

(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2007-519739

(P2007-519739A)

(43) 公表日 平成19年7月19日(2007.7.19)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 14/00	(2006.01)	C07K 14/00 Z N A 4 B 0 6 4
C07K 16/00	(2006.01)	C07K 16/00 4 C 0 8 4
C07K 16/44	(2006.01)	C07K 16/44 4 H 0 4 5
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02
A61K 45/00	(2006.01)	A61K 45/00

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く

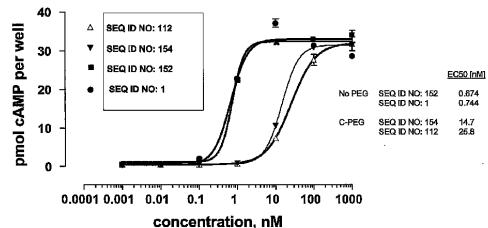
(21) 出願番号	特願2006-551478 (P2006-551478)	(71) 出願人	503211596 バイエル・ファーマシューチカルズ・コーポレーション アメリカ合衆国コネチカット州O 6 5 1 6 ウエストヘブン・モーガンレーン4 0 0
(86) (22) 出願日	平成17年1月27日 (2005.1.27)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成18年7月26日 (2006.7.26)	(72) 発明者	クレアモント, ケビン アメリカ合衆国コネチカット州O 6 4 1 0 チエシャー・マーウインサークル8 0
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/002609	(72) 発明者	ラム, ケビン・ジエイ アメリカ合衆国コネチカット州O 6 4 3 7 ギルフォード・グラナイトロード5 2 0
(87) 國際公開番号	W02005/072385		
(87) 國際公開日	平成17年8月11日 (2005.8.11)		
(31) 優先権主張番号	60/539,550		
(32) 優先日	平成16年1月27日 (2004.1.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/566,499		
(32) 優先日	平成16年4月29日 (2004.4.29)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)受容体(VCAP2)アゴニストおよびそれらの製薬学的使用方法

(57) 【要約】

本発明は、生体内でV P A C 2受容体のアゴニストとして機能する新規のペプチドを提供する。それらのインスリン分泌促進性ポリペプチド物質は、生体内でのグルコースのチャレンジに対して血糖を低下することが示される。本発明のポリペプチドは、配合物内で安定でありそして長い半減期を有する。本発明のペプチドは、低い内因性インスリン分泌、例えばⅠ型糖尿病の患者に対する治療を提供する。本発明は、ペプチドの治療有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる、該哺乳動物内の代謝疾患を処置する方法にも関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 ~ 148 からなる群から選択されるポリペプチド、ならびにそれらの機能的に等価なフラグメント、誘導体、および変種。

【請求項 2】

ポリペプチドが配列番号 1、2、3、4、5、112、113、114、115、および 116 からなる群から選択される、請求項 1 のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 4】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項 3 の抗体。

【請求項 5】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 3 の抗体。

【請求項 6】

ポリエチレングリコールに特異的に結合する抗体。

【請求項 7】

抗体がポリクローナル抗体である、請求項 6 の抗体。

【請求項 8】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 6 の抗体。

【請求項 9】

a . 試料を請求項 3 または請求項 6 の抗体と接触させ、

b . 該抗体を検出し、そして

c . 抗体の検出を試料中のポリペプチドの量と相関させる

ことを含んでなる、試料中の配列番号 1 ~ 148 からなる群から選択されるポリペプチドの検出方法。

【請求項 10】

a . 試料を請求項 3 または請求項 6 の第一の抗体と接触させ、

b . 試料を第二の抗体と接触させ、ここで第二の抗体は第一の抗体に結合しており、

c . 標識を検出し、そして

d . 標識の検出を試料中のポリペプチドの量と相関させる

ことを含んでなる、試料中の配列番号 1 ~ 148 からなる群から選択されるポリペプチドの検出方法。

【請求項 11】

請求項 3 または請求項 6 の第一の抗体、および第二の抗体が第一の抗体に結合している第二の抗体を含んでなり、試料中の配列番号 1 ~ 148 からなる群から選択されるポリペプチドを検出するためのキット。

【請求項 12】

請求項 1 のポリペプチドまたはそれらの機能的に等価なフラグメント、誘導体、および変種の治療有効量を、製薬学的に許容できるキャリヤと組合させて含んでなる製薬学的組成物。

【請求項 13】

ポリペプチドが配列番号 1、2、3、4、5、112、113、114、115、および 116 からなる群から選択される、請求項 12 の製薬学的組成物。

【請求項 14】

請求項 1 のポリペプチド、またはそれらの機能的に等価なフラグメント、誘導体、および変種の治療有効量を、製薬学的に許容できるキャリヤおよび 1 種もしくはそれ以上の製薬学的有効物質と組合させて含んでなる、製薬学的組成物。

【請求項 15】

製薬学的有効物質が、PPAR リガンド、インスリン分泌促進物質、スルホニル尿素薬、- グルコシダーゼ阻害剤、インスリン感作物質、肝グルコース分泌低下性化合物、イ

10

20

30

40

50

ンスリンおよびインスリン誘導体、ビグアニド、タンパク質チロシンホスファターゼ - 1 B、ジペプチジルペプチダーゼ I V、11ベータ - H S D 阻害剤、抗肥満薬、H M G - C o A 還元酵素阻害剤、ニコチン酸、脂質低下薬、A C A T 阻害剤、胆汁酸金属イオン封鎖剤、胆汁酸再取込み阻害剤、ミクロソームトリグリセリド輸送阻害剤、フィブリック酸誘導体、- ブロッカー、A C E 阻害剤、カルシウムチャンネルブロッカー、利尿剤、レニン阻害剤、A T - 1 受容体拮抗剤、E T 受容体拮抗剤、中性エンドペプチダーゼ阻害剤、血管ペプチダーゼ阻害剤、およびニトラートからなる群から選択される、請求項 1 4 の製薬学的組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 のポリペプチド、またはそれらの機能的に等価なフラグメント、誘導体、および変種の有効量を、不活性キャリヤと組合させて含んでなる、組成物。 10

【請求項 1 7】

請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 1 2 の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、糖尿病の処置方法。

【請求項 1 8】

糖尿病が、I I 型糖尿病、若年発症成人型糖尿病、潜伏性自己免疫性成人型糖尿病、および妊娠糖尿病からなる群から選択される、請求項 1 7 の方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 1 2 の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、症候群 X の処置方法。 20

【請求項 2 0】

請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 1 2 の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、糖尿病関連障害の処置方法。

【請求項 2 1】

糖尿病関連障害が、高血糖症、高インスリン血症、耐糖能異常、空腹時血糖異常、異常脂質血症、高トリグリセリド血症、およびインスリン抵抗性からなる群から選択される、請求項 2 0 の方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 のポリペプチドの治療有効量と一種もしくはそれ以上の製薬学的作用物質とを組合せて、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、糖尿病の処置方法。 30

【請求項 2 3】

製薬学的作用物質が、P P A R アゴニスト、スルホニル尿素薬、非スルホニル尿素分泌促進物質、- グルコシダーゼ阻害剤、インスリン感作物質、インスリン分泌促進物質、肝グルコース分泌低下性化合物、インスリン、および抗肥満作用物質からなる群から選択される、請求項 2 0 の方法。

【請求項 2 4】

糖尿病が、I I 型糖尿病、若年発症成人型糖尿病、潜伏性自己免疫性成人型糖尿病、および妊娠糖尿病からなる群から選択される、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 のポリペプチドの治療有効量と一種もしくはそれ以上の製薬学的作用物質とを組合せて、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、症候群 X の処置方法。 40

【請求項 2 6】

製薬学的作用物質が、P P A R アゴニスト、スルホニル尿素薬、非スルホニル尿素分泌促進物質、- グルコシダーゼ阻害剤、インスリン感作物質、インスリン分泌促進物質、肝グルコース分泌低下性化合物、インスリン、および抗肥満作用物質からなる群から選択される、請求項 2 5 の方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 のポリペプチドの治療有効量と一種もしくはそれ以上の製薬学的作用物質とを組合せて、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、糖尿病関連障害の処置方法。 50

【請求項 28】

糖尿病関連障害が、高血糖症、高インスリン血症、耐糖能異常、空腹時血糖異常、異常脂質血症、高トリグリセリド血症、およびインスリン抵抗性からなる群から選択される、請求項27の方法。

【請求項 29】

製薬学的作用物質が、PPARアゴニスト、スルホニル尿素薬、非スルホニル尿素分泌促進物質、-グルコシダーゼ阻害剤、インスリン感作物質、インスリン分泌促進物質、肝グルコース分泌低下性化合物、インスリン、および抗肥満作用物質からなる群から選択される、請求項28の方法。

【請求項 30】

請求項1のポリペプチドの治療有効量と、HMG-CoA還元酵素阻害剤、ニコチン酸、脂質低下薬、ACAT阻害剤、胆汁酸金属イオン封鎖剤、胆汁酸再取り込み阻害剤、ミクロソームトリグリセリド輸送阻害剤。フィブリック酸誘導体、-プロッカー、ACE阻害剤、カルシウムチャネルプロッカー、利尿剤、レニン阻害剤、AT-1受容体拮抗剤、ET受容体拮抗剤、中性エンドペプチダーゼ阻害剤、血管ペプチダーゼ阻害剤、およびニトラートからなる群から選択される1種もしくはそれ以上の作用物質とを組合させて、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、糖尿病、症候群X、または糖尿病関連障害の処置方法。

【請求項 31】

糖尿病関連障害が、高血糖症、高インスリン血症、耐糖能異常、空腹時血糖異常、異常脂質血症、高トリグリセリド血症、およびインスリン抵抗性からなる群から選択される、請求項30の方法。

【請求項 32】

請求項1のポリペプチドおよび1種もしくはそれ以上の製薬学的作用物質が、単一の製薬学的投与配合物として投与される。請求項22～31のいずれかの方法。

【請求項 33】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、糖尿病の併発病因の処置または防止方法。

【請求項 34】

併発病因為、糖質コルチコイド過剰、成長ホルモン過剰、クロム親和細胞腫、および薬剤誘発糖尿病からなる群から選択される、請求項33の方法。

【請求項 35】

請求項1のポリペプチドの治療有効量と1種もしくはそれ以上の製薬学的作用物質とを組合せて、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、糖尿病の併発病因の処置または防止方法。

【請求項 36】

製薬学的作用物質が、PPARアゴニスト、スルホニル尿素薬、非スルホニル尿素分泌促進物質、-グルコシダーゼ阻害剤、インスリン感作物質、インスリン分泌促進物質、肝グルコース分泌低下性化合物、インスリン、および抗肥満作用物質からなる群から選択される、請求項35の方法。

【請求項 37】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、呼吸器疾患の処置方法。

【請求項 38】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、肥満の処置方法。

【請求項 39】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、心血管疾患の処置方法。

【請求項 40】

10

20

30

40

50

心血管疾患が、アテローム性動脈硬化症、冠性心疾患、冠動脈疾患、および高血圧から選択される、請求項39の方法。

【請求項41】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、脂質および炭水化物代謝の障害の処置方法。

【請求項42】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、睡眠障害の処置方法。

【請求項43】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、男性生殖障害の処置方法。

【請求項44】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、生育障害またはエネルギー・ホメオスタシス障害の処置方法。

【請求項45】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、免疫疾患の処置方法。

【請求項46】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、自己免疫疾患の処置方法。

【請求項47】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、急性および慢性の炎症性疾患の処置方法。

【請求項48】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物の治療有効量を、それを必要とする対象者に投与する段階を含んでなる、敗血症性ショックの処置方法。

【請求項49】

請求項1のポリペプチドまたは請求項12の製薬学的組成物を対象者に投与することによる、それを必要とする対象者内でグルコース依存性の様式でインスリン放出を促進する方法。

【請求項50】

糖尿病および糖尿病関連疾患の処置および／または予防のための請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項51】

請求項1記載の少なくとも1種のポリペプチドを少なくとも1種の製薬学的に許容でき、製薬学的に安全なキャリヤまたは賦形剤と組合わせて含む医薬。

【請求項52】

糖尿病および糖尿病関連疾患の処置および／または予防のための医薬を製造するための請求項1記載のポリペプチドの使用。

【請求項53】

糖尿病の処置および／または予防のための請求項51に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2004年1月27日付け出願の米国仮特許出願番号60/539,550号および2004年4月29日付け出願の米国仮特許出願番号60/566,499号（それらの内容は引用することにより本明細書にすべて編入される）の利益を主張する。

【0002】

10

20

30

40

50

本発明は、新規に同定されたポリペプチドおよび治療目的のためのかかるポリペプチドの使用に関する。さらに具体的には、本発明のポリペプチドは、グルコース依存性の様式で臍臓細胞からのインスリン放出の刺激に有用であり、それにより代謝障害、例えば糖尿病または糖尿病前症である耐糖能障害に悩む個体のための治療選択肢を提供する。

【背景技術】

【0003】

糖尿病は、なかでも糖尿病患者内での上昇した血糖レベルにより現れる糖代謝異常を特徴とする。その基となる欠陥は、糖尿病の2種の主要な群への分類、すなわち、患者のランゲルハンス臍島内でインスリンを生成する細胞を患者が欠失する場合に起きるI型糖尿病、すなわちインスリン依存性糖尿病(I D D M)、および細胞機能障害およびインスリン作用の改変を有する患者内で起きるII型糖尿病、すなわち非インスリン依存性糖尿病(N I D D M)に分類される。10

【0004】

I型糖尿病患者は、現在インスリンを用いて処置され、一方II型糖尿病患者の大部分は細胞機能を刺激する薬剤を用いまたはインスリンに対する患者の組織感作性を増進する薬剤を用いて処置されている。時が経過するとII型糖尿病対象者のほとんど半分はこれらの薬剤への反応を失い、従ってインスリン治療を受けなければならない。II型糖尿病を治療するために現在使用されている医薬を以下に記載する。

【0005】

アルファ-グルコシダーゼ阻害剤(例えばプレコース(Pre cose^(R))(Bayer Pharmaceuticals Corporation)、ボグリボース(Vogl iboseTM)(Takeda Pharmaceuticals Company Limited)およびミグリトール(Mig litol^(R))(Bayer Pharmaceuticals Corporation)は、消化管からのグルコースの吸収を遅延して摂取後のグルコースの移動を低下させる。これらの医薬は安全であり、そして軽度から中程度の症状の糖尿病対象者のための治療を提供する。しかし、胃腸への副作用が文献中に記載されている。20

【0006】

インスリン感作物質は、インスリンへの身体の反応を増強する医薬である。チオゾリジンジオン(thiozolidinedione)、例えばアバンジア(Avandia^(R))(GlaxoSmithKline、ロシグリタゾン(rosiglitazone)およびアクトス(ActosTM)(Takeda Pharmaceuticals Company Limited、ピオグリタゾン(pioglitazone))は、ペルオキソーム増殖剤反応性受容体(PPAR)ガンマサブタイプを活性化しそして十分に記述はされていない一組の遺伝子の活性を調節する。その分類で最初のレズリン(RezulinTM)(Warner-Lambert Company、トログリタゾン(troglitazone))は、肝臓酵素レベルおよび薬剤誘発肝毒性の上昇のために取り下げられた。これらの肝臓作用は、アバンジア^(R)およびアクトスTMを使用する患者では著しい問題とは考えられない。しかしながら、治療の最初の一年間は二ヵ月毎そしてその後は定期的に肝臓酵素検査が推奨されている。アバンジア^(R)およびアクトスTMは、体液滞留および水腫と関連するように見える。別の可能性がある副作用は体重増加である。アバンジア^(R)は鬱血性心不全との関連のためにインスリンとの併用は処方されない。3040

【0007】

インスリン分泌促進物質(例えばスルホニル尿素(SFU)およびATP-依存性K⁺チャネルにより作用するその他の薬剤)は、II型糖尿病を治療するために現在使用されている別の薬剤である。SFUは軽度ないし中程度の空腹時血糖症を有するII型糖尿病のための標準的な治療である。SFUは低血糖、体重増加、および高い一次および二次効力低下率の可能性を含む限界を有する。新たに処置された患者の10~20%が著しい処置効果の消失を示す(一次効力低下)。二次効力低下は、SFU使用の6カ月後の処置

10

20

30

40

50

効果のさらに20~30%の低下で示される。インスリン処置は、治療の5~7年後でS FU反応者の50%で要求される(非特許文献1)。

【0008】

グルコファージ(Glucophage^(R))(Lipha Corporation、メトホルミン(metformin)HC1)は、肝臓グルコース産生を低下しそして末梢グルコース取込みおよび利用を増加することにより血糖を低下するビグアニドである。この医薬は、軽度および中程度の罹患患者での血糖低下に有効であり、そして体重増加の副作用または低血糖誘発の可能性を有していない。しかし、グルコファージ^(R)は胃腸障害および乳酸アシドーシスを含む多数の副作用を有する。グルコファージ^(R)は70歳以上および腎臓または肝臓機能に障害を有する患者での糖尿病には禁忌である。最後に、グルコファージ^(R)はS FUと同様の一次および二次効力低下率を有する。10

【0009】

インスリン処置は、食事療法、運動療法の後に開始され、そして経口薬物治療では血糖を適切に調節できなかった。この処置は注入用という欠点を有し、注入は低血糖を招くことがあります、そしてそれは体重増加を起こす。

【0010】

現在の処置に関連する問題のために、II型糖尿病を処置する新しい治療が要求されている。具体的には、正常(グルコース依存性)インスリン分泌を維持する新規の処置が要求されている。かかる新薬は下記の特性を持たなければならない:インスリン分泌を促進するためのグルコース依存性(すなわち上昇した血糖が存在する時にのみインスリン分泌を行う);低い一次および二次効力低下率;および膵島細胞機能の維持。本明細書中で開示する新規治療を開発するための戦略は、サイクリックアデノシン一リン酸(cAMP)シグナル伝達機構およびインスリン分泌へのその効果に基づいている。20

【0011】

サイクリックAMPは、インスリン分泌プロセスの主要な調節因子である。このシグナル分子の上昇は、タンパク質キナーゼA経路の活性化に続くK⁺チャンネルの閉止を促進する。K⁺チャンネルの閉止は細胞脱分極および引き続くCa⁺⁺チャンネルの開放を起こし、それは一方ではインスリン顆粒のエクサイトーシスに導く。インスリン分泌への作用は、もし存在したとしても、低いグルコース濃度がない場合にはほとんど起きない(非特許文献2)。分泌促進物質、例えばPACAP(下垂体細胞アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド)、VIP(血管作動性腸管ペプチド)、およびGLP-1(グルカゴン様ペプチド1)は、グルコース依存性の様式でインスリン分泌を調節するためにcAMPシステムを使用する(非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5)。cAMPの上昇を介して作動するインスリン分泌促進物質、例えばGLP-1、VIPおよびPACAPは、インスリン放出に加えてインスリン合成を促進することもできる(非特許文献6、非特許文献7)。

【0012】

GLP-1は、食事後に腸管L細胞から放出されそしてインクレチンホルモンとして作用する(すなわち、それは膵臓細胞からのグルコース誘導インスリン放出を強化する)。それは組織タイプに依存して、グルカゴン遺伝子により種々に発現される37アミノ酸ペプチドである。細胞中でcAMPレベルを上昇する有益な効果を支持する臨床データが、GLP-1に関して集められている。コントロールが不良なII型糖尿病におけるGLP-1の輸液は、それらの空腹時血液グルコースレベルを正常化し(非特許文献8)、そしてより長期の輸液は細胞機能を正常な対象者のものに改善する(非特許文献9)、最近の報告は、GLP-1が、耐糖能障害を有する対象者中のグルコースへ反応する細胞の能力を改善することを示した(非特許文献10)。しかし、それらのすべての効果は、該ペプチドの短い半減期のために短命である。40

