Cys、Orn、Cit、Aib、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であるか又は存在せず、

Xaa<sub>30</sub>はArg、Lys、Ile、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr、Cys、hR、Cit、Aib、Orn、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であるか又は存在せず、

Xaa<sub>31</sub>はTyr、His、Phe、Thr、Cys、Ser、Lys、Gln、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であるか又は存在せず、

Xaa<sub>32</sub>はSer、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>33</sub>はTrpであるか又は存在せず、

Xaa<sub>34</sub>はCysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>35</sub>はGluであるか又は存在せず、

Xaa<sub>36</sub>はProであるか又は存在せず、

Xaa<sub>37</sub>はGlyであるか又は存在せず、

10

20

30

40

50

Xaa<sub>38</sub>はTrpであるか又は存在せず、

Xaa<sub>39</sub>はCysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>40</sub>はArgであるか又は存在せず、

式中、Xaa<sub>29</sub>、Xaa<sub>30</sub>、Xaa<sub>31</sub>、Xaa<sub>32</sub>、Xaa<sub>33</sub>、Xaa<sub>34</sub>、Xaa<sub>35</sub>、Xaa<sub>36</sub>、Xaa<sub>37</sub>、Xaa<sub>38</sub>又はXaa<sub>39</sub>が不在である場合、その下流にある次のアミノ酸はペプチドアゴニスト配列における次のアミノ酸である】

と、

C末端延長部分とを含んでなり、当該C末端延長部分のN末端は式4のペプチドのC末端と結合し、当該C末端延長部分は以下の式のアミノ酸配列：

式3(配列番号3)：Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub> 10

【式中、

Xaa<sub>1</sub>はGly、Cysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>2</sub>はGly、Argであるか又は存在せず、

Xaa<sub>3</sub>はPro、Thrであるか又は存在せず、

Xaa<sub>4</sub>はSerであるか又は存在せず、

Xaa<sub>5</sub>はSerであるか又は存在せず、

Xaa<sub>6</sub>はGlyであるか又は存在せず、

Xaa<sub>7</sub>はAlaであるか又は存在せず、

Xaa<sub>8</sub>はProであるか又は存在せず、

Xaa<sub>9</sub>はProであるか又は存在せず、

Xaa<sub>10</sub>はProであるか又は存在せず、

Xaa<sub>11</sub>はSer、Cysであるか又は存在せず、及び

Xaa<sub>12</sub>はCysであるか又は存在せず、

C末端延長部分のXaa<sub>1</sub>からXaa<sub>12</sub>のうちの少なくとも5つは存在し、

Xaa<sub>1</sub>、Xaa<sub>2</sub>、Xaa<sub>3</sub>、Xaa<sub>4</sub>、Xaa<sub>5</sub>、Xaa<sub>6</sub>、Xaa<sub>7</sub>、Xaa<sub>8</sub>、Xaa<sub>9</sub>、Xaa<sub>10</sub>又はXaa<sub>11</sub>が不在である場合、その下流にある次のアミノ酸はC末端延長部分における次のアミノ酸であり、

C末端のアミノ酸はアミド化されてもよい】

を含んでなり、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子に共有結合する少なくとも1つのCys残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子に共有結合する少なくとも1つのLys残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子に共有結合する少なくとも1つのK(W)を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子に共有結合する少なくとも1つのK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)を含んでなるか、もしくは

当該ペプチドアゴニストのカルボキシ末端アミノ酸がPEG分子に共有結合して付着するか、または

それらの組み合わせを含んでなる、

PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項14】

請求項1から13のいずれか1項記載のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト、並びに製薬的に許容し得る希釈剤、担体及び賦形剤のうちの1つ以上を含んでなる医薬組成物。

【請求項15】

医薬としての使用のための、請求項1から13のいずれか1項記載のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項16】

10

20

30

40

50

インスリン非依存性糖尿病の治療のための医薬の製造のための、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項記載の PEG 化 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニストの使用。

【請求項 17】

インスリン依存性糖尿病の治療のための医薬の製造のための、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項記載の PEG 化 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニストの使用。

【請求項 18】

請求項 1 から 13 のいずれか 1 項記載の PEG 化 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニストを投与することを含んでなる、そのような処置を必要とする患者の糖尿病の治疗方法。

【請求項 19】

前記糖尿病がインスリン非依存性糖尿病である、請求項 18 記載の方法。

10

【請求項 20】

前記糖尿病がインスリン依存性糖尿病である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 21】

実施例において実質的に記載された PEG 化 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニスト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は選択的な V PAC 2 受容体ペプチドアゴニストに関する。

【0002】

具体的には本発明は、1 分子以上のポリエチレングリコール分子又はその誘導体と共有結合している、選択的な V PAC 2 受容体ペプチドアゴニストに関する。

20

【背景技術】

【0003】

2 型糖尿病又はインスリン非依存性真性糖尿病 (NIDDM) は最も一般的な糖尿病であり、糖尿病に罹患する患者の 90 % に影響を及ぼす。NIDDM により、患者体内の細胞の機能が低下し、不十分なインスリン产生及び / 又はインスリン感受性の減少に至る。NIDDM が制御されない場合、血液中グルコース量が過剰となり、高血糖をもたらす。時間の経過により更に深刻な合併症に至ることもあり、それにより腎臓機能不全、心血管障害、視覚の損失、下肢潰瘍化、神経障害及び虚血などが生じうる。NIDDM の治療法としては、様々な経口薬の使用のほかに、食事、運動及び体重管理の改善などが挙げられる。NIDDM に罹患する個人はまず、かかる経口薬を服用することにより、血糖値を制御できる。しかしながら、これらの処置では、NIDDM 患者において生じる 細胞の機能の亢進的な損失は抑えられず、ゆえに疾患後の段階における血糖値を十分に制御することができない。また、現在利用可能な薬物治療は、NIDDM 患者を、例えば低血糖症、胃腸障害、体液貯留、浮腫及び / 又は体重増加などの副作用の危険にさらすこととなる。

30

【0004】

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) 及び血管作動性腸ペプチド (VIP) は、セクレチン及びグルカゴンと同じペプチドファミリーに属する。PACAP 及び VIP は、cAMP の媒介及び他の  $Ca^{2+}$  の媒介によるシグナル伝達経路を経て、3 つの G タンパク質共役受容体によって活性化する。これらの受容体は、PACAP 嗜好性のタイプ 1 (PAC1) 受容体 (非特許文献 1 及び 2) 及び 2 つの VIP 共有型のタイプ 2 受容体 (V PAC1 及び V PAC2) (非特許文献 3 から 8) として公知である。一連の PACAP のアナログは特許文献 1 及び 2 に開示される。

40

【0005】

PACAP は 3 つの受容体全てに対する顕著な活性化能を有する一方で、VIP は選択的に 2 つの V PAC 受容体を活性化する (非特許文献 9)。両方の VIP 及び PACAP は、それらを静脈注射で提供したとき、ヒトのインスリン分泌を刺激するのみならず、グルカゴン分泌及び肝臓からのグルコース放出を増加させることが知られている (非特許文献 10 及び 11)。但し、PACAP 又は VIP 刺激は結果的には、全体的には血糖症を

50

改善させない。PACAP又はVIPによる多くの受容体の活性化は、神経、内分泌腺、心血管、再生機構、筋肉及び免疫系に幅広い生理的影響を及ぼす（非特許文献12）。またVIPにより誘導されたラットの下痢は、VPAC受容体のうちの1つ（VPAC1）のみにより媒介されることが示唆されている（非特許文献13および9）。VPAC1及びPAC1受容体は細胞及び肝細胞において発現し、すなわち肝臓からのグルコース放出をもたらす効果に関与するものと考えられる。

【0006】

エキセンディン-4は、アメリカドクトカゲ（Gila Monster、学名：Heloderma Suspectum）の唾液中に含まれる物質である（非特許文献14）。39のアミノ酸からなるペプチドであり、グルコース依存性のインスリン分泌を促進する活性を有する。具体的なPEG化エキセンディン及びエキセンジンアゴニストペプチドは、特許文献3中に記載されている。

10

【0007】

最近の研究では、VPAC2受容体に選択的なペプチドが、胃腸（GI）における副作用をもたらさず、グルカゴン放出及び肝臓グルコース放出を増加させずに、膵臓からのインスリン分泌を促進できることが示唆されている（非特許文献9）。VPAC2受容体に選択的なペプチドは最初は、VIP及び/又はPACAPの修飾により同定された（例えば非特許文献15及び9、並びに特許文献4及び5、を参照）。

20

【0008】

しかしながら現在までに報告されているVPAC2受容体ペプチドアゴニストの多くは効果、選択性及び安定性プロフィールに関して問題があり、それらの臨床的な使用可能性が限られている。更に、これらのペプチドの多くは、製剤中における当該ポリペプチドの安定性、並びにin vivoでのこれらのポリペプチドの半減期が短いこと、などの問題から、商業的に利用するための候補としては不適当である。更に、幾つかのVPAC2受容体ペプチドアゴニストがジペプチジル-ペプチダーゼ（DPP-IV）の作用により不活性となることが確認されている。すなわち短い血清中半減期は、治療薬としてこれらのアゴニストの使用の妨げとなりうる。したがって、NIDDM薬剤に関する現在直面する課題を解決する、新規な治療方法に対するニーズが存在する。

20

【非特許文献1】Isobe,ら、Regul. Pept., 110: 213-217 (2003)、

30

【非特許文献2】Ogi,ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 196: 1511-1521 (1993)

30

【非特許文献3】Sherwoodら、Endocrinol. Rev., 21: 619-670 (2000)、

40

【非特許文献4】Hammarら、Pharmacol. Rev., 50: 265-270 (1998)、

40

【非特許文献5】Couvineau,ら、J. Biol. Chem., 278: 24759-24766 (2003)、

40

【非特許文献6】Sreedharan,ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 193: 546-553 (1993)、

40

【非特許文献7】Lutz,ら、FEBS Lett., 458: 197-203 (1999)、

40

【非特許文献8】Adamou,ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 209: 385-392 (1995)

40

【非特許文献9】Tsutsumiら、Diabetes, 51: 1453-1460 (2002)

40

【非特許文献10】Erikssonら、Peptides, 10: 481-484 (1989)

40

【非特許文献11】Filipssonら、JCEM, 82: 3093-3098 (1997)

50

【非特許文献12】Gozesら、Curr. Med. Chem., 6:1019-1034 (1999)

【非特許文献13】Itoら、Peptides, 22:1139-1151 (2001)、Tsutsumiら、Diabetes, 51:1453-1460 (2002)

【非特許文献14】Engら、J. Biol. Chem., 267(11):7402-7405 (1992)

【非特許文献15】Xiaら、J. Pharmacol. Exp. Ther., 281:629-633 (1997)、

【特許文献1】米国特許第6242563号

10

【特許文献2】国際公開第2000/05260号

【特許文献3】国際公開第2000/66629号

【特許文献4】国際公開第01/23420号

【特許文献5】国際公開第2004/06839号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

20

本発明は、VPAC2受容体に選択性があり、高い血糖値が示される場合には膵臓からのインスリン分泌を誘導する、改良された化合物の提供に関する。本発明の化合物は、細胞の機能を向上させると考えられるペプチドである。これらのペプチドは、GI副作用又はそれに対応する肝臓からのグルコース放出の増加を伴わずに、インスリン分泌を誘導する生理的効果を有し、更に公知のVPAC2受容体ペプチドアゴニストと比較して、ペプチドの選択性、効力及び/又はin vivo安定性が全体的に向上している。

【0010】

本発明はまた、クリアランスが低く、in vivo安定性が改善された、選択性なVPAC2受容体ペプチドアゴニストの提供に関する。本発明のアゴニストは、長い期間内に最小限の回数で投与されることが望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0011】

30

本発明の第1の態様では、

配列番号17: HSDAVFTEQY(OMe)TRAibRAibQLAAlbOrnY(OMe)LQSIKAibOrn、

30

配列番号18: HSDAVFTEK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)Y(OMe)TOrnLRAlbQVAAAibOrnYlQSIOrnYlQSIOrnOrn、

配列番号19: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYlQSIOrnK(W)Orn、

配列番号20: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)YLQSIOrnOrn、

配列番号21: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)OrnYlQSIOrnOrn、

配列番号22: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVCAAlbOrnYlQSIOrnOrn、

40

配列番号23: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRCQVAAAibOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号24: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAlbOrnYlQSIOrnOrn、

配列番号25: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYAibQSIOrnOrn、

配列番号26: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYlQAIbIOrnOrn、

配列番号27: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAbuAi

50

bOrnYLQAi bIOrnOrn、  
 配列番号28 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbO  
 rnYLQAi bIOrnOrn、  
 配列番号29 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbO  
 rnYAibQAi bIOrnOrn、  
 配列番号30 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi  
 bOrnYAibQSiOrnOrn、  
 配列番号31 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi  
 bOrnYLQSiOrnOrn、  
 配列番号32 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi 10  
 bOrnYAibQAi bIOrnOrn、  
 配列番号33 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbO  
 rnYAibQSiOrnOrn、  
 配列番号34 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRK(W)QVAAAib  
 OrnYLQSiOrnOrn、  
 配列番号35 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQVAAAibO  
 rnYLK(W)SiOrnOrn、  
 配列番号36 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQK(W)AAA  
 ibOrnYLQSiOrnOrn、  
 配列番号37 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH  
 )QVAAAibOrnYLQSiOrnOrn、  
 配列番号38 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQVAAAibK  
 (W)YLQSiOrnOrn、  
 配列番号39 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQVAAAibC  
 YLQSiOrnOrn、  
 配列番号40 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi  
 bOrnYLQAi bIOrnOrn、  
 配列番号41 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQVAAAibO  
 rnYLQSK(W)OrnOrn、  
 配列番号42 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi 30  
 bOrnYLQAi bIOrnCorn、  
 配列番号43 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi  
 bOrnYLQAi bCornOrn、  
 配列番号44 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQCAAAbuAi  
 bOrnYLQAi bIOrnOrn、  
 配列番号45 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRCQLAAAbuAi bO  
 rnYLQAi bIOrnOrn、  
 配列番号94 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQVK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)AAibOrnYLQSiOrnOrn、  
 配列番号95 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi 40  
 bOrnYLQSiOrnCorn、  
 配列番号96 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi  
 bOrnYLQSCOrnOrn、  
 配列番号97 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi  
 bOrnYLQAi bIOrnK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)Orn、  
 配列番号98 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbuAi  
 bOrnYLQSiOrnK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)Orn、  
 配列番号99 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRK(W)QLAAAbuAi  
 bOrnYLQAi bIOrnOrn、  
 配列番号100 : HSDAVFTEQY(OME)TOrnLRAibQLAAAbi b 50

O r n Y L Q S I O r n O r n C 、

配列番号 101 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q V A A A i b

O r n Y L Q S I O r n O r n C 、

配列番号 102 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y L Q S I O r n O r n C 、

配列番号 103 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y ( O M e ) L Q A i b I O r n O r n 、

配列番号 104 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y ( O M e ) L Q A i b I O r n C O r n 、

配列番号 105 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q C A A b u A i b O r n Y ( O M e ) L Q A i b I O r n O r n 、

配列番号 106 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y L Q A i b I O r n O r n C 、

配列番号 107 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y ( O M e ) L Q S I O r n O r n 、

配列番号 108 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q C A A b u A i b O r n Y ( O M e ) L Q S I O r n C O r n 、

配列番号 109 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y ( O M e ) L Q S I O r n O r n C O r n 、

配列番号 110 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A b u A A i b O r n Y L Q S I O r n O r n 、

配列番号 111 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q K ( C O ( C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub> S H ) A A b u A i b O r n Y L Q A i b I O r n O r n 、 及び

配列番号 112 : H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q K ( W ) A A b u A i b O r n Y L Q A i b I O r n O r n 、

から選択される 1 つの配列と、 C 末端延長部分とを含んでなる P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストの提供に関する。当該 C 末端延長部分の N 末端は上記ペプチド配列の C 末端と結合し、当該 C 末端延長部分は

式 3 ( 配列番号 3 ) : X a a<sub>1</sub> - X a a<sub>2</sub> - X a a<sub>3</sub> - X a a<sub>4</sub> - X a a<sub>5</sub> - X a a<sub>6</sub> - X a a<sub>7</sub> - X a a<sub>8</sub> - X a a<sub>9</sub> - X a a<sub>10</sub> - X a a<sub>11</sub> - X a a<sub>12</sub>

で表されるアミノ酸配列である。

式中、 X a a<sub>1</sub> は G l y 、 C y s 又は存在せず、

X a a<sub>2</sub> は G l y 、 A r g 又は存在せず、

X a a<sub>3</sub> は P r o 、 T h r 又は存在せず、

X a a<sub>4</sub> は S e r 又は存在せず、

X a a<sub>5</sub> は S e r 又は存在せず、

X a a<sub>6</sub> は G l y 又は存在せず、

X a a<sub>7</sub> は A l a 又は存在せず、

X a a<sub>8</sub> は P r o 又は存在せず、

X a a<sub>9</sub> は P r o 又は存在せず、

X a a<sub>10</sub> は P r o 又は存在せず、

X a a<sub>11</sub> は S e r 、 C y s 又は存在せず、 及び

X a a<sub>12</sub> は C y s 又は存在せず、

C 末端延長部分の X a a<sub>1</sub> から X a a<sub>12</sub> の少なくとも 5 つは存在し、

X a a<sub>1</sub> 、 X a a<sub>2</sub> 、 X a a<sub>3</sub> 、 X a a<sub>4</sub> 、 X a a<sub>5</sub> 、 X a a<sub>6</sub> 、 X a a<sub>7</sub> 、 X a a<sub>8</sub> 、 X a a<sub>9</sub> 、 X a a<sub>10</sub> 又は X a a<sub>11</sub> が不在である場合、その下流にある次のアミノ酸は C 末端延長部分の次のアミノ酸であり、 C 末端のアミノ酸はアミド化されてもよく、

当該ペプチドアゴニストは P E G 分子と共有結合する少なくとも 1 つの C y s 残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストは P E G 分子と共有結合する少なくとも 1 つの L y s 残基を含

10

20

30

40

50

んでなるか、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子と共有結合する少なくとも1つのK(W)を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子と共有結合する少なくとも1つのK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)を含んでなるか若しくは

当該ペプチドアゴニストのカルボキシ末端アミノ酸がPEG分子と共有結合するか、又はそれらの組み合わせである。

【0012】

好ましくは、式3のC末端延長部分のX<sub>aa1</sub>からX<sub>aa12</sub>のうちの少なくとも6個は存在する。好ましくは、当該C末端延長部分のX<sub>aa1</sub>からX<sub>aa12</sub>のうちの少なくとも7、8、9、10、11又は全てが存在する。

10

【0013】

好ましくは、PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストのC末端延長部分は、以下から選択される。

【表1】

配列番号5	GGPSSGAPPS
配列番号6	GGPSSGAPPS-NH <sub>2</sub>
配列番号7	GGPSSGAPP C
配列番号8	GGPSSGAPP C-NH <sub>2</sub>
配列番号9	GRPSSGAPPS
配列番号10	GRPSSGAPPS-NH <sub>2</sub>
配列番号11	GGPSSGAPP C
配列番号12	GGPSSGAPP C-NH <sub>2</sub>

20

【0014】

更に好ましくは、PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストのC末端延長部分は、配列番号11又は配列番号12の配列を有する。

【0015】

本発明の第1の態様に従ってV<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストのいかなる位置のいかなるLys、Cys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)残基に、1つ以上のPEG分子を共有結合させてもよい。

30

【0016】

PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストが配列番号22、23、39、42、43、44、45、95、96、100、101、102、104、105、106、108及び109から選択される配列を有する場合、システイン残基がPEG化されているのが好ましい。

【0017】

PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストが配列番号19、34、35、36、38、41、99及び112から選択される配列を有する場合、K(W)残基がPEG化されているのが好ましい。

40

【0018】

PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストが配列番号18、20、21、37、94、97、98及び111から選択される配列を有する場合、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)残基がPEG化されているのが好ましい。

