

(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 I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁)		
<hr/>		
(21) 出願番号	特願2008-537892 (P2008-537892)	(71) 出願人 594197872
(86) (22) 出願日	平成18年10月24日 (2006.10.24)	イーライ リリー アンド カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月25日 (2008.4.25)	アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/041550	8 5 インディアナポリス リリー コー
(87) 国際公開番号	W02007/050651	ポレイト センター (番地なし)
(87) 国際公開日	平成19年5月3日 (2007.5.3)	(74) 代理人 100068526
(31) 優先権主張番号	60/730, 291	弁理士 田村 恭生
(32) 優先日	平成17年10月26日 (2005.10.26)	(74) 代理人 100100158
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 鮫島 睦
(31) 優先権主張番号	60/740, 342	(74) 代理人 100076521
(32) 優先日	平成17年11月29日 (2005.11.29)	弁理士 坪井 有四郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人 100138900
(31) 優先権主張番号	60/743, 364	弁理士 新田 昌宏
(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)TRAIbRAIbQLAAAIbOrnY(OMe)LQSIKAIbOrn、

配列番号18: HSDAVFTEK(CO(CH₂)₂SH)Y(OMe)TOrnLRAIbQVAAAIbOrnY LQSIOrnOrn、

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

配列番号20: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVAAAIbK(CO(CH₂)₂SH)YLQSIOrnOrn、 10

配列番号21: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVAAK(CO(CH₂)₂SH)OrnY LQSIOrnOrn、

配列番号22: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVCAAIbOrnY LQSIOrnOrn、

配列番号23: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRCQVAAAIbOrnY LQSIOrnOrn、

配列番号24: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQLAAAIbOrnY LQSIOrnOrn、

配列番号25: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVAAAIbOrnYAIbQSIOrnOrn、 20

配列番号26: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVAAAIbOrnY LQAIbIOrnOrn、

配列番号27: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVAAbuAIbOrnY LQAIbIOrnOrn、

配列番号28: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQLAAAIbOrnY LQAIbIOrnOrn、

配列番号29: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQLAAAIbOrnYAIbQAIbIOrnOrn、

配列番号30: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQLAAbuAIbOrnYAIbQSIOrnOrn、 30

配列番号31: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQLAAbuAIbOrnY LQSIOrnOrn、

配列番号32: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQLAAbuAIbOrnYAIbQAIbIOrnOrn、

配列番号33: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQLAAAIbOrnYAIbQSIOrnOrn、

配列番号34: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(W)QVAAAIbOrnY LQSIOrnOrn、

配列番号35: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVAAAIbOrnY LK(W)SIOrnOrn、 40

配列番号36: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQK(W)AAAIbOrnY LQSIOrnOrn、

配列番号37: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(CO(CH₂)₂SH)QVAAAIbOrnY LQSIOrnOrn、

配列番号38: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVAAAIbK(W)YLQSIOrnOrn、

配列番号39: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQVAAAIbCY LQSIOrnOrn、

配列番号40: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAIbQLAAbuAI 50

bOrnYLQAibIOrnOrn、

配列番号41: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAibOrnYLQSK(W)OrnOrn、

配列番号42: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnCOrn、

配列番号43: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibCOrnOrn、

配列番号44: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQCAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn、

配列番号45: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRCQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn、

配列番号94: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVK(CO(CH₂)₂SH)AAibOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号95: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnCOrn、

配列番号96: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSCOrnOrn、

配列番号97: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnK(CO(CH₂)₂SH)Orn、

配列番号98: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnK(CO(CH₂)₂SH)Orn、

配列番号99: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRK(W)QLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn、

配列番号100: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAAibOrnYLQSIOrnOrnC、

配列番号101: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnC、

配列番号102: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnOrnC、

配列番号103: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAibIOrnOrn、

配列番号104: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAibIOrnCOrn、

配列番号105: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQCAAbuAibOrnY(OMe)LQAibIOrnOrn、

配列番号106: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnC、

配列番号107: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSIOrnOrn、

配列番号108: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQCAAbuAibOrnY(OMe)LQSIOrnOrn、

配列番号109: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSIOrnCOrn、

配列番号110: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAbuAAibOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号111: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQK(CO(CH₂)₂SH)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn、及び

配列番号112: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQK(W)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn、

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、

10

20

30

40

50

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）：

$Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 - Xaa_8 - Xaa_9 - Xaa_{10} - Xaa_{11} - Xaa_{12}$

で表されるアミノ酸配列

（式中、

Xaa_1 がGly、Cys又は存在せず、

Xaa_2 がGly、Arg又は存在せず、

Xaa_3 がPro、Thr又は存在せず、

Xaa_4 がSer又は存在せず、

Xaa_5 がSer又は存在せず、

Xaa_6 がGly又は存在せず、

Xaa_7 がAla又は存在せず、

Xaa_8 がPro又は存在せず、

Xaa_9 がPro又は存在せず、

Xaa_{10} がPro又は存在せず、

Xaa_{11} がSer、Cys又は存在せず、及び

Xaa_{12} がCys又は存在せず、

C末端延長部分の Xaa_1 から Xaa_{12} の少なくとも5つが存在し、

Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 、 Xaa_4 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 、 Xaa_{10} 又は Xaa_{11} 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PEG分子と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分子と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(CH₂)₂SH)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、

前記PEG化VPAC2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PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニスト。

【表1】

配列番号5	GGPSSGAPPPS
配列番号6	GGPSSGAPPPS-NH ₂
配列番号7	GGPSSGAPPPC
配列番号8	GGPSSGAPPPC-NH ₂
配列番号9	GRPSSGAPPPS
配列番号10	GRPSSGAPPPS-NH ₂
配列番号11	GGPSSGAPPPCC
配列番号12	GGPSSGAPPPCC-NH ₂

【請求項3】

前記 C 末端延長部分が配列番号 11 又は配列番号 12 で表される、請求項 2 記載の PEG 化 VPAC2 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 PEG 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 PEG 化 VPAC2 受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項 5】

前記 PEG 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 PEG 化 VPAC2 受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項 6】

前記 PEG 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 PEG 化 VPAC2 受容体ペプチドアゴニスト。

10

【請求項 7】

各 PEG 分子が 20,000、30,000、40,000 又は 60,000 Da の分子量である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項記載の PEG 化 VPAC2 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 PEG 化 VPAC2 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、VPAC2 受容体ペプチドアゴニスト：

20

(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_1-C_6 アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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_1-C_{16} アルキルの付加、

(d) $-C(O)R^1$ の添加 (式中、 R^1 は、 C_1-C_{16} アルキル (アリール、 C_1-C_6 アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン、 $-SH$ 及び $-CF_3$ 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_1-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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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_1-C_4 アルキル (C_1-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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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、 $-NR^2R^3$ (式中、 R^2 及び R^3 は独立に水素、 C_1-C_6 アルキル、アリール又はアリール C_1-C_4 アルキルである) であるか、 $-OR^4$ (R^4 は C_1-C_{16} アルキル (アリール、 C_1-C_6 アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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_1-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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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_1-C_4 アルキル (C_1-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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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)、

30

40

(e) $-SO_2R^5$ の付加 (式中、 R^5 はアリール、アリール C_1-C_4 アルキル又は C_1-C_{16} アルキルである)、

(f) C_1-C_6 アルキル又は $-SR^6$ 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^6 は水素又は C_1-C_6 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-アミノヘキサノ酸 (6-アミノカプロン酸) の付加及び

(i) $-C(=NH)-NH_2$ の付加。

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 - アミノカブロン酸) 及び - C (= N H) - N H₂ から選択される基の付加である、請求項 8 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 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 P E G 化 V P A C 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 P E G 化 V P A C 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)TO rnLRAibQVAAAibK(W-PEG40K)Y LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P417	47	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TRAibRAibQLAAAibOrnY(OMe)LQSI KAibOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P451	48	C6-HSDAVFTEK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)Y(OMe)TO rnLRAibQVAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

20

【表 3】

P454	49	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnK(W PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P460	50	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibC(PEG40K)YLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P472	51	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibK(CO(CH ₂) ₂ S PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P473	52	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibK(CO(CH ₂) ₂ S PEG20K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P475	53	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAK(CO(CH ₂) ₂ SPEG 40K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P478	54	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVC(PEG40K)AAibOrnYLQ SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P483	55	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRC(PEG40K)QVAAAibOrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P485	56	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)QVAAAib OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P507	57	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYAibQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P509	58	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P511	59	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P513	60	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAibOrnYAibQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P515	61	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAibOrnYLQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P517	62	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P519	63	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAibOrnYAibQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂

10

20

30

【表 4】

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

10

20

30

【表 5】

P555	119	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P557	120	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRK(WPEG40K)QLAAbuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P560	121	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAAbuAibOrnYLQSIOrn OrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH ₂
P562	122	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrn C(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P564	123	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH ₂
P566	124	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH ₂
P572	125	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P574	126	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAi bIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P576	127	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAi bIOrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P578	128	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQC(PEG40K)AAbuAib OrnY(OMe)LQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P580	129	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P582	130	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P584	131	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSI OrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P586	132	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQC(PEG40K)AAbuAib OrnY(OMe)LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P588	133	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSI OrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P590	134	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂

