

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-509584

(P2017-509584A)

(43) 公表日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/605 (2006.01)	C O 7 K 14/605 Z N A	4 C O 7 6
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/26 (2006.01)	A 6 1 K 37/28	4 H O 4 5
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-540547 (P2016-540547)	(71) 出願人	594197872
(86) (22) 出願日	平成26年12月11日 (2014. 12. 11)		イーライ リリー アンド カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成28年6月16日 (2016. 6. 16)		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/US2014/069643		8 5 インディアナポリス リリー コー
(87) 国際公開番号	W02015/094875		ポレイト センター (番地なし)
(87) 国際公開日	平成27年6月25日 (2015. 6. 25)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	61/917, 597		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成25年12月18日 (2013. 12. 18)	(74) 代理人	100095360
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100176094
			弁理士 稲田 満
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 重度低血糖症の治療のための新規化合物

(57) 【要約】

本発明は、低血糖症の治療に有用な新規化合物を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y s - A l a - G l n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y s - T h r - G l y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y s - S e r - L y s - N H ₂ (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む、化合物。

【請求項 2】

前記化合物が、H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y s - A l a - G l n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y s - T h r - G l y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y s - S e r - L y s - N H ₂ (配列番号 2) のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の前記化合物。

10

【請求項 3】

請求項 1 または請求項 2 に記載の前記化合物と、薬学的に許容される緩衝液とを含む、薬学的組成物。

【請求項 4】

前記薬学的に許容される緩衝液が、ヒスチジン緩衝生理食塩水である、請求項 3 に記載の前記薬学的組成物。

20

【請求項 5】

有効量の請求項 1 または請求項 2 に記載の化合物を投与することを含む、対象における低血糖症を治療する方法。

【請求項 6】

療法における使用のための、請求項 1 または請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 7】

低血糖症の治療における使用のための、請求項 1 または請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 8】

低血糖症治療用の医薬品の製造における使用のための、請求項 1 または請求項 2 に記載の化合物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病及び／または肥満の治療における使用のための、ヒトグルカゴンを超える改善された溶解度ならびに物理的及び化学的安定性を有する化合物に関する。

【背景技術】

【0002】

H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - S e r - A r g - A r g - A l a - G l n - A s p - P h e - V a l - G l n - T r p - L e u - M e t - A s n - T h r (配列番号 1) のアミノ酸配列を有するヒトグルカゴンは、膵臓において産生される 29 個のアミノ酸のペプチドホルモンである。血中グルコースが低下し始めると、グルカゴンは肝臓に信号を送り、貯蔵されていたグリコーゲンをグルコースに分解して血流中に放出することにより、血中グルコースレベルを上昇させる。

40

【0003】

糖尿病を有する対象において、低血糖症は、糖尿病治療の副作用として生じ得る。加えて、糖尿病患者における低血糖症に対する天然グルカゴン応答は損なわれており、グルコースレベルが正常範囲に戻ることをより困難にし得る。治療せずに放置すると、重度または急性低血糖症は、発作、意識喪失、脳損傷、または更には死亡などの深刻な問題を引き起こし得る。

50

【 0 0 0 4 】

グルカゴンの投与は、急性低血糖症の治療のための確立された療法である。緊急のグルカゴン投与は、投与から数分以内に正常なグルコースレベルを回復させることができる。しかしながら、投与のために調製されたグルカゴンは、いくつかの問題を有する。生理的 pH または生理的 pH 付近の水性緩衝液中では、グルカゴンは溶解度が不良である。低い pH または高い pH で調合された場合、グルカゴンはまた、ゲル化及び可溶性凝集体形成などの不良な化学的安定性及び不良な物理的安定性を示す。これらの問題を最低限に抑えるために、現在市販されているグルカゴン製品は、投与時に水でもどすようにという指示と共に、凍結乾燥した粉末として提供されている。緊急事態では、凍結乾燥した粉末を水でもどすことは、手間であり不便である。故に、生理的条件下でヒトグルカゴンの生物学的能力を維持し、同時に、非生理的条件下での十分な水溶解度、化学的安定性、及び物理的安定性も呈する、治療的使用のための化合物を提供することが望ましい。

10

【 0 0 0 5 】

アミノ酸置換によって酸性 pH 及び生理的 pH の緩衝液における溶解度及び安定性を改善したグルカゴン類似体が、国際公開第 2 0 0 8 0 8 6 0 8 6 号に開示されている。生理的条件下でヒトグルカゴンの生物学的能力を維持し、同時に、非生理的条件下での十分な溶解度ならびに化学的及び物理的安定性も呈する化合物が依然として必要である。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

20

したがって、本発明は、野生型グルカゴン活性を維持するが、十分な溶解度ならびに化学的及び物理的安定性も呈する化合物を提供する。本発明はまた、ポンプ及び / または緊急投与に好適な化合物を提供する。加えて、本発明は、二室式ポンプ中で即効性のインスリン類似体と組み合わせて投与して、閉ループ血糖管理を提供することができる化合物を提供する。

【 0 0 0 7 】

本発明は、アミノ酸配列

【 0 0 0 8 】

H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r - A s p - T y r
- S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y s - A l a - G
l n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y s - T h r - G
l y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y s - S e r - L
y s - N H ₂ (配列番号 2) を含む化合物を提供する。本発明はまた、アミノ酸配列