【0019】

PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストがC末端延長部分を有する場合、1つ以上のPEG分子が前記C末端延長部分の1つ以上のCys残基に共有結合してもよい。配列番号17～45及び94～112から選択される配列は、1つ以上のLys、Cys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)残基と、1つ以上のCys残基を含むC末端延長

50

部分を含んでなる場合、片方又は両方の配列中に1つ以上のPEG化された残基が存在してもよい。

【0020】

好ましくは、V PAC 2受容体ペプチドアゴニストのC末端延長部分の残基に少なくとも1つのPEG分子が共有結合して存在する。

【0021】

1を超えるPEG分子が存在する場合、Lys、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)、K(W)及びカルボキシ末端におけるPEG化アミノ酸の組合せが存在してもよい。例えば、2つのPEG分子が存在する場合、1つがLys残基に結合し、もう1つがCys残基に結合してもよい。

10

【0022】

好ましくは、PEG分子は分岐状である。あるいは、PEG分子は直鎖状であってもよい。

【0023】

好ましくは、PEG分子は1,000Da～100,000Daの分子量である。好ましくは、PEG分子は10,000、20,000、30,000、40,000、50,000及び60,000Daから選択される。更に好ましくは、20,000、30,000、40,000又は60,000Daから選択される。本発明のペプチドアゴニストに共有結合するPEG分子が2つ存在する場合、各々は1,000～40,000Daであり、好ましくは20,000及び20,000Da、10,000及び30,000Da、30,000及び30,000Da又は20,000及び40,000Daの分子量を有する。

20

【0024】

PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト配列は更に、当該ペプチドのXaa<sub>1</sub>の上流のN末端にヒスチジン残基を更に含んでなってもよい。

【0025】

好ましくは、本発明の第1の態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、ペプチドアゴニストのN末端においてN末端修飾を更に有し、当該N末端修飾は以下のものから選択される。

(a) D-ヒスチジン、イソロイシン、メチオニン又はノルロイシンの付加、

30

(b) Ser-Trp-Cys-Glu-Pro-Gly-Trp-Cys-Arg(配列番号93)の配列を含んでなるペプチドの付加(式中、ArgがペプチドアゴニストのN末端と結合する)、

(c) 独立にアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>基から選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよいC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルキルの付加、

(d) -C(O)R<sup>1</sup>の添加(式中、R<sup>1</sup>は、C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルキル(アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン-SH及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)であるか、アリール(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)であるか、アリールC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)であるか、-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>(式中、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は独立に水素、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、アリール又はアリールC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルである)であるか、-OR<sup>4</sup>(R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルキル(アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)、アリール(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)、又はアリールC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル(C<sub>1</sub>-

40

1-C<sub>16</sub>アルキル(アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)である)であるか、-OR<sup>4</sup>(R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルキル(アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)、アリール(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルキニル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)、又はアリールC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル(C<sub>1</sub>-

50

$C_6$ アルキル、 $C_2$  -  $C_6$ アルケニル、 $C_2$  -  $C_6$ アルキニル、 $C_1$  -  $C_6$ アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい)であるか、又は5-ピロリジン-2-オンである)、

(e) -SO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>の付加(式中、R<sup>5</sup>がアリール、アリールC<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキル又はC<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>アルキルである)、

(f) C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル又は-SR<sup>6</sup>で任意に置換されてもよいスクシンイミド基の形成(式中、R<sup>6</sup>が水素又はC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキルである)、

(g) メチオニンスルホキシドの付加、

(h) ピオチニル-6-アミノヘキサン酸(6-アミノカプロン酸)の付加及び

(i) -C(=NH)-NH<sub>2</sub>の付加。

10

【0026】

好ましくは、当該N末端修飾は、アセチル、プロピオニル、ブチリル、ペンタノイル、ヘキサノイル、メチオニン、メチオニンスルホキシド、3-フェニルプロピオニル、フェニルアセチル、ベンゾイル、ノルロイシン、D-ヒスチジン、イソロイシン、3-メルカプトプロピオニル、ピオチニル-6-アミノヘキサン酸(6-アミノカプロン酸)及び-C(=NH)-NH<sub>2</sub>から選択される基の付加である。当該N末端修飾がアセチル又はヘキサノイルの付加であるのが、特に好適である。

【0027】

当業者であれば、配列番号17~45及び94~112から選択される様々な組合せのペプチド配列を含んでなるPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト(本願明細書に記載のC末端延長部分及びN末端修飾)を、上記の開示に基づいて作製できることを認識するであろう。

20

【0028】

本発明の第1の態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、以下から選択されるアミノ酸配列を含んでなるのが好ましい。

【表2】

アゴニスト#	配列番号	配列
P410	46	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibK(W-PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>

30

【表3】

P417	47	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TRAibRAibQLAAibOrnY(OMe)LQSIKA ibOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P451	48	C6-HSDAVFTEK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG40K)Y(OMe)TOrnLRAibQVAA AibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P454	49	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnK(W PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P460	50	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibC(PEG40K)YLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P472	51	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> S PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P473	52	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> S PEG20K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P475	53	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG 40K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P478	54	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVC(PEG40K)AAibOrnYLQ SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P483	55	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRC(PEG40K)QVAAAibOrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P485	56	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG40K)QVAAAib OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P507	57	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAAibOrnYAibQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P509	58	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P511	59	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P513	60	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAibOrnYAibQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P515	61	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAibOrnYLQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>

10

20

30

【表4】

P517	62	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn GGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P519	63	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAAibOrnYAibQAibIOrnOrnG GPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P521	64	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrnOrn GGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P523	65	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P525	66	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQ AibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P529	67	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRK(WPEG40K)QVAAAibOrnYLQSIOr nOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P531	68	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLK(W PEG40K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P533	69	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQK(WPEG40K)AAAib OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P535	70	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSK (WPEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P537	71	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnC(PE G40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P541	72	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibC(PEG40 K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P545	73	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQC(PEG40K)AabuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P547	74	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRC(PEG40K)QLAAbuAibOrnYLQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P480	113	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG40K)AAibOr nYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P481	114	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)AAibOr nYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P539	115	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P543	116	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQS C(PEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>

10

20

30

【表5】

P549	117	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYL QAibIOrnK(CO(CH2)2SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P551	118	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYL QSIOrnK(CO(CH2)2SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P555	119	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P557	120	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(WPEG40K)QLAAbuAib OrnYLQAbiOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P560	121	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAAbiOrnYLQSIOrn OrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P562	122	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAAbiOrnYLQSIOrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P564	123	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAbiOrnOrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P566	124	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P572	125	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P574	126	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAbiI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P576	127	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAbiI OrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P578	128	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG40K)AAbuAib OrnY(OMe)LQAbiIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P580	129	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAbiIOrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P582	130	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P584	131	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSIOrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P586	132	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG40K)AAbuAib OrnY(OMe)LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>

10

20

30

【表6】

P588	133	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSI OrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P590	134	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAbuAAibOrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P597	135	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)AAb uAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P599	136	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG40K)AAb uAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P601	137	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(WPEG40K)AAbuAibOrnY LQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P469	139	C6-HSDAVFTEK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)Y(OMe)TOrnLRAibQVAAAi bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P486	140	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)QVAAAb OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P553	141	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn C(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P570	144	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH <sub>2</sub>
P595	146	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAbuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P476	147	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG 20K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P602	148	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH <sub>2</sub>

## 【0029】

より好ましい本発明の第1の態様に係るPEG化V PAC2受容体ペプチドアゴニストは、配列番号47、64、66、115、119、122、126、130及び144から選択されるアミノ酸配列を含んでなる。

## 【0030】

本発明の第2態様は、以下から選択されるアミノ酸配列を含んでなるPEG化V PAC2受容体ペプチドアゴニストの提供に関する。

10

20

30

【表7】

アゴニスト#	配列番号	配列
P470	75	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)RAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P490	76	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P492	77	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)AibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P495	78	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)IOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P497	79	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQS K(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P499	80	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnK(CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P501	81	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLC(PEG20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P503	82	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSC(PEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P505	83	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P402	138	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPK(W-PEG40K)-NH <sub>2</sub>
P558	142	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>
P568	143	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH <sub>2</sub>
P593	145	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQAibIOrnOrnGGPSSGAPPK(WPEG40K)-NH <sub>2</sub>

10

20

30

## 【0031】

より好ましい本発明の第2態様に係るPEG化V PAC2受容体ペプチドアゴニストは、配列番号80又は配列番号83のアミノ酸配列を含んでなる。

## 【0032】

本発明の第3の態様は、以下の式のアミノ酸配列：

式4(配列番号4)：Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Thr-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Thr-Xaa<sub>12</sub>-Xaa<sub>13</sub>-Xaa<sub>14</sub>-Xaa<sub>15</sub>-Xaa<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Abu-Xaa<sub>20</sub>-Xaa<sub>21</sub>-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Xaa<sub>24</sub>-Xaa<sub>25</sub>-Xaa<sub>26</sub>-Xaa<sub>27</sub>-Xaa<sub>28</sub>-Xaa<sub>29</sub>-Xaa<sub>30</sub>-Xaa<sub>31</sub>-Xaa<sub>32</sub>-Xaa<sub>33</sub>-Xaa<sub>34</sub>-Xaa<sub>35</sub>-Xaa<sub>36</sub>-Xaa<sub>37</sub>-Xaa<sub>38</sub>-Xaa<sub>39</sub>-Xaa<sub>40</sub>

(式中、

Xaa<sub>1</sub>はHis、dHであるか又は存在せず、

Xaa<sub>2</sub>はdA、Ser、Val、Gly、Thr、Leu、dS、Pro又はAibであり、

Xaa<sub>3</sub>はAsp又はGluであり、

Xaa<sub>4</sub>はAla、Ile、Tyr、Phe、Val、Thr、Leu、Trp、Gly、dA、Aib又はNMeAであり、

40

50

Xaa<sub>5</sub>はVal、Leu、Phe、Ile、Thr、Trp、Tyr、dV、Aib  
又はNMeVであり、

Xaa<sub>6</sub>はPhe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp又はTyrであり、

Xaa<sub>8</sub>はAsp、Glu、Ala、Lys、Leu、Arg又はTyrであり、

Xaa<sub>9</sub>はAsn、Gln、Asp、Glu、Ser、Cys、Lys又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、

Xaa<sub>10</sub>はTyr、Trp、Tyr(OME)、Ser、Cys又はLysであり、

Xaa<sub>12</sub>はArg、Lys、Glu、hR、Orn、Lys(イソプロピル)、Aib、Cit、Ala、Leu、Gln、Phe、Ser又はCysであり、

Xaa<sub>13</sub>はLeu、Phe、Glu、Ala、Aib、Ser、Cys、Lys又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、10

Xaa<sub>14</sub>はArg、Leu、Lys、Ala、hR、Orn、Lys(イソプロピル)、Phe、Gln、Aib、Cit、Ser又はCysであり、

Xaa<sub>15</sub>はLys、Ala、Arg、Glu、Leu、hR、Orn、Lys(イソプロピル)、Phe、Gln、Aib、K(AC)Cit、Ser、Cys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、15

Xaa<sub>16</sub>はGln、Lys、Glu、Ala、hR、Orn、Lys(イソプロピル)、Cit、Ser、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>17</sub>はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Nle、Lys、Aib、Ser、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、20

Xaa<sub>18</sub>はAla、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)K(W)、Abu又はNleであり、

Xaa<sub>20</sub>はLys、Gln、hR、Arg、Ser、His、Orn、Lys(イソプロピル)、Ala、Aib、Trp、Thr、Leu、Ile、Phe、Tyr、Val、K(AC)Cit、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>21</sub>はLys、His、Arg、Ala、Phe、Aib、Leu、Gln、Orn、hR、K(AC)Cit、Ser、Cys、Val、Tyr、Ile、Thr、Trp、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、25

Xaa<sub>22</sub>はTyr、Trp、Phe、Thr、Leu、Ile、Val、Tyr(OME)Ala、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、30

Xaa<sub>23</sub>はLeu、Phe、Ile、Ala、Trp、Thr、Val、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、

Xaa<sub>24</sub>はGln、Glu、Asn、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>25</sub>はSer、Asp、Phe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp、Gln、Asn、Tyr、Aib、Glu、Cys、Lys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、35

Xaa<sub>26</sub>はIle、Leu、Thr、Val、Trp、Tyr、Phe、Aib、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>27</sub>はLys、hR、Arg、Gln、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Met、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr、Lys(イソプロピル)、Cys、Leu、Orn、dK、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であり、40

Xaa<sub>28</sub>はAsn、Asp、Gln、Lys、Arg、Aib、Orn、hR、Cit、Pro、dK、Ser、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又はK(W)であり、

Xaa<sub>29</sub>はLys、Ser、Arg、Asn、hR、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Thr、Val、Trp、Tyr、Cys、Orn、Cit、Aib、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であるか又は存在せず、45

Xaa<sub>30</sub>はArg、Lys、Ile、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr、Cys、hR、Cit、Aib、Orn、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であるか又は存在せず、

Xaa<sub>31</sub>はTyr、His、Phe、Thr、Cys、Ser、Lys、Gln、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)であるか又は存在せず、

Xaa<sub>32</sub>はSer、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>33</sub>はTrpであるか又は存在せず、

Xaa<sub>34</sub>はCysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>35</sub>はGluであるか又は存在せず、

Xaa<sub>36</sub>はProであるか又は存在せず、

Xaa<sub>37</sub>はGlyであるか又は存在せず、

Xaa<sub>38</sub>はTrpであるか又は存在せず、

Xaa<sub>39</sub>はCysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>40</sub>はArgであるか又は存在せず、

式中、Xaa<sub>29</sub>、Xaa<sub>30</sub>、Xaa<sub>31</sub>、Xaa<sub>32</sub>、Xaa<sub>33</sub>、Xaa<sub>34</sub>、Xaa<sub>35</sub>、Xaa<sub>36</sub>、Xaa<sub>37</sub>、Xaa<sub>38</sub>又はXaa<sub>39</sub>が不在である場合、その下流にある次のアミノ酸はペプチドアゴニスト配列における次のアミノ酸である)

と、C末端延長部分とを含んでなり、当該C末端延長部分のN末端は式4のペプチドのC末端と結合し、当該C末端延長部分は以下の式のアミノ酸配列：

式3(配列番号3)：Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub>

(式中、Xaa<sub>1</sub>はGly、Cysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>2</sub>はGly、Argであるか又は存在せず、

Xaa<sub>3</sub>はPro、Thrであるか又は存在せず、

Xaa<sub>4</sub>はSerであるか又は存在せず、

Xaa<sub>5</sub>はSerであるか又は存在せず、

Xaa<sub>6</sub>はGlyであるか又は存在せず、

Xaa<sub>7</sub>はAlaであるか又は存在せず、

Xaa<sub>8</sub>はProであるか又は存在せず、

Xaa<sub>9</sub>はProであるか又は存在せず、

Xaa<sub>10</sub>はProであるか又は存在せず、

Xaa<sub>11</sub>はSer、Cysであるか又は存在せず、及び

Xaa<sub>12</sub>はCysであるか又は存在せず、

C末端延長部分のXaa<sub>1</sub>からXaa<sub>12</sub>のうちの少なくとも5つは存在し、

Xaa<sub>1</sub>、Xaa<sub>2</sub>、Xaa<sub>3</sub>、Xaa<sub>4</sub>、Xaa<sub>5</sub>、Xaa<sub>6</sub>、Xaa<sub>7</sub>、Xaa<sub>8</sub>、Xaa<sub>9</sub>、Xaa<sub>10</sub>又はXaa<sub>11</sub>が不在である場合、その下流にある次のアミノ酸はC末端延長部分における次のアミノ酸であり、

C末端アミノ酸はアミド化されてもよい)

を含んでなり、

当該ペプチドアゴニストがPEG分子に共有結合する少なくとも1つのCys残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストがPEG分子に共有結合する少なくとも1つのLys残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストがPEG分子に共有結合する少なくとも1つのK(W)を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストがPEG分子に共有結合する少なくとも1つのK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)を含んでなるか、

若しくは当該ペプチドアゴニストのカルボキシ末端アミノ酸がPEG分子に共有結合して付着するか、又は、

10

20

30

40

50

それらの組み合わせを含んでなる、  
PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの提供に関する。

【0033】

好ましくは、第3の本発明の態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、式4(配列番号4)の配列を含んでなる。

ここで、

Xaa<sub>3</sub>はAsp又はGluであり、

Xaa<sub>8</sub>はAsp又はGluであり、

Xaa<sub>9</sub>はAsn又はGlnであり、

Xaa<sub>10</sub>はTyr又はTyr(OME)であり、

Xaa<sub>12</sub>はArg、HR、Lys又はOrnであり、

Xaa<sub>14</sub>はArg、Gln、Aib、HR、Orn、Cit、Lys、Ala又はLeuであり、

Xaa<sub>15</sub>はLys、Aib、Orn又はArgであり、

Xaa<sub>16</sub>はGln又はLysであり、

Xaa<sub>17</sub>はVal、Leu、Ala、Ile、Lys又はNleであり、

Xaa<sub>20</sub>はLys、Val、Leu、Aib、Ala、Gln又はArgであり、

Xaa<sub>21</sub>はLys、Aib、Orn、Ala、Gln又はArgであり、

Xaa<sub>23</sub>はLeu又はAibであり、Xaa<sub>25</sub>はSer又はAibであり、

Xaa<sub>27</sub>はLys、Orn、HR又はArgであり、

Xaa<sub>28</sub>はAsn、Gln、Lys、HR、Aib、Orn又はProであり、

Xaa<sub>29</sub>はLys、Orn、HRであるか又は存在しない。

【0034】

好ましくは、本発明の第3の態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、式4(配列番号4)の配列を含んでなり、式中、Xaa<sub>23</sub>又はXaa<sub>25</sub>はAibである。更に好ましくは、Xaa<sub>23</sub>及びXaa<sub>25</sub>の両方がAibである。

【0035】

好ましくは、本発明の第3の態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、Xaa<sub>14</sub>又はXaa<sub>15</sub>がAibである式4の配列を含んでなる。

【0036】

あるいは、本発明の第3の態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、Xaa<sub>20</sub>又はXaa<sub>21</sub>がAibである式4の配列を含んでなる。

【0037】

より好ましくは、Xaa<sub>14</sub>又はXaa<sub>15</sub>がAibであり、Xaa<sub>20</sub>又はXaa<sub>21</sub>がAibである。Xaa<sub>15</sub>がAibで、Xaa<sub>20</sub>がAibであるのが特に好ましい。

【0038】

好ましくは、本発明の第3の態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、Xaa<sub>15</sub>がAibであり、Xaa<sub>20</sub>がAibであり、Xaa<sub>12</sub>、Xaa<sub>21</sub>、Xaa<sub>27</sub>及びXaa<sub>28</sub>が全てOrnである式4の配列を含んでなる。好ましくは、Xaa<sub>15</sub>はAibであり、Xaa<sub>20</sub>はAibであり、Xaa<sub>12</sub>、Xaa<sub>21</sub>、Xaa<sub>27</sub>及びXaa<sub>28</sub>は全てOrnであり、Xaa<sub>8</sub>はGluであり、Xaa<sub>9</sub>はGlnであり、Xaa<sub>10</sub>はTyr(OME)である。更に好ましくは、Xaa<sub>15</sub>はAibであり、Xaa<sub>20</sub>はAibであり、Xaa<sub>12</sub>、Xaa<sub>21</sub>、Xaa<sub>27</sub>及びXaa<sub>28</sub>は全てOrnであり、Xaa<sub>8</sub>はGluであり、Xaa<sub>10</sub>はTyr(OME)であり、Xaa<sub>23</sub>及び/又はXaa<sub>25</sub>はAibである。Xaa<sub>8</sub>、Xaa<sub>9</sub>、Xaa<sub>10</sub>、Xaa<sub>12</sub>、Xaa<sub>15</sub>、Xaa<sub>20</sub>、Xaa<sub>21</sub>、Xaa<sub>23</sub>、Xaa<sub>25</sub>、Xaa<sub>27</sub>及びXaa<sub>28</sub>のうちの1つ以上が、PEG化されたLys、Cys、K(CO、CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH又はK(W)であってもよく、その他の全ての位置において上記したような適切なアミノ酸置換がなされてもよい。