【0013】

Amylin Pharmaceuticalsは、Gila Monsterにより最初に同定された39アミノ酸ペプチドであるエクセンディン-4(Exendin-4)

10

20

30

40

50

) (A C 2 9 9 3) を用いて臨床試験を行った。Amylinは、臨床試験が、エクセンディン-4を用いて処置されたII型糖尿病患者において改善された血糖コントロールを示したと報告している。しかし、恶心および吐き気の症候は有意であった。

【0014】

PACAPは、膵臓細胞からのグルコース依存性インスリン分泌の強力な刺激因子である。3種の異なるPACAP受容体タイプ(PAC1、VPAC1、およびVPAC2)が記載されている(非特許文献11、非特許文献12)。PACAPは受容体選択性を示さず、3種すべてに同様の活性および効力を有する。PAC1は、CNS中に主として位置し、一方VPAC1およびVPAC2はそれより広範に分布する。VPAC1は、CNSならびに肝臓、肺臓、および腸管内に位置する。VPAC2は、CNS、膵臓、骨格筋、心臓、腎臓、脂肪組織、精巣、および胃内に位置する。最近の報告は、VPAC2が細胞からのインスリン分泌に責任があると主張している(非特許文献13、非特許文献14)。PACAPのこのインスリン指向性作用は、GTP結合性タンパク質Gにより媒介される。一方、細胞内cAMPの蓄積は、細胞内の非選択性陽イオンチャネルを活性化して[Ca⁺⁺]を増加し、そしてインスリン含有分泌顆粒のエクサイトーシスを促進する。

【0015】

PACAPは、cAMP媒介シグナル伝達経路を介してそれらの作用を行う代謝性、神経内分泌性、そして神経伝達性ペプチドホルモンのスーパーファミリーの最新の一員である(非特許文献15)。この生物学的活性ペプチドは、アミド化カルボキシル末端を有する38アミノ酸ペプチド(PACAP-38)および/または27アミノ酸ペプチド(PACAP-27)のいずれかの2種の分子形態で生合成前駆体から放出される(上記の非特許文献15)。

【0016】

ペプチドの2種の形態の最高濃度は脳および精巣内に見いだされている(上記の非特許文献15)。ペプチドの短い方の形態、PACAP-27は、血管作用性腸管ポリペプチド(VIP)と68%に構造一致を示す。しかし、中枢神経系内のPACAPおよびVIPの分布は、それらの構造的に関連するペプチドが異なる神経伝達機能を有することを示唆する(非特許文献16)。

【0017】

最近の研究は、生殖における役割(非特許文献17)からインスリン分泌刺激の能力(非特許文献18)までのPACAP-38の種々の生物学的效果を示している。さらにPACAPは、脂質および炭水化物代謝のホルモン性調節(非特許文献19)、概日機能(非特許文献20)、および免疫系、成長、エネルギー代謝、および男性生殖機能(非特許文献21)、食欲調節(非特許文献22)、ならびに急性および慢性炎症性疾患、敗血症ショック、および自己免疫疾患(例えば全身性エリトマトーデス)(非特許文献23)に関係すると考えられる。

【0018】

血管作用性腸管ポリペプチド(VIP)は、最初にブタの上部小腸から単離された28アミノ酸ペプチドである(非特許文献24、特許文献1)。このペプチドは、ヘロデルミン(helodermin)、セクレチン(secretin)、ソマトスタチン(somatostatin)、およびグルカゴンを含む構造的に関連した小型ポリペプチドのファミリーに属する。VIPの生物学的效果は、細胞内cAMPシグナル伝達系に結合した膜結合受容体タンパク質の活性化により媒介される。それらの受容体は、最初はVIP-R1およびVIP-R2として知られていたが、しかし、それらはVPAC1およびVPAC2と同じ受容体であることがその後判明した。VIPは、VPAC1およびVPAC2と同様の活性および効力を示す。

【0019】

ヒトの肺液内でのVIPの安定性を改善するために、ボリンラ(非特許文献25)は、このペプチドのらせん傾向を増加しそしてタンパク質分解性劣化を低下させるように設計

10

20

30

40

50

された一連のVIP変種を作製した。置換は、受容体結合には重要でないと考えられた位置8、12、17、および25～28に集中した。さらに、らせんをさらに効果的に覆うことを探して“GGT”配列をVIP変異体のC末端上にタグした。最後に、らせんをさらに安定化するために、数種の環状変種を合成した(特許文献2)。これらの効果は受容体選択性に直接には関係しなかったけれども、それらは、より高いV PAC 2選択性を有する2種の類似体を生成した(非特許文献26、非特許文献27)。

- 【特許文献1】米国特許第3,879,371号明細書
- 【特許文献2】米国特許第5,677,419号明細書
- 【非特許文献1】Scheen et al., Diabetes Res. Clin. Pract. 6:533-543, 1989 10
- 【非特許文献2】Weinhaus, et al., Diabetes 47:1426-1435, 1998
- 【非特許文献3】Komatsu, et al., Diabetes 46:1928-1938, 1997
- 【非特許文献4】Filippsson, et al., Diabetes 50:1959-1969, 2001
- 【非特許文献5】Drucker, Endocrinology 142:521-527, 2001
- 【非特許文献6】Stoglund, et al., Diabetes 49:1156-1164, 2000 20
- 【非特許文献7】Borboni, et al., Endocrinology 140:5530-5537, 1999
- 【非特許文献8】Gutniak, et al., New Eng. J. Med. 326:1316-1322, 1992
- 【非特許文献9】Rachman, et al., Diabetes 45:1524-1530, 1996
- 【非特許文献10】Byrne, et al., Diabetes 47:1259-1265, 1998
- 【非特許文献11】Harmer, et al., Pharmacol. Reviews 50:265-270, 1998 30
- 【非特許文献12】Vaudry, et al., Pharmacol. Reviews 52:269-324, 2000
- 【非特許文献13】Inagaki, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2679-2683, 1994
- 【非特許文献14】Tsutsumi, et al., Diabetes 51:1453-1460, 2002
- 【非特許文献15】Arimura, Regul. Peptides 37:287-303, 1992
- 【非特許文献16】Koves, et al., Neuroendocrinology 54:159-169, 1991 40
- 【非特許文献17】McArdle, Endocrinology 135:815-817, 1994
- 【非特許文献18】Yada, et al., J. Biol. Chem. 269:1290-1293, 1994
- 【非特許文献19】Gray, et al., Mol. Endocrinol. 15:1739-47, 2001
- 【非特許文献20】Harmar, et al., Cell 109:497-508, 2002
- 【非特許文献21】Asnicar, et al., Endocrinol. 143:3994-4006, 2002 50

【非特許文献22】Tachibana, et al., *Neurosci. Lett.* 339: 203 - 206, 2003

【非特許文献23】Pozo, *Trends Mol. Med.* 9: 211 - 217, 2003

【非特許文献24】Said and Mutt, *Science* 169: 1217 - 1218, 1970

【非特許文献25】Bolin, et al., *Biopolymers* 37: 57 - 66, 1995

【非特許文献26】Goulet, et al., *Peptides* 18: 403 - 408, 1997

【非特許文献27】Xia, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281: 629 - 633, 1997

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

PACAP、GLP-1、またはエクセンディン-4のグルコース依存性インスリン分泌促進活性を有するが副作用が少なく、そして好ましくは配合物内で安定でありそして生体内で長い血漿半減期を有する改善されたペプチドへの要求がある。かかる改善された生体内半減期は、クリアランス低下およびタンパク質分解に対する感受性低下の双方を有するペプチドからもたらされる。さらに、血漿グルコースレベルのより狭い制御は、長期の糖尿病性合併症を防止するであろう。従って、新規の糖尿病医薬は、患者の生活の改善された質をもたらすであろう。

【0021】

発明の要旨

本発明は、生体内でVPAC2受容体（以後VPAC2）のアゴニストとして機能しそしてVPAC2アゴニスト活性を有する作用物質により改善されることができる疾患および状態の処置に有効である新規のポリペプチドを提供する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、VPAC1およびPAC1よりもVPAC2に対して高い効力を有する選択的VPAC2アゴニストである。例えば、限定ではないが、それらのポリペプチドは、グルコース依存性の様式でインスリン合成および膵臓細胞からの放出を刺激しそして引き続いて血漿グルコース低下となる。それらの分泌促進性ポリペプチドは、グルコースチャレンジの際のビヒクル制御より多く血漿内の血糖を低下することが示されている。さらに、本発明のポリペプチドは、配合物内で安定でありそして長い血漿半減期および誘導体化された場合に生体内の長い作用期間を有する。

【0022】

本発明のポリペプチドは、PACAPまたはVIPと比較して、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP4)によるタンパク質分解に対しておよび血漿内で改善された安定性を有する。VIPおよびPACAP27の両者がDPP4による切断に抵抗性であると報告されているが(Zhu, et al., *J. Biol. Chem.* 278: 22418 - 22423, 2003)、図2aは、それらのペプチドはより後の時点で切断され、一方、本発明のペプチドは試験した時点では切断に抵抗性であることが示された。本発明の誘導体は、生体内で長期間の作用が示され、誘導体化された場合に一日一回以下、一週間に一回またはそれより長期の投与間隔を支援する。

【0023】

本発明のポリペプチドは、例えば、代謝障害、例えば低下した内因性インスリン分泌からもたらされる障害、例えばII型糖尿病を有する患者、または耐糖能障害、すなわちインスリン分泌に軽度の改変を有する前糖尿病状態を有する患者に対する治療を提供する。さらに、本発明のポリペプチドは、妊娠糖尿病、若年発症成人型糖尿病(MODY)、潜伏性自己免疫性成人型糖尿病(LADA)、および関連する糖尿病異常脂質血症およびその他の糖尿病合併症、ならびに高血糖症、高インスリン血症、耐糖能障害、空腹時血糖異

常、異常脂質血症、高トリグリセリド血症、症候群X、およびインスリン抵抗性の予防および／または処置に有用であり得る。

【0024】

本発明のポリペプチドは、肥満（例えば食欲および摂食の調節）、アテローム性動脈硬化疾患、高脂血症、高コレステロール血症、低HDLレベル、高血圧、心血管疾患（アテローム性動脈硬化、冠性心疾患、冠動脈疾患、および高血圧を含む）、脳血管疾患および末梢血管疾患の予防および／または処置において；および狼瘡、多囊胞性卵巣症候群、発癌、および過形成、喘息、男性生殖異常、潰瘍、睡眠障害、脂質および炭水化物代謝異常、概日不全、成長障害、エネルギーホメオスタシス異常、自己免疫疾患を含む免疫疾患（例えば全身エリトマトーデス）、ならびに急性および慢性炎症性疾患、敗血症ショック、および本明細書中に指定するその他の病状、または本明細書中に以下に記載するその他の機能の予防および／または処置のためにも有用であり得る。

10

【0025】

本発明の一つの局面は、配列番号1～148からなる群から選択されるポリペプチド、および表示した配列番号のポリペプチドと本質的に同様の少なくとも1種の生物学的機能を示すそれらのフラグメント、誘導体、および変種であり（集合的に、「本発明のポリペプチド」）、それらの機能的等価物も含む。本発明の他の態様では、配列番号1～37および配列番号112～148からなる群から選択されるポリペプチドおよび表示した配列番号のポリペプチドおよび表示した配列番号のポリペプチドと本質的に同様の少なくとも1種の生物学的機能を示すそれらのフラグメント、誘導体、および変種である。本発明の別の態様は、配列番号1～5および配列番号112～115からなる群から選択されるポリペプチドおよび表示した配列番号のポリペプチドと本質的に同様の少なくとも1種の生物学的機能を示すそれらのフラグメント、誘導体、および変種である。本発明のさらなる態様は、配列番号1および112および表示した配列番号のポリペプチドと本質的に同様の少なくとも1種の生物学的機能を示すそのフラグメント、誘導体、および変種から成る群から選択されるポリペプチドである。

20

【0026】

本発明のポリペプチドを選択的に結合する抗体および抗体フラグメントも提供される。かかる抗体は、本発明のポリペプチドを検出するために有用であり、そして当該技術分野では周知の手順により同定および作製できる。ポリクローナルN末端IgG抗体およびモノクローナルC末端Fab抗体が、本発明のポリペプチドを認識するとして作製かれている。

30

【0027】

本発明は、本発明のいずれかのポリペプチドまたはV PAC 2に対して活性のいずれかのポリペプチド、例えば配列番号1～148の治療有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる、糖尿病、糖尿病関連障害および／または本発明のポリペプチドにより作用される他の疾患および状態、例えば哺乳動物内で本発明のポリペプチドのV PAC 2アゴニスト機能により作用されるものを処置する方法にも関する。本発明のポリペプチドを作製する方法も開示される。

40

【0028】

発明の詳細な説明

本発明は、新規のポリペプチド、および実質的に図1a～1d中のポリペプチドと同様の少なくとも1種の生物学的機能を示すそれらのフラグメント、誘導体、および変種（集合的に、本発明のポリペプチド）を提供する。生体内でV PAC 2アゴニストとして機能する本発明のポリペプチドは、II型糖尿病、妊娠糖尿病、若年発症成人型糖尿病（MODY）（Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994）、潜伏性自己免疫性成人型糖尿病（LADA）（Zimmer, et al., Diabetes Med. 11:299, 1994）を含む糖尿病、および関連する糖尿病異常脂質血症およびその他の糖尿病合併症、ならびに高血糖症、高インスリン血症、耐糖能障害、空腹時血糖異常、異常脂質血症、高トリグリセリド血症、症候群X、およびインスリン抵

50

抗性などの疾患または状態の予防および／または処置に使用できる。

【0029】

さらに本発明のポリペプチドは、肥満（例えば食欲および摂食の調節）、アテローム性動脈硬化疾患、高脂血症、高コレステロール血症、低HDLレベル、高血圧、心血管疾患（アテローム性動脈硬化、冠性心疾患、冠動脈疾患、および高血圧を含む）、脳血管疾患および末梢血管疾患の予防および／または処置のため；および狼瘡、多囊胞性卵巣症候群、発癌、過形成、喘息、ヒト精子運動性を含む男性生殖異常、潰瘍、睡眠障害、および本明細書中に指定するその他の病状、または本明細書中に以下に記載するその他の機能の予防および／または処置のためにも有用であり得る。

【0030】

さらに、本発明のポリペプチドは、グルコース依存性の様式で膵臓細胞からのインスリン放出を促進する。本発明のポリペプチドは、水性および非水性配合物の双方の中でも安定でありそして1時間以上の血漿中半減期を示し、例えば6時間より長い血漿半減期を示す。

【0031】

本発明のポリペプチドはV PAC 2アゴニストである。それらは、例えばV PAC 1および／またはPAC 1よりもV PAC 2に対して少なくとも10倍の選択性を有する選択性V PAC 2アゴニストである。本発明のポリペプチドは、例えばII型糖尿病の処置に逆効果である血漿グルコースのレベルの維持または上昇を含むことなく、グルコース依存性の様式で血漿内へのインスリン放出を促進する。さらに、本発明のポリペプチドは、V PAC 2受容体の選択性アゴニストであり、それにより、例えば、血漿中へのインスリンの放出増加を起こし、一方では、不快で危険な副作用、例えば消化管内水滞留、および／または望ましくない心血管効果、例えば心拍数または血圧の上昇に関連する他の受容体に対して選択性である。

【0032】

本発明のポリペプチドは、水性および非水性配合物中でも安定である。例えば、本発明のポリペプチドは、水(pH 7~8)または非水性有機溶剤中に溶解された場合に、37~40で一週間の期間で10%未満の分解を示す。さらに、本発明の組成物および配合物は、本発明のポリペプチド、および1種もしくはそれ以上の製薬学的に許容できるキャリヤ、製薬学的に許容できる希釈剤、および製薬学的に許容できる溶剤を含んでなってよい。

【0033】

本発明のポリペプチドは、低い内因性インスリン分泌または耐糖能障害、例えばII型糖尿病を有する患者に対する治療を提供する。すなわち、本発明のポリペプチドはグルコース刺激性インスリン分泌を維持、改善、および回復するために使用してもよい長期作用型V PAC 2アゴニストである。さらに、V PAC 2受容体の選択性ペプチドアゴニストは、他のPACAP受容体の非選択性活性化と関連する副作用を起こすことなく、膵臓内のグルコース依存性インスリン分泌を促進する。

【0034】

本明細書中を通じて使用されるいくつかの用語をここで定義し、その他は使用の都度定義する。特定のアミノ酸の一文字略号、その相当するアミノ酸、および三文字略号は下記である：A、アラニン(a l a)；C、システイン(c y s)；D、アスパラギン酸(a s p)；E、グルタミン酸(g l u)；F、フェニルアラニン(p h e)；G、グリシン(g l y)；H、ヒスチジン(h i s)；I、イソロイシン(i l e)；K、リシン(l y s)；L、ロイシン(l e u)；M、メチオニン(m e t)；N、アスパラギン(a s n)；P、プロリン(p r o)；Q、グルタミン(g l n)；R、アルギニン(a r g)；S、セリン(s e r)；T、トレオニン(t h r)；V、バリン(v a l)；W、トリプトファン(t r p)；およびY、チロシン(t y r)。

【0035】

「機能的に等価」または「本質的に同様の生物学的機能または活性」は、それぞれのボ

10

20

30

40

50

リペプチドの生物学的活性が同じ手順で決定された場合に、比較しているポリペプチドにより示される生物学的活性の約30%以内～約100%またはそれ以上の生物学的活性の程度をそれぞれ意味する。例えば、図1のポリペプチドと機能的に等価であるポリペプチドは、実施例9のサイクリックAMP(cAMP)シンチレーションプロキシミティーアッセイにより試験された場合に、ヒトV_{PAC}2受容体を発現するCHO細胞系統内のcAMPの蓄積を示すものである。

【0036】

「フラグメント」、「誘導体」および「変種」の用語は、図1のポリペプチドに関する場合には、以下にさらに記載するポリペプチドと本質的に同様の生物学的機能または活性を保持する該ポリペプチドのフラグメント、誘導体、および変種を意味する。

10

【0037】

類似体とは、その中に本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を含むプロ-ポリペプチドを含む。本発明の活性ポリペプチドは、本来、生体内プロセス、または当該技術分野では周知の手順、例えば酵素または化学的切断により、プロ-ポリペプチド分子を構成する別のアミノ酸から切断できる。例えば、28アミノ酸の本来のペプチドVIPは、28アミノ酸活性成熟ペプチドを放出するように生体内でプロセッシングされるさらに大きいポリペプチドとして元々は発現される。

【0038】

フラグメントは、本明細書中に開示の生体内モデルに記載のように、本質的に同様の機能活性を保持するポリペプチドの一部分である。

20

【0039】

誘導体は、本明細書中に開示される機能を本質的に保持しそして追加の構造および付随的機能（例えば、さらに長い半減期を有するPEG付加またはアセチル化ポリペプチド）を含むポリペプチド、長い半減期、標的特異性または意図する標的への低い毒性を与えるような追加の活性を与える融合ポリペプチドへのすべての改変物を含み、それらは以下にさらに記載する。