10

20

30

【表 6】

P597	135	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P599	136	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P601	137	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(WPEG40K)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P469	139	C6-HSDAVFTEK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)Y(OMe)TOrnLRAibQVAAAi bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P486	140	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)QVAAAi bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P553	141	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn C(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P570	144	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH ₂
P595	146	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAbuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P476	147	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAK(CO(CH ₂) ₂ SPEG 20K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P602	148	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH ₂

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VPAC2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 ₂) ₂ SPEG20K)RAibQVAAAi bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P490	76	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAi bOrnYL K(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P492	77	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAK(CO(CH ₂) ₂ SPEG 20K)AibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂

30

【表 8】

P495	78	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLQK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)IOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P497	79	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLSK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P499	80	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLSIOrnK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P501	81	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLC(PEG20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P503	82	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLS(PEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P505	83	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLSIOrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P402	138	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLSIOrnOrnGGPSSGAPPPK(W-PEG40K)-NH ₂
P558	142	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAAIbOrnYLSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P568	143	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAAIbOrnYLSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P593	145	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPK(WPEG40K)-NH ₂

10

20

【請求項 13】

以下の式で表される配列：

式 4 (配列番号 4) : X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - X a a₅ - X a a₆ - T h r - X a a₈ - X a a₉ - X a a₁₀ - T h r - X a a₁₂ - X a a₁₃ - X a a₁₄ - X a a₁₅ - X a a₁₆ - X a a₁₇ - X a a₁₈ - A b u - X a a₂₀ - X a a₂₁ - X a a₂₂ - X a a₂₃ - X a a₂₄ - X a a₂₅ - X a a₂₆ - X a a₂₇ - X a a₂₈ - X a a₂₉ - X a a₃₀ - X a a₃₁ - X a a₃₂ - X a a₃₃ - X a a₃₄ - X a a₃₅ - X a a₃₆ - X a a₃₇ - X a a₃₈ - X a a₃₉ - X a a₄₀

30

[式中、

X a a₁はH i s、d Hであるか又は存在せず、X a a₂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 a₃はA s p又はG l uであり、X a a₄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 a₅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、

40

X a a₆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 a₈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 a₉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 H₂)₂ S H)であり、X a a₁₀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 a₁₂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 a₁₃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 H₂)₂ S H)であり、X a a₁₄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)

50

、Phe、Gln、Aib、Cit、Ser又はCysであり、

Xaa₁₅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(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₁₆はGln、Lys、Glu、Ala、hR、Orn、Lys(イソプロピル)、Cit、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₁₇はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Nle、Lys、Aib、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₁₈はAla、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)K(W)、Abu又はNleであり、

Xaa₂₀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(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₁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(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₂₂はTyr、Trp、Phe、Thr、Leu、Ile、Val、Tyr(OMe)Ala、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₂₃はLeu、Phe、Ile、Ala、Trp、Thr、Val、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₂₄はGln、Glu、Asn、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₅はSer、Asp、Phe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp、Gln、Asn、Tyr、Aib、Glu、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₆はIle、Leu、Thr、Val、Trp、Tyr、Phe、Aib、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₇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(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₂₈はAsn、Asp、Gln、Lys、Arg、Aib、Orn、hR、Cit、Pro、dK、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₉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(CH₂)₂SH)であるか又は存在せず、

Xaa₃₀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(CH₂)₂SH)であるか又は存在せず、

Xaa₃₁はTyr、His、Phe、Thr、Cys、Ser、Lys、Gln、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH)であるか又は存在せず、

Xaa₃₂はSer、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa₃₃はTrpであるか又は存在せず、

Xaa₃₄はCysであるか又は存在せず、

Xaa₃₅はGluであるか又は存在せず、

Xaa₃₆はProであるか又は存在せず、

Xaa₃₇はGlyであるか又は存在せず、

10

20

30

40

50

X a a₃₈はT r pであるか又は存在せず、

X a a₃₉はC y sであるか又は存在せず、

X a a₄₀はA r gであるか又は存在せず、

式中、X a a₂₉、X a a₃₀、X a a₃₁、X a a₃₂、X a a₃₃、X a a₃₄、X a a₃₅、X a a₃₆、X a a₃₇、X a a₃₈又はX a a₃₉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）：X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - X a a₅ - X a a₆ - X a a₇ - X a a₈ - X a a₉ - X a a₁₀ - X a a₁₁ - X a a₁₂ 10

[式中、

X a a₁はG l y、C y sであるか又は存在せず、

X a a₂はG l y、A r gであるか又は存在せず、

X a a₃はP r o、T h rであるか又は存在せず、

X a a₄はS e rであるか又は存在せず、

X a a₅はS e rであるか又は存在せず、

X a a₆はG l yであるか又は存在せず、

X a a₇はA l aであるか又は存在せず、

X a a₈はP r oであるか又は存在せず、 20

X a a₉はP r oであるか又は存在せず、

X a a₁₀はP r oであるか又は存在せず、

X a a₁₁はS e r、C y sであるか又は存在せず、及び

X a a₁₂はC y sであるか又は存在せず、

C末端延長部分のX a a₁からX a a₁₂のうちの少なくとも5つは存在し、

X a a₁、X a a₂、X a a₃、X a a₄、X a a₅、X a a₆、X a a₇、X a a₈、X a a₉、X a a₁₀又はX a a₁₁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、 30

当該ペプチドアゴニストはP E G分子に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分子に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P E G分子に共有結合する少なくとも1つのK (C O (C H₂)₂ S H)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P E G分子に共有結合して付着するか、または 40

それらの組み合わせを含んでなる、

P E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項14】

請求項1から13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、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P E G化V P A C 2受容体ペプチドアゴニスト。

【請求項16】

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 VPAC2 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 VPAC2 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 VPAC2 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療方法。

【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 VPAC2 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 VPAC2 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 VPAC2 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産生及び / 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 (VPAC1 及び VPAC2) (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 VPAC 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關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）。

【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ァイ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當である。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、治療薬としての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薬剤に關連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)

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

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

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

【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)、

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

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

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

【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

【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】

本発明は、VPAC2受容体に選択的であり、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、選択的な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】

本発明の第1の態様では、

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

配列番号18: HSDAVFTEK(CO(CH₂)₂SH)Y(OMe)TO rnLRAibQVAAAIbOrnYLQSIOrnOrn、

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

配列番号20: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAIbK(CO(CH₂)₂SH)YLQSIOrnOrn、

配列番号21: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAK(CO(CH₂)₂SH)OrnYLQSIOrnOrn、

配列番号22: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVCAAIbOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号23: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRCQVAAAIbOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号24: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAAIbOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号25: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAIbOrnYAIbQSIOrnOrn、

配列番号26: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAIbOrnYLQAIbIOrnOrn、

配列番号27: HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAA buAi

10

20

30

40

50

bOrnYLQAibIOrnOrn、

配列番号28:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAAibO
rnYLQAibIOrnOrn、

配列番号29:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAAibO
rnYAibQAibIOrnOrn、

配列番号30:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi
bOrnYAibQSIOrnOrn、

配列番号31:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi
bOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号32:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi 10
bOrnYAibQAibIOrnOrn、

配列番号33:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAAibO
rnYAibQSIOrnOrn、

配列番号34:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRK(W)QVAAAib
OrnYLQSIOrnOrn、

配列番号35:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAibO
rnYLK(W)SIOrnOrn、

配列番号36:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQK(W)AAA
ibOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号37:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRK(CO(CH₂)₂SH 20
)QVAAAibOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号38:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAibK
(W)YLQSIOrnOrn、

配列番号39:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAibC
YLQSIOrnOrn、

配列番号40:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi
bOrnYLQAibIOrnOrn、

配列番号41:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAAibO
rnYLQSK(W)OrnOrn、

配列番号42:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi 30
bOrnYLQAibIOrnCO rn、

配列番号43:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi
bOrnYLQAibCO rnOrn、

配列番号44:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQCAAbuAi
bOrnYLQAibIOrnOrn、

配列番号45:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRCQLAAbuAibO
rnYLQAibIOrnOrn、

配列番号94:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVK(CO(C
H₂)₂SH)AAibOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号95:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi 40
bOrnYLQSIOrnCO rn、

配列番号96:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi
bOrnYLQSCOrnOrn、

配列番号97:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi
bOrnYLQAibIO rnK(CO(CH₂)₂SH)Orn、

配列番号98:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAi
bOrnYLQSIOrnK(CO(CH₂)₂SH)Orn、

配列番号99:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRK(W)QLAAbuA
ibOrnYLQAibIO rnOrn、

配列番号100:HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAAib 50

OrnYLQSIOrnOrnC、

配列番号101: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAib
OrnYLQSIOrnOrnC、

配列番号102: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuA
ibOrnYLQSIOrnOrnC、

配列番号103: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuA
ibOrnY(OMe)LQAibIOrnOrn、