【0039】

好ましくは、式3のC末端延長部分のXaa<sub>1</sub>からXaa<sub>12</sub>のうちの少なくとも6つが

10

20

30

40

50

存在する。好ましくは、C末端延長部分のX<sub>aa<sub>1</sub></sub>からX<sub>aa<sub>12</sub></sub>のうちの7、8、9、10、11個又は全てが存在する。

【0040】

好ましくは、本発明の第3の態様に係るPEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストのC末端延長部分は、配列番号5、6、7、8、9、10、11及び12から選択される配列で表される。

【0041】

好ましくは、本発明の第3の態様に係るPEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストのC末端延長部分は、配列番号11又は配列番号12で表される。

【0042】

1つ以上のPEG分子を、本発明の第3の態様に係るV<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストの任意に位置において、Lys、Cys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)のいずれの残基に共有結合させてもよい。C末端延長部分は、PEG化してもよい1つ以上のCys残基を含んでなっていてもよい。式4による配列が1つ以上のLys、Cys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)残基を含み、C末端延長部分が1つ以上のCys残基を含む場合、1つ以上のPEG化残基を片方又は両方の配列中に存在させてもよい。

【0043】

好ましくは、少なくとも1つのPEG分子が式4の残基に共有結合して存在する。好ましくは、1つ以上のPEG分子が、式4の9、13、15、16、17、18、20、21、24、25、26及び28の位置の残基と共有結合して存在する。

【0044】

好ましくは、少なくとも1つのPEG分子が、V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストのC末端延長部分の残基に共有結合して存在する。

【0045】

1を超えるPEG分子を存在させる場合、Lys、Cys、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)K(W)及びカルボキシ末端アミノ酸におけるPEG化を組合せてもよい。2つのPEG分子を存在させる場合、例えば1つをLys残基に結合させ、もう1つをCys残基に結合させてもよい。

【0046】

好ましくは、当該PEG分子は分岐状である。あるいは、当該PEG分子は直鎖状であってもよい。

【0047】

好ましくは、当該PEG分子は1,000Da～100,000Daの分子量である。好ましくは、当該PEG分子は10,000、20,000、30,000、40,000、50,000及び60,000Daのものから選択される。更に好ましくは、20,000、30,000、40,000又は60,000Daのものから選択される。本発明のペプチドアゴニストに共有結合するPEG分子が2つ存在する場合、各々1,000～40,000Daであってもよく、好ましくは20,000及び20,000Da、10,000及び30,000Da、30,000及び30,000Da又は20,000及び40,000Daの分子量である。

【0048】

好ましくは、本発明の第3の態様に係るPEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストはペプチドアゴニストのN末端においてN末端修飾を更に含んでなり、当該N末端修飾は以下から選択される。

(a) D-ヒスチジン、イソロイシン、メチオニン又はノルロイシンの付加、

(b) Ser-Trp-Cys-Glu-Pro-Gly-Trp-Cys-Arg(配列番号93)の配列を含んでなるペプチドの付加(式中、ArgがペプチドアゴニストのN末端と結合する)、

(c) 独立にアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン及び-CF<sub>3</sub>から選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよいC<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>アルキルの付加、

10

20

30

40

50

(d) - C (O) R<sup>1</sup>の添加（式中、R<sup>1</sup>は、C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>アルキル（アリール、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ、- NH<sub>2</sub>、- OH、ハロゲン - SH 及び - CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい）であるか、アリール（C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニル、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ、- NH<sub>2</sub>、- OH、ハロゲン及び - CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい）であるか、アリール C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキル（C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニル、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ、- NH<sub>2</sub>、- OH、ハロゲン及び - CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい）であるか、- NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>（式中、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は独立に水素、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、アリール又はアリール C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキルである）であるか、- OR<sup>4</sup>（R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>アルキル（アリール、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ、- NH<sub>2</sub>、- OH、ハロゲン及び - CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい）、アリール（C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニル、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ、- NH<sub>2</sub>、- OH、ハロゲン及び - CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい）、又はアリール C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキル（C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニル、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ、- NH<sub>2</sub>、- OH、ハロゲン及び - CF<sub>3</sub>から独立に選択される1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい）であるか、又は5-ピロリジン-2-オンである）、

(e) - SO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>の付加（式中、R<sup>5</sup>がアリール、アリール C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキル又は C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>アルキルである）、

(f) C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル又は - SR<sup>6</sup>で任意に置換されてもよいスクシンイミド基の形成（式中、R<sup>6</sup>が水素又はC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキルである）、

(g) メチオニンスルホキシドの付加、

(h) ピオチニル-6-アミノヘキサン酸（6-アミノカプロン酸）の付加及び

(i) - C (= NH) - NH<sub>2</sub>の付加。

#### 【0049】

好ましくは、当該N末端修飾は、アセチル、プロピオニル、ブチリル、ペンタノイル、ヘキサノイル、メチオニン、メチオニンスルホキシド、3-フェニルプロピオニル、フェニルアセチル、ベンゾイル、ノルロイシン、D-ヒスチジン、イソロイシン、3-メルカプトプロピオニル、ピオチニル-6-アミノヘキサン酸（6-アミノカプロン酸）及び - C (= NH) - NH<sub>2</sub>から選択される基の付加である。当該N末端修飾がアセチル又はヘキサノイルの付加であるのが、特に好適である。

#### 【0050】

当業者であれば、本願明細書に記載したような式4のペプチド配列、C末端延長部分及びN末端修飾を様々な組合せで含んでなるPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストを、上記の開示に基づいて作製できると認識するであろう。

#### 【0051】

本発明の第3の態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、配列番号59、62、64、65、66、71、72、73、74、115、116、117、118、119、120、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、135、136、137、141、144、146及び148から選択されるアミノ酸配列を含んでなるのが好ましい。

#### 【0052】

本発明の第4の態様にしたがい、本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト及び1つ以上の製薬的に許容し得る希釈剤、担体及び/又は賦形剤を含んでなる医薬組成物を提供する。

#### 【0053】

本発明の第5の態様にしたがい、医薬としての使用のための、本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストを提供する。

#### 【0054】

本発明の第6の態様にしたがい、インスリン非依存性糖尿病の治療のための医薬の製造

のための、本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの使用を提供する。

【0055】

本発明の更に別の態様では、インスリン依存性糖尿病の治療のための医薬の製造のための、本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの使用を提供する。

【0056】

本発明は、本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト投与することを含んでなる、そのような処置を必要とする患者における糖尿病の治疗方法を提供し、該糖尿病はインスリン非依存性糖尿病又はインスリン依存性糖尿病であつてよい。

【0057】

本発明は更に、本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストを含んでなる、インスリン非依存性糖尿病又はインスリン依存性糖尿病の治療用の医薬組成物を提供する。

【0058】

本発明の別の態様によれば、配列番号17～45及び94～112から選択される1つの配列と、C末端延長部分であつて、そのC末端延長部分のN末端が上記ペプチド配列のC末端と結合するC末端延長部分を含んでなるPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストを提供する。当該C末端延長部分は、以下の式のアミノ酸配列を含んでなる。

式1(配列番号1) : Xaa<sub>1</sub> - Xaa<sub>2</sub> - Xaa<sub>3</sub> - Xaa<sub>4</sub> - Xaa<sub>5</sub> - Xaa<sub>6</sub> - Xaa<sub>7</sub> - Xaa<sub>8</sub> - Xaa<sub>9</sub> - Xaa<sub>10</sub> - Xaa<sub>11</sub> - Xaa<sub>12</sub> - Xaa<sub>13</sub>  
(式中、

Xaa<sub>1</sub>はGly、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>2</sub>はGly、Arg、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>3</sub>はPro、Thr、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>4</sub>はSer、Pro、His、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>5</sub>はSer、Arg、Thr、Trp、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>6</sub>はGly、Ser、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>7</sub>はAla、Asp、Arg、Glu、Lys、Gly、Cys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>8</sub>はPro、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>9</sub>はPro、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>10</sub>はPro、Ser、Ala、Arg、Lys、His、Cys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>11</sub>はSer、Cys、His、Pro、Lys、Arg、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>12</sub>はHis、Ser、Arg、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>13</sub>はHis、Ser、Arg、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)又は存在せず、

Xaa<sub>1</sub>、Xaa<sub>2</sub>、Xaa<sub>3</sub>、Xaa<sub>4</sub>、Xaa<sub>5</sub>、Xaa<sub>6</sub>、Xaa<sub>7</sub>、Xaa<sub>8</sub>、Xaa<sub>9</sub>、Xaa<sub>10</sub>、Xaa<sub>11</sub>又はXaa<sub>12</sub>が存在しない場合、その下流に存在する次のアミノ酸は当該C末端延長部分における次のアミノ酸であり、

C末端のアミノ酸はアミド化されていてもよく、

10

20

30

40

50

当該ペプチドアゴニストはPEG分子に共有結合する少なくとも1つのCys残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子に共有結合する少なくとも1つのLys残基を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子に共有結合する少なくとも1つのK(W)を含んでなるか、

当該ペプチドアゴニストはPEG分子に共有結合する少なくとも1つのK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)を含んでなるか、若しくは

当該ペプチドアゴニストのカルボキシ末端アミノ酸はPEG分子に共有結合するか、又は、

それらの組み合わせである。)

#### 【0059】

式1のC末端延長部分が、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)のいずれをも、3つ以下で含有するのが好ましい。C末端延長部分が、これらの残基のいずれをも2つ以下で含有するのがより好ましい。2つのCys残基がC末端延長部分に存在する場合、Cys残基がC末端に存在するのが好ましい。C末端延長部分が、これらの残基のいずれをも1つ以下で含有するのが更に好ましい。C末端延長部分に1つのCys残基だけが存在する場合、Cys残基がC末端に存在するのが好ましい。

#### 【0060】

好ましくは、上記の他の実施態様に関するPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストのC末端延長部分は、以下の式のアミノ酸配列を含んでなる。

式2(配列番号2): Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Xaa<sub>10</sub>-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub>-Xaa<sub>13</sub>

(式中、

Xaa<sub>1</sub>はGly、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>2</sub>はGly、Arg、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>3</sub>はPro、Thr、Ser、Ala、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>4</sub>はSer、Pro、His、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>5</sub>はSer、Arg、Thr、Trp、Lys、Cysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>6</sub>はGly、Ser、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>7</sub>はAla、Asp、Arg、Glu、Lys、Gly、Cysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>8</sub>はPro、Ser、Ala、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>9</sub>はPro、Ser、Ala、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>10</sub>はPro、Ser、Ala、Arg、Lys、His、Cysであるか又は存在せず、

Xaa<sub>11</sub>はSer、Cys、His、Pro、Lys、Argであるか又は存在せず、

Xaa<sub>12</sub>はHis、Ser、Arg、Lys、Cysであるか又は存在せず、及び

Xaa<sub>13</sub>はHis、Ser、Arg、Lys、Cysであるか又は存在せず、

但しXaa<sub>1</sub>、Xaa<sub>2</sub>、Xaa<sub>3</sub>、Xaa<sub>4</sub>、Xaa<sub>5</sub>、Xaa<sub>6</sub>、Xaa<sub>7</sub>、Xaa<sub>8</sub>、Xaa<sub>9</sub>、Xaa<sub>10</sub>、Xaa<sub>11</sub>又はXaa<sub>12</sub>が存在しない場合、次の下流側のアミノ酸はC末端延長部分における次のアミノ酸であり、

C末端のアミノ酸はアミド化されていてもよい)。

#### 【0061】

好ましくは、式1又は2のC末端延長部分のXaa<sub>1</sub>からXaa<sub>13</sub>のうち少なくとも1つが存在する。好ましくは、C末端延長部分のXaa<sub>1</sub>からXaa<sub>13</sub>のうち、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個又は全てが存在する。

#### 【0062】

好ましくは、上記の別の実施態様に係るPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストのC末端延長部分は、以下の式のアミノ酸配列を含んでなる。

10

20

30

40

50

式3(配列番号3) : X a a<sub>1</sub> - X a a<sub>2</sub> - X a a<sub>3</sub> - X a a<sub>4</sub> - X a a<sub>5</sub> - X a a<sub>6</sub> - X a a<sub>7</sub> - X a a<sub>8</sub> - X a a<sub>9</sub> - X a a<sub>10</sub> - X a a<sub>11</sub> - X a a<sub>12</sub>

(式中、

X a a<sub>1</sub>はG l y、C y sであるか又は存在せず、

X a a<sub>2</sub>はG l y、A r gであるか又は存在せず、

X a a<sub>3</sub>はP r o、T h rであるか又は存在せず、

X a a<sub>4</sub>はS e rであるか又は存在せず、

X a a<sub>5</sub>はS e rであるか又は存在せず、

X a a<sub>6</sub>はG l yであるか又は存在せず、

X a a<sub>7</sub>はA l aであるか又は存在せず、

X a a<sub>8</sub>はP r oであるか又は存在せず、

X a a<sub>9</sub>はP r oであるか又は存在せず、

X a a<sub>10</sub>はP r oであるか又は存在せず、

X a a<sub>11</sub>はS e r、C y sであるか又は存在せず、及び

X a a<sub>12</sub>はC y sであるか又は存在せず、

但しX a a<sub>1</sub>、X a a<sub>2</sub>、X a a<sub>3</sub>、X a a<sub>4</sub>、X a a<sub>5</sub>、X a a<sub>6</sub>、X a a<sub>7</sub>、X a a<sub>8</sub>、X a a<sub>9</sub>、X a a<sub>10</sub>又はX a a<sub>11</sub>が存在しない場合、次の下流側のアミノ酸はC末端延長部分における次のアミノ酸となり、

C末端のアミノ酸はアミド化されていてもよい)。

【0063】

好ましくは、式3のC末端延長部分のX a a<sub>1</sub>からX a a<sub>12</sub>のうちの少なくとも1つは存在する。好ましくは、当該C末端延長部分のX a a<sub>1</sub>からX a a<sub>12</sub>のうちの最低2、3、4、5、6、7、8、9、10、11個又は全てが存在する。

【0064】

本発明の任意の態様及び実施態様においても使用できる、他のC末端延長部分は、以下の式のアミノ酸配列を有する。

式13(配列番号13) : X a a<sub>1</sub> - X a a<sub>2</sub> - X a a<sub>3</sub> - X a a<sub>4</sub> - X a a<sub>5</sub> - X a a<sub>6</sub> - X a a<sub>7</sub> - X a a<sub>8</sub> - X a a<sub>9</sub> - X a a<sub>10</sub>

(式中、

X a a<sub>1</sub>はS e r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、

X a a<sub>2</sub>はA r g、S e r、h R、O r n、H i s、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、

X a a<sub>3</sub>はT h r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、

X a a<sub>4</sub>はS e r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、

X a a<sub>5</sub>はP r o、S e r、A l a、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、

X a a<sub>6</sub>はP r o、S e r、A l a、A r g、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、

X a a<sub>7</sub>はP r o、S e r、A l a、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、

X a a<sub>8</sub>はL y s、K (W) P r o、C y s、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、

X a a<sub>9</sub>はK (E C<sub>16</sub>) S e r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在せず、及び

X a a<sub>10</sub>はS e r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)であるか又は存在しない。)

【0065】

10

20

30

40

50

式13のX<sub>aaa<sub>1</sub></sub>、X<sub>aaa<sub>2</sub></sub>、X<sub>aaa<sub>3</sub></sub>、X<sub>aaa<sub>4</sub></sub>、X<sub>aaa<sub>5</sub></sub>、X<sub>aaa<sub>6</sub></sub>、X<sub>aaa<sub>7</sub></sub>、X<sub>aaa<sub>8</sub></sub>又はX<sub>aaa<sub>9</sub></sub>が存在しない場合、その次の下流側のアミノ酸がC末端延長部分における次のアミノ酸であるのが好ましい。C末端アミノ酸はアミド化されていてもよい。

#### 【0066】

好ましくは、式13のC末端延長部分のX<sub>aaa<sub>1</sub></sub>からX<sub>aaa<sub>10</sub></sub>のうちの少なくとも1つが存在する。好ましくは、当該C末端延長部分のX<sub>aaa<sub>1</sub></sub>からX<sub>aaa<sub>10</sub></sub>のうちの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9個又は全てが存在する。

#### 【0067】

更に好ましくは、本発明の任意の態様及び実施態様においても使用できる、他のC末端延長部分は、以下から選択される。

10

#### 【表8】

配列番号85	S R T S P P P
配列番号86	S R T S P P P - N H <sub>2</sub>
配列番号87	S S T S P R P P S S
配列番号88	S S T S P R P P S S - N H <sub>2</sub>
配列番号89	S R T S P P P K (W)
配列番号90	S R T S P P P K (W) - N H <sub>2</sub>
配列番号91	S R T S P P P C
配列番号92	S R T S P P P C - N H <sub>2</sub>

20

#### 【0068】

本発明のV P A C 2受容体ペプチドアゴニストは、公知のV P A C 2受容体ペプチドアゴニストよりも選択性、効果及び/又は安定性が強化されている。特に、Cキャッピング配列としての、エキセンディン-4のC末端配列又はこのC末端配列の変異型の付加により、意外なことにV P A C 2受容体選択性が増加し、またタンパク質分解に対する安定性が増加した。

#### 【0069】

V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト上の特定の残基への1分子以上のP E Gの共有結合により、非P E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストと比較して、半減期が長く、クリアランスの減少した、生物学的に活性を有するP E G化されたV P A C 2受容体ペプチドアゴニストが得られる。

30

#### 【0070】

用語「V P A C 2」は、本発明のアゴニストが活性化する具体的な受容体(Lutzら、F E B S Lett. , 458: 197 - 203 (1999); Adamouら、Biochem. Biophys. Res. Commun. , 209: 385 - 392 (1995))を指す用語として用いる。この用語はまた、本発明のアゴニストを指す用語としても用いる。

#### 【0071】

本発明の「選択的なV P A C 2受容体ペプチドアゴニスト」又は「V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト」は、選択的にV P A C 2受容体を活性化し、インスリン分泌を誘導するペプチドのことを指す。好ましくは、本発明の選択的なV P A C 2受容体ペプチドアゴニストの配列は、28~40の天然及び/又は非天然のアミノ酸を有し、更にC末端延長部分を含んでもよく、又は含まなくともよい。

40

#### 【0072】

「選択的なP E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト」又は「P E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト」とは、1分子以上のポリエチレンギリコール(P E G)が共有結合している選択的なV P A C 2受容体ペプチドアゴニスト又はその誘導体を指し、各P E Gは、アミノ酸(システイン若しくはリジン)、K(W)若しくはK(C O(C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S H)、又はペプチドのカルボキシ末端に結合する。

50

#### 【0073】

選択的な P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストは C 末端延長部分を有してもよい。本発明の「C 末端延長部分」とは 1 ~ 13 の天然若しくは非天然のアミノ酸配列を含んでなり、ペプチド結合を介して C 末端延長部分の N 末端が上記配列の C 末端と結合している。C 末端延長部分のいかななる C y s 、 L y s 、 K ( W ) 又は K ( C O ( C H <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> S H ) 残基も P E G 分子と共有結合してもよく、及び / 又は、 C 末端延長部分のカルボキシ末端アミノ酸に P E G 分子が共有結合していてもよい。

## 【 0 0 7 4 】

C 末端延長部分に関する、本発明で用いられる「結合する」の用語には、ペプチド配列の C 末端にアミノ酸若しくは化学基が直接付加若しくは結合することが包含される。

## 【 0 0 7 5 】

所望により、選択的な P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストは N 末端修飾を有してもよい。本明細書で用いられる「N 末端修飾」の用語には、ペプチドの N 末端にアミノ酸若しくは化学基が直接付加若しくは結合して化学基を形成することが包含され、それによりペプチドの N 末端に窒素原子が導入される。

## 【 0 0 7 6 】

N 末端修飾には、V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストの配列への 1 つ以上の天然又は非天然アミノ酸の付加が包含されてもよく、好ましくは 10 アミノ酸以下であり、最も好ましくは 1 アミノ酸の付加である。N 末端に付加させることができる天然アミノ酸としては、メチオニン及びイソロイシンが挙げられる。N 末端に付加する修飾アミノ酸として D - ヒスチジンを用いてもよい。あるいは、以下のアミノ酸を N 末端に付加してもよい。