【0040】

本発明のポリペプチドのフラグメント、誘導体、または変種は、(i)1個もしくはそれ以上のアミノ酸残基が保存的もしくは非保存的アミノ酸残基（好ましくは保存的アミノ酸残基）で置換されそしてかかる置換アミノ酸残基が遺伝子コードによりコードされるものであってもなくてもよいもの、または(ii)1個もしくはそれ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(iii)N末端アセチル基が最初の3個のアミノ酸の1個もしくはそれ以上において他の置換基で置換されているか、もしくは1個もしくはそれ以上の最初の3個のアミノ酸が保存的もしくは非保存的アミノ酸残基（好ましくは保存的アミノ酸残基）で置換されそしてかかる置換されたアミノ酸酵素がタンパク質分解に対する耐性を与えるために遺伝子コードによりコードされるものであってもそうでなくともよいもの、または(iv)成熟ポリペプチドが他の化合物、例えばポリペプチドの半減期を増加する化合物（例えばポリエチレングリコールまたは脂肪酸）と融合しているもの、または(v)追加のアミノ酸が成熟ポリペプチド、例えばリーダーもしくは分泌配列もしくは成熟ポリペプチドもしくはポリペプチド配列の精製に使用される配列と融合しているもの、または(vi)ポリペプチド配列がより大きなポリペプチド（例えば、ヒトアルブミン、抗体またはFc、効果の持続期間を延長するため）と融合しているもの、であってもよい。かかるフラグメント、誘導体、および変種および類似体は、本明細書中の教示から、当該技術分野の専門家の範囲内にあると考えられる。

30

【0041】

本発明の誘導体は、1個もしくはそれ以上の予測され、好ましくは非必須のアミノ酸残基になされる一定の保存的アミノ酸置換（以下に定義する）を含んでもよい。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を改変することなくタンパク質の野生型配列から改変できる残基であり、一方「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性のために必要である。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似のアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基と置換さ

40

50

れるものである。類似のアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されている。それらのファミリーは、塩基性側鎖（例えはリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えはアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えはグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えはアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖（例えはトレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えはチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。非保存性置換は、保存されるアミノ酸残基に対してまたは保存されるタンパク質ドメイン内に存在するアミノ酸残基、例えばかかる残基がV P A C 2活性および／またはV P A C 2選択性などに対して必須である残基19および27に対してなされてはならない。フラグメント、または生物学的活性部分は、医薬として、抗体産生のため、研究用試薬としてなどとしての使用に適するポリペプチドフラグメントを含む。フラグメントは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に十分に類似またはそれから誘導され、そして該ポリペプチドの少なくとも1種の活性を示すが、しかし本明細書中に開示される全長ポリペプチドよりは少ないアミノ酸を含むアミノ酸配列を含んでなるペプチドを含む。典型的には、生物学的活性部分は、ポリペプチドの少なくとも1種の活性を有するドメインまたはモチーフを含んでなる。ポリペプチドの生物学的活性部分は、例えは5個またはそれより多いアミノ酸長さであるペプチドであることができる。かかる生物学的活性部分は、合成的にまたは組換え技術により作製でき、そして本明細書中に開示または当該技術分野では公知の手段により本発明のポリペプチドの機能活性の1種もしくはそれ以上について評価できる。

10

20

30

【0042】

本発明のポリペプチドの変種は、図1(a-d)の配列番号のアミノ酸配列またはそのドメインに十分に類似するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。「十分に類似」の用語は、第一および第二アミノ酸配列が共通の構造ドメインおよび／または共通の機能活性を有するように、第二のアミノ酸配列に関して一致または等価なアミノ酸残基の十分または最小数を含む第一アミノ酸配列を意味する。例えは、少なくとも約45%、約75%～約98%、または一致する共通の構造ドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書中では十分に類似として定義される。例えは、変種は、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に十分に類似であってもよい。

30

【0043】

変種は、突然変異発生によりアミノ酸配列が相違するポリペプチドを含む。V P A C 2アゴニストとして機能する変種は、V P A C 2アゴニスト活性について、本発明のポリペプチドの変異体、例えは末端切断変異体、の組合せライブラリーをスクリーニングして同定できる。

40

【0044】

さらに、本発明の誘導体は、他の化合物、例えはポリペプチドの半減期を延長でき、および／またはポリペプチドの潜在的な免疫原性を低下できる化合物（例えはポリエチレンギリコール、「PEG」または脂肪酸）に融合された成熟ポリペプチドを含む。PEG付加の場合に、PEGへのポリペプチドの融合は、当該技術分野の熟練者には公知のいずれかの手段により達成されてもよい。例えは、PEG付加は、最初に、PEGが付着するリンクァーを得るためにポリペプチド内にシステイン変異を導入し、次いでPEG-マレイミドを用いて部位指定誘導体化を行って達成されてもよい。例としては、システインをペプチドのC末端に付加してもよい（例えは、Tsutsumi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(15):8548-53, 2000, Veronesi, Biomaterials 22:405-417, 2001, Goodsoon & Krate, Bio/Technology 8:343-346, 1990参照）。マレイミドに加えて、多数のCys反応性基がタンパク質架橋の該当技術分野の専門家には公知であり、例えはハロゲン化アルキルおよびビニルスルホンの使用である（例えは、T. E. Creighton, Proteins, 第二版, 1993参照）

50

。さらに、PEGは、C末端カルボン酸基に対して、C末端の側鎖に対して、内部アミノ酸、例えばCys、Lys、Asp、もしくはGluに対して、または類似の反応性側鎖部分を含む非本来性アミノ酸に、直接付加により導入してもよい。

【0045】

PEGとペプチド架橋基との間のリンカーは変更してもよい。例えば、市場で入手できるCys反応性40kDa PEG(mPEG2-MAL; Nekter, San Carlos, CA)は、Cysへの結合のためにマレイミド基を使用し、そしてマレイミド基はLysを含むリンカーを介してPEGに付加する。第二の例として、市場で入手できるCys反応性43kDa PEG(GL2-400MA、NOF、東京、日本)は、Cysへの結合のためにマレイミド基を使用し、そしてマレイミド基は二置換アルカンリンカーを介してPEGに付加する。

【0046】

本発明は、架橋部位としてCysの使用を例示するが、しかしこれに限定はされない。アミノ酸内に存在する他の部分、例えばN末端アミノ基、C末端カルボン酸基、およびアミノ酸の側鎖、例えばLys、Arg、Asp、Gluは、共有結合修飾およびPEGへの付加に適する部分を提供する反応性基を提供することは周知である。適合する架橋剤の多数の例は、当該技術分野の専門家には公知である(例えばT.E.Creighton, Proteins, 第二版、1993参照)。かかる架橋剤は、例示のように、これらに限定はされないが、例えばNekterおよびNOFにより市販されているアミン、アルデヒド、アセタール、マレイミド、スクシンイミド、およびチオールを含む市場で入手できるPEG誘導体によりPEGに連結されてもよい(例えばHarris, et al., Clin. Pharmacokin. 40:539-551, 2001参照)。

【0047】

本発明は、キメラまたは融合ポリペプチドも提供する。本発明のポリペプチドは、ペプチド結合または変更ペプチド結合により相互に結合したアミノ酸から成ることができ(例えばペプチドアイソスター(isoester))、そして20種の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。ポリペプチドは、天然のプロセス、例えば翻訳後プロセシングにより、または当該技術分野では周知の化学修飾技術のいずれかにより修飾されてもよい。かかる修飾は、基本的な教科書中およびさらに詳細な論文、ならびに研究報告中に詳細に説明されている。修飾はポリペプチド中のどこでなされてもよく、それにはペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端も含まれる。同じ形式の修飾が、与えられたポリペプチド内のいくつかの部位で同一または変化した程度で存在してもよい。また、与えられたポリペプチドは、多数の形式の修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、例えばユビキチン化の結果として分枝してもよく、そしてそれらは分枝を有するかまたは有しない環状であってもよい。環状、分枝状、および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後の天然プロセスからもたらされてもよくまたは合成法により作製されてもよい。修飾は、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタマートの形成、製剤、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、PEG付加(pegylation)、タンパク質分解性プロセシング、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、転移RNA媒介のアミノ酸のタンパク質への付加、例えばアルギニン化、およびユビキチン化を含む(例えば、Proteins, Structure and Molecular Properties, 第二版、T.E.Creighton, W.H.Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C.Johnson編集、Academic Press, New York, 1~12ページ(1983); Seifter, et al., Meth. Enzy-

10

20

30

40

50

m o l 1 8 2 : 6 2 6 - 6 4 6 , 1 9 9 0 ; R a t t e n e t a l . , A n n . N . Y . A c a d . S c i . 6 6 3 ; 4 8 - 6 2 , 1 9 9 2 参照)。

【0048】

本発明のポリペプチドは、図1a-dのポリペプチド（配列番号1~148）ならびにそれからの配列中に非本質的な変更を有する配列を含む。「非本質的変更」とは、本発明のポリペプチドの本質的に少なくとも1種の生物学的機能、例えば本明細書中に記載のV P A C 2 アゴニスト活性、選択的V P A C 2 アゴニスト活性、またはインスリン分泌活性を本質的に維持するいずれかの配列付加、置換、または欠損変種を含む。それらの機能的等価物は、図1a-dのポリペプチドに対して少なくとも約90%一致、少なくとも約95%一致、または少なくとも約97%一致を有するポリペプチドを含んでもよく、そして本質的に同一の生物学的活性を有するかかるポリペプチドの部分も含む。しかし、本明細書中にさらに記載する機能的等価性を示す図1a-dのポリペプチドからのアミノ酸配列中に非本質的な変更を有するいずれのポリペプチドも本発明の記載中に含まれる。10

【0049】

当該技術分野では公知のように、2個のポリペプチド間の「類似性」は、アミノ酸配列および一つのポリペプチドの保存性アミノ酸置換を第二のポリペプチド配列に対して比較して決定される。かかる保存性置換は、上記およびデイホフ（Dayhoff, The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978）およびアルゴス（Argos, AMBO J. 8: 779-785, 1989）に記載されたものを含む。例えば、下記のグループの一つに属するアミノ酸は保存的変化を示す。20

- a l a 、 p r o 、 g l y 、 g l n 、 a s n 、 s e r 、 t h r ;
- c y s 、 s e r 、 t y r 、 t h r ;
- v a l 、 i l e 、 l e u 、 m e t 、 a l a 、 p h e ;
- l y s 、 a r g 、 h i s ;
- p h e 、 t y r 、 t r p 、 h i s ; および
- a s p 、 g l u

【0050】

本発明のポリペプチドは、化学合成方法の産物であってもよく、そのために、本発明の単離もしくは精製されたポリペプチド、またはその生物学的活性部分は、化学的に合成された場合に化学的前駆体もしくはその他の化学製品を本質的に含まないであろう。例えば、本発明の単離されたポリペプチドは、非-ポリペプチド、すなわち汚染性物質約30%未満（乾燥重量により）を含むであろう。本発明のペプチドが化学合成により調製された場合に、調製物は化学的前駆体または本発明以外の化学製品を乾燥重量で約30%未満含むであろう。30

【0051】

本発明のポリペプチドは、下記の特定する実施例に記載のように単離されると好都合である。例えば、精製ポリペプチドの調製物は、少なくとも約70%純度、または約85%~約99%の純度である。調製物の純度は、当該技術分野で公知のいずれかの技術、例えばS D S - ポリアクリルアミド - ゲル電気泳動法および質量分光分析 / 液体クロマトグラフィー法により評価できる。40

【0052】

当該技術分野内の技術者の理解内にある関連ペプチドおよび化合物（例えば小型化合物）、例えば化学的擬似体、有機擬似体、またはペプチド擬似体も提供される。本明細書中に使用する場合に「擬似体」、「ペプチド擬似体（p e p t i d e m i m e t i c ）」、「ペプチド擬似体（p e p t i d o m i m e t i c ）」、「有機擬似体」および「化学的擬似体」の用語は、本発明のペプチドのものと等価な三次元配置にある原子の配列を有するペプチド誘導体、ペプチド類似体、および化学化合物を包含すると意図する。本明細書中に使用される「に等価」の語句は、本発明のペプチドの生物学的機能を有するように該ペプチド内の一定の原子もしくは化学部分の置換（1個若しくは複数個）を有し、該原50

子および部分の同様もしくは十分に類似する配列もしくは配向を生成する擬似化合物中の結合長さ、結合角、および配列を有する、ペプチドまたは化合物を包含すると意図すると理解される。本発明のペプチド擬似体において、化学構成の三次元配列は、ペプチド内のペプチド骨格の三次元配列および成分アミノ酸側鎖に構造的および/または機能的に等価な本質的に生物学的活性を有する本発明のペプチドのペプチド-、有機-、および化学的擬似体をもたらす。それらの用語は、当該技術分野内での理解に従って使用され、例えばフォーシャー (Fauchere, Adv. Drug Res. 15: 29, 1986) 、ヴェバーとフライディング (Veber & Freidinger, TINS, 392 ページ、1985) およびエヴァンズら (Evans, et al., J. Med. Chem. 30: 1229, 1987) により説明されている (それらは引用することにより本明細書に編入される)。

10

20

【0053】
本発明のそれぞれのペプチドの生物学的活性にファーマコフォア (pharmacophore) が存在することは理解されている。ファーマコフォアは、当該技術分野において、生物学的活性に対する構造的要求の理想化された三次元定義を含んでなると理解されている。ペプチド-、有機- および化学的擬似体は、現在の計算機モデル化ソフトウェアを用いてそれぞれのファーマコフォアに適合するように設計されてもよい (計算機支援医薬設計)。該擬似体は、本発明のペプチド内の置換原子からの位置情報に基づいて、構造関数解析により生成されてもよい。

30

【0054】
本発明により提供されるペプチドは、当該技術分野では公知のいずれかの化学合成技術、特に固相合成技術、例えば市場で入手できる自動化ペプチド合成装置を用いて合成されると有利である。本発明の擬似体は、慣用的にペプチドの合成に使用されている固相または溶液相法により合成されてもよい (例えば Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-54, 1963; Carpinio, Acc. Chem. Res. 6: 191-98, 1973; Birr, Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis, Springer-Verlag: Heidelberg, 1978; The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, 1, 2, 3, および 5巻, (Gross & Meinhofefer 編集), Academic Press: New York, 1979 ; Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, Pierce Chem. Co.: Rockford, Ill, 1984; Kent, Ann Rev. Biochem. 57: 957-89, 1988; および Gregg, et al., Int. J. Peptide Protein Res. 55: 161-214, 1990 (それらは引用することにより本明細書にその全体が編入される) 参照)。

30

40

【0055】
例えば、固相法を使用してもよい。要約すると、N-保護-C末端アミノ酸残基を不溶性支持体、例えばジビニルベンゼン架橋ポリスチレン、ポリアクリルアミド樹脂、けいそう土/ポリアミド (pepsyn K)、細孔性ガラス (controlled pore glass)、セルロース、ポリプロピレン膜、アクリル酸被覆ポリエチレンロッド、などに連結する。順次保護アミノ酸誘導体の脱保護、中和、およびカップリングのサイクルが、アミノ酸配列に従う C 末端からアミノ酸を連結するために使用される。いくつかの合成ペプチドに対して、酸感受性樹脂を用いる F M O C 戦略を用いてもよい。これに関する固体支持体は、各種の機能性化された形態で市場で入手できるジビニルベンゼン架橋ポリスチレン樹脂であり、それはクロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、パラアセタミドメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン (BHA) 樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン (MBHA) 樹脂、オキシム樹脂、4-アルコキシベンジルアルコール樹脂 (Wang 樹脂)、4-(2', 4'-ジメトキシフェニルアミノメチル)-フェノキシメチル樹脂、2, 4-ジメトキシベンズヒドリル-アミン樹脂、および 4-(2', 4'-ジメト

50

キシフェニル - F M O C - アミノ - メチル) - フエノキシアセタミドノルロイシル - M B H A 樹脂 (R i n k アミド M B H A 樹脂) が含まれる。さらに希望する場合には、酸感受性樹脂も C 末端酸を提供する。アミノ酸のための保護基は、塩基不安定性の 9 - フルオレニルメトキシ - カルボニル (F M O C) である。

【 0 0 5 6 】

B O C (t - ブチルオキシカルボニル) および F M O C 基と化学的に適合するアミノ酸の側鎖官能性の適合する保護基は、当該技術分野では周知である。F M O C 化学を使用する場合には、下記の保護されたアミノ酸誘導体が好ましい : F M O C - C y s (T r i t) 、 F M O C - S e r (B u t) 、 F M O C - A s n (T r i t) 、 F M O C - L e u 、 F M O C - T h r (T r i t) 、 F M O C - V a l 、 F M O C - G l y 、 F M O C - L y s (B o c) 、 F M O C - G l n (T r i t) 、 F M O C - G l u (O B u t) 、 F M O C - H i s (T r i t) 、 F M O C - T y r (B u t) 、 F M O C - A r g (P M C (2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホニル)) 、 F M O C - A r g (B O C) ₂ 、 F M O C - P r o , および F M O C - t r p (B O C) 。アミノ酸残基は当該技術分野では公知の各種のカップリング剤および化学薬品、例えば D I C (ジイソプロピル - カルボジイミド) 、 D C C (ジシクロヘキシルカルボジイミド) 、 B O P (ベンゾトリアゾリル - N - オキシトリスジメチルアミノホスホニウム ヘキサフルオロホスファート) 、 P y B O P (ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス - ピロリジノホスホニウム ヘキサフルオロホスファート) 、 P y B r O P (プロモ - トリス - ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート) を用いる直接カップリング ; 予め形成された対称無水物経由 ; 活性エステル、例えばペントフルオロフェニルエステル経由 ; または予め形成された H O B t (1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール) 活性エステル経由または F M O C - アミノ酸フルオリドおよびクロリド使用によりまたは F M O C - アミノ酸 - N - カルボキシ無水物使用によるもの、を使用してカップリングしてもよい。H O B t または H O A t (7 - アザヒドロキシベンズトリアゾール) の存在下での H B T U (2 - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) 、 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスファート) または H A T U (2 - (1 H - 7 - アザ - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) 、 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスファート) を用いる活性化が好ましい。

【 0 0 5 7 】

固相法は、手操作で行ってもよいが、しかし市場で入手できるペプチド合成装置 (例えば A p p l i e d B i o s y s t e m s 4 3 1 A など ; A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A) に基づく自動化合成を用いてもよい。典型的な合成では、第一 (C 末端) アミノ酸がクロロトリチル樹脂上に負荷される。A B I F a s t M o c プロトコール (A p p l i e d B i o s y s t e m s) に従う。順次脱保護 (2 0 % ピペリジン / N M P (N - メチルピロリドン) 使用) および A B I F a s t M o c プロトコール (A p p l i e d B i o s y s t e m s) に従うカップリングサイクルをペプチド配列を生成するために使用してもよい。無水酢酸によるキャップ形成を伴う二重および三重カップリングを用いてもよい。

【 0 0 5 8 】

合成擬似ペプチドを樹脂から切断しそして適當な捕捉剤を含む T F A (トリフルオロ酢酸) で処理して脱保護してもよい。多数のかかる切断試薬、例えば R e a g e n t K (0 . 7 5 g 結晶フェノール、 0 . 2 5 m L エタンジチオール、 0 . 5 m L チオアニソール、 0 . 5 m L 脱イオン水、 1 0 m L T F A) などを使用してもよい。濾過によりペプチドを樹脂がら分離しそしてエーテル沈降により単離してもよい。さらなる精製は、慣用の方法、例えばゲル濾過および逆相 H P L C (高速液体クロマトグラフィー) により達成してもよい。本発明による合成擬似体は、製薬学的に許容できる塩、特に有機塩基と無機塩基との塩を含む塩基付加塩であってもよい。アミノ酸残基の塩基付加塩は、当該技術分野の専門家には周知の方法に従って、適當な塩基または無機塩基を用いるペプチドの処理により調製するか、または適當な塩基の凍結乾燥により所望の塩を直接得てもよい。