配列番号104: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuA
ibOrnY(OMe)LQAibIOrnCOrn、

配列番号105: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQCAAbuA
ibOrnY(OMe)LQAibIOrnOrn、

配列番号106: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuA
ibOrnYLQAibIOrnOrnC、

配列番号107: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuA
ibOrnY(OMe)LQSIOrnOrn、

配列番号108: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQCAAbuA
ibOrnY(OMe)LQSIOrnOrn、

配列番号109: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuA
ibOrnY(OMe)LQSIOrnCOrn、

配列番号110: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAA
ibOrnYLQSIOrnOrn、

配列番号111: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(CO(C
H₂)₂SH)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn、及び

配列番号112: HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQK(W)A
buAibOrnYLQAibIOrnOrn、

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PEG化VPAC2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): Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa
7-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂

で表されるアミノ酸配列である。

式中、Xaa₁はGly、Cys又は存在せず、

Xaa₂はGly、Arg又は存在せず、

Xaa₃はPro、Thr又は存在せず、

Xaa₄はSer又は存在せず、

Xaa₅はSer又は存在せず、

Xaa₆はGly又は存在せず、

Xaa₇はAla又は存在せず、

Xaa₈はPro又は存在せず、

Xaa₉はPro又は存在せず、

Xaa₁₀はPro又は存在せず、

Xaa₁₁はSer、Cys又は存在せず、及び

Xaa₁₂はCys又は存在せず、

C末端延長部分のXaa₁からXaa₁₂の少なくとも5つは存在し、

Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa
9、Xaa₁₀又はXaa₁₁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PEG分子と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分子と共有結合する少なくとも1つのLys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 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 ₂)₂ 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。

【 0 0 1 2 】

好ましくは、式 3 の C 末端延長部分の X a a₁ から X a a₁₂ 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 a a₁ から X a a₁₂ のうちの少なくとも 7、8、9、10、11 又は全てが存在する。

10

【 0 0 1 3 】

好ましくは、P E G 化 V P A C 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	GGPSSGAPPPS
配列番号 6	GGPSSGAPPPS-NH ₂
配列番号 7	GGPSSGAPPPC
配列番号 8	GGPSSGAPPPC-NH ₂
配列番号 9	GRPSSGAPPPS
配列番号 10	GRPSSGAPPPS-NH ₂
配列番号 11	GGPSSGAPPPCC
配列番号 12	GGPSSGAPPPCC-NH ₂

20

【 0 0 1 4 】

更に好ましくは、P E G 化 V P A C 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。

【 0 0 1 5 】

本発明の第 1 の態様に従って V P A C 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 L y s、C y s、K (W) 又は K (C O (C H ₂)₂ S H) 残基に、1 つ以上の P E G 分子を共有結合させてもよい。

30

【 0 0 1 6 】

P E G 化 V P A C 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 P E G 化されているのが好ましい。

【 0 0 1 7 】

P E G 化 V P A C 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 P E G 化されているのが好ましい。

40

【 0 0 1 8 】

P E G 化 V P A C 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 (C O (C H ₂)₂ S H) 残基が P E G 化されているのが好ましい。

【 0 0 1 9 】

P E G 化 V P A C 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 P E G 分子が前記 C 末端延長部分の 1 つ以上の C y s 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 L y s、C y s、K (W) 又は K (C O (C H ₂)₂ S H) 残基と、1 つ以上の C y s 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 P E G 化された残基が存在してもよい。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、V P A C 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 P E G 分子が共有結合して存在する。

【 0 0 2 1 】

1 を超える P E G 分子が存在する場合、L y s、C y s、K (C O (C H ₂) ₂ S H)、K (W) 及びカルボキシ末端における P E G 化アミノ酸の組合せが存在してもよい。例えば、2 つの P E G 分子が存在する場合、1 つが L y s 残基に結合し、もう 1 つが C y s 残基に結合してもよい。

10

【 0 0 2 2 】

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

【 0 0 2 3 】

好ましくは、P E G 分子は 1 , 0 0 0 D a ~ 1 0 0 , 0 0 0 D a の分子量である。好ましくは、P E G 分子は 1 0 , 0 0 0、2 0 , 0 0 0、3 0 , 0 0 0、4 0 , 0 0 0、5 0 , 0 0 0 及び 6 0 , 0 0 0 D a から選択される。更に好ましくは、2 0 , 0 0 0、3 0 , 0 0 0、4 0 , 0 0 0 又は 6 0 , 0 0 0 D a 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 P E G 分子が 2 つ存在する場合、各々は 1 , 0 0 0 ~ 4 0 , 0 0 0 D a であり、好ましくは 2 0 , 0 0 0 及び 2 0 , 0 0 0 D a、1 0 , 0 0 0 及び 3 0 , 0 0 0 D a、3 0 , 0 0 0 及び 3 0 , 0 0 0 D a 又は 2 0 , 0 0 0 及び 4 0 , 0 0 0 D a の分子量を有する。

20

【 0 0 2 4 】

P E G 化 V P A C 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 X a a ₁ 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。

【 0 0 2 5 】

好ましくは、本発明の第 1 の態様に係る P E G 化 V P A C 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。

30

(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、C₁ - C₆ アルコキシ、- N H₂、- O H、ハロゲン及び - C F₃ 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 C₁ - C₁₆ アルキルの付加、

(d) - C (O) R¹ の添加 (式中、R¹ は、C₁ - C₁₆ アルキル (アリール、C₁ - C₆ アルコキシ、- N H₂、- O H、ハロゲン - S H 及び - C F₃ 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 (C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、C₁ - C₆ アルコキシ、- N H₂、- O H、ハロゲン 及び - C F₃ 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 C₁ - C₄ アルキル (C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、C₁ - C₆ アルコキシ、- N H₂、- O H、ハロゲン 及び - C F₃ 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 R² R³ (式中、R² 及び R³ は独立に水素、C₁ - C₆ アルキル、アリール又はアリール C₁ - C₄ アルキルである) であるか、- O R⁴ (R⁴ は C₁ - C₁₆ アルキル (アリール、C₁ - C₆ アルコキシ、- N H₂、- O H、ハロゲン 及び - C F₃ 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 (C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、C₁ - C₆ アルコキシ、- N H₂、- O H、ハロゲン 及び - C F₃ 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 C₁ - C₄ アルキル (C₁ -

40

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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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) $-SO_2R^5$ の付加(式中、 R^5 がアリール、アリール $C_1 - C_4$ アルキル又は $C_1 - C_{16}$ アルキルである)、

(f) $C_1 - C_6$ アルキル又は $-SR^6$ 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^6 が水素又は $C_1 - C_6$ 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) $-C(=NH)-NH_2$ 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 $-C(=NH)-NH_2$ 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VPAC2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VPAC2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)TOmLRAibQVAAAibK(W-PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

30

【表 3】

P417	47	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TRAIbRAibQLAAAIbOrnY(OMe)LQSIKAIbOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P451	48	C6-HSDAVFTEK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)Y(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P454	49	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLQSIOrnK(WPEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P460	50	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbC(PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P472	51	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P473	52	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P475	53	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P478	54	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVC(PEG40K)AAIbOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P483	55	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRC(PEG40K)QVAAAIbOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P485	56	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)QVAAAIbOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P507	57	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P509	58	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P511	59	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAIbOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P513	60	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAAIbOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P515	61	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAAIbOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂

10

20

30

【表 4】

P517	62	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P519	63	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAAbuAibOrnYAibQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P521	64	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P523	65	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P525	66	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P529	67	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRK(WPEG40K)QVAAAbuAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P531	68	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAAbuAibOrnYLK(WPEG40K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P533	69	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQK(WPEG40K)AAAbuAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P535	70	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQVAAAbuAibOrnYLQSK(WPEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P537	71	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P541	72	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibC(PEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P545	73	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRAibQC(PEG40K)AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P547	74	C6-HSDAVFTEQY(Ome)TOrnLRC(PEG40K)QLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P480	113	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P481	114	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P539	115	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P543	116	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSC(PEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

10

20

30

【表 5】

P549	117	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYL QAibIOrnK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P551	118	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYL QSIOrnK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P555	119	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P557	120	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRK(WPEG40K)QLAAbuAib OrnYLAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P560	121	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrn OrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH ₂
P562	122	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P564	123	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLAibIOrnOr nC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH ₂
P566	124	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH ₂
P572	125	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSI OrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P574	126	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P576	127	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAibI OrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P578	128	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG40K)AAbuAib OrnY(OMe)LQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P580	129	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLAibIOrnOr nC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P582	130	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSIOr nOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P584	131	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSIOr nC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P586	132	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG40K)AAbuAib OrnY(OMe)LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

10

20

30

【表 6】

P588	133	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQSI OrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P590	134	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAbuAAibOrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH ₂
P597	135	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)AAb uAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P599	136	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)AAb uAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P601	137	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQK(WPEG40K)AAbuAibOrnY LQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P469	139	C6-HSDAVFTEK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)Y(OMe)TOmLRAibQVAAAi bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P486	140	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)QVAAAi bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P553	141	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn C(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P570	144	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH ₂
P595	146	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQC(PEG20K)AAbuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P476	147	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQVAAK(CO(CH ₂) ₂ SPEG 20K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P602	148	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOmLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrn OrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH ₂