配列番号 93 : S e r T r p - C y s - G l u - P r o G l y - T r p - C y s - A r g ( ここで、 A r g がペプチドアゴニストの N 末端と結合する ) 。好ましくは、当該 N 末端に付加させるいずれのアミノ酸も、ペプチド結合で当該 N 末端と結合する。

## 【 0 0 7 7 】

本発明の用語「結合する」には、N 末端修飾に関して用いる場合、V P A C 2 受容体アゴニストの N 末端に直接アミノ酸若しくは化学基を付加若しくは結合させることが包含される。上記の N 末端修飾の付加は、ペプチド結合を形成させる通常の結合条件下で実施できる。

## 【 0 0 7 8 】

ペプチドアゴニストの N 末端にアルキル基 ( R ) ( 好ましくは C <sub>1</sub> - C <sub>16</sub> アルキル基 ) を付加して修飾し、 ( R ) N H - を形成させてもよい。

## 【 0 0 7 9 】

あるいは、ペプチドアゴニストの N 末端に式 - C ( O ) R <sup>1</sup> の基を付加して修飾し、式 R <sup>1</sup> C ( O ) N H - のアミドを形成させてもよい。式 R <sup>1</sup> C O O H の有機酸と反応させて式 - C ( O ) R <sup>1</sup> 基を付加してもよい。アシル化反応を使用したアミノ酸配列の N 末端への修飾は、従来技術において公知である ( 例えは G o z e s ら、 J . P h a r m a c o l E x p T h e r 、 273 : 161 - 167 ( 1995 ) を参照 ) 。式 - C ( O ) R <sup>1</sup> の基の添加により N 末端において尿素基又はカルバメート基が形成される ( 国際公開第 2004 / 06839 号、国際公開第 01 / 23240 号パンフレットを参照 ) 。また、ピログルタミン酸又は 6 - アミノヘキサン酸を付加することにより N 末端を修飾してもよい。

## 【 0 0 8 0 】

ペプチドアゴニストの N 末端に式 - S O <sub>2</sub> R <sup>5</sup> の基を付加して修飾し、 N 末端でスルフォニアミド基を形成させてもよい。

## 【 0 0 8 1 】

ペプチドアゴニストの N 末端をコハク無水物と反応させて修飾し、 N 末端でスクシンイミド基を形成させてもよい。スクシンイミド基によりペプチドの N 末端に窒素原子が組み込まれる。

## 【 0 0 8 2 】

あるいは、メチオニンスルホキシド ( ビオチニル - 6 - アミノヘキサン酸 ) 又は - C ( = N H ) - N H <sub>2</sub> の付加により N 末端を修飾してもよい。 - C ( = N H ) - N H <sub>2</sub> の付加は

10

20

30

40

50

グアニド化修飾であり、それにより N 末端アミノ酸の末端 NH<sub>2</sub> が - NH C (= NH) - NH<sub>2</sub> となる。

【 0 0 8 3 】

N 末端修飾及び C 末端延長部分を含む本発明の大部分の配列中には、標準的な 1 文字又は 3 文字表記で表される 20 の天然アミノ酸が含まれる。使用する他の表記は、以下の通り定義する。

C 6 = ヘキサノイル基、

d = 各アミノ酸の D 型アイソフォーム（非天然）（例えば、d A = D - アラニン、d S = D - セリン、d K = D - リジン）、

h R = ホモアルギニン、

A i b = アミノイソ酪酸、

O M e = メトキシ基、

N l e = N o r - ロイシン、

N M e = アミノ酸の アミノ基に結合する N メチル基（例えば、N M e A = N - メチルアラニン、N M e V = N - メチルバリン）、

O r n = オルニチン、

K ( C O ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> S H ) = - ( 3 ' - メルカプトプロピオニル ) - リジン、

K ( W ) = - ( L - トリプトフィル ) - リジン、

A b u = - アミノ - n - 酪酸又は 2 - アミノブタノン酸、

C i t = シトルリン、

K ( A c ) = - アセチルリジン、

P E G = ポリエチレンギリコール、

P E G 4 0 K = 4 0 , 0 0 0 ダルトンの P E G 分子、

P E G 3 0 K = 3 0 , 0 0 0 ダルトンの P E G 分子、

P E G 2 0 K = 2 0 , 0 0 0 ダルトンの P E G 分子。

【 0 0 8 4 】

V I P は、28 のアミノ酸を有する単一配列として天然に存在する。しかしながら、P A C A P は、アミド化されたカルボキシル基を有する、38 アミノ酸のペプチド ( P A C A P - 38 ) 又は 27 アミノ酸のペプチド ( P A C A P - 27 ) のいずれかとして存在する ( Miyata et al., Biochem Biophys Res Commun, 170 : 643 - 648 ( 1990 ) )。V I P 、P A C A P - 27 及び P A C A P - 38 の配列は以下の通りである。

【 表 9 】

ペプチド	配列番号#	配列
VIP	配列番号 1 4	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLN SILN
PACAP-27	配列番号 1 5	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AAVL-NH <sub>2</sub>
PACAP-38	配列番号 1 6	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AAVLGKRYQRVKN K-NH <sub>2</sub>

【 0 0 8 5 】

本明細書の用語「天然アミノ酸」とは、ヒト遺伝暗号によってコードされる 20 のアミノ酸（すなわち 20 の標準的なアミノ酸）を意味する。これらの 20 のアミノ酸とは、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリンである。

【 0 0 8 6 】

「非天然アミノ酸」の例としては、合成アミノ酸及び体内で修飾されたそれらが挙げられる。これらには、D - アミノ酸、アルギニン様アミノ酸（例えばホモアルギニン）、及び側鎖に余分のメチレン基を有する他のアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、修飾アミノ酸（

10

20

30

40

50

例えばノルロイシン、(イソプロピル)リジン(リジンの側鎖アミンはイソプロピル基で修飾)などがあげられる。またオルニチン、アミノイソ酪酸及び2-アミノブタン酸などのアミノ酸も含まれる。

#### 【0087】

本発明の用語「選択的」とは、V PAC 2受容体ペプチドアゴニストが、他の公知の受容体よりもV PAC 2受容体との高い選択性を有することを指す。選択性の程度は、V PAC 2受容体結合アフィニティ:V PAC 1受容体結合アフィニティの比率、又は、V PAC 2受容体結合アフィニティ:PAC 1受容体結合アフィニティの比率により算出される。なお、結合アフィニティは実施例4にて後述するとおりに算出される。

#### 【0088】

「インスリン分泌活性」とは、高いグルコース濃度に応答してインスリン分泌を促進する能力のことを指し、これにより細胞によるグルコース取り込みが開始され、血漿中グルコース濃度が減少する。インスリン分泌活性は公知の方法で評価することができ、例えばV PAC 2受容体結合活性又は受容体活性化(例えばインスリノーマ細胞系又は小島によるインスリン分泌)を測定する試験、静脈グルコース負荷試験(IVGTT)、腹膜内グルコース負荷試験(IPGTT)、並びに経口グルコース負荷試験(OGTT)などがあげられる。インスリン分泌活性は、ヒトの場合はインスリン濃度又はC-ペプチド濃度を測定することによって日常的に測定する。本発明の選択的PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストはインスリン分泌活性を有する。

#### 【0089】

本発明の「In vitro効果」とは、細胞ベースのアッセイにおいてV PAC 2受容体を活性化するペプチドの能力の基準のことを指す。In vitro効果は「EC<sub>50</sub>」として表し、それは単一の用量反応実験において、活性上昇の最大に対して50%の結果を生じさせる化合物の有効濃度を意味する。本発明の場合、In vitro効果は、DiscovRx及びAlpha Screenの2つの異なるアッセイを使用して算出する。これらのアッセイの詳細は実施例3及び5を参照。これらのアッセイは異なる方法で実施されるものの、得られる結果は通常2つのアッセイ間における相関関係を示す。

#### 【0090】

「血漿中半減期」という用語は、循環する当該分子の半分が血漿中でクリアランスされるまでにかかる時間のことを指す。あるいは「半減時間」の用語を用いることもある。血漿中半減期又は半減時間に関して「延長された」又は「長期化された」というときは、PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの半減期が、同じ条件下における参照分子(例えば非PEG化形態のペプチド又は天然ペプチド)のそれと比較して統計学的に有意に増加していることを意味する。本願明細書に記載する半減期は除去の半減期であり、すなわち対数直線で表される除去速度を指す。当業者であれば、半減期は派生パラメータであり、クリアランス及び分布体積の関数であることを認識する。

#### 【0091】

クリアランスとは、薬を除去する生体の能力の基準のことを指す。例えば薬剤の修飾によりクリアランスが低下した場合、半減期は長期化すると考えられる。しかしながらこの相互関係は、分布量に変化がない場合にのみ正確なものとなる。対数直線における最終相の半減期(t<sub>1/2</sub>)、クリアランス(C)及び分布(V)体積における、利用可能な近似関係は、t<sub>1/2</sub> ~ 0.693(V/C)の方程式で表される。クリアランスとはどれくらいの薬剤が除去されたかを指示するものではなく、むしろ当該除去によって薬剤が完全に除去されるべき生体液(例えば血液かプラズマ)の量のことを指す。クリアランスは単位時間あたりの体積として表される。

#### 【0092】

本発明で用いる「配列同一性(%)」とは、配列のアラインメントを取ったとき、それらが同様の位置又は領域において同様のアミノ酸である(同一か若しくは保存的に置換されている場合)ことを示す場合に用い、その場合、同一若しくは保存的に置換されているアミノ酸とは、元となるタンパク質と比較して、当該タンパク質の活性又は機能を変えな

10

20

30

40

50

いそれらのことを指す。例えば、各々少なくとも 85% の相同性を有する 2 つのアミノ酸配列とは、最適なアラインメントで最高 3 つのギャップを許容した場合、同様の位置において少なくとも 85% 同様（同一若しくは保存的に置換された残基）であることを指すが、但しギャップに関しては、合計 15 以下のアミノ酸残基が影響を受けない。

【0093】

本発明の配列同一性（%）の算出に使用する参照ペプチドを以下に示す。

【表 10】

P487	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAibOrnYLQSI
配列番号 84	OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>

10

【0094】

配列同一性（%）は、本発明に包含されるペプチドと P487（配列番号 84）などの参照ペプチドとの間における異なる残基の数を決定し、その数を、参照ペプチドのアミノ酸数（例えば P487 では 39 アミノ酸）で除算し、その結果に 100 を乗算し、更に 100 からその結果の数を減算することにより算出できる。例えば、P487 と異なる 4 つのアミノ酸を有する 39 アミノ酸を有する配列は、90%（例えば 100 - (4 / 39) × 100）の配列同一性を有する。39 のアミノ酸より長い配列の場合、P487 配列と異なる残基の数は、上記の算出に供される 39 アミノ酸を超える分のアミノ酸を含む。例えば、40 アミノ酸を有し、P487 配列の 39 アミノ酸とは 4 つのアミノ酸が異なり、P487 配列に存在しないアミノ酸がカルボキシ末端に 1 つ添加されている場合、P487 と異なるアミノ酸は合計 5 つとなる。すなわち、この配列は 87%（例えば 100 - (5 / 39) × 100）の配列同一性（%）を有する。配列同一性の程度は公知の方法を使用して算出してもよい（Wilbur, W. J. 及び Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 726-730 (1983) 及び Myers E. 及び Miller W., Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17 (1988) を参照）。相同性の程度を算出する際に使用できる 1 つのプログラムとしては MegAlign リップマン - ピアソンの 1 ペア方法（デフォルトパラメータを使用する）が挙げられ、Lasergene system の一部として DNAstar Inc.社, 11128, Self park Street, Madison, Wisconsin, 53715, USA から入手できる。使用できる他のプログラムとしては Clustal W が挙げられる。これは Thompson らが開発した、DNA 又はタンパク質配列の多数配列アラインメントパッケージである（Nucleic Acids Research, 22 (22): 4673-4680 (1994)）。このツールは関連する配列の異種間比較を実行し、配列の保存性を解析するのに有用である。Clustal W は DNA 又はタンパク質のための多目的用の多数配列アラインメントプログラムである。これは異なる配列における、生物学的に有意義な多数の配列のアラインメントを生じさせる。選択された配列中に存在する、最高にマッチする部分を算出し、相同性、類似性及び相違が視覚可能となるようにそれらを整列させる。進化上の関係は、Cladogram 又は Phylogenograms を観察することにより解析できる。

20

30

【0095】

本発明の選択的な PEG 化 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニストの配列は V PAC 2 受容体に対して選択的であり、好ましくは P487（配列番号 84）と 60% ~ 70%、60% ~ 65%、65% ~ 70%、70% ~ 80%、70% ~ 75%、75% ~ 80%、80% ~ 90%、80% ~ 85%、85% ~ 90%、90% ~ 97%、90% ~ 95% 又は 95% ~ 97% の配列同一性を有する。好ましくは、当該配列は P487（配列番号 84）と 82% 超の配列同一性を有する。好ましくは、当該配列は P487（配列番号 84）と 90% 超の配列同一性を有する。更に好ましくは、当該配列は P487（配列番号 84）と 92% 超の配列同一性を有する。より更に好ましくは、当該配列は P487（配列番号 84）と 95% 又は 97% 超の配列同一性を有する。

40

【0096】

50

本明細書で用いられる用語「C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>アルキル」とは、1~16個の炭素原子を有する一価の飽和した直鎖状、分岐状若しくは環状の基であり、環状であるときは3~16個の炭素原子を有する炭化水素を意味する。すなわち、用語「C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>アルキル」には例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ヘプチル、n-オクチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシルが包含される。C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>アルキル基は、例えばアリール、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ基、-OH、ハロゲン、-CF<sub>3</sub>及び-SHなどの1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい。

## 【0097】

本発明の用語「C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル」とは、1~6個の炭素原子を有する一価の飽和した直鎖状、分岐状若しくは環状の基であり、環状であるときは3~6個の炭素原子を有する炭化水素を意味する。すなわち、用語「C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル」には、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシルが包含される。C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基は1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい。

10

## 【0098】

本発明の用語「C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルケニル」とは、少なくとも1つの二重結合を有し、2~6個の炭素原子を有する一価の飽和した直鎖状、分岐状若しくは環状の基であり、環状であるときは3~6個の炭素原子を有する炭化水素を意味する。すなわち、用語「C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルケニル」にはビニル、プロブ-2-エニル、ブト-3-エニル、ペント-4-エニル及びイソプロペニルが包含される。C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルケニル基は1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい。

20

## 【0099】

本発明の用語「C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニル」とは、少なくとも1つの三重結合を有し、2~6個の炭素原子を有する一価の直鎖状又は分枝鎖状の炭化水素基を意味する。すなわち、用語「C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニル」には、プロブ-2-イニル、ブト-3-イニル及びペント-4-イニルが包含される。C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニルは1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい。

30

## 【0100】

本発明の用語「C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ」とは、1~6個の炭素原子を有し、二価のOを介して置換部位と結合している、一価の非置換の飽和した直鎖状若しくは分岐鎖状の炭化水素を意味する。すなわち、用語「C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ」には例えばメトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ及びtert-ブトキシが包含される。C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシ基は1つ以上の置換基で任意に置換されてもよい。

30

## 【0101】

「ハロ」又は「ハロゲン」の用語は、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素を意味する。

## 【0102】

用語「アリール」とは、それのみ又は基の一部として使用する場合、フェニル基などの5~10員からなる芳香族若しくは複素環式芳香族基、5又は6員からなる単環の複素環式芳香族基（その各員は利用できる置換部位の数によって1、2、3、4又は5個の置換基で任意に置換されてもよい）、ナフチル基、又は8-、9-又は10員からなる二環式複素環式芳香族基（によって、任意に置換されてもよいことがありえる）（その各員は利用できる置換部位の数によって1、2、3、4、5又は6個の置換基で任意に置換されてもよい）のことを指す。このアリールの定義において、適切な置換基としてはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニル、-NH<sub>2</sub>、-OH、ハロゲン、-SH及びCF<sub>3</sub>が挙げられる。

40

## 【0103】

本発明の用語「アリールC<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキル」とは、アリールで置換されたC<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキルを意味する。すなわち、用語「アリールC<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキル」には、ベンジル、1-フ

50

エニルエチル（-メチルベンジル）、2-フェニルエチル、1-ナフタレンメチル又は2-ナフタレンメチルが包含される。

【0104】

「ナフチル」という用語には、1-ナフチル及び2-ナフチルが包含される。1-ナフチルが好ましい。

【0105】

本発明の用語「ベンジル」とは、-CH<sub>2</sub>-基を介して置換部位と結合する一価の非置換フェニル基を意味する。

【0106】

本発明の用語「5又は6員環の単環式複素環式芳香族基」とは、環中に合計5又は6個の原子を有する単環式芳香族基であって、それらの1~4個の原子がN、O及びSから各々独立に選択されるものを意味する。好ましい基は、N、O及びSから各々独立に選択される1又は2個の原子を環中に有してなる。5員の単環式複素環式芳香族基の例としては、ピロリル（またアゾリルとも呼ばれる）、フラニル、チエニル、ピラゾリル（また1H-ピラゾリル及び1,2-ジアゾリルと呼ばれる）、イミダゾリル、オキサゾリル（また1,3-オキサゾリルと呼ばれる）、イソキサゾリル（また1,2-オキサゾリルと呼ばれる）、チアゾリル（また1,3-チアゾリルと呼ばれる）、イソチアゾリル（また1,2-チアゾリルと呼ばれる）、トリアゾリル、オキサゾリル、チアジアゾリル、テトラゾリル、オキサトリアゾリル及びチアトリアゾリルが挙げられる。6員の単環式複素環式芳香族の例としては、ピリジニル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル及びトリアジニルが挙げられる。

10

20

30

40

【0107】

本発明の用語「8、9又は10員の二環式複素環式芳香族基」とは、環中に合計8、9又は10個の原子を有する融合した二環式芳香族基であって、それらの1~4個の原子がN、O及びSから各々独立に選択されるものを意味する。好ましい基は、環中に1~3個の、N、O及びSから各々独立に選択される原子を有する。好適な8員の二環式複素環式芳香族基としては、イミダゾ[2,1-b][1,3]チアゾリル、チエノ[3,2-b]チエニル、チエノ[2,3-d][1,3]チアゾリル及びチエノ[2,3-d]イミダゾリルが挙げられる。好適な9員の二環式複素環式芳香族基としては、インドリル、イソインドリル、ベンゾフラニル（またベンゾ[b]フラニルと呼ばれる）、イソベンゾフラニル（またベンゾ[c]フラニルと呼ばれる）、ベンゾチエニル（またベンゾ[b]チエニルと呼ばれる）、イソベンゾチエニル（またベンゾ[c]チエニルと呼ばれる）、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、1,3-ベンゾキサゾリル、1,2-ベンズイソキサゾリル、2,1-ベンズイソキサゾリル、1,3-ベンゾチアゾリル、1,2-ベンゾイソチアゾリル、2,1-ベンゾイソチアゾリル、ベンゾトリアゾリル、1,2,3-ベンゾキサジアゾリル、2,1,3-ベンゾキサジアゾリル、1,2,3-ベンゾチアジアゾリル、2,1,3-ベンゾチアジアゾリル、チエノピリジニル、ブリニル及びイミダゾ[1,2-a]ピリジンが挙げられる。好適な10-会員を有する二環式複素環式芳香族基としては、キノリニル、イソキノリニル、シノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、1,5-ナフチリジル、1,6-ナフチリジル、1,7-ナフチリジル及び1,8-ナフチリジル。

30

40

【0108】

本発明の用語「PEG」とは、ポリエチレングリコール分子を意味する。その典型的な形態においては、PEGは末端にヒドロキシル基を有する直鎖状ポリマーであり、式HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH（式中、nは約8~約4000）で表される。末端の水素原子は保護基（例えばアルキル又はアルカノール基）で置換されてもよい。好ましくは、PEGは少なくとも1つのヒドロキシ基、好ましくは末端ヒドロキシ基を有する。好ましくはこのヒドロキシ基を活性化し、ペプチドと反応させる。本発明にとり有用な多くの形態のPEGが存在する。多数のPEG誘導体が従来技術において公知であり、本発明への使用にも適している（米国特許第5445090号、第5900