10

20

30

30

40

50

【0059】

一般に、当該技術分野の専門家は、本明細書中に記載するペプチドが、本質的に非修飾ペプチドと同様の活性を有し、そして場合によりその他の望ましい性質を有するペプチドを生成するための各種の化学的技術により修飾されてもよいことを認めるであろう。例えば、ペプチドのカルボン酸基は、製薬学的に許容できる陽イオンの塩の形態で提供されてもよい。ペプチド内のアミノ基は、製薬学的に許容できる酸付加塩、例えばHCl、HBr、酢酸、安息香酸、トルエンスルホン酸、マレイン酸、酒石酸、およびその他の有機酸の形態であってもよく、またはアミドに変換されてもよい。チオールは、多数の周知の保護基のいずれか一つ、例えばアセトアミド基を用いて保護されてもよい。当該技術分野の専門家は、本来の結合立体配置がさらに良く近似されるように本発明のペプチド内に環状構造を導入する方法も認めるであろう。例えば、カルボキシル末端またはアミノ末端システイン残基をペプチドに付加して、酸化された場合にペプチドがジスルフィド結合を含み、それにより環状ペプチドを生成するようしてもよい。その他のペプチド環状化方法は、チオエーテルおよびカルボキシルおよびアミノ末端アミドおよびエステルの形成を含む。

10

【0060】

特定すると、相当するペプチドと同様または類似の所望の生物学的活性を有するが、しかし溶解度、安定性、および加水分解およびタンパク質分解に対する感受性に関してペプチドよりもさらに有利な活性を有するペプチド誘導体および類似体を構築するために、各種の技術が利用できる。かかる誘導体および類似体は、N末端アミノ基、C末端カルボキシル基における修飾、および/またはペプチド内の1個もしくはそれ以上のアミド結合の非アミド結合への変更がされたペプチドを含む。2個もしくはそれ以上のかかる修飾が一つのペプチド擬似構造内に一緒になってもよいことは理解されるであろう（例えば、C末端カルボキシル基での修飾およびペプチド内の2個のアミノ酸間の-CH₂-カルバミン酸連結の導入）。

20

【0061】

アミノ末端修飾は、アルキル化、アセチル化、カルボベンゾイル基の付加、およびスクシンイミド基の形成を含む。特定すると、N末端アミノ基は、式RC(O)NH-〔式中、Rはアルキル、例えば低級アルキルである〕のアミド基を形成するように反応され、そして酸ハロゲン化物、RC(O)Clまたは酸無水物との反応により付加されてもよい。典型的には、該反応は、ほぼ等モルもしくは過剰量（例えば約5当量）の酸ハロゲン化物を、好ましくは反応中に生成する酸を捕捉するために第三級アミン、例えばジイソプロピルエチルアミンの過剰量（例えば約10当量）を含む不活性希釈剤（例えばジクロロメタン）中でペプチドと接触させて行うことができる。その外、反応条件は慣用のものである（例えば室温で30分間）。上記のように、低級アルキルN-置換を得るための末端アミノのアルキル化、引き続く酸ハロゲン化物との反応は、式RC(O)NR-のN-アルキルアミド基をもたらす。あるいは、アミノ末端は、無水コハク酸との反応によりスクシンイミド基に共有結合で連結されてもよい。無水コハク酸のほぼ当量もしくは過剰量（例えば約5当量）が使用され、そして末端アミノ基は、ウォレンバーグラ（W o l l e n b e r g , e t a l . 米国特許第4,612,132号明細書、その全体を引用することにより本明細書に編入される）に記載のようにして、適合する不溶性溶剤（例えばジクロロメタン）中の第三級アミン、例えばジイソプロピルエチルアミンの過剰量（例えば10当量）の使用を含む当該技術分野では周知の方法によりスクシンイミドに変換される。コハク酸基は、例えばC₂~C₆-アルキルまたは-SR置換基で置換されてもよく、それらはペプチドのN末端で置換スクシンイミドを得るために慣用の様式で調製できることも理解される。かかるアルキル置換基は、上記のウォレンバーグラに記載の方法で、低級オレフィン（C₂~C₆-アルキル）と無水マレイン酸との反応により調製されてもよく、そして-SR置換基は、RSHと無水マレイン酸との反応により調製されてもよい〔式中、Rは上記に定義されている〕。別の有利な態様では、アミノ末端は、ベンジルオキシカルボニル-NH-または置換ベンジルオキシカルボニル-NH-基を形成するために誘導体化されてもよい。該誘導体は、例えば反応の間に生成する酸を捕捉するための第三級アミ

30

40

50

ンを含む適當な不活性希釈剤（例えばジクロロメタン）中で、ほぼ當量または過剰のベンジルオキシカルボニル クロリド（C B Z - C 1）、または置換されたC B Z - C 1との反応により調製してもよい。さらに別の誘導体では、N末端は、末端アミンをスルホニアミドに変換するために適當な不活性希釈剤（ジクロロメタン）中で、當量または過剰（例えば5當量）のR - S (O) ₂ C 1との反応によるスルホニアミド基を含んでなる〔式中、Rはアルキル、そして好ましくは低級アルキルである〕。例えば、不活性希釈剤は、反応の間に生成する酸を捕捉するために、過剰の第三級アミン（例えば10當量）、例えばジイソプロピルエチルアミンを含んでもよい。その外、反応条件は慣用のものである（例えば室温で30分間）。カルバミン酸基は、末端アミンをカルバマートに変換するために適合する不活性希釈剤（例えばジクロロメタン）中で當量または過剰（例えば5當量）のR - O C (O) C 1またはR - O C (O) O C ₆ H ₄ - p - N O ₂との反応によりアミノ末端に生成されてもよい〔式中、Rはアルキル、好ましくは低級アルキルである〕。例えば、不活性希釈剤は、反応中に生成するいづれかの酸を捕捉するために、過剰（例えば約10當量）の第三級アミン、例えばジイソプロピルエチルアミンを含んでもよい。その外、反応条件は慣用のものである（例えば室温で30分間）。尿素基は、末端アミンを尿素（すなわちR N H C (O) NH -）基〔式中、Rは上記に定義されている〕に変換するために、適合する不活性希釈剤（例えばジクロロメタン）中で、當量または過剰（例えば5當量）のR - N = C = Oと反応させてアミノ末端に形成してもよい。例えば、不活性希釈剤は、過剰（例えば約10當量）の第三級アミン、例えばジイソプロピルエチルアミンを含んでもよい。その外、反応条件は慣用のものである（例えば室温で30分間）。

10

20

30

40

50

【0062】

C末端カルボキシル基がエステル（例えば、- C (O) OR〔式中、Rはアルキル、そして好ましくは低級アルキルである〕）により置換されてもよいペプチド擬似体を調製する場合に、ペプチド酸を調製するために使用される樹脂を使用してもよく、そして側鎖を保護されたペプチドは、塩基および適合するアルコール（例えばメタノール）を用いて切断されてもよい。かかる連鎖保護基は、所望のエステルを得るためにフッ化水素を用いる処理により、通常の様式で除去されてもよい。C末端カルボキシル基がアミド-C(O)NR₃R₄により置換されているペプチド擬似体を調製する場合には、ペプチド合成のための固体支持体としてベンズヒドリルアミン樹脂が使用される。合成が完了すると、支持体からペプチドを解放するためにフッ化水素処理すると遊離ペプチドアミンが直接もたらされる（すなわち、C末端が-C(O)NH₂である）。あるいは、側鎖保護ペプチドを支持体から切断するためにアンモニアとの反応を伴うペプチド合成の間のクロロメチル化樹脂の使用は、遊離ペプチドアミドを生成し、そしてアルキルアミンまたはジアルキルアミンとの反応は、アルキルアミドまたはジアルキルアミドで保護された側鎖を生成する（すなわち、C末端は-C(O)NRR₁である〔式中、RおよびR₁はアルキル、そして好ましくは低級アルキルである〕）。次いで側鎖保護は、フッ化水素を用いる通常の様式で除去され、遊離アミド、アルキルアミド、またはジアルキルアミドを生成する。

【0063】

別の代わりの態様では、C末端カルボキシル基またはC末端エステルは、カルボキシル基またはエステルのそれぞれ-OHまたはエステル(-OR)をN末端アミノ基で置換して環化する環状ペプチドを形成するように誘導されてもよい。ここで。例えば、ペプチド酸を生成する合成および切断の後に、例えば塩化メチレン(C H₂ C l₂)、ジメチルホルムアミド(D M F)、またはそれらの混合物中で、適當なカルボキシル基活性化剤、例えばジシクロヘキシリカルボジイミド(D C C)により、遊離酸を活性化エステルに溶液中で変換する。次いで、環状ペプチドは、活性化エステルをN末端アミンで置換して形成される。当該技術分野で周知の方法による大希釈溶液の使用により、重合ではなくむしろ環化が促進されてもよい。

【0064】

当該技術分野で理解されそして本発明により提供されるペプチド擬似体は、本発明のペプチドと構造的に類似しているが、当該技術分野で公知でありそして下記の引用文献：S

patola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, (Weinstei
n編集), Marcel Dekker: New York, 267ページ, 1983; Spatola, Peptide Backbone Modifications 1
: 3, 1982; Morley, Trends Pharm. Sci. 463 - 468ページ, 1980; Hudson, et al., Int. J. Pept. Res. 14:
177 - 185, 1979; Spatola, et al., Life Sci. 38:
1243 - 1249, 1986; Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 307 - 314, 1982; Almquist, et al., J. Med.
. Chem. 23: 1392 - 1398, 1980; Jennings-White, et al., Tetrahedron Lett. 23: 2533; Szelke, et
al., 欧州特許第045665A号明細書; Hollandry, et al., Tetrahedron Lett. 24: 4401 - 4404, 1983; およびHru
by, Life Sci. 31: 189 - 199, 1982(それらはいずれも引用することにより本明細書に編入される)に記載の方法により、-CH₂NH-、-CH₂S-、
-CH₂CH₂-、-CH=CH-(シスおよびトランス配置の双方)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-、および-CH₂SO-からなる群から選択される連結により場合により置換された1個もしくはそれ以上のペプチド結合を有する。かかるペプチド擬似体は、例えば生産がさらに経済的、さらに高い化学的安定性または増強された薬理学的性質(例えば半減期、吸収、効能、効力など)を有し、低下した抗原性、およびその他の性質を含み、ポリペプチド様よりも著しい長所を有するであろう。
10 20 20

【0065】

本発明のペプチドの擬似類似体は、慣用または合理的な医薬設計の原理を利用して得てもよい(例えばAndrews, et al., Proc. Alfred Benzon Symp. 28: 145 - 165, 1990; McPherson, Eur. J. Biochem. 189: 1 - 24, 1990; Hol, et al., in Molecular Recognition: Chemical and Biochemical Problems, (Roberts編集); Royal Society of Chemistry; 84 - 93ページ, 1989a; Hol, Arzheim-Forsch. 39: 1016 - 1018, 1989b; Hol, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 25: 767 - 778, 1986(それらの開示は引用することにより本明細書に編入される)参照)。

30

【0066】

慣用の医薬設計の方法に従って、所望の擬似分子は、その構造が「本来」のペプチドの構造に共通の属性を有する分子を無作為に試験して得られてもよい。結合分子の特定の基での変化からもたらされる定量的な寄与は、ペプチドの活性と比較して推定される擬似体の生物学的活性を測定して決定されてもよい。合理的な医薬設計の一つの態様では、擬似体は、ペプチドの最も安定な三次元配置の寄与を共有するように設計される。従って、例えば、本明細書中に開示される本発明のペプチドにより示されるものと類似したイオン性、疎水性、またはファンデルワールス相互作用を起こすために十分な様式で配向される化学基を有するように擬似体を設計してもよい。

40

【0067】

合理的な擬似体設計を実行するための一つの方法は、ペプチドの三次元構造の表現を形成できる計算機システム、例えばHol, 1989a, Hol, 1989b、およびHol, 1986により例示されたものを使用する。本発明のペプチドのペプチド-、有機-、および化学的擬似体の分子構造は、当該技術分野で市場で入手できる計算機支援設計プログラムを用いて作成してもよい。かかるプログラムの例は、SYBYL 6.5^(R)、HQ SARTM、およびALCHEMY 2000TM (Tripos); GALAXYTM およびAM 2000TM (AM Technologies, Inc., San Antonio, TX)、CATALYSTTM およびCERIUSTM (Molec
50

ular Simulations, Inc., San Diego, CA); CACHÉ PRODUCTS™、TSAR™、AMBER™、およびCHEM-X™(Oxford Molecular Products, Oxford, CA)およびHEMBUILDER 3D™(Interactive Simulations, Inc. San Diego, CA)を含む。

【0068】

例えは当該技術分野で認められた分子モデル化プログラムを使用して本明細書中に開示されたペプチドを用いて調製されたペプチド-、有機-、および化学的擬似体は、慣用の化学合成技術を用いて調製され、そして組合わせ化学法を含む高収量スクリーニングを適合させるように設計されてもよい。本発明のペプチド-、有機-、および化学的擬似体を調製するために有用な組合わせ法は、固相合成および組合わせ化学アレイ、例えはSIDDCO(Tucson, Arizona); Tripos, Inc.; Calbiochem/Novabiochem(San Diego, CA); Symyx Technologies, Inc.(Santa Clara, CA); Medicchem Research, Inc.(Lemont, IL); Pharm-Eco Laboratories, Inc.(Bethlehem, PA); またはN.V.Oregon(Oss Netherlands)から提供されるものを含む。本発明のペプチド-、有機-、および化学的擬似体の組合わせ化学的調製は、Territ, (Combinatorial Chemistry, Oxford University Press, London, 1998); Gallop, et al., J. Med. Chem. 37: 1 233-51, 1994; Gordon, et al., J. Med. Chem. 37: 1 385-1401, 1994; Look, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 6: 707-12, 1996; Ruhland, et al., J. Am. Chem. Soc. 118; 253-4, 1996; Gordon, et al., Acc. Chem. Res. 29: 144-54, 1996; Thompson & Ellman, Chem. Rev. 96: 555-600, 1996; Fruchtel & Jung, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 17-42, 1996; Pavia, "The Chemical Generation of Molecular Diversity", Network Science Center, www.netsci.org. 1995; Adnan, et al., "Solid Support Combinatorial Chemistry in Lead Discovery and SAR Optimization," Id., 1995; Davies and Briant, "Combinatorial Chemistry Library Design using Pharmacophore Diversity," Id. 1995; Pavia, "Chemically Generated Screening Libraries: Present and Future," Id. 1996; および米国特許第5,880,972号、第5,463,564号、第5,331,573号、および第5,573,905号の各明細書中に開示の技術を含み、それらに限定はされないが、当該技術分野で公知の方法に従って調製されてもよい。

【0069】

新規に合成されたポリペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィーにより本質的に精製されてもよい(例えはCreighton, Proteins: Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, N.Y. 1983参照)。本発明の合成ポリペプチドの組成は、例えはエドマン(Edman)分解法(Creighton、上記)によるアミノ酸解析または配列決定により確認してもよい。さらに、ポリペプチドのアミノ酸配列のいずれの部分も、変種ポリペプチドもしくは融合ポリペプチドを生成するために直接合成の間に改変されるかおよび/または他のタンパク質からの配列を用いる化学的方法を用いて組合わせてもよい。

10

20

30

40

50

【0070】

また、本発明のポリペプチドを選択的に結合する抗体および抗体フラグメントも本明細書中に含まれる。当該技術分野で公知のいずれの形式の抗体も、当該技術分野で公知の方法を用いて生成されてもよい。例えば、抗体は、本発明のポリペプチドのエピトープに特異的に結合するように生成されてもよい。本明細書中に使用される「抗体」は、不变の免疫グロブリン分子、ならびにそのフラグメント、例えば $F(ab)_2$ 、および Fv を含み、それらは本発明のポリペプチドのエピトープを結合できる。典型的には、少なくとも 6 、 8 、 10 、または 12 個の隣接アミノ酸がエピトープを形成するために必要とされる。しかし、非隣接アミノ酸を含むエピトープは、それより多いアミノ酸、例えば少なくとも 15 、 25 、または 50 個のアミノ酸を必要とするであろう。

10

【0071】

本発明のポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体は、治療的、ならびに免疫化学アッセイ、例えばウエスタンプロット、ELISA、放射免疫アッセイ、免疫皮膚化学アッセイ、免疫沈降法、またはその他の当該技術分野で公知の免疫化学アッセイに使用されてもよい。種々の免疫アッセイが所望の特異性を有する抗体を同定するために使用されてもよい。競合結合または免疫放射アッセイに対する多数のプロトコールが当該技術分野で周知である。かかる免疫アッセイは、典型的には、免疫原と免疫原に特異的に結合する抗体との間の複合体形成の測定を含む。

20

【0072】

典型的には、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、免疫化学アッセイに使用された場合に他のタンパク質で与えられる検出シグナルより少なくとも 5 、 10 、または 20 倍高い検出シグナルを与える。好ましくは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、免疫化学アッセイにおいて他のタンパク質を検出せず、そして溶液から本発明のポリペプチドを免疫沈降できる。

20

【0073】

本発明のポリペプチド、またはそれらのフラグメントは、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ラビット、モルモット、サル、またはヒトを免疫化してポリクローナル抗体を產生するために使用されてもよい。所望の場合には、本発明のポリペプチドまたはそれらのフラグメントは、キャリヤタンパク質、例えばウシ血清アルブミン、チログロブリン、およびキーホールリンペット (l i m p e t) ヘモシアニンに結合してもよい。宿主種に依存して、免疫学的反応を増加するために種々のアジュバントが使用できる。かかるアジュバントには、限定ではないが、フロイントアジュバント、無機質ゲル（例えば水酸化アルミニウム）、および界面活性物質（例えばリソレクチン、ブルロニク・ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルション、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノール）が含まれる。ヒト内に使用されるアジュバントの中では、BCG (カルメット - ゲラン菌) およびコリネバクテリウム・バルヴム (Corynebacterium parvum) が特に有用である。

30

【0074】

本発明のポリペプチドまたはそれらのフラグメントに特異的に結合するモノクローナル抗体は、培地内の連続細胞株による抗体分子の產生をもたらすいずれの技術を用いてでも調製できる。それらの技術には、限定ではないが、ハイブリドーマ技術、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術、および EBV ハイブリドーマ技術が含まれる (Kohler, et al., Nature 256 : 457 - 97, 1985; Kotzbor, et al., J. Immunol. Methods 81 : 3124, 1985; Cote, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 2026 - 30, 1983; Cole et al., Mol. Cell. Biol. 62 : 109 - 20, 1984)。

40

【0075】

さらに、「キメラ抗体」を產生するための開発された技術、すなわち、適當な抗原特異性および生物学的活性を有する分子を得るためのヒト抗体遺伝子へのマウス抗体遺伝子のスプライシングを使用してもよい (Morrison, et al., Proc. Nat

50

1. Acad. Sci. 81: 6851 - 55, 1984; Neuberger et al., Nature 312: 604 - 08, 1984; Takeda, et al., Nature 314: 452 - 54, 1985)。モノクローナルおよびその他の抗体も、それが治療に使用された場合に抗体に対する免疫反応の付与を患者から防止するために「ヒト化」できる。かかる抗体は、治療に直接使用するためにはヒト抗体と配列が十分に類似していてもよくまたはいくつかの主要残基の改変を必要としてもよい。げっ歯類抗体とヒト配列との間の配列の相違は、個別残基の部位指定突然変異誘発によりまたはすべての相補性決定領域のグレーティング (gratting) によりヒト配列中の残基とは異なるものを置換して最小化してもよい。あるいは、ヒト化抗体は組換え技術を用いて產生してもよい(例えば英國特許第2188638B号明細書参照)。本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、部分的または完全にヒト化された抗原結合部位を含んでもよく、これは米国特許第5,565,332号明細書中に開示されている。