10

20

【0029】

より好ましい本発明の第1の態様に係るPEG化VPAC2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。

30

【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VPAC2受容体ペプチドアゴニストの提供に関する。

【表 7】

アゴニ スト#	配列番号	配列
P470	75	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)RAibQVAAA ibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P490	76	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYL K(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P492	77	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAK(CO(CH ₂) ₂ SPEG 20K)AibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P495	78	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQ K(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)IOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P497	79	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLS K(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P499	80	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnK(C O(CH ₂) ₂ SPEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P501	81	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLC(PEG 20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P503	82	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSC (PEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P505	83	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnC(PE G20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P402	138	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrn GGPSSGAPPPK(W-PEG40K)-NH ₂
P558	142	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAAibOrnYLQ SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P568	143	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQC(PEG20K)AAAibOrnYLQ SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P593	145	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQ AibIOrnOrnGGPSSGAPPPK(WPEG40K)-NH ₂

10

20

30

【 0 0 3 1 】

より好ましい本発明の第 2 態様に係る P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストは、配列番号 8 0 又は配列番号 8 3 のアミノ酸配列を含んでなる。

【 0 0 3 2 】

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

40

(式中、

X a a ₁ は H i s 、 d H であるか又は存在せず、

X a a ₂ 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 ₃ は A s p 又は G l u であり、

X a a ₄ 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、

50

Xaa₅はVal、Leu、Phe、Ile、Thr、Trp、Tyr、dV、Aib
又はNMeVであり、

Xaa₆はPhe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp又はTyrであり、

Xaa₈はAsp、Glu、Ala、Lys、Leu、Arg又はTyrであり、

Xaa₉はAsn、Gln、Asp、Glu、Ser、Cys、Lys又はK(CO(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₁₀はTyr、Trp、Tyr(OMe)、Ser、Cys又はLysであり、

Xaa₁₂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、

Xaa₁₃はLeu、Phe、Glu、Ala、Aib、Ser、Cys、Lys又はK(CO(CH₂)₂SH)であり、 10

Xaa₁₄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、

Xaa₁₅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(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₁₆はGln、Lys、Glu、Ala、hR、Orn、Lys(イソプロピル)、Cit、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₁₇はVal、Ala、Leu、Ile、Met、Nle、Lys、Aib、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、 20

Xaa₁₈はAla、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)K(W)、Abu又はNleであり、

Xaa₂₀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(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₁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(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₂₂はTyr、Trp、Phe、Thr、Leu、Ile、Val、Tyr(OMe)Ala、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH₂)₂SH)であり、 30

Xaa₂₃はLeu、Phe、Ile、Ala、Trp、Thr、Val、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W)又はK(CO(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₂₄はGln、Glu、Asn、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₅はSer、Asp、Phe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp、Gln、Asn、Tyr、Aib、Glu、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₆はIle、Leu、Thr、Val、Trp、Tyr、Phe、Aib、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、 40

Xaa₂₇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(CH₂)₂SH)であり、

Xaa₂₈はAsn、Asp、Gln、Lys、Arg、Aib、Orn、hR、Cit、Pro、dK、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH)又はK(W)であり、

Xaa₂₉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(CH₂)₂SH)であるか又は存在せず、 50

Xaa₃₀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(CH₂)₂SH)であるか又は存在せず、

Xaa₃₁はTyr、His、Phe、Thr、Cys、Ser、Lys、Gln、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH)であるか又は存在せず、

Xaa₃₂はSer、Cys、Lysであるか又は存在せず、

Xaa₃₃はTrpであるか又は存在せず、

Xaa₃₄はCysであるか又は存在せず、

Xaa₃₅はGluであるか又は存在せず、

10

Xaa₃₆はProであるか又は存在せず、

Xaa₃₇はGlyであるか又は存在せず、

Xaa₃₈はTrpであるか又は存在せず、

Xaa₃₉はCysであるか又は存在せず、

Xaa₄₀はArgであるか又は存在せず、

式中、Xaa₂₉、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₂、Xaa₃₃、Xaa₃₄、Xaa₃₅、Xaa₃₆、Xaa₃₇、Xaa₃₈又はXaa₃₉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：

20

式3(配列番号3)：Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂

(式中、Xaa₁はGly、Cysであるか又は存在せず、

Xaa₂はGly、Argであるか又は存在せず、

Xaa₃はPro、Thrであるか又は存在せず、

Xaa₄はSerであるか又は存在せず、

Xaa₅はSerであるか又は存在せず、

Xaa₆はGlyであるか又は存在せず、

Xaa₇はAlaであるか又は存在せず、

Xaa₈はProであるか又は存在せず、

30

Xaa₉はProであるか又は存在せず、

Xaa₁₀はProであるか又は存在せず、

Xaa₁₁はSer、Cysであるか又は存在せず、及び

Xaa₁₂はCysであるか又は存在せず、

C末端延長部分のXaa₁からXaa₁₂のうちの少なくとも5つは存在し、

Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀又はXaa₁₁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、

40

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(CH₂)₂SH)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、

50

それらの組み合わせを含んでなる、
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。

【 0 0 3 3 】

好ましくは、第 3 の本発明の態様に係る P E G 化 V P A C 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、

X a a₃ は A s p 又は G l u であり、
X a a₈ は A s p 又は G l u であり、
X a a₉ は A s n 又は G l n であり、
X a a₁₀ は T y r 又は T y r (O M e) であり、
X a a₁₂ は A r g 、 h R 、 L y s 又は O r n であり、
X a a₁₄ は A r g 、 G l n 、 A i b 、 h R 、 O r n 、 C i t 、 L y s 、 A l a 又は L e u であり、
X a a₁₅ は L y s 、 A i b 、 O r n 又は A r g であり、
X a a₁₆ は G l n 又は L y s であり、
X a a₁₇ は V a l 、 L e u 、 A l a 、 I l e 、 L y s 又は N l e であり、
X a a₂₀ は L y s 、 V a l 、 L e u 、 A i b 、 A l a 、 G l n 又は A r g であり、
X a a₂₁ は L y s 、 A i b 、 O r n 、 A l a 、 G l n 又は A r g であり、
X a a₂₃ は L e u 又は A i b であり、X a a₂₅ は S e r 又は A i b であり、
X a a₂₇ は L y s 、 O r n 、 h R 又は A r g であり、
X a a₂₈ は A s n 、 G l n 、 L y s 、 h R 、 A i b 、 O r n 又は P r o であり、
X a a₂₉ は L y s 、 O r n 、 h R であるか又は存在しない。

【 0 0 3 4 】

好ましくは、本発明の第 3 の態様に係る P E G 化 V P A C 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、X a a₂₃ 又は X a a₂₅ は A i b である。更に好ましくは、X a a₂₃ 及び X a a₂₅ の両方が A i b である。

【 0 0 3 5 】

好ましくは、本発明の第 3 の態様に係る P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストは、X a a₁₄ 又は X a a₁₅ が A i b である式 4 の配列を含んでなる。

【 0 0 3 6 】

あるいは、本発明の第 3 の態様に係る P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストは、X a a₂₀ 又は X a a₂₁ が A i b である式 4 の配列を含んでなる。

【 0 0 3 7 】

より好ましくは、X a a₁₄ 又は X a a₁₅ が A i b であり、X a a₂₀ 又は X a a₂₁ が A i b である。X a a₁₅ が A i b で、X a a₂₀ が A i b であるのが特に好ましい。

【 0 0 3 8 】

好ましくは、本発明の第 3 の態様に係る P E G 化 V P A C 2 受容体ペプチドアゴニストは、X a a₁₅ が A i b であり、X a a₂₀ が A i b であり、X a a₁₂、X a a₂₁、X a a₂₇ 及び X a a₂₈ が全て O r n である式 4 の配列を含んでなる。好ましくは、X a a₁₅ は A i b であり、X a a₂₀ は A i b であり、X a a₁₂、X a a₂₁、X a a₂₇ 及び X a a₂₈ は全て O r n であり、X a a₈ は G l u であり、X a a₉ は G l n であり、X a a₁₀ は T y r (O M e) である。更に好ましくは、X a a₁₅ は A i b であり、X a a₂₀ は A i b であり、X a a₁₂、X a a₂₁、X a a₂₇ 及び X a a₂₈ は全て O r n であり、X a a₈ は G l u であり、X a a₉ は G l n であり、X a a₁₀ は T y r (O M e) であり、X a a₂₃ 及び / 又は X a a₂₅ は A i b である。X a a₈、X a a₉、X a a₁₀、X a a₁₂、X a a₁₅、X a a₂₀、X a a₂₁、X a a₂₃、X a a₂₅、X a a₂₇ 及び X a a₂₈ のうちの 1 つ以上が、P E G 化された L y s 、C y s 、K (C O 、C H₂)₂ S H) 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。