50

461号、第5932462号、第6436386号、第6448369号、第6437025号、第6448369号、第6495659号、第6515100号及び第6514491号、並びにZalipsky、S.Bioconjugate Chem. 6) : 150 - 165、1995を参照)。本発明のV PAC 2受容体ペプチドアゴニストに共有結合するPEG分子は、特定のタイプに限定されない。PEG分子は好ましくは500~100,000Daの分子量である。PEGは直鎖状であってもよく、又は分岐状であってもよい。本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、1、2又は3個のPEG分子がペプチドに結合していてもよい。1、2個のPEG分子がPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト1分子当たりに存在するのがより好ましいが、複数のPEG分子がペプチド1分子に存在する場合は、3個以下で存在するのが好ましい。PEG分子の両端を亦モ若しくはヘテロ官能化し、2つ以上のV PAC 2受容体ペプチドアゴニストを架橋してもよいことが更に考察される。2つのPEG分子が存在する場合、当該PEG分子は好ましくは各々20,000DaのPEG分子であるか、又は各々30,000DaのPEG分子である。しかしながら、異なる分子量を有するPEG分子を用いてもよく、例えば1つが10,000DaのPEG分子でもう1つが30,000DaのPEG分子であってもよく、又は1つが20,000DaのPEG分子でもう1つが40,000DaのPEG分子であってもよい。

10

## 【0109】

本発明では、PEG分子はCys又はLys残基、又はC末端残基に共有結合してもよい。PEG分子はLys残基(K(W))の側鎖に結合するTrp残基に共有結合してもよい。あるいは、K(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)基をPEG化してK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S-PEG)を形成させてもよい。ペプチドアゴニスト中のいかなるLys残基もK(W)又はK(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)で置換してもよく、それらを更にPEG化してもよい。更に、ペプチドアゴニストのいかなるCys残基も修飾システイン残基(例えばhC)で置換してもよい。修飾Cys残基はPEG分子に共有結合してもよい。

20

## 【0110】

本発明の用語「PEG化」とは、本発明のV PAC 2受容体ペプチドアゴニストに、上記の通りに1つ以上のPEG分子が共有結合することを意味する。

## 【0111】

本発明の好ましい実施態様は、配列番号17~45及び94~112から選択されるペプチド配列、及び配列番号5、6、7、8、9、10、11及び12から選択されるC末端延長部分を含んでなるPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの提供に関する。C末端延長部分が配列番号11又は配列番号12であるのが特に好適である。

30

## 【0112】

本発明のより好ましい実施態様は、配列番号17~45及び94~112から選択されるペプチド配列、及び配列番号5、6、7、8、9、10、11及び12から選択されるC末端延長部分を含んでなるPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの提供に関し、当該V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは更にN末端修飾を含んでなり、当該修飾がアセチル、プロピオニル、ブチリル、ペンタノイル、ヘキサノイル、メチオニン、メチオニンスルホキシド、3-フェニルプロピオニル、フェニルアセチル、ベンゾイル、ノルロイシン、D-ヒスチジン、イソロイシン、3-メルカプトプロピオニル、ビオチニル-6-アミノヘキサン酸(6-アミノカプロン酸)及び-C(=NH)-NH<sub>2</sub>の付加である。本実施態様では、N末端修飾がアセチル又はヘキサノイルの付加であるのがより好ましい。

40

## 【0113】

更なる本発明の好ましい実施態様は、式4(配列番号4)のアミノ酸配列、及び配列番号5、6、7、8、9、10、11及び12から選択されるC末端延長部分を含んでなるPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの提供に関し、当該PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは更にN末端修飾を含んでなり、当該修飾がアセチル、プロピオニル、ブチリル、ペンタノイル、ヘキサノイル、メチオニン、メチオニンスルホキシド、

50

3 - フェニルプロピオニル、フェニルアセチル、ベンゾイル、ノルロイシン、D - ヒスチジン、イソロイシン、3 - メルカプトプロピオニル、ビオチニル - 6 - アミノヘキサン酸(6 - アミノカプロン酸)及び - C (= NH) - NH<sub>2</sub>の付加である。本実施態様では、N末端修飾がアセチル又はヘキサノイルの付加であるのがより好ましい。

#### 【0114】

本発明のより好ましい実施態様は、式4(配列番号4)のアミノ酸配列を含んでなるPEG化V<sub>1</sub>P<sub>1</sub>A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>受容体ペプチドアゴニストの提供に関し、式中、X<sub>aa15</sub>はAibであり、X<sub>aa20</sub>はAibであり、X<sub>aa12</sub>、X<sub>aa21</sub>、X<sub>aa27</sub>及びX<sub>aa28</sub>は全てOrnであり、C末端延長部分は配列番号5、6、7、8、9、10、11及び12から選択され、当該PEG化V<sub>1</sub>P<sub>1</sub>A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>受容体ペプチドアゴニストは更にN末端修飾を含んでなり、当該修飾がアセチル、プロピオニル、ブチリル、ペントノイル、ヘキサノイル、メチオニン、メチオニンスルホキシド、3 - フェニルプロピオニル、フェニルアセチル、ベンゾイル、ノルロイシン、D - ヒスチジン、イソロイシン、3 - メルカプトプロピオニル、ビオチニル - 6 - アミノヘキサン酸(6 - アミノカプロン酸)及び - C (= NH) - NH<sub>2</sub>の付加である。本実施態様では、より好ましくは、X<sub>aa15</sub>がAibであり、X<sub>aa20</sub>がAibであり、X<sub>aa12</sub>、X<sub>aa21</sub>、X<sub>aa27</sub>及びX<sub>aa28</sub>が全てOrnであり、X<sub>aa8</sub>がGluであり、X<sub>aa9</sub>がGlnであり、X<sub>aa10</sub>がTyr(OME)である。特に好ましくは、X<sub>aa15</sub>がAibであり、X<sub>aa20</sub>がAibであり、X<sub>aa12</sub>、X<sub>aa21</sub>、X<sub>aa27</sub>及びX<sub>aa28</sub>が全てのOrnであり、X<sub>aa8</sub>がGluであり、X<sub>aa9</sub>がGlnであり、X<sub>aa10</sub>がTyr(OME)であり、X<sub>aa23</sub>及び/又はX<sub>aa25</sub>がAibである。

#### 【0115】

タンパク質のPEG化により、治療用にペプチド又はタンパク質を使用することに付随する、多数の薬理学的、及び毒物的/免疫学的な課題が解決できる。しかしながら、個々のペプチドによっては、PEG化されたペプチドの形態が、非PEG化されたペプチドの形態と比較して生物活性が顕著に損なわれる場合もありうる。

#### 【0116】

PEG化タンパク質の生物活性は、例えば以下のような要因の影響を受ける。

i) PEG分子のサイズ、

ii) 結合の具体的な部位、

iii) 修飾の程度、

iv) 有害なカップリング条件、

v) 結合にリンカーが用いられるか、あるいはポリマーが直接結合するか、

vi) 有害な副生成物の生成、

vii) 活性化ポリマーによるダメージ、又は、

viii) 電荷の保持。

例えば、サイトカインのPEG化により、PEG化が有しる効果が示される。採用するカップリング反応によっては、サイトカインのポリマー修飾により生物活性の劇的な減少につながりうる(Francis, G. E. ,ら、(1998)、PEGylation of cytokines and peptides: the importance of biological optimization of coupling techniques, Int'l. J. Hem. 68: 1 - 18)。PEG化ペプチドの生物活性の維持は、タンパク質の場合よりも多くの課題を含む。ペプチドはタンパク質より小分子であるため、PEG化による修飾は生物活性により大きな影響を及ぼすことが考えられる。

#### 【0117】

本発明のV<sub>1</sub>P<sub>1</sub>A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>受容体ペプチドアゴニストを1分子以上のPEGと共有結合させて修飾することにより、タンパク質分解及び腎クリアランスが遅延され、薬物動態プロファイルが全体的に改善された。PEG化によりV<sub>1</sub>P<sub>1</sub>A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>受容体ペプチドアゴニストの見かけのサイズが増加し、そのため腎臓濾過が減少し、下生体内における分布が変化する。P

EG化により、V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト中の抗原性エピトープが保護され、それにより網内系クリアランス及び免疫系による認識が低減し、更にタンパク質分解酵素（例えばD P P - I V）による分解が低減する。

【0118】

通常であれば、小分子の、生物学的に活性を有するV P A C 2受容体ペプチドアゴニストに対する1分子以上のP E Gの共有結合により、例えば、固有の二次構造及び生理活性形態が不安定になることや、生物活性の減少によるアゴニストへの悪影響の危険性が生じ、当該アゴニストの治療的使用にとり不適切なものとなることが予想されるしかしながら、V P A C 2受容体ペプチドアゴニストの特定の残基への1分子以上のP E Gの共有結合により、驚くべきことに、非P E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストと比較して、高い生物学的活性を有し、長期の半減期を有し、及びクリアランスの低下したP E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストが得られることを見出し、その発見に基づき本発明を完成させるに至った。本発明の化合物には、選択的なP E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストが含まれる。

10

【0119】

V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト中の潜在的なP E G化部位を決定するため、セリンのスキャニングを実施した。S e r残基をペプチドの特定の部位で置換し、S e r修飾されたペプチドに関し、それによる効果及び選択性を試験する。あるS e r置換による薬剤の効果に対する影響が最小であり、当該S e r修飾ペプチドがV P A C 2受容体に選択的である場合、そのS e r残基を更にC y s又はL y s残基で置換し、その部分を直接的又は間接的なP E G化部位として用いる。間接的な残基のP E G化とは、P E G化部位の残基と結合する化学基又は残基をP E G化することを指す。L y sの間接的なP E G化としては、K (W)及びK (C O (C H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)のP E G化が挙げられる。

20

【0120】

本明細書に記載した発明は、P E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストを提供する。P E G化により選択的なV P A C 2受容体ペプチドアゴニストの半減期が長期化され、少なくとも1時間、好ましくは少なくとも3、5、7、10、15、20又は24時間、最も好ましくは少なくとも48時間の除去半減期を有するP E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストが得られる。本発明のP E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストは、好ましくは200mL/h/kg以下、より好ましくは180、150、120、100、80、60mL/h/kg以下、最も好ましくは50、40又は20mL/h/kg未満のクリアランス値を示す。

30

【0121】

本発明にはまた、V P A C 2受容体ペプチドアゴニストのペプチド配列のC末端にある特定のアミノ酸を添加することによりペプチドが保護され、また活性、選択性及び/又は薬理的効果を強化できるという発見が含まれる。例えば、これらのC末端延長部分はペプチドの螺旋構造を安定させ、酵素による開裂を受け易いC末端付近の部位を安定化させることができる。更にまた、本願明細書に開示されるC末端延長部分のペプチドの多くが、V P A C 2受容体に対して選択的であり、V I P、P A C A P及び他の公知のV P A C 2受容体ペプチドアゴニストより強力である。好ましいC末端延長部分の例としては、Cキャッピング配列としてのエキセンディン4の延長部分ペプチドである。エキセンディン4は、G i l a M o n s t e r (H e l o d e r m a S u s p e c t u m)の唾液中に含まれる物質である(Engら、J. B i o l. C h e m., 267(11): 7402-7405(1992))。C末端延長部分の他の例としては、ヘロデルミン(h e l o d e r m i n)及びヘロスペクチン(h e l o s p e c t i n)のC末端配列である。ヘロデルミン及びヘロスペクチンはG i l a M o n s t e rの唾液中にもみられる。

40

【0122】

更に、V P A C 2受容体ペプチドアゴニストのN末端修飾により、薬理効果の強化及び/又はD P P - I V開裂に対する安定性の強化が得られることを見出した。

【0123】

50

VIP 及び幾つかの公知のV PAC 2受容体ペプチドアゴニストは様々な酵素による開裂を受け易いため、短い *in vivo* 半減期を示す。V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの様々な酵素切断部位は後述する。切断部位はVIP(配列番号14)のアミノ酸部位との関連において記載し、本願明細書に記載の配列にも適用できる。

## 【0124】

酵素ジペプチジル-ペプチダーゼ-IV(DPP-IV)によるペプチドアゴニストの開裂は、位置2(VIPのSer)及び位置3(VIPのアスパラギン酸)との間で起きる。本発明のアゴニストへのN末端修飾の付加によって、この領域がDPP-IVによる切断に対してより安定になる。DPP-IVによる切断に対する安定性を改善できるN末端修飾の例としては、アセチル、プロピオニル、ブチリル、ペントノイル、ヘキサノイル、メチオニン、メチオニンスルホキシド、3-フェニルプロピオニル、フェニルアセチル、ベンゾイル、ノルロイシン、D-ヒスチジン、イソロイシン、3-メルカプトプロピオニル、ビオチニル-6-アミノヘキサン酸(6-アミノカプロン酸)及び-C(=NH)-NH<sub>2</sub>の付加が挙げられる。N末端修飾がアセチル又はヘキサノイルの付加であるのがより好ましい。

10

## 【0125】

野生型VIP中のキモトリプシン切断部位は、アミノ酸10と11(チロシン及びトレオニン)の間、及びアミノ酸22と23(チロシン及びロイシン)の間に存在する。位置10及び/又は11及び位置22及び/又は23における置換により、これらの部位でのペプチドの安定性が改善されうる。例えば、位置10及び/又は位置22のチロシンのTyrosine(OME)による置換により安定性が向上しうる。

20

## 【0126】

野生型VIP中のトリプシン切断部位は、アミノ酸位置12と13の間に存在する。特定のアミノ酸置換(例えば位置12におけるオルニチン、及び位置13におけるアミノイソ酪酸)は、この部位でのペプチド切断に対する感受性を減少させる。

20

## 【0127】

野生型VIP、及び公知の多数のV PAC 2受容体ペプチドアゴニストにおいては、塩基性アミノ酸である位置14と15の間、及び位置20と21の間に切断部位が存在する。本発明の選択的なPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは、これらの部位が置換されているため、*in vivo*でのタンパク質分解に対する安定性が改善されている。これらの部位の好ましい置換により、トリプシン様酵素(トリプシンを含む)によるペプチド切断に対する感受性が減少する。例えば、位置15のアミノイソ酪酸、位置20のアミノイソ酪酸及び位置21のオルニチンによる置換は、安定性の向上につながりうるため全て好ましい。ペプチダーゼ切断に対する抵抗を有する、本発明の数種の代表的な選択的PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストにおける改良された安定性を実施例7において示す。

30

## 【0128】

切断部位はまた、野生型VIPのアミノ酸位置25と26の間にも存在する。

## 【0129】

V PAC 2受容体ペプチドアゴニスト中の、アミノ酸位置27、28、29、30及び31を含む領域もまた酵素分解を受け易い。C末端延長部分の付加によってペプチドアゴニストが神経エンドペプチダーゼ(NEP)に対してより安定になることもありえ、V PAC 2受容体に対する選択性が向上することもありえる。この領域はまたトリプシン様の酵素による攻撃を受け易い。それが生じる場合には、ペプチドアゴニストは更なるカルボキシペプチダーゼ活性によりそのC末端延長部分を喪失し、当該ペプチドが不活性な形態となりうる。この領域の分解に対する抵抗性を向上させる好ましい置換としては、位置27におけるオルニチン、位置28におけるオルニチン又はアミノイソ酪酸、及び位置29におけるオルニチンによる置換が挙げられる。

40

## 【0130】

選択的なPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは様々なペプチダーゼによる分

50

解抵抗性を有するが、それ以外にも、本発明の選択的なPEG化VPAC2ペプチド受容体アゴニストは、公知の幾つかのペプチドと比較して、VPAC2受容体に対する選択性を有し、薬理効果が強化され、及び/又は安定性が向上したペプチドであるという側面を有する。本発明の様々なPEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストにおける強化された効果及び選択性を実施例3、4及び5に示す。

【0131】

実施例3の表1は選択的なPEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストのリスト、及びそれらの対応するin vitro効果に関する試験結果を示す。好ましくは、本発明の選択的なPEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストは200nM未満のEC<sub>50</sub>値を示す。好ましくは、EC<sub>50</sub>値は100nM未満である。更に好ましくは、EC<sub>50</sub>値は50nM未満である。最も好ましくは、EC<sub>50</sub>値は30nM未満である。

10

【0132】

実施例4の表2は、PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニスト、並びにそれらのヒトVPAC2、VPAC1及びPAC1への受容体結合試験の結果のリストを示す。これらのアッセイの詳細は実施例4を参照。選択性の程度は、VPAC2受容体結合アフィニティ：VPAC1受容体結合アフィニティの比率、及びVPAC2受容体結合アフィニティ：PAC1受容体結合アフィニティの比率により算出される。好ましくは、本発明のアゴニストは、VPAC1及び/又はPAC1受容体の場合と比較して、VPAC2受容体に対する親和性が少なくとも50倍高い選択性比率として表される。好ましくは、このVPAC2に対する親和性は、VPAC1及び/又はPAC1よりも少なくとも100倍高い。更に好ましくは、このVPAC2に対する親和性は、VPAC1及び/又はPAC1よりも少なくとも200倍高い。より更に好ましくは、このVPAC2に対する親和性は、VPAC1及び/又はPAC1よりも500倍高い。より更に好ましくは、このVPAC2に対する親和性は、VPAC1及び/又はPAC1よりも少なくとも1000倍高い。

20

【0133】

本発明で用いられる「選択的VPAC2受容体ペプチドアゴニスト」にはまた、本願明細書に記載の当該アゴニストの製薬的に許容し得る塩が含まれる。本発明の選択的なVPAC2受容体ペプチドアゴニストは多くの酸性基、塩基性基及びそれらの両方の官能基を有するため、多くの無機塩基、並びに無機及び有機酸のいずれとも反応して塩を形成する。酸性付加塩の形成に通常使用される酸としては、塩酸、臭化水素、ヨウ素化水素、硫酸、リン酸などの無機酸、並びにp-トルエンスルホン酸、メタン硫酸、シュウ酸、p-ブロモフェニルスルホン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸、トリフルオロ酢酸などの有機酸が挙げられる。かかる塩の例としては、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、重亜硫酸塩、リン酸塩、モノリン酸水素塩、リン酸二水素塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カブリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオール酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スペリン酸塩、セバシン酸、フマル酸エステル、マレイン酸塩、ブチン-1,4-ジオン酸塩、ヘキシン-1,6-ジオン酸塩、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、フェニル酢酸、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、-ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、プロパンスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、マンデル酸塩、キシレンスルホン酸塩などが挙げられる。

30

【0134】

塩基付加塩としては、無機塩基（例えばアンモニウム、又はアルカリ若しくはアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩など）に由来するものが挙げられる。本発明の塩の調製に有用なそのような塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、炭酸カリウムなどが挙げられる。

40

50

## 【0135】

本発明の選択的PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストは、好ましくは医薬組成物として製剤化される。標準的な製剤技術として、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載の方法を採用してもよい。本発明の選択的PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストは、頬側、局所、経口、経真皮、鼻腔内、肺内投与用に製剤化してもよく、又は非経口投与用に製剤化してもよい。

## 【0136】

非経口投与としては、例えば筋肉内、静脈内、皮下、皮内、腹膜内投与などの全身投与が挙げられる。選択的PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストを、医薬組成物の一部として、製薬的に許容し得る担体、希釈剤又は賦形剤との組み合わせで患者に投与し、NIDDM又は以下に記載するような障害を治療することができる。当該医薬組成物は溶液状であってもよく、又は、非経口投与する場合には、PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストの懸濁液、又は二価の金属陽イオン（例えば亜鉛）と錯体を形成したPEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストの懸濁液としてもよい。適切な薬剤担体は、ペプチド又はペプチド誘導体と相互作用しない不活性成分を含有してもよい。非経口投与用の適切な薬剤担体としては、例えば滅菌した水、生理的食塩水、静菌食塩水（約0.9%mg/mLでベンジルアルコールを含有する食塩水）、リン酸緩衝食塩水（ハンクス溶液）、乳酸リンガー液などが挙げられる。適切な賦形剤の若干の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、トレハロース、ソルビトール及びマンニトールが挙げられる。