【0076】

あるいは、一本鎖抗体の產生のために記載された技術を、本発明のポリペプチドに特異的に結合する一本鎖抗体を產生するように当該技術分野で公知の方法を用いて適合させてもよい。関連する特異性を有するが然し異なるイディオタイプを有する抗体は、無作為の組合せ免疫グロブリンライブラリーから連鎖シャッリフリングにより生成できる(Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 11120 - 23, 1991)。

【0077】

一本鎖抗体は、DNA增幅法、例えば鑄型としてハイブリドーマcDNAを用いるPCRを用いて構築してもよい(Thirion, et al., Eur. J. Cancer Prev. 5: 507 - 11, 1996)。一本鎖抗体は、單一または二重特異性であることができ、そして二価または四価ができる。四価、二重特異性、一本鎖抗体の構築は、コロマおよびモリソン(Coloma & Morrison, Nat. Biotechnol. 15: 159 - 63, 1997)中に記載されている。二価、二重特異性一本鎖抗体の構築は、マレンダーおよびフォス(Mallender & Voss, J. Biol. Chem. 269: 199 - 206, 1994)中に記載されている。

【0078】

一本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列は、手操作または自動ヌクレオチド合成を用い、標準組換えDNA法を用いて発現構築体内にクローニングし、そしてコード配列を発現するために細胞内に導入して構築してもよく、それは以下に記載される。あるいは、一本鎖抗体は、例えば、纖維状ファージ技術を用いて直接產生できる(Verhaar, et al., Int. J. Cancer 61: 497 - 501, 1995; Nicoll, et al., J. Immunol. Meth. 165: 81 - 91, 1993)。

【0079】

本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、リンパ球集団中の生体内產生の誘導により、または文献(Orlandi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 38333 - 37, 1989; Winter, et al., Nature 349: 293 - 99, 1991)中に開示のように高度に特異性の結合試薬の免疫グロブリンライブラリーまたはパネルをスクリーニングして產生してもよい。

【0080】

他の形式の抗体を本発明の方法中で構築および治療的に使用してもよい。例えば、キメラ抗体は、國際特許出願WO93/03151号明細書中に開示のようにして構築してもよい。免疫グロブリンから誘導されそして多価および多重特異性である結合タンパク質、例えば「二重特異性抗体(diabody)」も調製できる(例えば國際特許出願公開WO94/13804号明細書参照)。

【0081】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドに結合するの能力を有するヒト抗体をMorphoSys HuCAL^(R)ライブラリーから以下のようにして同定してもよい。本発明のポリペプチドを微量分析用プレート上に被覆し、そしてMorphoSys HuCAL^(R)Fabファージライブラリーと共に培養してもよい。本発明のポリペプチドに結合していないそれらのファージ連結Fabをプレートから洗浄除去し、本発明のポリペプチドに緊密に結合したファージのみを残すことができる。結合したファージは、例えばpH変化によりもしくは大腸菌を用いる溶離により溶離できそして大腸菌宿主の感染により増幅する。この選別法は、本発明のポリペプチドに緊密に結合している抗体の集団を濃縮するために一回または二回反復できる。次いで濃縮プールからのFabを発現、精製、そしてELISAアッセイでスクリーニングする。

10

【0082】

本発明の抗体は、当該技術分野で周知の方法により精製されてもよい。例えば、抗体は本発明のポリペプチドが結合されるカラム上を通してアフィニティー精製されてもよい。次いで、結合抗体を高塩濃度の緩衝液を用いてカラムから溶離できる。

【0083】

本明細書中に使用される場合の各種の用語を以下に定義する。

【0084】

本発明の要素またはその好ましい態様を紹介する場合に、冠詞「a」、「an」、「the」および「said(該)」は、1個もしくはそれ以上の要素が存在することを意味すると意図する。「含んでなる」、「含む」および「有する」の用語は、列挙した要素のほかにも追加の要素があり得ることを含みそして意味することを意図する。

20

【0085】

本明細書中に使用される場合の「対象者」の用語は、哺乳動物(例えばヒトおよび動物)を含む。

【0086】

「処置」の用語は、いずれかのプロセス、作用、適用、治療などを含み、ここで、人類を含む対象者は、直接もしくは間接的に対象者の条件を改善、または対象者内の状態もしくは障害の進行を遅延させる目的の医療援助を受ける。

30

【0087】

「組合せ治療」または「共治療」の用語は、状態および/または障害を処置するための2種もしくはそれ以上の治療薬剤の投与を意味する。かかる投与は、本質的に同時の様式、例えば有効成分の固定比率を含む單一カプセルまたはそれぞれの阻害剤について複数の分離したカプセル内での2種もしくはそれ以上の治療薬剤の投与を包含する。さらに、かかる投与は、連続する様式でのそれぞれのタイプの治療薬剤の使用を包含する。

【0088】

「治療的に有効」の語句は、糖尿病状態または障害重度における改善の目標を達成し、一方、与えられる治療処置に関連する不利な副作用を回避または最小化するそれぞれの投与薬剤の量を意味する。

【0089】

「製薬学的に許容できる」の用語は、該当物が製薬学的製品中の使用に適当であることを意味する。

40

【0090】

本発明のポリペプチドは、イン・ビトロで膵島細胞からのインスリン分泌を促進する能力の結果として、および生体内血糖の低下を起こすことにより、II型糖尿病(非インスリン依存型糖尿病)を含む糖尿病の処置に使用されてもよい。かかる処置は、糖尿病および糖尿病合併症の発生も遅延させるであろう。該ポリペプチドは、II型糖尿病の進展への進行から耐糖能障害を有する患者を防止するために使用してもよい。本発明の方法により本発明のペプチドを用いて処置もしくは防止されるであろうその他の疾患および状態は、若年発症成人型糖尿病(MODY)(Hermann, et al., Diabetes 43:40, 1992); 潜伏性自己免疫性成人型糖尿病(LADA)(Zimmer

50

et al., Diabetes Med. 11: 299, 1994); 耐糖能障害(IGT)(Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22(Suppl. 1): S5, 1999); 空腹時血糖異常(IFG)(Charles, et al., Diabetes 40: 796, 1991); 妊娠糖尿病(Metzger, Diabetes, 40: 197, 1991); および代謝症候群Xを含む。

【 0 0 9 1 】

本発明のポリペプチドは、肥満のような異常、およびアテローム性動脈硬化疾患、高脂血症、高コレステロール血症、低HDLレベル、高血圧、心血管疾患（アテローム性動脈硬化、冠性心疾患、冠動脈疾患、および高血圧を含む）、脳血管疾患および末梢血管疾患の処置；および狼瘡、多囊胞性卵巣症候群、発癌、および過形成、喘息、男性生殖異常、潰瘍、睡眠障害、脂質および炭水化物代謝異常、概日不全、成長障害、エネルギーホメオスタシス異常、自己免疫疾患を含む免疫疾患（例えば全身エリトマトーデス）、ならびに急性および慢性炎症性疾患、および敗血症ショックの治療にも有効である。

(0 0 9 2)

本発明のポリペプチドは、例えば脂質蓄積細胞を產生する細胞分化、インスリン感度および血糖レベルの調節に関する生理学的疾患を処置するために有用であり、それらには、例えば、インスリンへの自己抗体、インスリン受容体への自己抗体、膵臓細胞を刺激する自己抗体による異常膵臓細胞機能、インスリン分泌腫瘍および/または自己免疫低血糖症、アテローム性斑の形成に導くマクロファージ分化、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、膵臓細胞含質量減少、インスリン分泌、インスリンへの組織感度、脂肪肉腫細胞増殖、多囊胞性卵巣疾患、慢性無排卵、高アンドロゲン症、プロゲステロン产生、ステロイド产生、細胞内のレドックス電位および酸化性ストレス、酸化窒素合成（NOS）产生、増加したガンマグルタミルトランスペプチダーゼ、カタラーゼ、血漿トリグリセリド、HDL、およびLDLコレステロールレベルなどに含まれる。

[0 0 9 3]

本発明のポリペプチドは、糖尿病の二次原因を処置するために本発明の方法に使用されてもよい(Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22(Supp. 1): S5, 1999)。かかる二次原因は、糖質コルチコイド過剰、成長ホルモン過剰、クロム親和細胞腫、および医薬誘導糖尿病を含む。糖尿病を誘発する医薬は、限定ではないが、ピリミニル(pyriminil)、ニコチン酸、糖質コルチコイド、フェニトイン、サイロイドホルモン、-アドレナリン作動性薬剤、-インターフェロンおよびHIV感染を処置する医薬を含む。

(0 0 9 4)

さらに、本発明のポリペプチドは、喘息の治療 (Bolin, et al., Biopolymer 37: 57-66, 1995; 米国特許第5,677,419号明細書、ポリペプチドR3P0がモルモット気管平滑筋の緩和に有効なことを示す)、低血圧誘導 (VIPは喘息患者の低血圧、頻脈、および顔面紅潮を誘発する (Morice, et al., Peptides 7: 279-280, 1986; Morice, et al., Lancet 2: 1225-1227, 1983))；男性生殖異常 (Slow, et al., Arch. Androl. 43(1): 67-71, 1999)；抗アポトーシス / ニューロン保護剤として (Brenneman, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865: 207-12, 1983)；虚血事象の間の心臓保護 (Kaffin, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1268(2): 952-8, 1994; Das, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865: 297-308, 1998)；概日時計の操作および関連疾患 (Hamar, et al., Cell 109: 497-508, 2002; Shen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 11575-80, 2000)。お

より最後に抗潰瘍剤 (Tuncel, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 865: 309 - 22, 1998) に使用されてもよい。

【0095】

本発明のポリペプチドは、単独または糖尿病または関連障害の処置に当該技術分野の専門家に公知の別の治療および／または化合物と一緒に使用されてもよい。あるいは、本明細書中に記載の方法およびポリペプチドは、組合わせ治療に部分的にまたは完全に使用されてもよい。

【0096】

本発明のポリペプチドは、糖尿病の処置のための他の公知の治療と組合わせて投与されてもよく、それには、PPARアゴニスト、スルホニル尿素薬剤、非スルホニル尿素分泌促進物質、-グルコシダーゼ阻害剤、インスリン感作物質、インスリン分泌促進物質、肝グルコース分泌低下性化合物、インスリンおよび抗肥満薬剤を含む。かかる治療は、本発明のポリペプチドの投与の前、それと同時にまたはその後に投与されてもよい。インスリンは、長期および短期作用性形態およびインスリンの配合物の双方を含む。PPARアゴニストは、いずれのPPARサブユニットのアゴニストおよびそれらの組合わせも含む。例えば、PPARアゴニストは、PPAR-₁、PPAR-₂、PPAR₃またはPPARのサブユニットの2種もしくは3種のいずれかの組合わせのアゴニストを含んでもよい。PPARアゴニストは、例えばロシグリタゾン (rosiglitazone)、トログリタゾン (troglitazone)、およびピオグリタゾン (pioglitazone) を含む。スルホニル尿素薬剤は、例えばグリブリド (glyburide)、グリメピリド (glimepiride)、クロロプロパミド (chloropropamide)、トルブタミド (tolbutamide) およびグリピジド (glipizide) を含む。本発明のポリペプチドと一緒に投与された場合に糖尿病処置に有用である-グルコシダーゼ阻害剤は、プレコース (Precose^(R))、ミグリトール (Miglitol^(R))、およびボグリボース (VogliboseTM) を含む。糖尿病処置に有用であるインスリン感作物質は、PPAR-₁アゴニスト、例えばグリタゾン (例えばトログリタゾン、ピオグリタゾン、エングリタゾン (englitazone))、MCC-555、ロシグリタゾン、などを含む；ビグアニド、例えばメトホルミン およびフェノホルミン；タンパク質チロシンホスファターゼ-1B (PTP-1B) 阻害剤；ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) 阻害剤；およびチアゾリジンジオン および非チアゾリジンジオンを含む。本発明のポリペプチドと一緒に投与されて糖尿病の処置に有用である肝グルコース分泌低下性化合物は、メトホルミン、例えばグルコファージ (Glucophage^(R)) およびグルコファージXR (Glucophage XR^(R)) を含む。本発明のポリペプチドと一緒に投与された場合に糖尿病の処置に有用であるインスリン分泌促進物質は、スルホニル尿素および非スルホニル尿素医薬 : GLP-1、GIP、セクレチン (secretin)、ナテグリニド (nateglinide)、メグリチニド (meglitinide)、レパグリニド (repaglinide)、グリベンクラミド (glipenclamide)、グリメピリド (glimepiride)、クロロプロパミド (chloropropamide)、グリピジド (glipizide) を含む。GLP-1は、本来のGLP-1より長い半減期を有するGLP-1の誘導体、例えば脂肪酸誘導体化GLP-1およびエクセンジンを含む。本発明の一つの態様では、本発明のポリペプチドは、インスリン分泌促進物質への膵臓細胞の感受性を増加するためにインスリン分泌促進物質と組合わせて使用される。

【0097】

本発明のポリペプチドは、抗肥満薬と組合わせて本発明の方法に使用されてもよい。抗肥満薬は、-3アゴニスト；CB-1アンタゴニスト；ニュロペプチドY阻害剤；食欲抑制剤、例えばシブトラミン (sibutramine) (Meridia^(R)、Abbott Laboratories)；およびリバーゼ阻害剤、例えばオルリスト (orlistat) (Xenical^(R)、Roche Pharmaceuticals) を含む。

10

20

30

40

50

【0098】

本発明のポリペプチドは、糖尿病患者中の脂質異常を処置するために一般的に使用され
り医薬と組合させて本発明の方法に使用されてもよい。かかる医薬は、限定ではないが、
HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、ニコチン酸、脂質低下薬（例えばスタノールエステル、
ステロールグリコシド、例えばチケシド（tiroside）、およびアゼチジノン（azetidinone）、
例えばエゼチミブ（ezetimibe）、ACAT阻害剤（例えばアバシミブ（avasimibe））、胆汁酸金属イオン封鎖剤、胆汁酸
再取込阻害剤、ミクロソームトリグリセリド阻害剤輸送、およびフィブリック酸（fibric acid）誘導体を含む。HMG-CoAレダクターゼ阻害剤は、例えばロバスタチン（lovastatin）、シムバスタチン（simvastatin）、プラバ
10
スタチン（pravastatin）、フルバスタチン（fluvastatin）、アトルバスタチン（atorvastatin）、リバスタチン（rivastatin）、
イタバスタチン（itavastatin）、セリバスタチン（cerivastatin）、およびZD-4522を含む。フィブリック酸誘導体は、例えばクロフィブラー
ト（clofibrate）、フェノフィブラート（fenofibrate）、ベンザ
フィブラート（benzafibrate）、シプロフィブラート（ciprofibrate）、ベクロフィブラート（beclofibrate）、エトフィブラート（etofibrate）、
およびゲムフィブロジル（gemfibrozil）を含む。金属
20
イオン封鎖剤は、例えば、コレスチラミン（cholestyramine）、コレスチ
ポール（colestipol）、および架橋したデキストランのジアルキルアミノアル
キル誘導体を含む。

【0099】

本発明のポリペプチドは、抗高血圧薬、例えばブロックerおよびACE阻害剤と組合
させて使用してもよい。本発明のポリペプチドと組合させて使用される追加の抗高血圧薬
の例は、カルシウムチャンネル遮断薬（L型およびT型、例えばジルチアゼム（diltizem）、ベラパミル（verapamil）、ニフェジピン（nifedipine）、アムロジピン（amlodipine）およびミベフラジル（mybefradil））、利尿剤（例えばクロロチアジド（chlorothiazide）、ヒドロクロロ
30
チアジド（hydrochlorothiazide）、フルメチアジド（flumethiazide）、ヒドロフルメチアジド（hydroflumethiazide）、ベンドロフルメチアジド（bendroflumethiazide）、メチルクロロチ
アジド（methylchlorothiazide）、トリクロロメチアジド（trichloromethiazide）、ポリチアジド（polythiazide）、ベ
ンズチアジド（benzthiazide）、エタクリン酸トリクリナafen（etacrynic acid tricrynahen）、クロルサリドン（chlorthalidone）、フロセミド（furosemide）、ムソリミン（musolimine）、ブメタニド（bumetanide）、トリアムトレネン（triamtrenene）、アミロリド（amiloride）、スピロノラクトン（spironolactone））、レニン阻害剤、ACE阻害剤（例えばカプトプリル（captopril）、ゾフェノプリル（zofenopril）、ホシノプリル（fosinopril）、エナラプリル（enalapril）、セラノプリル（ceranopril）、シラ
ゾプリル（cilazopril）、デラプリル（delapril）、ペントプリル（pentopril）、キナプリル（quinapril）、ラミプリル（ramipril）、リシノプリル（lisinopril））、AT-1受容体拮抗剤（例えばロサルタン（losartan）、イルベサルタン（irbesartan）、バルサルタ
ン（valsartan））、ET受容体拮抗剤（例えばシタキセンタン（sitaxentan）、アトルセンタン（atrsentan）、中性エンドペプチダーゼ（NEP
40
）阻害剤、血管ペプシダーゼ阻害剤（二重NEP-ACE阻害剤）（例えば、オマパトリ
ラート（omapatrilat）およびゲモパトリラート（gemopatrilat）およびニトラートを含む。

10

20

30

40

50

【0100】

かかる共治療は、2種またはそれ以上の薬剤のいずれの組合わせで投与してもよい（例えばインスリン感作物質と抗肥満薬と組合わせた本発明のポリペプチド）。かかる共治療は、以上に記載したような製薬学的組成物の形態で投与してもよい。

【0101】

哺乳動物内で上記に同定された条件の処置の効力を決定するために使用される周知のアッセイに基づいて、そしてそれらの結果とそれらの状態を処置するために使用される公知の薬剤の結果との比較により、本発明のポリペプチドの有効用量がそれぞれの所望の徴候の処置のために容易に決定できる。それらの状態の一つの処置に投与されるべき有効成分（例えばポリペプチド）の量は、使用される特定のポリペプチドおよび投与単位、投与の方法、処置の期間、処置される患者の年齢および性別、および処置される状態の性質および程度のような考慮事項に従って広範に変化できる。10

【0102】

投与される有効成分の全量は、一般に一日、体重あたりに、約0.00001mg/kg～約1mg/kg、そして好ましくは約0.0001mg/kg～約0.1mg/kg（体重）の範囲であってもよい。単位用量は、有効成分約0.01mg～約20mgを含み、そして一週間あたりに一回ないし数回投与されてもよい。静脈内、筋肉内、皮下を含む注入、および非経口注入、および輸液技術の使用による投与のための週間用量は、約0.0001mg/kg～約0.1mg/kgであってもよい。毎日の直腸投与方法では、0.001～1mg/kg（全体重）である。経皮濃度は、日容量0.001～1mg/kgを維持するために必要なものであってもよい。20

【0103】

当然ではあるが、各患者への特定の初回および継続投与方法は、担当診断医師により決定される状態の性質および重症度、使用する特定のポリペプチドの活性、患者の年齢、患者の食事、投与時間、投与経路、医薬の排出速度、医薬の組合せ、などに従って変動する。処置の所望の方法、本発明のポリペプチドの投与の数は、慣用の処置試験を用いて当該技術分野の熟練者により確認されてもよい。