【 0 0 3 9 】

好ましくは、式 3 の C 末端延長部分の X a a₁ から X a a₁₂ のうちの少なくとも 6 つが

存在する。好ましくは、C末端延長部分のX a a₁からX a a₁₂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VPAC2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VPAC2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VPAC2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(CH₂)₂SH)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るもよい。式4による配列が1つ以上のLys、Cys、K(W)又はK(CO(CH₂)₂SH)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、VPAC2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(CH₂)₂SH) 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VPAC2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、C₁-C₆アルコキシ、-NH₂、-OH、ハロゲン及び-CF₃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C₁-C₁₆アルキルの付加、

10

20

30

40

50

- (d) $-C(O)R^1$ の添加(式中、 R^1 は、 $C_1 - C_{16}$ アルキル(アリール、 $C_1 - C_6$ アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン $-SH$ 及び $-CF_3$ 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($C_1 - C_6$ 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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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 $C_1 - C_4$ アルキル($C_1 - C_6$ 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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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、 $-NR^2R^3$ (式中、 R^2 及び R^3 は独立に水素、 $C_1 - C_6$ アルキル、アリール又はアリール $C_1 - C_4$ アルキルである)であるか、 $-OR^4$ (R^4 は $C_1 - C_{16}$ アルキル(アリール、 $C_1 - C_6$ アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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($C_1 - C_6$ 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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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 $C_1 - C_4$ アルキル($C_1 - C_6$ 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、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、ハロゲン及び $-CF_3$ 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) $-SO_2R^5$ の付加(式中、 R^5 がアリール、アリール $C_1 - C_4$ アルキル又は $C_1 - C_{16}$ アルキルである)、
- (f) $C_1 - C_6$ アルキル又は $-SR^6$ 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^6 が水素又は $C_1 - C_6$ 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-アミノヘキサノ酸(6-アミノカプロン酸)の付加及び
- (i) $-C(=NH)-NH_2$ 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-アミノヘキサノ酸(6-アミノカプロン酸)及び $-C(=NH)-NH_2$ 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VPAC2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VPAC2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、本発明のPEG化VPAC2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、医薬としての使用のための、本発明のPEG化VPAC2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、インスリン非依存性糖尿病の治療のための医薬の製造

10

20

30

40

50

のための、本発明の PEG 化 VPAC2 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 VPAC2 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 VPAC2 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療方法を提供し、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ってよい。

【0057】

本発明は更に、本発明の PEG 化 VPAC2 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。

10

【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 末端延長部分であって、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 VPAC2 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) : $Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 - Xaa_8 - Xaa_9 - Xaa_{10} - Xaa_{11} - Xaa_{12} - Xaa_{13}$

(式中、

20

Xaa_1 は Gly、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_2 は Gly、Arg、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_3 は Pro、Thr、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_4 は Ser、Pro、His、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_5 は Ser、Arg、Thr、Trp、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

30

Xaa_6 は Gly、Ser、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_7 は Ala、Asp、Arg、Glu、Lys、Gly、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_8 は Pro、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_9 は Pro、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_{10} は Pro、Ser、Ala、Arg、Lys、His、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

40

Xaa_{11} は Ser、Cys、His、Pro、Lys、Arg、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_{12} は His、Ser、Arg、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_{13} は His、Ser、Arg、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 又は存在せず、

Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 、 Xaa_4 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 、 Xaa_{10} 、 Xaa_{11} 又は Xaa_{12} 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、

50

当該ペプチドアゴニストは P E G 分子に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 分子に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 P E G 分子に共有結合する少なくとも 1 つの K (C O (C H₂)₂ 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は P E G 分子に共有結合するか、又は、それらの組み合わせである。)

【 0 0 5 9 】

式 1 の C 末端延長部分が、C y s、L y s、K (W) 又は K (C O (C H₂)₂ S H) 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 C y s 残基が C 末端延長部分に存在する場合、C y s 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 C y s 残基だけが存在する場合、C y s 残基が C 末端に存在するのが好ましい。

【 0 0 6 0 】

好ましくは、上記の他の実施態様に関する P E G 化 V P A C 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) : X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - X a a₅ - X a a₆ - X a a₇ - X a a₈ - X a a₉ - X a a₁₀ - X a a₁₁ - X a a₁₂ - X a a₁₃

(式中、

X a a₁ は G l y、C y s、L y s であるか又は存在せず、

X a a₂ は G l y、A r g、C y s、L y s であるか又は存在せず、

X a a₃ は P r o、T h r、S e r、A l a、C y s、L y s であるか又は存在せず、

X a a₄ は S e r、P r o、H i s、C y s、L y s であるか又は存在せず、

X a a₅ は S e r、A r g、T h r、T r p、L y s、C y s であるか又は存在せず、

X a a₆ は G l y、S e r、C y s、L y s であるか又は存在せず、

X a a₇ は A l a、A s p、A r g、G l u、L y s、G l y、C y s であるか又は存在せず、

X a a₈ は P r o、S e r、A l a、C y s、L y s であるか又は存在せず、

X a a₉ は P r o、S e r、A l a、C y s、L y s であるか又は存在せず、

X a a₁₀ は P r o、S e r、A l a、A r g、L y s、H i s、C y s であるか又は存在せず、

X a a₁₁ は S e r、C y s、H i s、P r o、L y s、A r g であるか又は存在せず、

X a a₁₂ は H i s、S e r、A r g、L y s、C y s であるか又は存在せず、及び

X a a₁₃ は H i s、S e r、A r g、L y s、C y s であるか又は存在せず、

但し X a a₁、X a a₂、X a a₃、X a a₄、X a a₅、X a a₆、X a a₇、X a a₈、X a a₉、X a a₁₀、X a a₁₁ 又は X a a₁₂ 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)。

【 0 0 6 1 】

好ましくは、式 1 又は 2 の C 末端延長部分の X a a₁ から X a a₁₃ 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 X a a₁ から X a a₁₃ 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。

【 0 0 6 2 】

好ましくは、上記の別の実施態様に係る P E G 化 V P A C 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) : $Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 - Xaa_8 - Xaa_9 - Xaa_{10} - Xaa_{11} - Xaa_{12}$

(式中、

Xaa_1 は G l y、C y s であるか又は存在せず、

Xaa_2 は G l y、A r g であるか又は存在せず、

Xaa_3 は P r o、T h r であるか又は存在せず、

Xaa_4 は S e r であるか又は存在せず、

Xaa_5 は S e r であるか又は存在せず、

Xaa_6 は G l y であるか又は存在せず、

Xaa_7 は A l a であるか又は存在せず、

Xaa_8 は P r o であるか又は存在せず、

Xaa_9 は P r o であるか又は存在せず、

Xaa_{10} は P r o であるか又は存在せず、

Xaa_{11} は S e r、C y s であるか又は存在せず、及び

Xaa_{12} は C y s であるか又は存在せず、

但し Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 、 Xaa_4 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 、 Xaa_{10} 又は Xaa_{11} 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)。

【 0 0 6 3 】

好ましくは、式 3 の C 末端延長部分の Xaa_1 から Xaa_{12} 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 Xaa_1 から Xaa_{12} 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。

【 0 0 6 4 】

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 1 3 (配列番号 1 3) : $Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Xaa_4 - Xaa_5 - Xaa_6 - Xaa_7 - Xaa_8 - Xaa_9 - Xaa_{10}$

(式中、

Xaa_1 は S e r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、

Xaa_2 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 ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、

Xaa_3 は T h r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、

Xaa_4 は S e r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、

Xaa_5 は P r o、S e r、A l a、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、

Xaa_6 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 ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、

Xaa_7 は P r o、S e r、A l a、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、

Xaa_8 は L y s、K (W) P r o、C y s、K (C O (C H ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、

Xaa_9 は K (E C ₁₆) S e r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H ₂) ₂ S H) であるか又は存在せず、及び

Xaa_{10} は S e r、C y s、L y s、K (W)、K (C O (C H ₂) ₂ S H) であるか又は存在しない。))

【 0 0 6 5 】

式 13 の Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 、 Xaa_4 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 又は Xaa_9 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 Xaa_1 から Xaa_{10} 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 Xaa_1 から Xaa_{10} 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。

【表 8】

配列番号 85	SRTSPPP
配列番号 86	SRTSPPP-NH ₂
配列番号 87	SSTSPRPPSS
配列番号 88	SSTSPRPPSS-NH ₂
配列番号 89	SRTSPPPK (W)
配列番号 90	SRTSPPPK (W) -NH ₂
配列番号 91	SRTSPPPC
配列番号 92	SRTSPPPC-NH ₂

【0068】

本発明の VPAC2 受容体ペプチドアゴニストは、公知の VPAC2 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 VPAC2 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】

VPAC2 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 PEG の共有結合により、非 PEG 化 VPAC2 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 PEG 化された VPAC2 受容体ペプチドアゴニストが得られる。

【0070】

用語「VPAC2」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、FEBS 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 VPAC2 受容体ペプチドアゴニスト」又は「VPAC2 受容体ペプチドアゴニスト」は、選択的に VPAC2 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 VPAC2 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。