10

20

30

40

## 【0137】

本発明のPEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストは、その血漿中濃度が長期間有効な濃度範囲内に維持されるように製剤化してもよい。ペプチド薬の有効な経口輸送を妨げる主な障害としては、酸及び酵素によるペプチドの分解による弱い生物学的利用能、上皮膜による弱い吸収、及び消化管の酸性pH環境への暴露後のペプチドの不溶性化が挙げられる。本発明に包含される当該ペプチドを経口送達する様々なシステムが公知である。例えば、PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストをマイクロカプセル中に封入し、更に経口送達することが可能である。例えば、PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストは、充填材として市販されている、生物学的適合性を有する、生物分解性ポリマー、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）-COOH及びオリーブ油から構成されるマイクロカプセルに封入することができる（Josephら、Diabetologia 43:1319-1328 (2000)を参照）。他のタイプのマイクロカプセル技術はまた、AlkermetesからMedisorb（登録商標）及びProlease（登録商標）などの市販の生分解性ポリマーを利用して実施できる。Medisorb（登録商標）ポリマーは、いずれかのラクチド異性体から調製できる。ラクチド：グリコリド比率は0:100~100:0の間で変化させることができ、幅広い範囲のポリマー特性とすることができます。これにより、数週から数か月にわたる吸収時間を有する送達システム及びインプラント可能手段の設計が可能となる。またEmisphereが、ペプチド及びタンパク質の経口送達技術に関する記事として多数報告されている。例えば、Leone-bayらの国際公開第95/28838号が挙げられ、そこでは修飾アミノ酸を含有する特異的な担体により吸収を促進する技術に関して開示している。

50

## 【0138】

本願明細書に記載のPAC2受容体ペプチドアゴニストは、多種の疾患及び症状に罹患する患者の治療に使用できる。本発明に包含されるアゴニストは、VPAC2受容体と呼ばれる受容体においてそれらの生物学的效果を及ぼす。ゆえに、VPAC2受容体刺激に、又は、VPAC2受容体ペプチドアゴニストの投与に有利に反応する疾患及び/又は症状に罹患する患者は、本発明のPEG化VPAC2アゴニストにより治療されることができる。これらの患者は、「VPAC2アゴニストを用いた当該治療を必要とする」或いは「VPAC2受容体の活性化を必要とする」などと称される。

50

## 【0139】

本発明の選択的なPEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストは糖尿病（1型及び2型糖尿病（インスリン非依存性真性糖尿病又はNIDDM））の治療に使用できる。例えばNIDDMが進行する危険性を有する患者に対して、V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体アゴニストを用いて予防的処置を行ってもよい。かかる処置により、糖尿病及び糖尿病による合併症の発症を遅延させることも可能となる。本発明のアゴニストで処置することができる更なる患者としては、耐糖能の異常（IGT）（Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1) : S5, 1999）、又は空腹時血糖異常（IFG）（Charlesら、Diabetes 40: 796, 1991）を有する患者であって、体重が、患者の身長及び体格における標準体重より約25%高い患者、NIDDMに罹患する親を1人でも有する患者、妊娠糖尿病に罹患した患者及び例えば内因性インスリン分泌の減少から生じる代謝性障害を有する患者が挙げられる。選択的なPEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストを用いて、耐糖能異常を有する患者の症状のNIDDMへの発展の防止、臍臍-細胞の悪化の防止、-細胞増殖の誘導、-細胞機能の改善、休止中の-細胞の活性化、-細胞への細胞分化、-細胞複製の刺激及び-細胞アポトーシスの阻害などが可能となる。本発明の方法において、本発明のアゴニストを使用して治療若しくは予防できる疾患及び症状としては：若年性糖尿病（MODY）（Hermannら、Diabetes 43: 40, 1994）、成人の潜在性自己免疫疾患（LADA）（Zimmetら、Diabetes Med. 11: 299, 1994）、妊娠糖尿病（Metzger, Diabetes, 40: 197, 1991）、代謝性エックス症候群、異脂肪血症、高血糖、高インスリン血症、高トリグリセリド血症及びインスリン抵抗などが挙げられる。

10

20

30

## 【0140】

本発明の選択的PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストは、糖尿病の第2の原因の治療にも使用できる（Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1) : S5, 1999）。かかる第2の原因としては、グルココルチコイド過剰、成長ホルモン過剰、クロム親和性細胞腫及び薬物性糖尿病が挙げられる。糖尿病を誘導しうる薬剤としては、限定されないがピリミニル、ニコチン酸、グルココルチコイド、フェニトイン、甲状腺ホルモン、-アドレナリン作動薬、-インターフェロン及びHIV感染治療薬などが挙げられる。

40

## 【0141】

本発明の選択的PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストは、食物摂取の抑制及び肥満の治療に効果的である。

## 【0142】

本発明の選択的なPEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストはまた、アテローム硬化型疾患、高脂血症、高コレステロール血症、低HDL濃度、高血圧、原発性肺高血圧症、心血管疾患（アテローム性動脈硬化症、冠状動脈性心臓病及び冠状動脈疾患を含む）、脳血管疾患及び末梢性血管疾患などの障害の予防若しくは治療、並びに、狼瘡、多囊胞性卵巣症候群、発癌及び過形成の治療、男性及び女性の生殖障害、性的障害、潰瘍、睡眠障害、脂質及び炭水化物の代謝障害、体内時計の機能不全、成長障害、エネルギーホメオスタシスの障害、自己免疫疾患などの免疫疾患（例えば全身エリテマトーデス）、並びに急性及び慢性炎症性疾患、慢性関節リウマチ及び感染性ショックなどの治療に効果的である。

## 【0143】

本発明の選択的PEG化V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストはまた、例えば脂質蓄積細胞への細胞分化、インスリン感受性及び血糖値の調節に関連する生理的障害の治療に有用である。それらは例えば臍臍細胞の不全、インスリン分泌腫瘍の形成及び/又は自己免疫低血糖症（インスリンに対する自己抗体、インスリン受容体に対する自己抗体若しく

50

は臍臍細胞を活性化する自己抗体による)、アテローム動脈硬化性斑、炎症性反応、発癌、過形成、脂肪細胞遺伝子発現、脂肪細胞分化、臍臍細胞質量の減少、インスリン分泌、インスリンに対する組織感度、脂肪肉腫細胞増殖、多囊胞性卵巢の疾患、慢性無排卵、高アンドロゲン症、プロゲステロン産生、ステロイド合成、細胞内の酸化還元ポテンシャル及び酸化ストレスの形成をもたらすマクロファージの分化、N Oシンターゼ(N O S)産生、グルタミルペプチド転移酵素、カタラーゼ、血漿中トリグリセリド、H D L及びL D Lコレステロール濃度の上昇などが関与する。

#### 【0144】

更に、本発明の選択的PEG化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストは喘息の治療(B o l i nら、B i o p o l y m e r 3 7 : 5 7 - 6 6 ( 1 9 9 5 )、米国特許第5 6 7 7 4 1 9号、ポリペプチドR 3 P Oがモルモット気管平滑筋を弛緩させる活性を有することを示す)、低血圧誘導(V I Pは喘息の患者における低血圧、心搏急速及びほてりを誘導する(M o r i c eら、P e p t i d e s 7 : 2 7 9 - 2 8 0 ( 1 9 8 6 )、M o r i c eら、L a n c e t 2 : 1 2 2 5 - 1 2 2 7 ( 1 9 8 3 ))、男性の生殖器障害の治療(S i o wら、A r c h . A n d r o l . 4 3 ( 1 ) : 6 7 - 7 1 ( 1 9 9 9 ))、抗アポトーシス/神経保護薬としての使用(B r e n n e m a nら、A n n . N . Y . A c a d . S c i . 8 6 5 : 2 0 7 - 1 2 ( 1 9 9 8 ))、虚血の間の心臓保護(K a l f i nら、J . P h a r m a c o l . E x p . T h e r . 1 2 6 8 ( 2 ) : 9 5 2 - 8 ( 1 9 9 4 )、D a s , ら、A n n . N . Y . A c a d . S c i . 8 6 5 : 2 9 7 - 3 0 8 ( 1 9 9 8 ))、体内時計及びそれに関連する障害の調節(H a m a r rら、C e l l 1 0 9 : 4 9 7 - 5 0 8 ( 2 0 0 2 )、S h e nら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 7 : 1 1 5 7 5 - 8 0 , ( 2 0 0 0 ))、及び抗潰瘍薬としての使用(T u n c e l ら、A n n . N . Y . A c a d . S c i . 8 6 5 : 3 0 9 - 2 2 , ( 1 9 9 8 ))に供することができる。

#### 【0145】

選択的PEG化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストの「有効量」とは、V P A C 2受容体刺激を必要とする患者に投与したときの、許容できない副作用を引き起こすことなく、所望の治療的及び/又は予防的効果をもたらす量のことを指す。「所望の治療的効果」には、以下の1つ以上が含まれる。1)疾患又は症状に関連する徴候の改善、2)疾患又は症状に関連する徴候の発症の遅延、3)治療を行わない場合と比較した寿命の長期化、及び4)治療を行わない場合と比較した生活の質の改善。例えば、N I D D Mの治療用のPEG化V P A C 2アゴニストの「有効量」とは、治療を行わない場合よりも血液グルコース濃度がより顕著に制御される量のことを指し、それにより、結果的に糖尿病による合併症(例えば網膜症、神経障害又は腎臓病)の発症が遅延される。N I D D Mの予防用の選択的PEG化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストの「有効量」とは、処置を行わない場合と比較して、抗血糖剤(例えばスルホニル尿素、チアゾリジンジオン、インスリン及び/又はビスグアニジン)による治療が必要となる高血糖の発症を遅延させる量のことを指す。

#### 【0146】

患者に投与される選択的なPEG化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストの「有効量」はまた、疾患のタイプ及び重症度、並びに患者の特徴(例えば健康状態、年齢、性別、体重及び薬剤に対する許容度)に依存する。患者の血液グルコースの正常化に効果的な選択的PEG化V P A C 2ペプチド受容体アゴニストの投与量は、限定されないが、患者の性別、体重及び年齢、血糖値の制御不能の重症度、投与経路及び生物学的利用能、ペプチドの薬物動態プロフィール、薬効及び製剤化のタイプなどの多くの要因に依存する。

#### 【0147】

本発明の選択的PEG化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストの典型的な投与量範囲は、約1 μ g / 日 ~ 約5 0 0 0 μ g / 日にわたる。好ましくは、投与量は約1 μ g / 日 ~ 約1 0 0 0 μ g / 日、より好ましくは約1 μ g / 日 ~ 約2 5 0 0 μ g / 日にわたる。更に好ましくは、投与量は約5 μ g / 日 ~ 約1 0 0 μ g / 日にわたる。更に好ましい投与量範囲

は、約 10 μg / 日 ~ 約 50 μg / 日である。最も好ましくは、投与量は約 20 μg / 日である。

【 0148 】

「患者」とは哺乳類であり、好ましくはヒトであるが、それ以外の動物、例えばコンパニオンアニマル（例えばイヌ、ネコなど）、家畜（例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）及び実験動物（例えばラット、マウス、モルモットなど）であってもよい。

【 0149 】

本発明の選択的 PEG 化 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニストは、固相ペプチド合成などの標準的な方法を用いて調製できる。例えば、ペプチド合成装置として Rainin - P T I S y m p h o n y P e p t i d e S y n t h e s i z e r ( T u c s o n 社製, A Z ) などが市販されている。固相合成用の試薬は、例えば Glycotope 社（シカゴ、 I L ）から市販されている。固相ペプチド合成装置を製造業者の指示に従って使用し、干渉基を保護し、反応させるアミノ酸を保護し、カップリングさせ、デカップリングさせ、未反応アミノ酸をキャッピングすることができる。

【 0150 】

典型的には、 - N 保護されたアミノ酸と、樹脂上で伸長するペプチド鎖上の N 末端アミノ酸を、室温で、不活性溶媒（ジメチルホルムアミド、 N - メチルピロリドン又はメチレンクロライド）中で、カップリング剤（例えばジシクロヘキシカルボジイミド及び 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール及び塩基（例えばジイソプロピルエチルアミン））の存在下でカップリングさせる。 - N 保護基を、トリフルオロ酢酸又はピペリジンなどの試薬を使用して、得られるペプチド樹脂から除去し、更にペプチド鎖に付加させる次の所望の N 保護アミノ酸を用いてカップリング反応を反復する。適切なアミン保護基は公知であり、例えば Green 及び W u t s , " P r o t e c t i n g G r o u p s i n O r g a n i c S y n t h e s i s " , John Wiley and Sons , 1991 に記載されている。例えば t - ブチルオキシカルボニル ( t B o c ) 基及びフルオロエニルメトキシカルボニル ( F m o c ) 基が挙げられる。

【 0151 】

選択的 V PAC 2 受容体ペプチドアゴニストは、適切な側鎖保護基を有する t - ブトキシカルボニル - 又はフルオロエニルメトキシカルボニル - - アミノ酸を使用する標準的な自動固相合成プロトコルを使用して合成できる。合成終了後、例えば - アミノ基を以下のものと反応させることにより N 末端修飾を行ってもよい。

( i ) 活性エステル ( - N 保護アミノ酸の導入に関する上記と同様のプロトコルを使用) 、

( i i ) アルデヒド（還元剤の存在下（還元的アミノ化方法））、及び

( i i i ) グアニド化 ( g u a n i d a t i o n ) 試薬。

更に、標準的なフッ化水素又はトリフルオロ酢酸 ( T F A ) を用いた側鎖の同時脱保護方法を用いて固相担体からペプチドを分離させる。更に粗ペプチドを、 V Y D A C C 18 カラムによる逆相クロマトグラフィを使用して、 0.1% T F A 中のアセトニトリル勾配により精製する。アセトニトリルを除去するため、 0.1% の T F A 、アセトニトリル及び水を含有する溶液からペプチドを凍結乾燥させる。分析用逆相クロマトグラフィにより純度を検定できる。質量分析によりペプチドのアイデンティティを解析できる。中性 pH の水性バッファ中にペプチドを溶解させることができる。

【 0152 】

また本発明のペプチドアゴニストは、真核生物及び原核細胞宿主を使用し、公知の組換え方法により調製してもよい。

【 0153 】

ペプチドを調製、精製した後、少なくとも 1 分子の PEG を、 C y s 若しくは L y s 残基、 K ( W ) 若しくは K ( C O ( C H 2 ) 2 S H ) 、又はカルボキシ末端アミノ酸に共有結合させて修飾する。 PEG と共有結合したペプチドの調製方法として、多様な手法が従来技術において公知であり、本発明に使用する方法は特に限定されない ( R o b e r t s M

10

20

20

30

40

50

. ら、Advanced Drug Delivery Reviews, 54: 459-476, 2002) の報告などを参照)。

【0154】

使用可能なPEG分子の例としては、メトキシ-PEG2-MAL-40K(2つに分かれたPEGマレイミド(Nektar社製、ハンツヴィル、アラバマ)が挙げられる。他の例としては、バルクmPEG-SBA-20K(Nektar社製)、mPEG2-ALD-40K(Nektar社製)及びメトキシ-PEG-MAL-30K(Dow社製)などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0155】

PEGのカルボキシ末端への結合は、組換えV PAC 2受容体ペプチドアゴニストを前駆体として使用して酵素的にカップリングさせるか、あるいは例えば米国特許4343898号又はInt'l. J. Pept. & Prot. Res. 43: 127-38(1994)に記載のような代替法で行ってもよい。

【0156】

本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストを調製するための1つの方法として、PEG-マレイミドを使用してPEGを直接ペプチドのチオール基に結合させる方法が挙げられる。チオール官能基の導入は、上記の位置でペプチド上若しくはペプチド内にCys又はhC残基を付加若しくは挿入することにより実施できる。また、チオール含有酸(例えばメルカプトプロピオン酸)を用いたリジン-アミノ基のアシル化により、ペプチドの側鎖上ヘチオール官能基を導入することもできる。本発明のPEG化方法では、マイケル付加を利用して安定なチオエーテルリンカーを形成させる。反応は非常に特異的であり、他の官能基の存在下で、穏やかな条件下で生じる。PEGマレイミドが、良く知られた、生理活性なPEG-タンパク質コンジュゲートの調製用の反応性ポリマーとして用いられている。好ましくは、当該方法では、チオール含有V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの過剰量(好ましくはPEGマレイミドに対して1~10モルの過剰)を用いて反応を完了させる。好ましくは10分~40時間、室温で、pH 4.0~9.0において反応を実施する。過剰の非PEG化チオール含有ペプチドは、従来技術の分離方法によってPEG化生成物から容易に分離できる。PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストは好ましくは逆相HPLC又は限外除外クロマトグラフィを使用して単離する。V PAC 2受容体ペプチドアゴニストのPEG化に必要な特異的な条件を実施例8に示す。システィンのPEG化は、PEGマレイミド又は2つに分かれたPEGマレイミドを使用して実施できる。

【0157】

本発明のPEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストを調製するための別法は、PEG-スクシニミジル誘導体を使用したリジン残基のPEG化に基づく方法である。部位特異的なPEG化のため、PEG化に使用されないLys残基をArg残基で置換する。

【0158】

他のPEG化方法は、Pictet-Spengler反応を経由する方法である。この方法では、V PAC 2受容体に選択的なペプチド上にPEG分子を導入するために、遊離アミンを有するTrp残基が必要となる。これを実施するための1つのアプローチとしては、固相合成の間に、Lys側鎖のアミンに対してアミド結合を介して部位特異的にTrp残基を導入する方法が挙げられる(実施例10を参照)。

【0159】

本発明の様々な好ましい特徴及び実施態様を、図を参照しながら記載する。図1は、グルコース注入24時間前にP505又はP525で処置した動物における、i.v.グルコース投与に対するインスリン応答の増大を示す。参考として、ビヒクルで処理した動物のインスリン応答を示す。

【実施例】

【0160】

<実施例1> 固相t-Bocによる、選択的なV PAC 2受容体ペプチドアゴニストの調

10

20

30

40

50

製 :

約 0.5 ~ 0.6 g (0.38 ~ 0.45 mmole) の BocSer (Bzl) - PAM 樹脂を、標準的な 60 mL 反応容器中に添加した。Applied Biosystems 社製の ABI 430 A ベプチド合成装置を用いてダブルカップリングを実施した。

【0161】

以下の側鎖被保護アミノ酸 (Boc アミノ酸の 2 mmole カートリッジ) を Midwest Biotech 社 (Fishers, IN) から購入し、合成に用いた。

Arg - トシリ (TOS) 、Asp - - シクロヘキシリエステル (OcHx) 、Glu - - シクロヘキシリエステル (OcHx) 、His - ベンジルオキシメチル (BOM) 、Lys - 2 - クロロベンジルオキシカルボニル (2Cl - Z) 、SerO - ベンジルエーテル (OBzl) 、Thr - O - ベンジルエーテル (OBzl) 、Trp - ホルミル (CHO) 及び Tyr - 2 - プロモベンジルオキシカルボニル (2Br - Z)。

【0162】

トリフルオロ酢酸 (TFA) 、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 、DMF 中の 0.5 M のヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) 及びジクロロメタン中の 0.5 M のジシクロヘキシリカルボジイミド (DCC) を PE - Applied Biosystems 社 (Foster City, CA) から購入した。ジメチルホルムアミド (DMF - Burdick and Jackson) 及びジクロロメタン (DCM - Mallinkrodt) を Mays Chemical 社 (インディアナポリス、IN) から購入した。

【0163】

対称無水物若しくは HOBt エステルを使用して標準的なダブルカップリングを実施し、両方とも DCC を使用して形成させた。合成終了後、N 末端 Boc 基を除去し、Trp が配列中に存在する場合にはペプチジル樹脂を、DMF 中の 20% ピペリジンで処理し、Trp 側鎖を脱ホルミル化した。N 末端アシル化のため、4 倍過剰の対称無水物をペプチド樹脂に添加した。DCM 中でジイソプロピルカルボジイミド (DIC) を活性化させ、対称無水物を調製した。4 時間反応させ、ニンヒドリン試験によりモニターした。DCM で洗浄した後、樹脂を TEFION 製の反応容器へ移し、真空乾燥させた。