【0104】

本発明のポリペプチドは、適切に配合された製薬学的組成物中でそれを必要とする患者に投与して所望の製薬学的效果を達成するために使用されてもよい。本発明の目的のためには、患者は、特定の状態または疾患の処置を必要とするヒトを含む哺乳動物である。従って、本発明は、製薬学的に許容できるキャリヤおよびポリペプチドの治療有効量を含んでなる製薬学的組成物を含む。製薬学的に許容できるキャリヤは、キャリヤへに帰属されているいずれの副作用も有効成分の有益な効果を損なわないように、有効成分のどの有効な活性とも矛盾しない濃度で比較的無毒性でありそして患者に無害であるいずれかのキャリヤである。ポリペプチドの治療有効量は、処置される特定の条件に対して結果が得られるかまたは影響を及ぼす量である。本明細書中に記載のポリペプチドは、例えば、即時または徐放製剤、経口、非経口、局所などを含むいずれかの有効な慣用の投与単位剤型を用いる製薬学的に許容できるキャリヤと共に投与されてもよい。30

【0105】

本発明のポリペプチドは、非経口、すなわち静脈内、筋肉内、腹腔内、または好ましくは皮下で、滅菌された液体または液体混合物、例えば水、食塩水、デキストロース水溶液および関連糖類水溶液；アルコール、例えばエタノール、イソプロパノール、もしくはヘキサデシルアルコール；グリコール、例えばプロピレングリコールもしくはポリエチレングリコール；グリセロールケタール、例えば2,2-ジメチル-1,1-ジオキソラン-4-メタノール、エーテル、例えばポリ(エチレングリコール)400；油；脂肪酸；脂肪酸エステルもしくはグリセリド；またはアセチル化脂肪酸グリセリドであって、製薬学的に許容できる界面活性剤、例えば石鹼または界面活性剤、懸濁剤、例えばペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、もしくはカルボキシメチルセルロース、または乳化剤およびその他の製薬学的アジュバントと共にあっても4050

なくてももよい製薬学的キャリヤと共に生理学的に許容できる希釈剤中のポリペプチドの注入可能な調剤として投与されてもよい。

【0106】

本発明の非経口配合物内に使用できる油の例は、石油、動物、植物、または合成由来の油であり、例えば、ラッカセイ油、ダイズ油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ油、ペトロラタム、および鉱油である。適合する脂肪酸は、オレイン酸、ステアリン酸、およびイソステアリン酸を含む。適合する脂肪酸エステルは、例えば、オレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピルである。適合する石鹼は、脂肪族アルカリ金属、アンモニウム、およびトリエタノールアミン塩を含みそして適合する界面活性剤は、陽イオン界面活性剤、例えばハロゲン化ジメチルジアルキルアンモニウム、ハロゲン化アルキルピリジニウム、および酢酸アルキルアミン、陰イオン界面活性剤、例えばスルホン酸アルキル、アリール、およびオレフィン、硫酸アルキル、オレフィン、エーテル、およびモノグリセリド、およびスルホスクシナート、非イオン界面活性剤、例えば脂肪族アミノオキシド、脂肪酸アルカノールアミド、およびポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー、および両性界面活性剤、例えばアルキル-ベータ-アミノプロピオナート、および2-アルキルイミダゾリン第四級アンモニウム塩、ならびに混合物を含む。

10

【0107】

本発明の非経口組成物は、典型的には、溶液内に有効成分の約0.5重量%～約2.5重量%を含んでもよい。保存剤および緩衝剤が有利に使用されてもよい。注入の部位での刺激を最小化または回避するために、かかる組成物は、約1.2～約1.7の親水親油バランス(HBL)を有する非イオン界面活性剤を含んでもよい。かかる配合物中の界面活性剤の量は、5重量%～約1.5重量%の範囲である。界面活性剤は、上記のHLBを有する単一成分であってもまたは所望のHLBを有する2種またはそれ以上の成分の混合物であることもできる。

20

【0108】

非経口配合物中に使用される界面活性剤の例は、ポリエチレンソルビタン-脂肪酸エステルの類、例えば、ソルビタンモノオレアートと、プロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合により形成される疎水性塩基とのエチレンオキシドの高分子量付加物である。

30

【0109】

製薬学的組成物は、滅菌された注入可能な水性懸濁液の形態であってもよい。かかる懸濁液は、適合する分散剤、または湿潤剤および懸濁剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、およびアラビアガ；天然に存在するホスファチドであってもよい分散剤または湿潤剤、例えばレクチン、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えばステアリン酸ポリエチレン、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール、脂肪酸とヘキシトールとから誘導された部分エステルとのエチレンオキシドの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレアート、または脂肪酸と無水ヘキシトールとから誘導された部分エステルとのエチレンオキシドの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレアートを用いる公知方法に従って配合されてもよい。

40

【0110】

滅菌された注入可能な調剤は、無毒性非経口的に受容できる希釀剤または溶剤中の滅菌注入用溶液または懸濁液であってもよい。使用してもよい希釀剤および溶剤は、例えば水、リングル液、および等張性塩化ナトリウム溶液であってもよい。さらに、滅菌固定油が溶剤または懸濁媒体として慣用的に利用される。この目的で、合成モノまたはジグリセリドを含むいかなる無刺激性固定油でも使用できる。さらに、オレイン酸のような脂肪酸も注入用製剤中に使用してもよい。

【0111】

本発明の組成物は、薬剤の直腸投与のための座薬の剤型で投与されてもよい。それらの

50

組成物は、薬剤（例えばポリペプチド）を、常温では固体であるがしかし直腸の温度では液体であり從って直腸内で溶融して薬剤を放出するめに適合する無刺激性賦形剤と一緒に混合して調製してもよい。かかる材料は、例えばカカオバターおよびポリエチレングリコールである。

【0112】

本発明の方法に使用される別の配合物は、経皮送達用具（「貼付剤」）を用いる。かかる経皮貼付剤は、本発明のポリペプチドの制御された量での連続または不連続輸液を提供するために使用されてもよい。薬剤の送達のための経皮貼付剤の構造および使用法は、当該技術分野で周知である（例えば米国特許第5,023,252号明細書（引用することにより本明細書に編入される）参照）。かかる貼付剤は、薬剤の連続、パルス状、またはオンデマンド送達に合わせて構成されてもよい。10

【0113】

機械的送達装置を介する患者への製薬学的組成物の導入が望ましいかまたは必要なこともある。薬剤の送達のための機械的送達装置の構造および使用法は、当該技術分野では周知である。例えば、脳への直接薬剤投与のための直接技術は、通常、血液脳関門を避けるために患者の消化器系内に薬剤送達カテーテルの配置を含む。身体の特定の解剖的領域への薬剤輸送のために使用される一つのかかる埋め込み送達システムは、米国特許第5,011,472号明細書（引用することにより本明細書に編入される）中に記載されている。20

【0114】

本発明の組成物は、一般にキャリヤまたは希釈剤と呼ばれるその他の慣用の製薬学的に許容できる配合成分を、必要または所望に応じて含んでもよい。本発明のいずれの組成物も、アスコルビン酸のような抗酸化剤の添加により、または適当な保存剤により保存されてもよい。かかる組成物を適切な投与剤型に調剤するための慣用の手順が利用できる。

【0115】

意図する投与経路のために組成物を配合するために適切として使用してもよい一般的に使用される製薬学的成分は、酸性化剤、例えば、これらに限定はされないが、酢酸、クエン酸、フマル酸、塩酸、硝酸；およびアルカリ化剤、例えばこれらに限定はされないが、アンモニア溶液、炭酸アンモニウム、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン、水酸化カリウム、ホウ酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、トリエタノールアミン、トロラミン（trolamine）を含む。30

【0116】

その他の製薬学的成分は、例えば、これらに限定はされないが、吸着剤（例えば粉末セルロースおよび活性炭）；エアロゾル噴射剤（例えば二酸化炭素、 CCl_2F_2 、 $\text{F}_2\text{CCl}-\text{CClF}_2$ および CClF_3 ）；空気置換剤（例えば窒素およびアルゴン）；抗菌保存剤（例えば安息香酸、ブチルパラベン、エチルパラベン、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム）；抗微生物保存剤（例えば塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、塩化セチルピリジニウム、クロロブタノール、フェノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀およびチメロサール）；抗酸化剤（例えばアスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、次亜リン酸、モノチオグリセロール、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム）；結合物質（例えばブロックポリマー、天然および合成ゴム、ポリアクリレート、ポリウレタン、シリコンおよびスチレン-ブタジエンコポリマー）；緩衝剤（例えば、メタリン酸カリウム、第一リン酸カリウム、酢酸ナトリウム、無水クエン酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム二水和物）、担持剤（例えばアカシアシロップ、アロマ系シロップ、アロマ系芳香エリキシル、チェリーシロップ、ココアシロップ、オレンジシロップ、シロップ、コーン油、鉱油、ラッカセイ油、ゴマ油、注入用静菌性塩化ナトリウムおよび注入用静菌性水）；キレート化剤（例えばエデト酸二ナトリウムおよびエデト酸）；着色料（例えば、FD & C赤色3号、FD & C赤色20号、F40

D & C 黄色 6 号、F D & C 青色 2 号、F D & C 绿色 5 号、F D & C オレンジ 5 号、F D & C 赤色 8 号、カラメルおよび酸化第二鉄赤)、清澄剤(例えばペントナイト)、乳化剤(限定ではないが、アカシア、セトマクロゴル、セチルアルコール、グリセリルモノステアラート、レクチン、ソルビタンモノオレアート、ステアリン酸ポリエチレン 50)；カプセル化剤(ゼラチンおよびフタル酸酢酸セルロース)；調味料(例えば、アニス油、シナモン油、ココア、メントール、オレンジ油、ペパーミント油およびバニリン)；湿潤剤(例えばグリセリン、プロピレングリコールおよびソルビトール)；研和剤(例えば鉛油およびグリセリン)；油(例えばラッカセイ油、鉛油、オリーブ油、ピーナツ油、ゴマ油および植物油)、軟膏基剤(例えばラノリン、親水性軟膏、ポリエチレングリコール軟膏、ペトロラタム、親水性ペトロラタム、白色軟膏、黄色軟膏、およびローズ水軟膏)；浸透促進剤(経皮送達)(例えば、モノヒドロキシもしくはポリヒドロキシアルコール、飽和もしくは不飽和脂肪アルコール、飽和もしくは不飽和脂肪エステル、飽和もしくは不飽和ジカルボン酸、精油、ホスファチジル誘導体、ケファリン、テルペン、アミド、エーテル、ケトンおよび尿素)；可塑剤(例えばフタル酸ジエチルおよびグリセリン)；溶剤(例えばアルコール、コーン油、綿実油、グリセリン、イソプロピルアルコール、鉛油、オレイン酸、ピーナツ油、純水、注入用水、注入用滅菌水および灌流用滅菌水)；剛化剤(例えばセチルアルコール、セチルエステルワックス、ミクロクリスタリンワックス、パラフィン、ステアリルアルコール、白色ワックスおよび黄色ワックス)；座薬基剤(例えばココアバターおよびポリエチレングリコール(混合物))；界面活性剤(例えば塩化ベンザルコニウム、ノノキシノール(nonoxyanol)10、オキシトキシノール(oxytol)9、ポリソルベート 80、ラウリル硫酸ナトリウムおよびソルビタンモノパルミタート)；懸濁剤(例えばカンテン、ペントナイト、カルボマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カオリン、メチルセルロース、トラガカントおよびビー(vhee)ガム)；甘味料、例えばアスパラテーム、デキストロース、グリセリン、マンニトール、プロピレングリコール、サッカリンナトリウム、ソルビトールおよびスクロース)；錠剤粘着防止剤(例えばステアリン酸マグネシウムおよびタルク)；錠剤結合剤(例えばアカシア、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースナトリウム、圧縮性糖、エチルセルロース、ゼラチン、液体グルコース、メチルセルロース、ポビドンおよびゼラチン化デンプン)；錠剤およびカプセル希釈剤(例えば第二リン酸カルシウム、カオリン、ラクトース、マンニトール、ミクロクリスタリンセルロース、粉末セルロース、沈降炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、ソルビトールおよびデンプン)；錠剤被覆剤(例えば液体グルコース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、フタル酸酢酸セルロースおよびシェラック)；錠剤直接圧縮賦形剤(例えば、第二リン酸カルシウム)、錠剤崩壊剤(例えばアルギン酸、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ミクロクリスタリンセルロース、ポラクリリンカリウム、アルギン酸ナトリウム、デンブングリコール酸ナトリウムおよびデンプン)；錠剤滑沢剤(例えばコロイド状シリカ、コーンデンプン、タルク)；錠剤滑り剤(例えばステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、鉛油、ステアリン酸およびステアリン酸亜鉛)；錠剤/カプセル不透明化剤(例えば二酸化チタン)；錠剤艶出剤(例えばカーナバワックスおよび白色ワックス)；粘度増加剤(例えばハチミツロウ、セチルアルコールおよびパラフィン)；張性剤(例えばデキストロースおよび塩化ナトリウム)；粘度上昇剤(例えばアルギン酸、ペントナイト、カルボマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ポビドン、アルギン酸ナトリウムおよびトラガカント)；および湿潤化剤(例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール、レシチン、ポリエチレンソルビトールモノオレアート、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレアート、およびステアリン酸ポリエチレン)を含む。

【0117】

本明細書中に記載のポリペプチドは、単独の医薬剤として、または組合せが受け入れ

10

20

30

40

50

られない不利な作用を起こさない場合に1種もしくはそれ以上の他の医薬剤と組合わせて投与されてもよい。例えば、本発明のポリペプチドは、公知の抗肥満薬、または周知の抗糖尿病薬またはその他の指示薬剤などとならびにそれらの混和物および組合わせとして組合わすことができる。

【0118】

本明細書中に記載のポリペプチドは、遊離塩基形態または組成物として、研究および診断、または分析参照標準としてなどに使用されてもよい。従って、本発明は、不活性キャリヤおよび本明細書中に記載の方法で同定されたポリペプチド、またはその塩もしくはエステルの有効量を含んでなる組成物を含む。不活性キャリヤは、担持されるポリペプチドと相互作用せず、そして担持されるポリペプチドに対して支持、運搬手段、增量、追跡可能な物質、などを提供するいずれかの物質である。ポリペプチドの有効量は、実行される特定の手順に関して結果を生むかまたはそれに影響を及ぼす量である。

【0119】

ポリペプチドは、水性および非水性環境で、加水分解、脱アミド化、酸化、ラセミ化および異性体化を受けることが知られている。分解、例えば、加水分解、脱アミド化または酸化は、毛管電気泳動、質量分光分析、またはエドマン分解法により容易に検出できる。酵素分解にもかかわらず、長い血漿半減期または生物学的存在時間を有するポリペプチドは、少なくとも水溶液中で安定であろう。ポリペプチドは、体温で一日間に10%未満の分解を示すことが重要である。ポリペプチドが体温で一日間に5%未満の分解を示すとさらに好ましい。慢性糖尿病患者における生涯処置のために、さらに好ましくは、治療薬剤は、それらの投与が容易であり、さらには非経口経路の場合に頻度が低いものである。体温で数週間の間の安定性（すなわち、数%未満の分解率）は、より頻度の低い投与を可能とさせる。DPP4に関しまたは血漿中で数日から数週間の期間でのタンパク質分解による劣化に対する安定性（すなわち、数%未満の分解率）は、さらに頻度の低い投与を可能とさせる。冷凍温度での数力年の安定性は、液体配合物での提供を製造者に可能とし、従って再構成の不便が避けられる。さらに、有機溶剤中の安定性は、ポリペプチドが埋め込みのような新規の投与剤型で配合されることも提供とする。

【0120】

皮下、静脈、筋肉内などに適する配合物、適合する製薬学的キャリヤ、および配合および投与の技術は、当該技術分野で周知のいずれかの方法により準備可能であろう（例えば Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing, Co. Easton, Pa. 第20版, 2000参照）。

【0121】

当該技術分野の通常の熟練者には、変化および変更が、本明細書中に記載の本発明の精神または範囲から外れることなく、本発明に対して実行できるとは明らかである。

【0122】

実施例

本発明をさらに良く理解するために、下記の実施例を記載する。それらの実施例は、説明のためのみであり、いかなる様式でも本発明の範囲を限定すると考えてはならない。本明細書中に記載したすべての出版物は、その全体を引用することにより編入される。

【実施例1】

【0123】

ペプチド合成方法

下記の共通手順を本発明のいくつかのポリペプチドを合成するために採用した。

【0124】

ペプチド合成は、Rapp-Polymer PEG-ポリスチレン樹脂 (Rapp-Polymer, Tübingen, ドイツ) を用い、連続流条件で F M O C / t - ブチル戦略 (Pennington & Dunn, Peptide Synthesis Protocols、第35巻、1994) により実行した。合成が完了した時点で、ペプチドを樹脂から切断しそして TFA / DTT / H₂O / トリイソプロピルシラン (

10

20

30

40

50

85 / 5 / 5 / 2) を用いて脱保護した。冷ジエチルエーテルを用いて切断カクテルからペプチドを沈降させた。沈降物を冷エーテルを用いて3回洗浄し、次いで、5%酢酸中に溶解し次いで冷凍乾燥した。3%TFAを含む水/アセトニトリルを0%~100%アセトニトリルの勾配として使用するWaters ALLIANCE^(R)システム(Waters Corporation, Milford, MA)上のYMC-Pack ODS-AQカラム(YMC Inc. Wilmington, NC)上の逆相クロマトグラフィー、およびVOYAGER DE^(R) MALDI質量分光分析計(モデル5-2386-00、PreSeptive BioSystems, Framingham, MA)上のMALDI質量分光分析により、ペプチドを検査した。ペプチド試料をMatrix緩衝液(50/50dH₂O/アセトニトリル、3%TFA含有)に1/1の比で加えた。純度基準>95%を満たさないペプチドは、Waters Delta Prep 4000 HPLCシステム(Waters Corporation, Milford, MA)上の逆相クロマトグラフィーにより精製した。

10

20

30

40

50

【実施例2】

【0125】

ペプチドアセチル化

ペプチドは当該技術分野で周知の標準方法を用いて合成した。ペプチドは、Rinkアミド樹脂上のHBTU活性化を伴うFMOOC化学を用いてApplied Biosystems 430Aペプチド合成装置を用いて合成し、そして無水酢酸を用いてN末端をアセチル化した。84.6%TFA、4.4%フェノール、4.4%水、4.4%チオアニソール、および2.2%エタンジチオールを用いてペプチドを切断した。冷t-ブチルメチルエーテルを用いて切断カクテルからペプチドを沈降させた。沈降物を冷エーテルを用いて洗浄しそしてアルゴン中で乾燥した。0.1%TFAを含み、線状の水/アセトニトリル勾配を有する逆相C18クロマトグラフィーを用いてペプチドを精製した。ペプチド同定は、MALDIおよびエレクトロスプレイ質量分光分析を用い、そしてアミノ酸分析を用いて確認した。

【実施例3】

【0126】

ペプチドPEG付加

生体内のペプチドの半減期は、ペプチドのポリエチレングリコール(PEG)部分の付加を介して増加され、これにより腎臓によるペプチドのクリアランスを低下しそしてペプチドのプロテアーゼ分解を低下する。V PAC 2受容体アゴニストペプチドの使用は、生体内の非常に短い半減期により厳しく制限されるが、しかし、ペプチドへのPEG部分の付加(PEG付加)は、一日一回から一週間一回の処置になるために十分なほどペプチドの半減期を延長する。

【0127】

PEG付加は、当該技術分野の熟練者に公知のいかなる方法で行ってもよい。しかし、本実施例では、PEG付加はペプチド内にユニークシスティン変異を導入し、次いでペプチドのスルフヒドリルとメトキシ-PEG-マレイミド試薬(Nektar (Inhaler / Shearwater), San Carlos, CA; NOF, 東京、日本)のマレイミド基との間の安定なチオエーテル結合を介してシスティンをPEG付加して行った。該ユニークシスティンは、PEG付加による活性の低下の可能性を低くするためにペプチドのC末端に導入してもよい。