【0072】

「選択的な PEG 化 VPAC2 受容体ペプチドアゴニスト」又は「PEG 化 VPAC2 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グリコール (PEG) が共有結合している選択的な VPAC2 受容体ペプチドアゴニスト又はその誘導体を指し、各 PEG は、アミノ酸 (システイン若しくはリジン)、K (W) 若しくは K (CO (CH₂)₂SH)、又はペプチドのカルボキシ末端に結合する。

【0073】

10

20

30

40

50

選択的なPEG化VPAC2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るCys、Lys、K(W)又はK(CO(CH₂)₂SH)残基もPEG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PEG分子が共有結合していてもよい。

【0074】

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。

【0075】

所望により、選択的なPEG化VPAC2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。

【0076】

N末端修飾には、VPAC2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: Ser Trp - Cys - Glu - Pro Gly - Trp - Cys - Arg (ここで、Arg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。

【0077】

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、VPAC2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。

【0078】

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C₁-C₁₆アルキル基)を付加して修飾し、(R)NH-を形成させてもよい。

【0079】

あるいは、ペプチドアゴニストのN末端に式-C(O)R¹の基を付加して修飾し、式R¹C(O)NH-のアミドを形成させてもよい。式R¹COOHの有機酸と反応させて式-C(O)R¹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(例えばGozesら、J. Pharmacol Exp Ther、273:161-167(1995)を参照)。式-C(O)R¹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。

【0080】

ペプチドアゴニストのN末端に式-SO₂R⁵の基を付加して修飾し、N末端でスルホンアミド基を形成させてもよい。

【0081】

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。

【0082】

あるいは、メチオニンスルホキシド(ピオチニル-6-アミノヘキサン酸)又は-C(=NH)-NH₂の付加によりN末端を修飾してもよい。-C(=NH)-NH₂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NH₂が-NHC(=NH)-NH₂となる。

【0083】

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。

C6 = 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、dA = D-アラニン、dS = D-セリン、dK = D-リジン）、

hR = ホモアルギニン、

Aib = アミノイソ酪酸、

OMe = メトキシ基、

Nle = Nor-ロイシン、

NMe = アミノ酸のアミノ基に結合するNメチル基（例えば、NMeA = N-メチルアラニン、NMeV = N-メチルバリン）、

Orn = オルニチン、

K(CO(CH₂)₂SH) = - (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、

Abu = - アミノ-n-酪酸又は2-アミノブタン酸、

Cit = シトルリン、

K(Ac) = - アセチルリジン、

PEG = ポリエチレングリコール、

PEG40K = 40,000ダルトンのPEG分子、

PEG30K = 30,000ダルトンのPEG分子、

PEG20K = 20,000ダルトンのPEG分子。

【0084】

VIP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、PACAP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(PACAP-38)又は27アミノ酸のペプチド(PACAP-27)のいずれかとして存在する(Miyataら、Biochem Biophys Res Commun、170:643-648(1990))。VIP、PACAP-27及びPACAP-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14	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILN
PACAP-27	配列番号15	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH ₂
PACAP-38	配列番号16	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYQ RVKN K-NH ₂

【0085】

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。

【0086】

「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（

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)などが挙げられる。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包含される。

【0087】

本発明の用語「選択的」とは、VPAC2受容体ペプチドアゴニストが、他の公知の受容体よりもVPAC2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、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、又は、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。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。インスリン分泌性活性は公知の方法で評価することができ、例えばVPAC2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)などが挙げられる。インスリン分泌性活性は、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VPAC2受容体ペプチドアゴニストはインスリン分泌性活性を有する。

【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VPAC2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「EC₅₀」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、DiscoverX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VPAC2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($t_{1/2}$)、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、 $t_{1/2} \sim 0.693 (V/C)$ 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し示すものではなく、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)TOrnLRAibQLAAAIbOrnYLQSI
配列番号 84	OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

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 $100 - (4 / 39) \times 100$ ）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 $100 - (5 / 39) \times 100$ ）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, 1128, Selfpark 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、Cladograms 又は Phylograms 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 VPAC2 受容体ペプチドアゴニストの配列は VPAC2 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「 $C_1 - C_{16}$ 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「 $C_1 - C_{16}$ 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。 $C_1 - C_{16}$ アルキル基は、例えばアリール、 $C_1 - C_6$ アルコキシ基、-OH、ハロゲン、-CF₃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「 $C_1 - C_6$ 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「 $C_1 - C_6$ 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。 $C_1 - C_6$ 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「 $C_2 - C_6$ 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「 $C_2 - C_6$ アルケニル」にはビニル、プロプ-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。 $C_2 - C_6$ 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「 $C_2 - C_6$ 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「 $C_2 - C_6$ アルキニル」には、プロプ-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。 $C_2 - C_6$ 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。

【0100】

本発明の用語「 $C_1 - C_6$ 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「 $C_1 - C_6$ 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。 $C_1 - C_6$ 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 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_2 - C_6$ アルキニル、-NH₂、-OH、ハロゲン、-SH及びCF₃が挙げられる。

40

【0103】

本発明の用語「アリール $C_1 - C_4$ アルキル」とは、アリールで置換された $C_1 - C_4$ アルキルを意味する。すなわち、用語「アリール $C_1 - C_4$ アルキル」には、ベンジル、1-フ

50

ェニルエチル (- 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。

【 0 1 0 4 】

「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。

【 0 1 0 5 】

本発明の用語「ベンジル」とは、 $-CH_2-$ 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。

【 0 1 0 6 】

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、ピリミジニル、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。

【 0 1 0 7 】

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、プ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 - 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 - ナフチリジニル、1, 6 - ナフチリジニル、1, 7 - ナフチリジニル及び1, 8 - ナフチリジニル。

【 0 1 0 8 】

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 $HO-CH_2CH_2-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$ (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

10

20

30

40

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VPAC2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VPAC2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VPAC2受容体ペプチドアゴニスト1分子当たり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分子の両端をホモ若しくはヘテロ官能化し、2つ以上のVPAC2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(CH₂)₂SH)基をPEG化してK(CO(CH₂)₂S-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(CH₂)₂SH)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VPAC2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VPAC2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VPAC2受容体ペプチドアゴニストの提供に関し、当該VPAC2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、ピオチニル-6-アミノヘキサノ酸(6-アミノカプロン酸)及び-C(=NH)-NH₂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VPAC2受容体ペプチドアゴニストの提供に関し、当該PEG化VPAC2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、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) - NH₂ 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。

【 0 1 1 4 】

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 VPAC2 受容体ペプチドアゴニストの提供に関し、式中、Xaa₁₅ は Aib であり、Xaa₂₀ は Aib であり、Xaa₁₂、Xaa₂₁、Xaa₂₇ 及び Xaa₂₈ 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 VPAC2 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、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) - NH₂ の付加である。本実施態様では、より好ましくは、Xaa₁₅ が Aib であり、Xaa₂₀ が Aib であり、Xaa₁₂、Xaa₂₁、Xaa₂₇ 及び Xaa₂₈ が全て Orn であり、Xaa₈ が Glu であり、Xaa₉ が Glu であり、Xaa₁₀ が Tyr (OMe) である。特に好ましくは、Xaa₁₅ が Aib であり、Xaa₂₀ が Aib であり、Xaa₁₂、Xaa₂₁、Xaa₂₇ 及び Xaa₂₈ が全ての Orn であり、Xaa₈ が Glu であり、Xaa₉ が Glu であり、Xaa₁₀ が Tyr (OMe) であり、Xaa₂₃ 及び / 又は Xaa₂₅ が Aib である。

10

20

【 0 1 1 5 】

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。

【 0 1 1 6 】

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。

30

例えば、サイトカインの PEG 化により、PEG 化が有しうる効果が示される。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., et al., (1998), PEGylation of cytokines and peptides: the importance of biological optimization of coupling techniques, Intl. 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。

40

【 0 1 1 7 】

本発明の VPAC2 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 VPAC2 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

50

E G 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ートープが保護され、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包含される。

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、セリンのスキャンニングを実施した。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 ₂)₂ S H) 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200 mL / h / kg 以下、より好ましくは180、150、120、100、80、60 mL / h / kg 以下、最も好ましくは50、40又は20 mL / 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包含される。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(E n g 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) 及びヘロスぺクチン(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ぺクチンは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

V I P 及び幾つかの公知の V P A C 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 P A C 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 V I P (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 - I V (D P P - I V) によるペプチドアゴニストの開裂は、位置 2 (V I P の S e r) 及び位置 3 (V I P 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 D P P - I V による切断に対してより安定になる。D P P - I V 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 (= N H) - N H ₂ 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 V I P 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 T y r (O M e) による置換により安定性が向上しうる。

20

【0126】

野生型 V I P 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。

【0127】

野生型 V I P、及び公知の多数の V P A C 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 P E G 化 V P A C 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 P E G 化 V P A C 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 V I P のアミノ酸位置 25 と 26 の間にも存在する。