【0164】

反応容器を HF (フッ化水素) 装置 (Penninsula Laboratory 社製) に取り付け、開裂反応を実施させた。g / 樹脂当たり 1 mL の m - クレゾールを添加し、10 mL の HF (AGA 社製、インディアナポリス、IN) を予め冷却された容器内で凝縮させた。メチオニンが存在する場合は、樹脂 g 当たり 1 mL の DMS を添加した。アイスバス中で 1 時間反応液を攪拌した。真空中で HF を除去した。エチルエーテル中に残余物を懸濁させた。固体を濾過し、エーテルで洗浄した。各ペプチドを酢酸水溶液で抽出し、凍結乾燥又は逆相カラム上へ直接ロードした。

【0165】

バッファ A (水中 0.1% TFA) を用い、2.2 × 25 cm の VYDAC C18 カラムで精製した。HPLC (Waters) で、10 mL / 分で 120 分、A の 20% ~ 90% の B (アセトニトリル中 0.1% の TFA) の勾配とし、280 nm (4.0 A) で UV をモニターしながら、1 分間ずつに分けてフラクションを回収した。適当なフラクションを混合し、凍結乾燥した。HPLC (0.46 × 15 cm の METASIL AQ C18) 及び MALDI 質量分析により、乾燥生成物を分析した。

【0166】

<実施例 2> 固相 Fmoc を用いた、選択的 VPAc2 受容体ペプチドアゴニストの調製

約 114 mg (50 mmole) の FmocSer (tBu) Wang 樹脂 (Glycopep 社製、シカゴ、IL) を各反応容器に添加した。Rainin Syphon Peptide Synthesizer を用いて合成を実施した。75 mg (50 μmole) の Rink Amide AM 樹脂 (Rapp Polymere. Tuebingen、ドイツ) を使用して C 末端アミドを有するアナログを調製した。

10

20

30

40

50

## 【0167】

以下のF M O Cアミノ酸を、G l y c o P e p社(シカゴ、IL)及びN o v a B i o c h e m社(L a J o l l a、CA)から購入した。A r g - 2 , 2 , 4 , 6 , 7 - ペンタメチルジヒドロベンゾフラン - 5 - スルホニル(P b f)、A s n - トリチル(T r t)、A s p - - t - ブチルエステル(t B u)、G l u - - t - ブチルエステル(t B u)、G l n - トリチル(T r t)、H i s - トリチル(T r t)、L y s - t - ブチルオキシカルボニル(B o c)、S e r t - ブチルエーテル(O t B u)、T h r - t - ブチルエーテル(O t B u)、T r p - t - ブチルオキシカルボニル(B o c)、T y r - t - ブチルエーテル(O t B u)。

## 【0168】

溶媒のジメチルホルムアミド(D M F - B u r d i c k a n d J a c k s o n)、Nメチルピロリドン(N M P - B u r d i c k a n d J a c k s o n)、ジクロロメタン(D C M - M a l l i n k r o d t)は、M a y s C h e m i c a l社(インディアナポリス、IN)から購入した。

## 【0169】

ヒドロキシベンゾトリアゾール(H O B t)、ジイソプロピルカルボジイミド(D I C)、ジイソプロピルエチルアミン(D I E A)及びピペリジン(P i p)は、A l d r i c h C h e m i c a l社(ミルウォーキー、WI)から購入した。

## 【0170】

全てのアミノ酸を、D M Fで0.3 Mとなるように溶解させた。20%のP i p / D M Fを使用して20分間脱保護した後、D I C / H O B tで活性化させてカップリングを3時間実施した。脱保護及びカップリングの後、各樹脂をD M Fで洗浄した。最後のカップリング及び脱保護の後、ペプチジル樹脂をD C Mで洗浄し、反応容器中で真空乾燥させた。N末端アシル化のため、4倍過剰の対応する酸の対称無水物をペプチド樹脂に添加した。D C M中でジイソプロピルカルボジイミド(D I C)を活性化させ、対称無水物を調製した。4時間反応させ、ニンヒドリン試験によりモニターした。ペプチド樹脂をD C Mで洗浄した後、真空乾燥させた。

## 【0171】

開裂反応液を、10mLのT F A中に0.2mLのチオアニソール、0.2mLのメタノール、0.4mLのトリイソプロピルシランを含有する開裂カクテル(全てA l d r i c h C h e m i c a l社、ミルウォーキー、WIから購入)と2時間混合させた。C y sが配列中に存在する場合、2%のエタンジチオールを添加した。T F A濾過液を40mLのエチルエーテルに添加した。沈殿物を2000回転/分で2分遠心分離した。上澄みをデカントした。ペレットを40mLのエーテル中に再懸濁し、再度遠心分離し、再度デカントし、窒素下更に真空下において乾燥させた。

## 【0172】

各生成物0.3~0.6mgを、1mLの0.1%のT F A / アセトニトリル(A C N)に溶解させ、20μLをH P L C [0.46×15cmのM E T A S I L A Q C 18、1mL/分、45、214nM(0.2A)、A = 0.1%T F A、B = 0.1%T F A / 50% A C N、勾配 = 50% B ~ 90% B、30分]により分析した。

## 【0173】

バッファA(水中0.1%T F A)を用い、2.2×25cmのV Y D A C C 18カラムで精製した。H P L C(Waters)で、10mL/分で120分、Aの20%~90%のB(アセトニトリル中0.1%のT F A)の勾配とし、280nm(4.0A)でUVをモニターしながら、1分間ずつに分けてフラクションを回収した。適当なフラクションを混合し、凍結乾燥した。H P L C(0.46×15cmのM E T A S I L A Q C 18)及びM A L D I質量分析により、乾燥生成物を分析した。

## 【0174】

P 5 2 1の前駆体(C 6 - H S D A V F T E Q Y (O M e) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y A i b Q S I O r n O r n G G P S S G A P P P C C - N H<sub>2</sub>)：上

10

20

30

40

50

記の F M o c プロトコルを使用して合成を実施した。分析用 H P L C によってペプチドを解析した (  $t_R = 10.9$  分、 H P L C 条件は上記の通り、及び M A L D I - T O F : m / z 計算値 = 4290.0、m / z 実測値 = 4290.8 [ M + H<sup>+</sup> ] )。調製用の逆相 H P L C を使用した精製の後、純粋なフラクションを混合し、凍結乾燥し、最終的な凍結乾燥粉末として 14.8 mg を得た。

## 【 0 1 7 5 】

P 5 2 5 の前駆体 ( C 6 - H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y A i b Q A i b I O r n O r n G G P S S G A P P P C C - N H<sub>2</sub> ) : P 5 2 1 前駆体の記載と同様に操作した。分析用 H P L C :  $t_R = 11.0$  分。 M A L D I - T O F : m / z 計算値 = 4288.0、m / z 実測値 = 4288.8 [ M + H<sup>+</sup> ] )。最終生成物を凍結乾燥し、粉末 18.7 mg を得た。

10

## 【 0 1 7 6 】

P 5 7 4 の前駆体 ( C 6 - H S D A V F T E Q Y ( O M e ) T O r n L R A i b Q L A A b u A i b O r n Y ( O M e ) L Q A i b I O r n O r n G G P S S G A P P P C C - N H<sub>2</sub> ) : P 5 2 1 前駆体の記載と同様に操作した。分析用 H P L C :  $t_R = 11.7$  分。 M A L D I - T O F : m / z 計算値 = 4330.1、m / z 実測値 = 4330.7 [ M + H<sup>+</sup> ] )。最終生成物を凍結乾燥し、粉末 46.2 mg を得た。

20

## 【 0 1 7 7 】

< 実施例 3 > ヒト V P A C 2 受容体の i n v i t r o における効果 : A l p h a S c r e e n :

培養フラスコ中で、 P B S を用いて細胞を 1 回洗浄した。次に酵素フリーの分散バッファを用いて細胞をリソスした。分散させた細胞を回収した。次に細胞をスピンドラウンド、刺激バッファで洗浄した。データポイントごとに、刺激バッファ中に懸濁させた 50,000 細胞を用いた。このバッファに、 A l p h a S c r e e n のシグナル ( 細胞内 c A M P 濃度を表す ) を、適切な計測装置 ( 例えば Perkin - Elmer 社製の A l p h a Q u e s t ) で測定した。 A l p h a S c r e e n のドナー及びアクセプタビーズを扱う処理は減光下で実施した。 c A M P 生成における E C<sub>50</sub> は、シグナルから直接算出したか、又は各プレートで作成した標準曲線によって定義される絶対的な c A M P 濃度に基づいて算出した。

30

## 【 0 1 7 8 】

各アゴニストの結果は、 1 度のランにおいて行った最低限 2 つの分析値から算出した。若干のアゴニストの場合、 1 つ以上のランにおける結果の平均として算出した。試験したペプチド濃度は、 1 0 0 0 0 0 、 1 0 0 0 、 1 0 0 、 1 0 、 3 、 1 、 0 . 1 、 0 . 0 1 、 0 . 0 0 3 、 0 . 0 0 1 、 0 . 0 0 0 1 及び 0 . 0 0 0 0 1 n M である。

40

## 【 0 1 7 9 】

D i s c o v e R x :

96 ウエルマイクロタイタープレート中で安定にヒト V P A C 2 受容体を発現する C H O - S 細胞系を、アッセイ前日に 50,000 細胞 / ウエルで播種した。 200  $\mu$  L の培地中で 24 時間細胞をインキュベートした。実験日に培地を除去した。更に細胞を 2 度洗浄した。室温で、 15 分間、アッセイバッファ + I B M X 中で細胞をインキュベートした。その後、刺激を添加し、アッセイバッファ中に溶解させた。 30 分間にわたり刺激した。次にアッセイバッファを穏やかに除去した。 D i s c o v e R x c A M P キット中の細胞溶解試薬を添加した。その後、製造業者の指示に従い、 c A M P シグナルの検出に関する標準的なプロトコルを実施した ( D i s c o v e R x 社、米国 )。 c A M P 生成における E C<sub>50</sub> は、シグナルから直接算出したか、又は各プレートで作成した標準曲線によって定義される絶対的な c A M P 濃度に基づいて算出した。

## 【 0 1 8 0 】

各アゴニストの結果は、独立に行った 2 つのランの結果の平均である。試験したペプチ

50

ド濃度は、10000、1000、100、10、3、1、0.1、0.01、0.003、0.001、0.0001及び0.00001nMである。

【0181】

それぞれのアッセイフォーマットによる、ヒトVPAC2受容体の活性( $EC_{50}$ (nM))をTable 1に示す。

【表11】

Table 1: ヒトVPAC2受容体におけるペプチドの効果

アゴニスト#	ヒトVPAC2受容体: Alphascreen ( $EC_{50}$ ;nM)	ヒトVPAC2受容体: DiscoverRx ( $EC_{50}$ ;nM)
VIP	1.0	0.7
PACAP-27	2.3	0.8
P410	128.8	
P417	14.7	
P451	68.6	
P454	59.9	
P460	430.2	.
P470	83.3	
P472	123.3	
P473	26.5	
P475	109.3	
P478	49.9	
P483	33.5	
P485	44.5	
P490	115.6	
P492	509.6	.
P495	116.7	

10

20

【表12】

P497	176.1	
P499	57.7	
P501	130.9	
P503	146.8	
P505	40.5	
P507	27.1	
P509	13.0	
P511	7.6	
P513	28.9	
P517	7.5	
P519	30.3	
P521	22.1	
P523	5.8	
P525	25.0	
P529	170.5	
P531	94.6	
P533	2382.0	
P535	98.4	
P537	32.0	
P541	45.8	
P545	45.0	
P547	62.0	
P539	10.7	47.3
P543	84.2	8.9
P551	15.6	
P553	15.0	
P555	22.5	8.1
P557		108.3
P560	13.8	11.3
P562	30.2	24.2
P566	11.8	7.8
P568	128.6	
P570	13.4	4.5
P572	11.2	
P574	21.2	36.1
P576	55.0	
P578	205.3	
P580	10.9	
P582	20.3	
P584	51.2	
P586	122.4	
P588	54.0	
P590	4.1	
P602	42.1	7.2

10

20

30

40

【0182】

## &lt;実施例4&gt;選択性

## 結合試験：

安定なV P A C 2細胞系(実施例3を参照)、又はヒトV P A C 1又はP A C 1でトランジェントにトランスフェクションした細胞から調製した細胞膜を用いた。トレーサーとしてV P A C 1及びV P A C 2の場合は<sup>125</sup>IラベルしたV I P、並びにP A C 1の場合には<sup>125</sup>IラベルしたP A C A P - 27を使用して、フィルタ結合試験を実施した。

50

## 【0183】

このアッセイに用いる溶液及び装置は以下の通りである。

前浸漬溶液：Aqua dest中の0.5%のポリエチレンアミン、

フィルタプレートのフラッシュバッファ：25mMのHEPES(pH7.4)、

ブロッキングバッファ：25mMのHEPES(pH7.4)、0.2%のプロテアーゼフリーのBSA、

アッセイバッファ：25mMのHEPES(pH7.4)、0.5%のプロテアーゼフリーのBSA、

希釈及びアッセイプレート：PS-Microplate、U型、

濾過プレート：Multiscreen FB Opaque Plate、1.0μM Bタイプのグラスファイバーフィルタ。 10

## 【0184】

フィルタプレートを調製するため、減圧濾過によって前浸漬溶液を吸引除去した。200μLのフラッシュバッファを用いてプレートを2度洗浄した。200μLのブロッキングバッファをフィルタプレートに添加した。次にフィルタプレートを、室温で1時間、200μLの前浸漬溶液でインキュベートした。

## 【0185】

アッセイプレートを25μLのアッセイバッファ、アッセイバッファの中に懸濁した25μL(2.5μg)の膜、アッセイバッファ中のアゴニスト25μL、及びアッセイバッファ中のトレーサー(約40000cpm)25μLで満たした。満たされたプレートを振とうしながら1時間インキュベートした。 20

## 【0186】

アッセイプレートからフィルタプレートへの移動を行わせた。ブロッキングバッファを減圧濾過によって吸引除去し、フラッシュバッファで2回洗浄した。アッセイプレートからフィルタプレートへ90μLを移した。アッセイプレートから移した90μLを吸引し、200μLのフラッシュバッファで3回洗浄した。プラスチック製の支持体を除去した。60で1時間乾燥させた。30μLのMicroscintを添加した。カウントを実施した。

## 【0187】

ヒトV PAC 2、V PAC 1及びPAC 1の受容体への結合(IC<sub>50</sub>)をTable 2に示す。 30

【表13】

Table 2

アゴニスト#	ヒト VPAC2 受容体 結合 (IC50;nM)	ヒト VPAC1 受容体 結合 (IC50;nM)	ヒト PAC1受 容体 結合 (IC 50;nM)
VIP	5.1	3.3	>1000
PACAP-27	2.6	4.5	10.2
P410	264.4	>25000	
P417	24.1	>25000	
P451	595.7		
P454	36.6	>25000	
P460	914.5	>25000	
P470	262.9		
P473	256.4	>25000	
P475	436.0		
P478	30.0		
P483	37.3	>25000	
P485	17.3		
P490	13.2		
P492	156.0		
P495	142.1		
P497	146.0		
P499	34.0	>25000	
P501	111.0		
P503	41.5		
P505	26.1	>25000	>25000
P509	11.2	>25000	
P511	7.2	>25000	>25000
P513	50.5		
P517	3.7	>25000	
P519	51.6		
P521	67.1		
P523	4.8		
P525	41.8	>25000	>25000
P529	192.4		
P531	69.7		
P533	959.0		
P535	145.4	>25000	
P537	17.2	>25000	>25000
P539	13.5		
P541	59.8	>25000	
P543	56.3		
P545	79.9	>25000	>25000
P547	5.6		
P551	16.6	>25000	>25000
P553	21.7	>25000	>25000
P555	15.4	>25000	>25000
P557	380.0		

10

20

30

40

【表14】

P560	11.6		
P562	42.8	>25000	>25000
P566	8.2		
P570	4.1	>25000	>25000
P572	14.9	>25000	>25000
P574	32.3	>25000	>25000
P580	20.7	>25000	>25000
P582	48.3	>25000	>25000
P590	7.4	>25000	>25000
P602	28.0	>25000	>25000

10

## 【0188】

## &lt;実施例5&gt;ラットV PAC 1及びV PAC 2受容体におけるin vitro効果

## Discover x:

市販のトランスフェクション試薬（In vitrorogen社製、Lipofectamine）を使用して、ラットV PAC 1又はV PAC 2受容体DNAにより、CHO-P0細胞をトランジェントにトランスフェクションした。96ウェルプレートに10,000／ウェルの密度で細胞を播種し、200mLの培地で3日間インキュベートし、3日目にアッセイを実施した。

20

## 【0189】

実験日に培地を除去した。更に細胞を2度洗浄した。室温で、15分間、アッセイバッファ+IBMX中で細胞をインキュベートした。その後、刺激を添加し、アッセイバッファ中に溶解させた。30分間にわたり刺激した。次にアッセイバッファを穏やかに除去した。Discover x cAMPキット中の細胞溶解試薬を添加した。その後、製造業者の説明書に従い、cAMPシグナルの検出に関する標準的なプロトコルを実施した（Discover x社、米国）。cAMP生成におけるEC<sub>50</sub>は、シグナルから直接算出したか、又は各プレートで作成した標準曲線によって定義される絶対的なcAMP濃度に基づいて算出した。

30

## 【0190】

各アゴニストの結果は、独立に行った2つのランの結果の平均である。ラットV PAC 1及びV PAC 2の結果は、Discover xアッセイのみを使用して得た。試験したペプチド濃度は、10000、1000、100、10、3、1、0.1、0.01、0.003、0.001、0.0001及び0.0001nMである。

## 【0191】

ラットV PAC 2及びV PAC 1受容体の活性（EC<sub>50</sub>（nM））をTable 3に示す。

【表15】

Table 3

アゴニスト#	Rat VPAC1受容体: DiscoveRx: (EC <sub>50</sub> ;nM)	Rat VPAC2受容体: DiscoveRx: (EC <sub>50</sub> ;nM)
VIP	0.01	0.6
P410	>1000	318.5
P417	232.3	8.7
P454	1229.5	79.6
P460	>1000	1163.1
P470	>1000	110.9
P472	>1000	284.6
P473	>1000	25.5
P475	>1000	220.4
P478	2053.8	120.1
P483	223.9	128.4
P485	734.9	42.5
P490	>1000	191.8
P492	>4000	962.7
P497	>1000	344.7
P499	803.8	68.2
P501	>1000	272.1
P503	>4000	520.3
P505	639.4	42.6
P507	>1000	94.9
P509	328.4	28.2
P511	61.9	13.9
P517	92.4	10.0
P521	602.4	33.1
P523	20.4	5.3
P525	1137.3	44.0
P529	1182.9	199.3
P531	300.7	69.9
P535	>1000	317.6
P537	205.8	38.8
P539	32.6	21.0
P541	665.1	101.9
P543	355.0	101.1
P545	380.5	99.5
P547	76.2	149.8
P551	171.9	13.2
P553	261.8	22.0
P555	68.9	32.5
P557	581.1	397.2
P560	155.6	20.4
P562	393.4	52.5
P566	52.7	13.1
P568	>1000	250.3
P570	86.7	21.3
P572	94.5	10.8
P574	162.9	33.8
P576	460.9	67.4

10

20

30

40

【表16】

P578	269.4	305.6
P580	1.1	11.9
P582	137.4	31.0
P584	188.1	67.2
P586	501.6	186.8
P588	406.3	311.2
P590	245.0	6.9
P602	209.0	36.9