【0128】

一つの例として、二倍モル過剰のmPEG-mal(分子量22kDおよび43kD)試薬をペプチド(例えば配列番号1、ペプチドのC末端にシスティン変異を有する)1mgに加えそしてpH 6の反応緩衝液(0.1M リン酸Na/0.1M NaCl/0.1M EDTA)中に溶解した。室温で30分後に、mPEG-malに対して2倍モル過剰のDTTを用いて反応を停止した。ペプチド-PEG-mal反応混合物を陽イオン交換カラムに通して残留PEG試薬を除き次いでゲルfiltrationカラムにより残留する遊離ペプ

チドを除去した。PEG付加された部位の純度、質量および数は、SDS-PAGEおよびMALDI-TOF質量分光分析により決定した。22kDPEGが本発明のペプチドに付加されると、強力なV PAC2受容体活性化が保持される。さらに、受容体活性化のV PAC2対V PAC1およびPAC1選択性も保持される。より小さいPEF(例えば線状22kDPEG)を用いるPEG付加はペプチドの活性を低下する傾向は低い可能性があるが、一方より大きいPEG(例えば分枝状43kDPEG)は、活性を低下しやすい。しかし、より大きいPEGは、血漿半減期をさらに長くして一週間に一回の注入を可能とするであろう(Harris, et al., Clin. Pharmacokin. 40: 539-551, 2001)。

【実施例4】

10

【0129】

製薬学的組成物 - IV および SC 配合物

滅菌したIV注入可能配合物は、配列番号1のポリペプチド4mg、または4mgポリペプチド含有量に相当する誘導体化ポリペプチド、および1Lの滅菌食塩水を用い、当該技術分野では周知のいずれかの製造技術を用いて調製される。ポリペプチドのより高い濃度をSC配合物に使用してもよい。配列番号1または誘導体化ポリペプチドとして同定されたポリペプチドの場合に、4mgを100mLの食塩水またはDMSO中に溶解しそして無菌濾過の後に滅菌バイアルを組成物と一緒に充填する。

【実施例5】

20

【0130】

ペプチドの質量分光分析

ペプチド40pmol/2μlアリコートを10μlとなるまで水を用いて希釈した。製造者の指示に基づいて、試料の50%(20pmol/5μl)を条件調整したMillipore C18 Zip Tipに適用してHEPES緩衝液を除去した。マトリックス(10mg/mlアルファ-シアノヒドロキシケイ皮酸、50%ACN中、0.1%TFA)を用いてZip Tipから試料をMALDIプレート中に直接溶離した。レフレクター・イオン・モードで操作するApplied Biosystems Voyager DE-PRO MALDIで試料を分析した。500-4000Da範囲でデータを採取しそして得られた質量を手計算で期待値と比較した。

【実施例6】

30

【0131】

ペプチドのエドマン分析

10mM HEPES pH7.4、5%TFA中の1nmol/10μlにおけるエドマン分解のためにペプチド試料を供給した。エドマン分析の前に、製造者の指示に従ってApplied Biosystems ProSorb試料カートリッジを用いてHEPES緩衝塩を除去した。要約すると、試料をPVDF膜に適用しそして0.1%TFAを用いて洗浄し、次いで膜を取り除きそしてエドマン分解のためにタンパク質配列決定装置に挿入した。エドマン分解は、製造者の指示に従ってパルス液体法を用いて、Applied Biosystems Precise 494HTタンパク質配列決定システムで実行した。シーケンスコールは手で行った。

40

【実施例7】

【0132】

ペプチドの安定性

実施例4に記載の配合物を定常安定室内に置いた。DPP4の溶液内および血漿内での分解に対する安定性に関してペプチドも分析した。ポリペプチドの分解を検出するための敏感な方法である毛管電気泳動、質量分光分析、エドマン分解、ELISA、およびペプチド活性のアッセイによる分析のために試料を定期的に取り出した。種々のピークの面積を集計しそして親ポリペプチドのピークの面積を全ピーク面積で割った。その商が純度%である。新しいポリペプチド内には不純物が存在するので、異なる時点での純度を最初の純度で割って、純度変化を正規化した。DPP4および血漿に対する安定性に対して、2

50

0 pmol / μ l のペプチドを 37 度、 100 mM HEPES、 pH 7.4 中の 300 pM DPP-I V の存在下でインキュベーションした(図 2 a)。種々の時点で、反応(2 μ l アリコート)を 1 μ M DPP-I V 阻害剤の添加および冷凍により停止した。MALDI 質量分光分析のために、T = 0 時間、1 時間、5 時間、および 24 時間の時点で評価した。結果を分解生成物と比較した不变のペプチドまたはペプチド誘導体の百分率としてプロットした。

【実施例 8】

【0133】

PACAP1、VPAC1 および 2 受容体へのペプチドの結合

PAC1、VPAC1、および VPAC2 受容体を過剰発現する CHO 細胞を集密となるまで培養し、それらのフラスコからかきだしそして 50 ml 管内のおだやかな回転でペレット化した。ペレットを Tris に基づくホモジネーション緩衝液中に再懸濁しそして氷上で 30 ~ 40 回の手動操作を用いて Dounce 組織グラインダー中でホモジナイズした。懸濁液を超遠心分離で分離すると、膜のペレット化をもたらした。このペレットを少量のホモジネーション緩衝液中に再懸濁しそして Pierce からの BCA キットを用いてタンパク質濃度を決定した。

【0134】

10 μ g 膜タンパク質、0.1 nM 125 I-PACAP27 を含む結合反応物および供試化合物の投与曲線を 96 ウエルプレート内、37 度 20 分間インキュベーションした。プレートを 20 分間氷上において反応を停止した。非特異性結合を避けるために、0.1% PEG を用いて予備インキュベーションしたフィルタープレートに反応物を加え、減圧マニホールド内でプロセシングしそして BSA に基づく洗浄溶液を用いて数回洗浄した。フィルタープレートを乾燥、シンチラント添加、そして MicroBeta カウンターで読み取った。データを解析しそして Prism グラフで示した。

【実施例 9】

【0135】

ペプチドに反応する cAMP の上昇

VPAC2 ペプチドを発現する CHO 細胞を 8×10^4 細胞 / ウエルで 96 ウエルプレート中にプレーティングしそして MEM、ヌクレオシド、グルタミン (Gibco/BRL, Rockville, MD)、5% FBS、100 μ g / mL Pen/Step、0.4 mg / mL ハイグロマイシン、および 1.5 mg / mL Geneticin (Gibco/BRL) 中、37 度 24 時間培養した。媒体を除きそしてプレートを PBS で洗浄した。細胞をペプチドと一緒に 15 分間、37 度でインキュベーションした(10 mM HEPES, 150 mM NaCl、5 mM KCl、2.5 mM CaCl₂、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、25 mM NaHCO₃ (pH 7.4) 中、1% BSA および 100 μ M IBMX を含む)。細胞抽出物中のサイクリック AMP を cAMP SPA 直接スクリーニングアッセイシステム (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ) を用いて定量した。溶解物中に存在する cAMP の量は、該キットで提供される指示に従って決定された。ペプチドのそれぞれの濃度において產生された cAMP の量 (pmol で表す) をプロットしそして Prism ソフトウェアを用いて非線型回帰分析により解析してそれぞれのペプチドについて EC₅₀ を決定した。

【0136】

あるいは、受容体活性化に反応する cAMP の上昇は、レポーター細胞株、例えば CHO 内で測定でき、それは所望の受容体を発現するだけでなく、レポーター、例えば cAMP 反応要素 (CRE) に連結したルシフェラーゼも発現する。かかる細胞をウエル当たりに 10^4 細胞で 96 ウエルプレートにプレーティングしそして 37 度 48 時間、MEM、ヌクレオシド、グルタミン (Gibco/BRL, Rockville, MD)、5% FBS、100 μ g / mL Pen/Step、0.4 mg / mL ハイグロマイシン、および 1.5 mg / mL Geneticin (Gibco/BRL) 中で培養した。次

10

20

30

40

50

いで細胞をペプチドと一緒に 6 時間インキュベーションし、媒体を除き、そして Bright - Glo 試薬 (Promega) を加えた。シグナルは、シンチレーションカウンターを用いて検出した。

【0137】

本発明のポリペプチドは VIP に基づいて設計され、それは PAC 1 での活性を欠損することにより示される (Vaudry, et al., Pharmacol. Rev. 52 : 296 - 324, 2000)。従って、本発明のポリペプチドは PAC 1 に対して感知されるほどの活性を有しないと考えられる。

【0138】

本発明の代表的ポリペプチドを用いた本アッセイの結果を図 3 に示す。配列番号 1 および 112 として同定されるペプチドは、VPAC 2 レポーターの強力なアゴニストであり、内因性ペプチド PACAP - 27 により達成される受容体活性化の最高レベルの 100 % まで受容体を活性化する。さらに、配列番号 1, 112, 152 および 154 として同定されるペプチドは、選択的 VPAC 2 受容体アゴニストであり、VPAC 1 に対して非常に弱いアゴニスト活性を有する。PACAP - 27 は VPAC 1 の強力なアゴニストである。

【実施例 10】

【0139】

分散ラット膵島細胞からのインスリン分泌

多数の本発明のペプチドにより媒介された分散ラット膵島のインスリン分泌を以下のようにして測定した。SD ラット (200 ~ 250 g) から単離したランゲルハンス島をコラゲナーゼを用いて消化した。分散膵島細胞をトリプシンを用いて処理し、96 V 底プレート中に接種し、そしてペレット化した。次いで本発明のペプチドを含むかまたは含まない媒体中で細胞を一晩培養した。媒体を吸引除去し、そして 3 mM グルコースを含む Krebs - Ringer - HEPES 緩衝液中で細胞を 30 分間、37 °C で予備インキュベーションした。予備インキュベーション緩衝液を除去し、そして、適当な時間、ペプチドを加えるものと加えないもので、適当なグルコース濃度 (例えば 8 mM) を含む Krebs - Ringer - HEPES 緩衝液と共に、37 °C で細胞をインキュベーションした。一部の試験では、適当な濃度の GIP - 1 も含まれていた。一部分の上清を取り出しそしてそのインスリン含有量を SPA により測定した。その結果を「折り重ね対照 (fold over control)」(FOC) として表現した。

【0140】

本アッセイにおいて、分散ラット膵島細胞からのインスリン分泌の増加は、少なくとも 1.4 倍の増加と定められた。本発明のポリペプチドの VPAC 2 受容体アゴニスト成分は、少なくとも 1.4 倍から約 1.7 倍で分散膵島細胞からインスリンを産生した。

【実施例 11】

【0141】

ペプチド特異生物学的抗体の作製およびELISAによるペプチド測定

本発明のポリペプチドに特異性のポリクローナル抗体を、ABI 433A ペプチド合成装置を用いて本発明のポリペプチドの特異性フラグメントを合成して作製した。次いでペプチドを樹脂から切断し、そして Beckman System Gold Analytical and Preparative HPLC システムを用いて精製した。Perspective MALDI 質量分光分析システムを修正された製品を同定するために使用した。凍結乾燥機を用いてペプチドを乾燥した。次いで、Cys 上の遊離スルフィドリル (sulphydryl) 基を介してペプチド (2 mg) をキーホール リンペット ヘモシアニン (KLH) に結合した。

【0142】

雌ニュージーランド白ラビットを 0, 14, 35, 56、および 77 日目に免疫化した。0 日目に、それぞれのラビットを 250 µg ペプチドおよび完全フロイントアジュvant で皮下注入した。その後の免疫化には、ラビットあたりに 125 µg ペプチドを使用し

10

20

30

40

50

た。採血は 21 日目から開始しそしてその後 21 日間隔で行った。抗ペプチド抗体の精製は、粗血清を特異性ペプチドアフィニティー精製カラムを通して行った。抗体力価は E L I S A により決定した。

【 0 1 4 3 】

96 ウエル Imm u l o n 4 H B X プレートを本発明のペプチドに対して特異性である C 末端 M o r p h o s y s F (a b) 抗体を用いて被覆し、そして一晩、4 でインキュベーションした。次いでプレートをブロックして非特異性結合を防止した。次いで、ペプチド標準 (2 5 0 0 n g / m L - 1 6 0 p g / m L) を 3 3 % 血漿中で希釈しそして試料を緩衝液中 1 : 3 に希釈し、次いで室温で 1 . 5 時間のインキュベーションした。洗净の後、本発明のペプチドに特異性のポリクローナル N 末端抗体をプレート上で 1 時間インキュベーションした。次いでホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) - 口バ - 抗 - ラビット抗体を添加しそして試料および標準をさらに 1 時間インキュベーションした。検出は、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (T M B) 溶液と共にインキュベーションした後に評価し、そしてプレートは O D ₄₅₀ で読み取った (図 4 a) 。

【 0 1 4 4 】

あるいは、本発明のペプチドの特異性のポリクローナル N 末端抗体を用いて、96 ウエル Imm u l o n 4 H B X プレートを被覆し、そして一晩、4 でインキュベーションした。次いで、非特異性結合を防止するためにプレートをブロックした。次いで、ペプチド標準 (2 5 0 0 n g / m L - 1 6 0 p g / m L) を血漿中で 5 0 % に希釈し、そして試料を緩衝液中で 1 : 2 に希釈し、それに次いで 1 . 5 時間、室温でインキュベーションした。洗净の後、本発明のペプチドに特異性のモノクローナル抗 P E G 抗体をプレート上で 1 時間インキュベーションした。次いで、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H P R) - 抗 - マウス抗体を添加しそして試料および標準をさらに 1 時間インキュベーションした。検出は、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (T M B) 溶液と共にインキュベーションした後に評価し、そしてプレートは O D ₄₅₀ で読み取った (図 4 b) 。

【 実施例 1 2 】

【 0 1 4 5 】

I V および皮下投与後のペプチドの薬物動態学

血漿試料をミクロ遠心分離管に移しそして当量のアセトニトリルを試料に加えた (5 0 % 最終濃度) 。試料を約 5 分間強く渦動攪拌し、そして氷上に 1 0 分間静置した。試料を再び約 1 分間渦動攪拌し、次いでミクロ遠心分離機で 3 0 分間 (4) 、最高 (約 1 5 , 0 0 0 × g) で遠心分離した。

【 0 1 4 6 】

遠心分離の後、水相を清浄な遠心分離管に注意して移し、ミクロ遠心分離機で約 5 分間 (4) 、最高速度 (約 1 5 , 0 0 0 × g) で試料を遠心分離した。中程度の加熱設定をした Speed Vac S C 1 1 0 (Savant) を用いて、抽出された試料を減圧下で乾燥するまで乾燥した。適量の滅菌水中に試料を再懸濁しそして 4 に保持した。次いで、分析の前に、試料を音波処理浴中で 1 0 分間、室温で音波処理した。ペプチド濃度は、実施例 9 に記載のようにレポーターアッセイを用いて決定した。

【 0 1 4 7 】

この方法を用いて、配列番号 1 1 2 の薬物動態学的性質を配列番号 1 5 4 のものと比較した (図 5 a) 。配列番号 1 1 2 上に存在するペプチドアセチル化は改善された薬物動態学的性質を示し、それは 2 4 時間および 4 8 時間目に検出されたが、一方非アセチル化ペプチドである配列番号 1 5 4 は、6 時間目に検出されたのみであった。それら 2 種のペプチドを比較するさらなる研究は、配列番号 1 1 2 がラット中で 1 0 . 9 時間の半減期を有し、一方アセチル化の配列番号 1 5 4 のそれは約 6 時間であることを示した (図 5 b) 。

【 0 1 4 8 】

血漿ペプチド濃度も E L I S A を用いて測定し、それを実施例 1 1 に記載した。この方法を用いて、配列番号 1 1 2 の薬物動態学をさらに検討した (図 5 c) 。イヌ中で、配列

10

20

30

40

50

番号 112 は一週間の間、検出可能な濃度で存在していた。

【実施例 13】

【0149】

ラットにおける腹腔内耐糖性に対するPEG付加ペプチドの影響

皮下投与された場合の本発明のPEG付加ペプチドの生体内活性をラット内で試験した。一晩絶食したラットに対照またはPEG付加ペプチド(1~100 μg/kg)を皮下注入した。3時間後に、基礎血糖を測定し、そしてラットにグルコース2g/kgを腹腔投与した。血糖を15、30、および60分後に再度測定した。本発明のPEG付加ペプチドは、IPGTT(腹腔内耐糖性試験)に従うビヒクルに関して血糖レベルを著しく低下し、グルコースAUCで17%~28%低下であった(図6a~6d)。これは、PEG付加ペプチドが生体内で長期の血糖低下活性を有することを示す。本発明のPEG付加ペプチドの血糖低下活性に加えて、それは生体内での長いペプチド半減期も示した。PACAP-27は、生体内で著しく短い半減期を有する(<10分間)。ペプチド投与後24(図6b)、41(図6c)、65(図6c)、および72(図6d)時間において血糖を低下する本発明のPEG付加ペプチドの能力は、ペプチドがその時間では循環系内に存在しそのためPACAP-27と比較してより長い半減期を有することを明確に示す(図6c)。さらに、配列番号154および配列番号155のペプチドと比較して、配列番号112のペプチドは、長期間、より大きい効能および効力を示す(図6bおよび6d)。

10

20

30

40

50

【0150】

本発明のポリペプチドの活性の証明は、当該技術分野では周知の試験室内、生体外、および生体内でのアッセイを通じて得られるであろう。例えば、糖尿病および関連障害、例えば症候群X、耐糖能異常、空腹時血糖異常、および高インスリン血症、アテローム性硬化症および関連障害、例えば高トリグリセリド血症、および高コレステロール血症、および肥満の処置のための薬剤の効力を証明するために、下記のアッセイを用いてもよい。

【0151】

血糖レベルの測定方法

db/dbマウス(Jackson Laboratories, Bar Harbor, MEから入手)を採血し(眼または尾血管より)そして等しい平均血糖レベルに従って群分けする。それらに経口(製薬学的に許容できるビヒクル中で強制栄養)で供試ポリペプチドを一日一回、14日間投与する。この時点で動物を眼または尾血管より再度採血そして血糖レベルを決定する。それぞれの場合に、血糖レベルはGlucometer Elite XL(Bayer Corporation, Elkhart, IN)を用いて測定する。

【0152】

心血管パラメーターへの効果の測定方法

血管パラメーター(例えば心拍数および血圧)も評価する。SHRラットは、ビヒクルまたは供試ポリペプチドを一日一回、2週間経口投与される。グリンゼルら(Grinsell, et al., Am. J. Hypertens. 13:370-375, 2000)に記載のように尾部カフ法により血圧および心拍数を決定する。サルにおいては、血圧および心拍数はシェンら(Shen, et al., J. Pharmacol. Exp. Therap. 278:1435-1443, 1996)に記載のようにして測定する。

【0153】

トリグリセリドレベルの測定方法

hAPOA1マウス(Jackson Laboratories, Bar Harbor, MEから入手)を採血し(眼または尾血管より)そして等しい平均血清トリグリセリドレベルに従って群分けした。それらに経口(製薬学的に許容できるビヒクル中で強制栄養)で供試ポリペプチドを一日一回、8日間投与する。次いで、動物を眼または尾血管より再度採血そして血清トリグリセリドレベルを決定する。それぞれの場合に、トリグ

リセリドレベルは、Technicon Axon Autoanalyzer (Bayer Corporation, Tarrytown, NY) を用いて測定する。