【0129】

V P A C 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ターゼ (N E P) に対してより安定になることもありえ、V P A C 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 P E G 化 V P A C 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EC₅₀値を示す。好ましくは、EC₅₀値は100nM未満である。更に好ましくは、EC₅₀値は50nM未満である。最も好ましくは、EC₅₀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より少なくとも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-プ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、カプリル酸塩、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、スベリン酸塩、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、 α -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

40

【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。

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。

【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、Alkermes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る。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。

【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効果を及ぼす。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。

【0139】

本発明の選択的なPEG化VPAC2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、VPAC2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VPAC2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、膵臓 - 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）（Herman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

【0140】

本発明の選択的PEG化VPAC2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。

30

【0141】

本発明の選択的PEG化VPAC2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VPAC2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、多嚢胞性卵巣症候群、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。

40

【0143】

本発明の選択的PEG化VPAC2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。それらは例えば膵臓細胞の不全、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

は膵臓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、膵臓細胞質量の減少、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、多嚢胞性卵巣の疾患、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、NOシンターゼ(NOS)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、HDL及びLDL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VPAC2受容体ペプチドアゴニストは喘息の治療(Bolinら、Biopolymer 37:57-66(1995)、米国特許第5677419号、ポリペプチドR3PO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(VIP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(Moriceら、Peptides 7:279-280(1986)、Moriceら、Lancet 2:1225-1227(1983))、男性の生殖器障害の治療(Slowら、Arch. Androl. 43(1):67-71(1999))、抗アポトーシス/神経保護薬としての使用(Brennemanら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:207-12(1998))、虚血の間の心臓保護(Kalifinら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 1268(2):952-8(1994)、Dasら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:297-308(1998))、体内時計及びそれに関連する障害の調節(Hamarら、Cell 109:497-508(2002)、Shenら、Proc. Natl. Acad. Sci. 97:11575-80, (2000))、及び抗潰瘍薬としての使用(Tuncelら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:309-22, (1998))に供することができる。

【0145】

選択的PEG化VPAC2受容体ペプチドアゴニストの「有効量」とは、VPAC2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、NIDDMの治療用のPEG化VPAC2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。NIDDMの予防用の選択的PEG化VPAC2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VPAC2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VPAC2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ァイル、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VPAC2受容体ペプチドアゴニストの典型的な投与量範囲は、約1µg/日~約5000µg/日にわたる。好ましくは、投与量は約1µg/日~約1000µg/日、より好ましくは約1µg/日~約2500µg/日にわたる。更に好ましくは、投与量は約5µg/日~約100µg/日にわたる。更に好ましい投与量範囲

は、約 $10 \mu\text{g}/\text{日}$ ~ 約 $50 \mu\text{g}/\text{日}$ である。最も好ましくは、投与量は約 $20 \mu\text{g}/\text{日}$ 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 VPAC2 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-PPTI Symphony Peptide Synthesizer（Tucson 社製、AZ）などが市販されている。固相合成用の試薬は、例えば Glycopep 社（シカゴ、IL）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、 α -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ル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。 α -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 Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", 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 (tBoc) 基及びフルオロエニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基が挙げられる。

【0151】

選択的 VPAC2 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 - α -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 α -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 (α -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)、

(ii) アルデヒド（還元剤の存在下（還元的アミノ化方法））、及び

(iii) グアニド化 (guanidation) 試薬。

更に、標準的なフッ化水素又はトリフルオロ酢酸 (TFA) 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、VYDAC C18 カラムによる逆相クロマトグラフィを使用して、0.1% TFA 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 TFA、アセトニトリル及び水を含む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、Cys 若しくは Lys 残基、K(W) 若しくは K(CO(CH₂)₂SH)、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 (Robertson M

10

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VPAC2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Intl. 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VPAC2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、ペプチドの側鎖上へ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VPAC2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、pH4.0~9.0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VPAC2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。VPAC2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。システムの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VPAC2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、VPAC2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VPAC2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 430A ペ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 - トシル (TOS)、Asp - シクロヘキシルエステル (OCHx)、Glu - シクロヘキシルエステル (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 - ブロモベンジルオキシカルボニル (2Br - Z)。

10

【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 のジシクロヘキシルカルボジイミド (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。

20

【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 倍過剰の対応する酸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 TEFLOn 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 Laboratories 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中で凝縮させた。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。真空内で 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。

30

【0165】

バッファ A (水中 0.1% TFA) を用い、2.2 x 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 Å) 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 x 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。

40

【0166】

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

約 114 mg (50 mmole) の FMOC Ser (tBu) WANG 樹脂 (GlycoPep 社製、シカゴ, IL) を各反応容器に添加した。Rainin Symphony Peptide Synthesizer を用いて合成を実施した。75 mg (50 μmole) の Rink Amide AM 樹脂 (Rapp Polymer e. Tübingen, 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。

50

【0167】

以下のFmocアミノ酸を、GlycoPep社(シカゴ、IL)及びNovaBiochem社(La Jolla、CA)から購入した。Arg-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(Pbf)、Asn-トリチル(Trt)、Asp-t-ブチルエステル(tBu)、Glu-t-ブチルエステル(tBu)、Gln-トリチル(Trt)、His-トリチル(Trt)、Lys-t-ブチルオキシカルボニル(Boc)、Ser-t-ブチルエーテル(OtBu)、Thr-t-ブチルエーテル(OtBu)、Trp-t-ブチルオキシカルボニル(Boc)、Tyr-t-ブチルエーテル(OtBu)。

【0168】

溶媒のジメチルホルムアミド(DMF-Burdick and Jackson)、Nメチルピロリドン(NMP-Burdick and Jackson)、ジクロロメタン(DCM-Mallinkrodt)は、Mays Chemical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(HOBt)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)及びピペリジン(Pip)は、Aldrich Chemical社(ミルウォーキー、WI)から購入した。

【0170】

全てのアミノ酸を、DMFで0.3Mとなるように溶解させた。20%のPip/DMFを使用して20分間脱保護した後、DIC/HOBt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DMF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DCM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。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。ペプチド樹脂をDCMで洗浄した後、真空乾燥させた。

【0171】

開裂反応液を、10mLのTFA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Aldrich Chemical社、ミルウォーキー、WIから購入)と2時間混合させた。Cys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。TFA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TFA/アセトニトリル(ACN)に溶解させ、20μLをHPLC[0.46×15cmのMETASIL AQ C18、1mL/分、45℃、214nm(0.2A)、A=0.1%TFA、B=0.1%TFA/50%ACN、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%TFA)を用い、2.2×25cmのVYDAC C18ラムで精製した。HPLC(Waters)で、10mL/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、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。HPLC(0.46×15cmのMETASIL AQ C18)及びMALDI質量分析により、乾燥生成物を分析した。

【0174】

P521の前駆体(C6-HSDAVFTEQY(OMe)TORnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPCC-NH₂):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⁺])。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。

【0175】

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 H₂) : 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⁺])。最終生成物を凍結乾燥し、粉末 18.7 mg を得た。

10

【0176】

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 H₂) : 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⁺])。最終生成物を凍結乾燥し、粉末 46.2 mg を得た。

【0177】

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

20

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ンスした。分散させた細胞を回収した。次に細胞をスピンドウンし、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 スクリーンアクセプタビーズを、当該刺激と共に添加した。この混合物を 60 分間インキュベートした。溶解バッファ及び A l p h a S c r e e n ドナービーズを添加し、60 ~ 120 分間インキュベートした。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 P e r k i n - E l m e r 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 C₅₀ 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

【0178】

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

【0179】

D i s c o v e R x :

96 ウェ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 / ウェルで播種した。200 μ 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 C₅₀ 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。

40

【0180】

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、1 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。

【 0 1 8 1 】

それぞれのアッセイフォーマットによる、ヒト VPAC 2 受容体の活性 (EC_{50} (n M)) を Table 1 に示す。

【 表 1 1 】

Table 1 : ヒト VPAC 2 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: DiscoverX (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 1 2】

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】

< 実施例 4 > 選択性

結合試験：

安定なVPAC2細胞系（実施例3を参照）、又はヒトVPAC1又はPAC1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VPAC1及びVPAC2の場合は¹²⁵IラベルしたVIP、並びにPAC1の場合は¹²⁵IラベルしたPACAP-27を使用して、フィルタ結合試験を実施した。

50

【 0 1 8 3 】

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：A q u a d e s t 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：2 5 m M の H E P E S (p H 7 . 4)、

ブロッキングバッファ：2 5 m M の H E P E S (p H 7 . 4)、0 . 2 % のプロテアーゼフリーの B S A、

アッセイバッファ：2 5 m M の H E P E S (p H 7 . 4)、0 . 5 % のプロテアーゼフリーの B S A、

希釈及びアッセイプレート：P S - M i c r o p l a t e、U 型、

濾過プレート：M u l t i s c r e e n F B O p a q u e P l a t e、1 . 0 μ M B タイプのグラスファイバーフィルタ。 10

【 0 1 8 4 】

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。2 0 0 μ L 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。2 0 0 μ L 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、2 0 0 μ L の前浸漬溶液でインキュベートした。