## 【0192】

10

## &lt;実施例6&gt; in vivo アッセイ

## 静脈ブドウ糖負荷試験 (IVGTT) :

通常のウィスター ラットを一晩絶食させ、実験前に麻酔した。血液サンプリング用カテーテルをラットに挿入した。アゴニストを皮下投与し、通常グルコース投与の24時間前に曝露した。血液サンプルを頸動脈から採取した。血液サンプルは、アゴニスト投与後のグルコース注入の直前に採血した。最初の採血の後、グルコース混合液を静脈内 (i.v.) に注射した。kg 体重当たりグルコース + アゴニストを有する担体を合計 1.5 mL 注入した (0.5 g / kg 体重によるグルコース投与となる)。望ましい投与量を決定するため、ペプチド濃度を  $\mu\text{g} / \text{kg}$  単位で変化させた。グルコース投与の 2、4、6 及び 10 分後に血液サンプルを採血した。アゴニストを含まない、グルコースのみを含む同じ担体を投与する群を対照動物群とした。幾つかの場合、グルコース投与後 20 及び 30 分における血液サンプルを採血した。アプロチニンを血液サンプルに添加 (250 ~ 500 kIU / mL 血液) した。次に標準的な方法を使用して血漿中のグルコース及びインスリンレベルを分析した。

20

## 【0193】

アッセイでは、PBS 中の調製及び補正されたペプチドストックを使用した。通常、このストックは 100  $\mu\text{M}$  ストックとして希釈する。しかしながら、約 1 mg / mL でアゴニストを含有する、更に濃縮されたストックを用いた。それぞれの濃度を常時測定した。最大応答の変動性は、担体投与量の変動性に大部分起因する。プロトコルの詳細を以下に示す。

30

【表17】

種/系統/体重	ラット/ウィスター ユニリーバー/約275~300g
投与方法	単回投与
投与量/経路	1.5 mL/kg/iv
担体	8% PEG300、0.1% BSA (／水)
食餌/水の摂取	手術前の晩、ラットを絶食させた。
生存パラメータ	試験終了時に動物をと殺した。
IVGTT: ペントバルビタール麻酔下で各ラット群に実施(2カテーテル、頸静脈及び頸動脈)	グルコースIVボーラス:500 mg/kg、10% 溶液(5 mL/kg)、時間=0。 化合物iv: グルコース含有血液のサンプリング (頸動脈から300 $\mu\text{L}$ 採取、凝集防止剤としてEDTA添加、アプロチニン及びPMSFをタンパク分解阻害剤として添加、氷上で保存)前0~240分: 0, 2, 4, 6 及び 10, 20 及び 30 分。 測定パラメータ: インスリン+グルコース
毒物動態	インスリン測定後における残余の血漿サンプルを-20°Cで保存し、化合物の濃度を測定した。

40

【表18】

Table 4a

アゴニスト#	グルコースから化合物までの時間	AUC増加%: 投与量=	AUC増加%: 投与量=	AUC増加%: 投与量=
		0.09 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg
P505	24h		12	74
P511	24h		38	59
P525	24h		72	208
P570	24h		36	
P602	24h	73		198

AUC=曲線の下の領域（インスリン、グルコース投与後0～10分）

## 【0194】

P E G化ペプチドの薬物動態的側面：健康なフィッシャー344ラット（群当たり3匹）を用い、100 μgアゴニスト / kg（ペプチド含量ベースにおけるアゴニスト量、PBSバッファ中に溶解）を注射した。投与後3、12、24、48、72、96及び168時間において血液サンプルを採血し、血清中のペプチド含量を、ペプチドのN末端を認識する標識免疫検定法（RIA）によって分析した。次にPKパラメータを、モデル非依存的な方法（WinNonlinPro、Pharsight社、Mountain View, CA, USA）を使用して算出した。

## 【表19】

Table 4b. PEG化ペプチドアゴニストのPKパラメータ

N=3による平均及び(SD)値。

アゴニスト#	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC <sub>0-最終</sub> (ng*h/mL)	T1/2 (h)	Cl/F (mL/h/kg)	Vd/F (mL/kg)
P499	132 (9)	24 (<1)	6650 (1294)	25 (5)	15 (2)	529 (85)
P505	160 (30)	12 (<1)	7006 (890)	22 (5)	13 (1)	425 (116)
P511	100 (16)	16 (7)	3067 (374)	NC	NC	NC
P521	233 (29)	12 (<1)	7633 (1871)	19 (6)	13 (3)	380 (208)
P525	133 (21)	16 (7)	4740 (486)	22 (3)	20 (2)	642 (126)
P539	102 (16)	24 (<1)	4013 (511)	15 (2)	25 (3)	540 (129)
P545	139 (48)	72 (42)	12737 (2492)	43 (5)	7 (2)	457 (66)
P555	102 (9)	16 (7)	4918 (597)	13 (1)	20 (3)	389 (65)
P562	120 (67)	24 (21)	5456 (2157)	25 (7)	19 (6)	673 (315)
P570	71 (34)	20 (7)	3891 (1309)	25 (4)	25 (7)	877 (326)
P574	70 (6)	20 (7)	3408 (312)	18 (2)	28 (2)	727 (71)

\*NC=不十分なデータのため算出せず

## 【0195】

## &lt;実施例7&gt;ラット血清における安定性試験:

ラット血清中におけるV<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2受容体ペプチドアゴニストペプチドの安定性を解析するため、CHO-V<sub>P</sub>A<sub>C</sub>2細胞クローニング#6(96ウェルプレート/50,000細胞/ウェル、1日インキュベート)、PBS 1×(Gibco社製)、100μMの分析用ストック液(上記)、と殺した通常のウィスターラットから採取したラット血清、アプロチニン及びDiscovery×アッセイキットを準備した。ラット血清を使用前まで4で保存し、2週以内に用いた。

## 【0196】

0日目に、90μLのラット血清及び10μLのペプチドストック液を混合し、10μMペプチド/ラット血清の100μLアリコートを2本調製した。250kIUアプロチニン/mLを、これらのアリコートのうちの1つに添加した。アプロチニンを含有するアリコートを4で保存した。アプロチニンを含有しないアリコートを37で保存した。アリコートを24又は72時間インキュベートした。

## 【0197】

1日目に、0日目に調製したアリコートの24又は72時間のインキュベーション後、インキュベートバッファ(PBS+1.3mMのCaCl<sub>2</sub>、1.2mMのMgCl<sub>2</sub>、2mMのグルコース及び0.25mMのIBMXを含有)を調製した。4及び37アリコートにおいて、ペプチドを11回の5倍連続希釈のプレートを作製し、ペプチドごとに

10

20

30

40

50

試験した。最初のスクリーニング（実施例3を参照）において、ペプチドが1nMを上回るEC<sub>50</sub>を有する場合、1000nMを最大濃度とし、一方ペプチドが1nM以下のEC<sub>50</sub>を有する場合、2000nMを最大濃度とした。プレートを細胞と共に2回インキュベートバッファで洗浄した。プレートに、ウェル当たり50μLのインキュベート培地を添加し、15分間インキュベートした。最初のスクリーニングにより示された最大濃度を用いて、試験されるペプチドごとの4及び37アリコートにおける、ペプチドの11回の5倍連続希釈により調製したプレートの細胞へ、ウェル当たり50μLで溶液を移した（2回試験を実施）。この処理によりペプチド濃度が2倍に希釈される。室温で30分間細胞をインキュベートした。上澄みを除去した。DiscoveRx抗体/抽出バッファを40μL/ウェルで添加した。シェーカ（300回転/分）で1時間、細胞をインキュベートした。DiscoveRxキットを用いて通常の操作を行った。cAMPスタンダードをカラム12に添加した。cAMPアッセイデータからEC<sub>50</sub>値を測定した。残留している活性化ペプチドの量を、各条件ごとに式EC<sub>50,4</sub>/EC<sub>50,37</sub>により推定した。

## 【表20】

Table 5

37°C、24時間又は72時間後のラット血清中におけるペプチド安定性（概算値）

アゴニスト #	24時間における 安定性(%)	72時間における 安定性(%)
VIP	0.2	
P417	265	
P472	66	
P473	86	
P475	61	
P478	34	
P483	22	
P485	65	
P492	131	
P503	174	
P505	133	161
P521		294
P523		281
P525	298	353
P529		119
P543	119	
P539	123	
P555	117	
P557	131	
P560	192	
P562	213	
P566	152	
P574	288	
P602	573	

<sup>1</sup>100%を超える値はPEGコンジュゲートからのインタクトなペプチドの遊離を示す。

## 【0198】

<実施例8>チオールベースの反応による、選択的V<sub>1</sub>PAC<sub>2</sub>受容体ペプチドアゴニストのPEG化：

10

20

30

40

50

PEG化反応は通常、チオエーテル結合が形成される条件下で実施する。具体的には、溶液のpHは約4~9、チオール含有ペプチド濃度はPEGマレイミド濃度の0.7~1.0モル過剰である。PEG化反応は通常室温で行う。次にPEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストを逆相HPLC又は限外除外クロマトグラフィ(SEC)を使用して単離する。分析用RP-HPLC、HPLC-SEC、SDS-PAGE及び/又はMALDI Mass Spectrometryを使用して、PEG化ペプチドアゴニストを解析する。

【0199】

通常、チオール官能基を選択的VPAC2受容体ペプチドアゴニスト中又は上に導入する場合、片方又は両方の末端に、システイン若しくはホモシステイン若しくはチオール含有部分を添加することにより、又は、システイン若しくはホモシステイン若しくはチオール含有部分を配列中に挿入することによって実施する。チオール含有VPAC2受容体ペプチドアゴニストを40kDa、30kDa又は20kDaのPEG-マレイミドと反応させ、チオエーテル結合により共有結合したPEG含有誘導体を調製する。

10

【0200】

P505の合成

20,000Daの平均分子量を有する19mgのペプチド前駆体(非PEG化P505)、及び162mgのメトキシ-PEG-マレイミド(NOF、日本)を2mLの100mMのNH<sub>4</sub>Acバッファ(10mMのEDTA(pH6.8)を含有)中に溶解させ、4時間反応させた。調製用RP-HPLC精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物97mgを得た。RP-HPLC及び限外除去HPLCでPEG化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

20

【0201】

P525の合成

20,000Daの平均分子量を有する18.7mgのペプチド前駆体(非PEG化P525)、及び157mgのメトキシ-PEG-マレイミド(NOF、日本)を2mLの100mMのNH<sub>4</sub>Acバッファ(10mMのEDTA(pH6.8)を含有)中に溶解させ、4時間反応させた。調製用RP-HPLC精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物114mgを得た。RP-HPLC及び限外除去HPLCでPEG化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

30

【0202】

P572の合成

20,000Daの平均分子量を有する22.3mgのペプチド前駆体(非PEG化P572)、及び177mgのメトキシ-PEG-マレイミド(NOF、日本)を2mLの100mMのNH<sub>4</sub>Acバッファ(10mMのEDTA(pH6.8)を含有)中に溶解させ、4時間反応させた。調製用RP-HPLC精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物137mgを得た。RP-HPLC及び限外除去HPLCでPEG化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

40

【0203】

P574の合成

20,000Daの平均分子量を有する31.9mgのペプチド前駆体(非PEG化P574)、及び283mgのメトキシ-PEG-マレイミド(NOF、日本)を3mLの100mMのNH<sub>4</sub>Acバッファ(10mMのEDTA(pH6.8)を含有)中に溶解させ、4時間反応させた。調製用RP-HPLC精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物171mgを得た。RP-HPLC及び限外除去HPLCでPEG化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

【0204】

P602の合成

ペプチド前駆体(非PEG化P602)20mgと、30,000Daの平均分子量を有するメトキシ-ポリ(エチレングリコール)マレイミド-プロピオンアミド(Chir

50

otech Technology社、英国) 223mgを、2mLの100mMのNH<sub>4</sub>Acバッファ(10mMのEDTA(pH 6.8)を含有)中に溶解させ、4時間反応させた。調製用RP-HPLC精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物132mgを得た。RP-HPLC及び限外除去HPLCでPEG化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

【0205】

<実施例9>アシル化によるリシンの側鎖のPEG化:

選択的V PAC 2受容体ペプチドアゴニストの部位特異的なPEG化を実施するため、PEG化しようとするLys残基以外の全てのLys残基をArg残基に置換する。使用できるPEG分子はmPEG-SBA-20K(Nektar社製、Lot #: PT-04E-11)である。好ましくは室温で2~3時間PEG化反応を実施する。調製用HPLCによりペプチドを精製する。

10

【0206】

実施例10:ピクテ-シュペングラー反応によるPEG化:

ピクテ-シュペングラー反応によるPEG化を実施するには、遊離アミン基を有するTrpを用いて、残基選択的にV PAC 2受容体ペプチドアゴニスト上にPEG分子を導入する必要がある。Trp残基をLys残基の側鎖上へカップリングさせる。広いSARは、この修飾によっても、in vitro効果及び選択性に関して親ペプチドの特性を変化させないことを示す。

20

【0207】

官能性アルデヒド(例えばmPEG2-BUTYRALD-40K(Nektar、米国)を有するPEGを反応に使用した。部位特異的なPEG化により、PEGとペプチドとの間のテトラカルボリン環の形成がなされた。室温で1~48時間、冰酢酸中でPEG化を実施した。1~10モル過剰のPEGアルデヒドを反応に用いた。酢酸の除去後、PEG化V PAC 2受容体ペプチドアゴニストを調製用RP-HPLCにより単離した。

30

【0208】

P535の合成

27.7mgのペプチド前駆体(非PEG化P535)、及び590mgのmPEG2-BUTYRALD-40Kを3mLの酢酸に溶解させ、2日間反応させた。分離用RP-HPLCにより単離し、凍結乾燥し、粉末状態のPEG化ペプチドアゴニストの生成物94mgを得た。RP-HPLC及び限外除去HPLCでPEG化ペプチドアゴニストを解析し、in vitroで試験した。

30

【0209】

P557の合成

23mgのペプチド前駆体(非PEG化P557)、及び460mgのmPEG2-BUTYRALD-40Kを3mLの酢酸に溶解させ、2日間反応させた。準備のRP-HPLCにより単離し、凍結乾燥し、粉末状態のPEG化ペプチドアゴニストの生成物50mgを得た。RP-HPLC及び限外除去HPLCでPEG化ペプチドアゴニストを解析し、in vitroで試験した。

40

【0210】

本発明の他の態様は、本発明の範囲から逸脱することなく当業者に自明である。

【図面の簡単な説明】

【0211】

【図1】グルコース注入24時間前にP505又はP525で処置した動物における、i.v.グルコース投与に対するインスリン応答の増大を示す。参考として、ビヒクルで処理した動物のインスリン応答を示す。

【図 1】

IVGTT-種々の用量のP505およびP525で処置した  
絶食覚醒力-テル插入雄性ワイスラーット

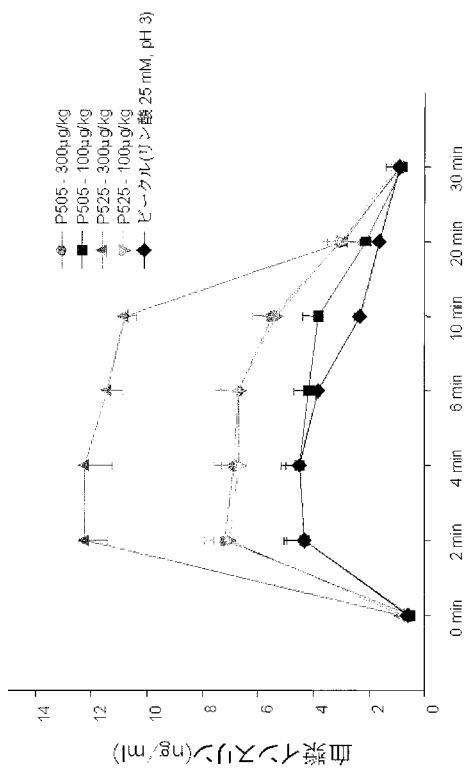


図1. 正常ワイスラーットにおけるP505およびP525のインスリン分泌活性、  
化合物をi.v. ダルコース投与の24時間前に注入した。

## 【配列表】

2009519212000001.xml

## 【手続補正書】

【提出日】平成20年4月25日(2008.4.25)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【配列表】

2009519212000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2006/041550
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 C07K14/575 A61K38/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 450 100 A1 (MEIJI SEIKA KAISHA [JP]; DAICEL CHEM [JP]) 9 October 1991 (1991-10-09) abstract	13-21
Y	JP 06 092991 A (DAICEL CHEM; MEIJI SEIKA KAISHA) 5 April 1994 (1994-04-05) table 2	13-21
Y	WO 2004/006839 A (BAYER PHARMACEUTICALS CORP [US]; FROLAND WAYNE A [US]; KELNER DREW N [ ]) 22 January 2004 (2004-01-22) the whole document	1-21
Y	WO 2005/072385 A2 (BAYER PHARMACEUTICALS CORP [US]; CLAIRMONT KEVIN [US]; LUMB KEVIN J [U]) 11 August 2005 (2005-08-11) claims	1-21
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*&amp;* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
15 February 2007	27/02/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Vogt, Titus	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/041550

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/058954 A (NOVO NORDISK AS [DK]; JOHANSEN NILS LANGELAND [DK]; LAU JESPER [DK]; M) 30 June 2005 (2005-06-30) claims	1-21
Y	WO 03/099314 A (AMYLIN PHARMACEUTICALS INC [US]; YOUNG ANDREW A [US]; KOLTERMAN ORVILL) 4 December 2003 (2003-12-04) claims	13-21
X, P	WO 2006/023356 A2 (LILLY CO ELI [US]; BOKVIST BENGT KRISTER [DE]; MAYER JOHN PHILIP [US];) 2 March 2006 (2006-03-02) claims	13-21
X, P	WO 2006/023358 A (LILLY CO ELI [US]; BOKVIST BENGT KRISTER [DE]; MAYER JOHN PHILIP [US];) 2 March 2006 (2006-03-02) claims	13-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2006/041550

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material:  
 a sequence listing  
 table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material:  
 on paper  
 in electronic form
  - c. time of filing/furnishing:  
 contained in the international application as filed  
 filed together with the international application in electronic form  
 furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2006/041550

**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Although claims 18-20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.**
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

**Box III Observations where unity of Invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

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

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2006/041550

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0450100	A1	09-10-1991	WO JP	9106565 A1 4193896 A	16-05-1991 13-07-1992
JP 6092991	A	05-04-1994		NONE	
WO 2004006839	A	22-01-2004	AU BR CA EP JP MX	2003267990 A1 0312621 A 2491279 A1 1578358 A2 2006506969 T PA04012305 A	02-02-2004 06-12-2005 22-01-2004 28-09-2005 02-03-2006 25-02-2005
WO 2005072385	A2	11-08-2005	AU CA EP	2005208911 A1 2554475 A1 1713493 A2	11-08-2005 11-08-2005 25-10-2006
WO 2005058954	A	30-06-2005	AU CA EP MX	2004298424 A1 2549582 A1 1704165 A1 PA06006745 A	30-06-2005 30-06-2005 27-09-2006 18-08-2006
WO 03099314	A	04-12-2003	AU CA EP JP	2003239910 A1 2487269 A1 1569673 A1 2005533768 T	12-12-2003 04-12-2003 07-09-2005 10-11-2005
WO 2006023356	A2	02-03-2006	WO	2006023358 A1 2006023359 A2 2006023367 A1	02-03-2006 02-03-2006 02-03-2006
WO 2006023358	A	02-03-2006	WO	2006023356 A2 2006023359 A2 2006023367 A1	02-03-2006 02-03-2006 02-03-2006

---

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T E F L O N

(72)発明者 ベンクト・クリスター・ボーグヴィスト

ドイツ連邦共和国デー-22419ハンブルク、エッセナー・ボーゲン7番、リリー・フォルシュング・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング

(72)発明者 リヤンシャン・チャン

アメリカ合衆国46033インディアナ州カーメル、スノウ・オウル・ドライブ13244番

(72)発明者 ホルヘ・アルシナ-フェルナンデス

アメリカ合衆国46208インディアナ州インディアナポリス、ノース・キャピトル・アベニュー5463番

F ターム(参考) 4C076 CC21 EE23 EE59 FF63

4C084 AA01 AA02 BA01 BA10 NA03 NA05 ZC35

4H045 CA40 DA50 HA05 HA06