【0154】

HDLコレステロールレベルの測定方法

血漿HDLコレステロールレベルを測定するために、hAppA1マウスを採血し、等しい平均血漿HDLコレステロールレベルで群分けする。マウスは、毎日一回、ビヒクルまたは供試ポリペプチドを7日間投与され、次いで8日目に再度採血する。血漿は、Synchron Clinical System (CX-4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA) を用いてHDLコレステロールを測定する。

【0155】

全コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリド、および血糖レベルの測定方法

別の生体内アッセイでは、肥満サルを採血し、次いで一日一回ビヒクルまたは供試ポリペプチドを4週間経口投与し、次いで再度採血する。血清は、Synchron Clinical System (CX-4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA) を用いて全コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリド、および血糖を測定する。リボタンパク質サブクラス分析は、オリバーら (Oliver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5306-5311, 2001) に記載のようにしてNMR分析により行う。

【0156】

上記の明細中に言及したすべての出版物および特許は、引用することにより本明細書に編入される。記載の本発明の組成物および方法の種々の変更および変化が、本発明の範囲および精神から外れることなく当該技術分野の熟練者には明らかである。本発明は特定の好みの態様に関連して記載されているが、請求される本発明はかかる特定の態様に不当に限定されるべきではないことを理解するべきである。実際に、生化学または関連分野の当該技術分野の熟練者には明らかな本発明を実施するための上記の態様の種々の変更が、以下の請求範囲内にあると考える。当該技術分野の熟練者は、慣用の範囲内の実験を利用して、本明細書中に記載の本発明の特定の態様に対して多数の等価なものを認め、または確認できるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1a-1d】配列番号1～148のポリペプチドのアミノ酸配列を記載する。配列番号112～148は、マレイミド連結を介するC末端システインでPEG付加されたペプチドを示す。PEGは、いかなる長さ、例えば22KD線状PEGまたは43KD分枝状PEGまたはそれより大きくてよい。

【図1e】関連するペプチド標準である。

【図2a-2b】DPP4によるタンパク質分解切断に対するV PAC 2類似体の安定性を示す。

【図3】V PACペプチドで処理された細胞のcAMP反応を示す。

【図4a-4b】ペプチド検出のためのサンドイッチELISAアッセイを示す。

【図5a-5c】V PACペプチドの薬物動態学的性質を示す。

【図6a-6d】生体内効力を示す。

10

20

30

40

【 図 1 a 】

配列番号	配列
1	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOVAAKKYLOSIKOKRY
2	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKRY
3	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOVAAKKYLOSIKOKRY
4	AC- HTEAVFTDQYTRLRKOVAAKKYLOSIKOKRY
5	AC- HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLOSIKOKRGGT
6	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKRY
7	AC- HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLOSIKOKRY
8	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKRY
9	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKRY
10	AC- HGDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKRY
11	AC- HSDAVFTDQYTRLRKQAGKYYLQSTIKOKR
12	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKRY
13	AC- HSDAVFTDQYTRLRKQAGKYYLQSTIKOKR
14	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKR
15	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKR
16	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKR
17	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKR
18	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKR
19	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKR
20	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKP
21	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKP
22	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKL
23	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKL
24	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKL
25	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKU
26	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKP
27	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKP
28	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKS
29	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKI
30	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKV
31	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKW
32	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKY
33	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKR
34	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKT
35	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKF
36	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKI
37	AC- HSDAVFTDQYTRLRKOMAAKKYLOSIKOKR

【 図 1 b 】

配列番号	配列
36	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLOSIKOKRY
39	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLOSIKOKRY
40	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLOSIKOKRY
41	Ac-HTEAVFTDNYTRLQKOAACKYLOSIKOKRY
42	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLYDQIKGCT
43	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLYDQIKGCT
44	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLYDQIKGCTKRY
45	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLYDQIKGCTKRY
46	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLYDQIKGCTKRY
47	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLYDQIKGCTKRY
48	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLYDQIKGCTKRY
49	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKOAACKYLYDQIKGCTKRY
50	Ac-BSCAVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
51	Ac-BSCAVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
52	Ac-RS2AVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
53	Ac-RS2AVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
54	Ac-RS2AVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
55	Ac-RS2AVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
56	Ac-RS2AVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
57	Ac-RS2AVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
58	Ac-RS2AVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
59	Ac-RS2AVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
60	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
61	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
62	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
63	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
64	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
65	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
66	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
67	Ac-BSUAVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
68	Ac-BSUAVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
69	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
70	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
71	Ac-ESDAVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
72	Ac-ESDAVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
73	Ac-ESDAVFTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR
74	Ac-HSDAVENTDNYTRLQKRNQAKKYLQSIKOKR

FIG. 1a

FIG. 1b

【図 1 c】

【 図 1 d 】

配列番号	配列
75	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLQS1NKR
76	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLQS1NKR
77	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLQS1NKR
78	Ac-HEDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLQS1NKR
79	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLQS1NKR
80	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLQS1NKR
81	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLQS1NKR
82	Ac-HSDAVFTDQYTRLRQAAKKYLQS1NKR
83	Ac-HSDAVFTDQYTRLRQAAKKYLQS1NKR
84	Ac-HSDAVFTDQYTRLRQAAKKYLQS1NKR
85	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
86	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
87	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
88	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
89	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
90	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
91	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
92	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
93	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
94	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
95	Ac-HEDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
96	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
97	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
98	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
99	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
100	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
101	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
102	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
103	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
104	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
105	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
106	Ac-HEDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
107	Ac-HEDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
108	Ac-HEDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
109	Ac-HEDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
110	Ac-HEDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR
111	Ac-HSDAVFTDQYTRRFRQMGAKYLQS1NKR

FIG. 1C

FIG. 1d

配列番号	配列
112	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
113	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
114	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
115	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
116	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
117	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
118	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
119	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
120	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
121	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
122	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
123	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
124	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
125	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
126	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
127	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
128	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
129	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
130	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
131	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
132	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
133	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
134	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
135	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
136	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
137	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
138	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
139	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
140	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
141	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
142	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
143	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
144	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
145	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
146	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG
147	Ac-H3DAVFTDQYRLAKWAAKKYLQSKIKOKRKC-PEG

【 図 1 e 】

配列番号	配列
149	HSDGIFTDGSVSRYBKQMPAVKYLAAVLGKRYKQSVWNK (PACAP38)
150	HSDEGIFTDSVSRYRKQWAKYLYNAVL (PACAP27)
151	HSDAVFTDNYSRERKQWAKYLYNSLN (VIP)
152	HSDAVFTDNYSRERKQWAKYLYNSLN
153	A-G-HCTAVFTDNYSRERKQWAKYLYNSLN-KRKY
154	HSDAVFTDOYTLERKQWAKYLYNSLN-KRKY-PEG
155	A-G-HCTAVFTDNYSRERKQWAKYLYNSLN-KRKY-PEG

FIG. 1e

【 図 2 a 】

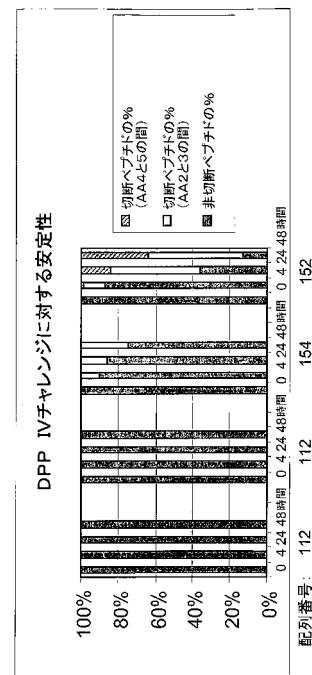


Figure 2a

【図2b】

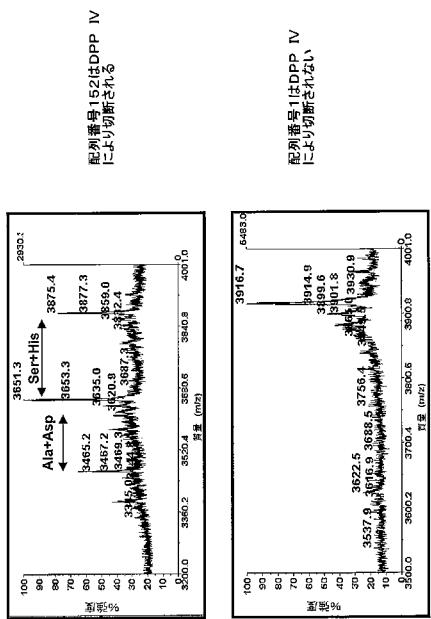


Figure 2b

【 図 3 】

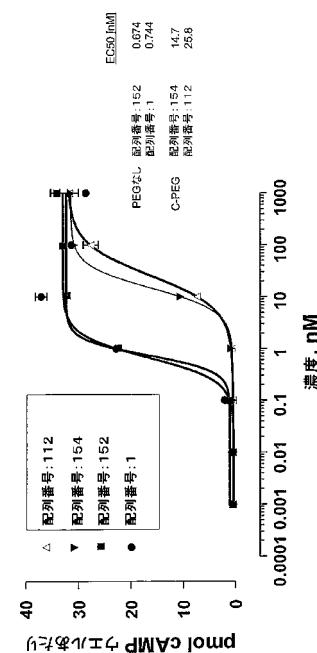


Figure 3

【図4a】

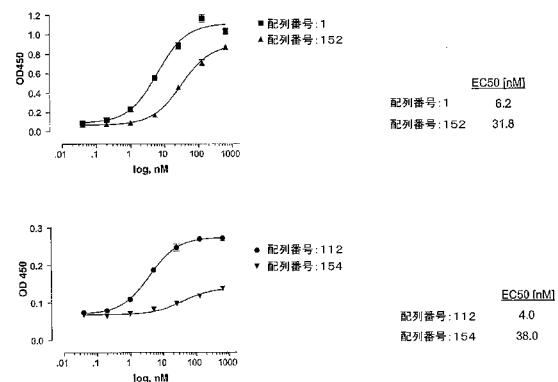


Figure 4a

【図4b】

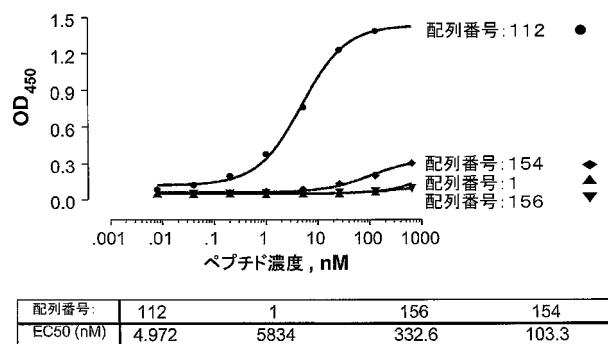


Figure 4b

【図5a】

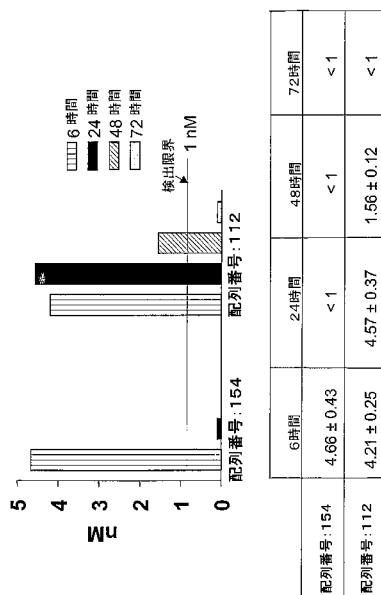


Figure 5a

【図5b】

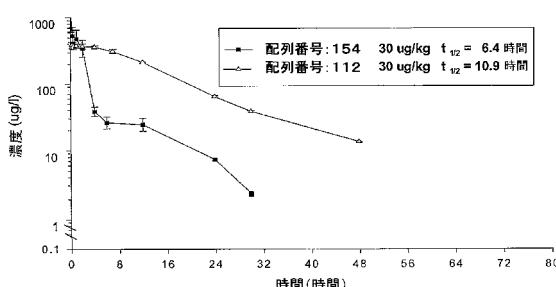


Figure 5b

【図5c】

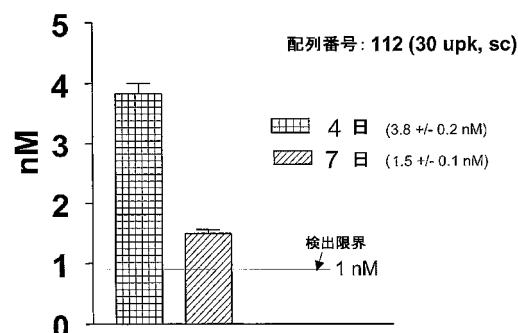


Figure 5c

【図 6 a】

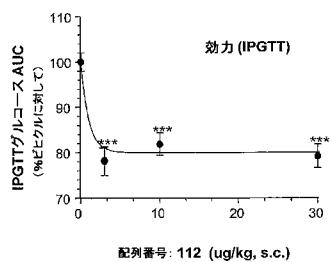
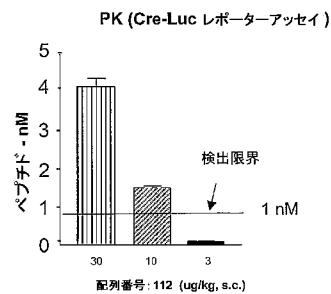
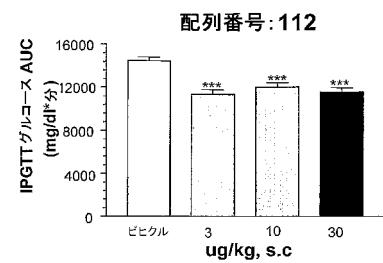


Figure 6a

【図 6 b】



配列番号: 154

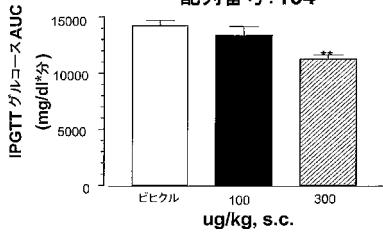


Figure 6b

【図 6 c】

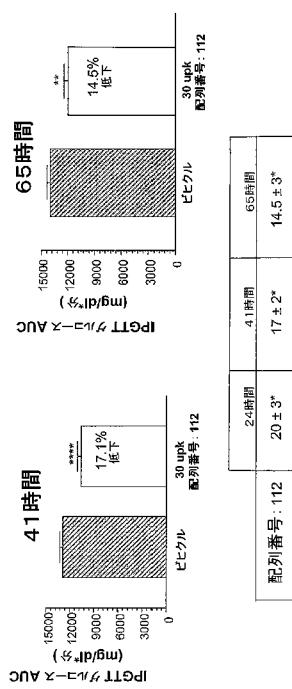


Figure 6c

【図 6 d】

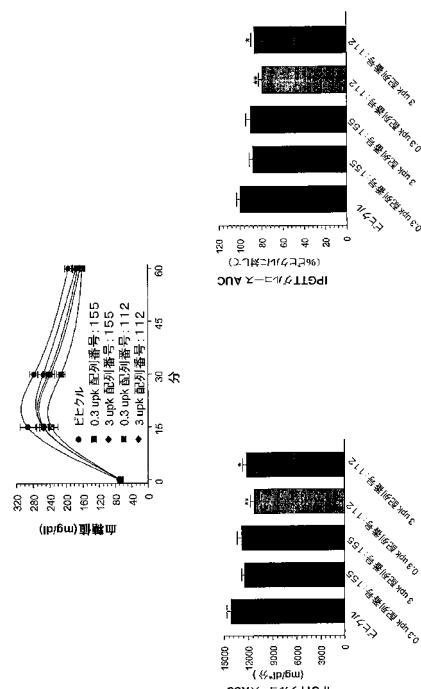


Figure 6d

【配列表】

2007519739000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/02609												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) : A61K 38/00, 38/16 US CL : 530/300, 324 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) U.S. : 530/300, 324														
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">EP 0536741A2 (Bolin et al) 14 April 2003 (14.04.93), p. 16, lines 22-23; p.29, lines 39-40, p.128.</td> <td style="padding: 2px;">1, 2, 12-16, 37</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 01/23420 A2 (Pan et al) 05 April 2001 (05.04.2001), entire document especially p.5, line 1; p.33, line 3; p.16, line 35 - p.17, line 21; p.23; p.38</td> <td style="padding: 2px;">1-4, 9, 12-18, 20-24, 27-29, 32, 33, 37, 39, 43, 47, 49, and 51-53</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 03/068805 A2 (Wang et al) 21 August 2003 (21.08.2003), entire document.</td> <td style="padding: 2px;">1, 2, 12-28, 30-36, 38-41, and 49-53</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	EP 0536741A2 (Bolin et al) 14 April 2003 (14.04.93), p. 16, lines 22-23; p.29, lines 39-40, p.128.	1, 2, 12-16, 37	X	WO 01/23420 A2 (Pan et al) 05 April 2001 (05.04.2001), entire document especially p.5, line 1; p.33, line 3; p.16, line 35 - p.17, line 21; p.23; p.38	1-4, 9, 12-18, 20-24, 27-29, 32, 33, 37, 39, 43, 47, 49, and 51-53	X	WO 03/068805 A2 (Wang et al) 21 August 2003 (21.08.2003), entire document.	1, 2, 12-28, 30-36, 38-41, and 49-53
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	EP 0536741A2 (Bolin et al) 14 April 2003 (14.04.93), p. 16, lines 22-23; p.29, lines 39-40, p.128.	1, 2, 12-16, 37												
X	WO 01/23420 A2 (Pan et al) 05 April 2001 (05.04.2001), entire document especially p.5, line 1; p.33, line 3; p.16, line 35 - p.17, line 21; p.23; p.38	1-4, 9, 12-18, 20-24, 27-29, 32, 33, 37, 39, 43, 47, 49, and 51-53												
X	WO 03/068805 A2 (Wang et al) 21 August 2003 (21.08.2003), entire document.	1, 2, 12-28, 30-36, 38-41, and 49-53												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input 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 application or patent 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														
Date of the actual completion of the international search 19 December 2005 (19.12.2005)		Date of mailing of the international search report 09 MAR 2006												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Gregory S. Emery  Telephone No. (571) 272-1600												

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/02609

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 6-8 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:
There was a lack of antecedent basis in the claims, i.e., the claims are drawn to "the polyethylene glycol."

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US05/02609

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
A_Geneseq databases, USPTO databases; Published_Applications_AA:, PIR databases, UniProt databases,
SEQ ID NOS: 1-5 and 112-116

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 K 38/28 (2006.01)	A 6 1 K 37/26	
A 6 1 P 5/04 (2006.01)	A 6 1 P 5/04	
A 6 1 P 5/46 (2006.01)	A 6 1 P 5/46	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 25/20 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/20	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 P 21/08	

(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,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,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バクホルツ,トーマス

アメリカ合衆国コネチカット州0 6 4 6 0 ミルフォード・モアハウスアベニュー1 0

(72)発明者 サルハニク,アーサー・アイ

アメリカ合衆国コネチカット州0 6 5 1 1 ニュー・ヘブン・ベルビューロード4 3 0

F ターム(参考) 4B064 AG27 CC24 DA01 DA13

4C084 AA02 AA03 AA07 AA19 BA01 BA02 BA08 BA19 DB34 NA05
 NA14 ZA052 ZA362 ZA402 ZA422 ZA452 ZA592 ZA702 ZA812 ZA832
 ZB072 ZB082 ZB112 ZB352 ZC032 ZC202 ZC212 ZC331 ZC332 ZC351
 ZC352 ZC422 ZC432 ZC502
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA18 BA57 EA20 FA20 FA50