【 0 1 8 5 】

アッセイプレートを 2 5 μ L のアッセイバッファ、アッセイバッファの中に懸濁した 2 5 μ L (2 . 5 μ g) の膜、アッセイバッファ中のアゴニスト 2 5 μ L、及びアッセイバッファ中のトレーサー (約 4 0 0 0 0 c p m) 2 5 μ L 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

【 0 1 8 6 】

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 9 0 μ L を移した。アッセイプレートから移した 9 0 μ L を吸引し、2 0 0 μ L 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。6 0 で 1 時間乾燥させた。3 0 μ L の M i c r o s c i n t を添加した。カウントを実施した。

【 0 1 8 7 】

ヒト V P A C 2、V P A C 1 及び P A C 1 の受容体への結合 (I C ₅₀) を Table 2 に示す。 30

【表 1 3】

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 (IC50;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 1 4】

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】

< 実施例 5 > ラット VPAC1 及び VPAC2 受容体における *in vitro* 効果

DiscoverX:

市販のトランスフェクション試薬 (Invitrogen 社製、Lipofectamine) を使用して、ラット VPAC1 又は VPAC2 受容体 DNA により、CHO-P O 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、200 mL 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。DiscoverX 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 (DiscoverX 社、米国)。cAMP 生成における EC₅₀ 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 VPAC1 及び VPAC2 の結果は、DiscoverX 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 0.00001 nM である。

【0191】

ラット VPAC2 及び VPAC1 受容体の活性 (EC₅₀ (nM)) を Table 3 に示す。

【表 15】

Table 3

アゴニスト#	Rat VPAC1受容体: DiscoverX: (EC ₅₀ ;nM)	Rat VPAC2受容体: DiscoverX: (EC ₅₀ ;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

< 実施例 6 > *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 μM 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 μL 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℃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= 0.09 mg/kg	AUC増加%: 投与量= 0.1 mg/kg	AUC増加%: 投与量= 0.3 mg/kg
P505	24h		12	74
P511	24h		38	59
P525	24h		72	208
P570	24h		36	
P602	24h	73		198

10

AUC＝曲線の下領域（インスリン、グルコース投与後0～10分）

【0194】

PEG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、モデル非依存的方法（WinNonlin Pro、Pharsight社、Mountain View, CA, USA）を使用して算出した。

20

【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 _{0-最終} (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 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】

<実施例7>ラット血清における安定性試験：

ラット血清中におけるVPAC2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-VPAC2細胞クローン#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 1x(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DiscoveRx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アリコートを作製した。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。アプロチニンを含むアリコートを4で保存した。アプロチニンを含む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CaCl₂、1.2mMのMgCl₂、2mMのグルコース及び0.25mMのIBMXを含む)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

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 1 nM を上回る EC_{50} を有する場合、1000 nM を最大濃度とし、一方ペプチドが 1 nM 以下の EC_{50} を有する場合、2000 nM を最大濃度とした。プレートに、ウェル当たり 50 μ L 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 50 μ L 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。Discover X 抗体 / 抽出バッファを 40 μ L / 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。Discover X キットを用いて通常の実験を行った。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_{50} 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 $EC_{50,4} / EC_{50,37}$ により推定した。

【表 20】

Table 5

37℃、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	

¹ 100% 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 VPAC2 受容体ペプチドアゴニストの PEG 化：

P E G 化反応は通常、チオエーテル結合が形成されう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P E Gマレイミド濃度の0.7～10モル過剰である。P E G 化反応は通常室温で行う。次にP E G 化V P A C 2受容体ペプチドアゴニストを逆相H P L C又は限外除クロマトグラフィ（S E C）を使用して単離する。分析用R P - H P L C、H P L C - S E C、S D S - P A G E及び/又はM A L D I M a s s S p e c t r o m e t r yを使用して、P E G 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V P A C 2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V P A C 2受容体ペプチドアゴニストを40kDa、30kDa又は20kDaのP E G - 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P E G 含有誘導体を調製する。

【0200】

P 5 0 5 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P E G 化P 5 0 5）、及び162mgのメトキシ - P E G - マレイミド（NOF、日本）を2mLの100mMのNH₄Ac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R P - H P L C精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物97mgを得た。R P - H P L C及び限外除去H P L CでP E G 化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

【0201】

P 5 2 5 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P E G 化P 5 2 5）、及び157mgのメトキシ - P E G - マレイミド（NOF、日本）を2mLの100mMのNH₄Ac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R P - H P L C精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物114mgを得た。R P - H P L C及び限外除去H P L CでP E G 化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

【0202】

P 5 7 2 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P E G 化P 5 7 2）、及び177mgのメトキシ - P E G - マレイミド（NOF、日本）を2mLの100mMのNH₄Ac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R P - H P L C精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物137mgを得た。R P - H P L C及び限外除去H P L CでP E G 化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

【0203】

P 5 7 4 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P E G 化P 5 7 4）、及び283mgのメトキシ - P E G - マレイミド（NOF、日本）を3mLの100mMのNH₄Ac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R P - H P L C精製の後、凍結乾燥し、粉末として生成物171mgを得た。R P - H P L C及び限外除去H P L CでP E G 化ペプチドアゴニストを解析し、in vitro活性を試験した。

【0204】

P 6 0 2 の合成

ペプチド前駆体（非P E G 化P 6 0 2）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

10

20

30

40

50

otech Technology 社、英国) 223 mg を、2 mL の 100 mM の NH_4Ac バッファ (10 mM 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 132 mg 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 VPAC2 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。

【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 VPAC2 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 残基の側鎖上ヘ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。

【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、氷酢酸中で 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 VPAC2 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。

【0208】

P535 の合成

27.7 mg のペプチド前駆体 (非 PEG 化 P535)、及び 590 mg の mPEG2-BUTYRALD-40K を 3 mL 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 94 mg 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。

【0209】

P557 の合成

23 mg のペプチド前駆体 (非 PEG 化 P557)、及び 460 mg の mPEG2-BUTYRALD-40K を 3 mL 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 50 mg 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。

【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。

10

20

30

40

【 図 1 】

IVGTT-種々の用量のP505およびP525で処置した
絶食覚醒カーテール挿入雄性ウィスターラット

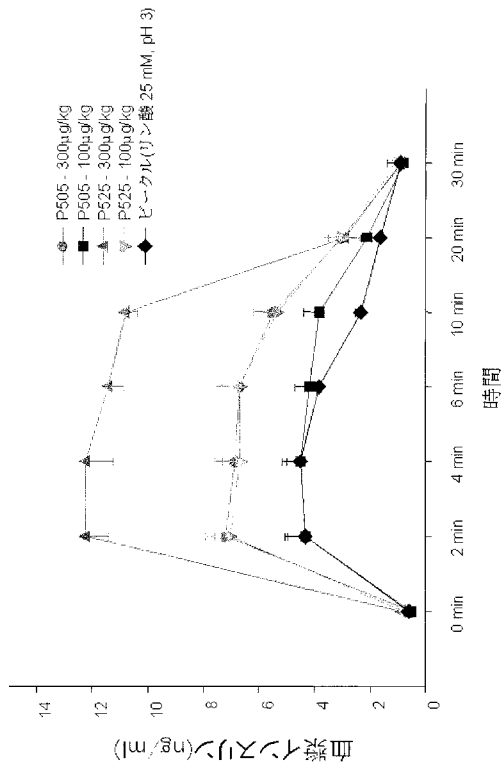


図1. 正常ウィスターラットにおけるP505およびP525のインスリン分泌活性。化合物を1. v. タルココース投与の24時間前に注入した。

【 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 [US]) 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 [US]) 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.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 15 February 2007		Date of mailing of the International search report 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 9106565 A1 JP 4193896 A	16-05-1991 13-07-1992
JP 6092991	A	05-04-1994	NONE	
WO 2004006839	A	22-01-2004	AU 2003267990 A1 BR 0312621 A CA 2491279 A1 EP 1578358 A2 JP 2006506969 T MX 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 2005208911 A1 CA 2554475 A1 EP 1713493 A2	11-08-2005 11-08-2005 25-10-2006
WO 2005058954	A	30-06-2005	AU 2004298424 A1 CA 2549582 A1 EP 1704165 A1 MX PA06006745 A	30-06-2005 30-06-2005 27-09-2006 18-08-2006
WO 03099314	A	04-12-2003	AU 2003239910 A1 CA 2487269 A1 EP 1569673 A1 JP 2005533768 T	12-12-2003 04-12-2003 07-09-2005 10-11-2005
WO 2006023356	A2	02-03-2006	WO 2006023358 A1 WO 2006023359 A2 WO 2006023367 A1	02-03-2006 02-03-2006 02-03-2006
WO 2006023358	A	02-03-2006	WO 2006023356 A2 WO 2006023359 A2 WO 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, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, 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 ベングト・クリスター・ボークヴィスト
ドイツ連邦共和国デー - 2 2 4 1 9 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 リャンシャン・チャン
アメリカ合衆国 4 6 0 3 3 インディアナ州カーメル、スノウ・オウル・ドライブ 1 3 2 4 4 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 4 6 2 0 8 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
5 4 6 3 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