30

【 0 0 0 9 】

H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r - A s p - T y r
- S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y s - A l a - G
l n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y s - T h r - G
l y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y s - S e r - L
y s - N H ₂ (配列番号 2) からなる化合物を提供する。意外なことに、本発明の化合物は、水溶液中のヒトグルカゴンと比較して、増加した水溶解度、増加した化学的安定性、及び減少したフィブリル化を呈することが見出された。加えて、本発明の化合物は、5 ~ 7 の範囲の pH にて強化された溶解度を示す。本発明の化合物はまた、ヒトグルカゴンと同様の活性、例えば、ヒトグルカゴンと比較して、グルカゴン受容体での効力、活性時間、及び選択性を提供する。故に、本発明の化合物は、重度または急性低血糖症を含む低血糖症を治療するのに好適である。本発明の化合物の改善された特性により、ポンプ投与及び重度低血糖症の治療のための水溶液中でのグルカゴンの調製も可能となる。

40

【 0 0 1 0 】

本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む化合物を投与することを含む、対象における低血糖症を治療する方法を更に提供する。本発明はまた、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる化合物を投与することを含む、対象における低血糖症を治療する方法も提供する。

50

本発明は、療法における使用のための配列番号2のアミノ酸配列を含む化合物を更に提供する。本発明はまた、療法における使用のための配列番号2のアミノ酸配列からなる化合物も提供する。本発明はまた、低血糖症の治療における使用のための配列番号2のアミノ酸配列を含む化合物も提供する。本発明はまた、低血糖症の治療における使用のための配列番号2のアミノ酸配列からなる化合物も提供する。本発明は、低血糖症治療用の医薬品の製造における使用のための配列番号2のアミノ酸配列を含む化合物を提供する。本発明はまた、低血糖症治療用の医薬品の製造における使用のための配列番号2のアミノ酸配列からなる化合物を提供する。

【0011】

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を含む化合物と薬学的に許容される緩衝液とを含む薬学的組成物を提供する。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列からなる化合物と薬学的に許容される緩衝液とを含む薬学的組成物も提供する。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列を含む化合物とヒスチジン緩衝液とを含む薬学的組成物も提供する。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列からなる化合物とヒスチジン緩衝液とを含む薬学的組成物も提供する。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列を含む化合物とヒスチジンとを含む薬学的組成物も提供する。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列からなる化合物とヒスチジンとを含む薬学的組成物も提供する。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列を含む化合物とヒスチジン緩衝生理食塩水とを含む薬学的組成物も提供する。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列からなる化合物とヒスチジン緩衝生理食塩水とを含む薬学的組成物も提供する。薬学的組成物は水溶液であることが好ましい。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される緩衝液」という用語は、当業者に既知の標準的な薬学的緩衝液のいずれをも包含するように理解される。非経口投与のための薬学的に許容される緩衝液としては、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、クエン酸緩衝生理食塩水、及びヒスチジン緩衝生理食塩水が挙げられる。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載のものなどの標準的な薬学的調合技法を用いてもよい。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の化合物は、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、または経皮などの任意の標準的な投与経路を使用して投与することができる。一実施形態では、本発明の化合物は、皮下または筋肉内投与される。

【0013】

薬学的組成物は、生理学的に許容されるpHを有し得る。一実施形態では、薬学的組成物は、約4～約8の範囲のpHを有し得る。より好ましくは、薬学的組成物は、約5～約6のpHを有し得る。

【0014】

本発明の化合物の用量は、約0.01mg～約100mgの範囲であることができる。用量は、約0.01mg～約10mgの範囲であり得る。用量はまた、約0.1mg～約3mgの範囲であってもよい。加えて、用量は、約0.01mg～約0.03mgの範囲であり得る。

【0015】

本発明の化合物は、キットの一部として提供することができる。一実施形態では、キットは、化合物をヒト対象に投与するためのデバイスと共に提供される。より好ましくは、キットは、化合物を投与するための注射器及び注射針を含む。最も好ましくは、化合物は、注射器内の水溶液中で事前調合される。

【0016】

本発明の化合物はまた、インスリンポンプまたは二重ホルモン（例えば、インスリン-グルカゴン）ポンプシステムなどのポンプシステムにおいて使用することもできる。

【0017】

本明細書で使用する場合、「有効量」という用語は、対象への投与時に、許容できない

10

20

30

40

50

副作用を引き起こすことなく所望の治療効果を生む量を意味すると理解される。例えば、本発明の化合物の「有効量」は、未治療の場合よりも優れた血中グルコース濃度の制御をもたらし得る量である。対象に投与される本発明の化合物の「有効量」は、疾患の種類及び重症度、ならびに全般的な健康、年齢、性別、体重、薬物耐性、及び血中グルコース調節不能の重症度が挙げられるがこれらに限定されない対象の特徴に依存し得る。

【0018】

本明細書で使用する場合、「治療する」という用語は、低血糖症などの特定の障害または状態に関連する症状の緩和を意味すると理解される。

【0019】

本発明のアミノ酸配列は、20個の天然型アミノ酸の標準的な一文字表記または三文字表記を含む。加えて、「Aib」はアルファアミノイソ酪酸である。

10

【0020】

本明細書で使用する場合、「フィブリル化」は、グルカゴンが低いpHまたは高いpHで調合される場合に観察されるゲル化及び可溶性凝集体形成を指す。

【実施例】

【0021】

実施例1：ペプチド合成

配列番号2の化合物を、Protein Technologies Inc.のSymphony上での固相ペプチド合成によって生成する。合成(0.125mmolスケール)を、約0.68mmol/gの置換で、Fmoc-Rinkアミドポリスチレン樹脂(Rapp Polymere Tubingen, Germany)上で行う。この合成は、Fmoc主鎖保護基戦略を使用して行う。使用するアミノ酸側鎖誘導体は、Asp(O-tert-ブチル、OtBu)、Gln(トリチル、Trt)、Glu(OtBu)、His(Trt)、Lys(tert-ブトキシ-カルボニル、Boc)、Ser(OtBu)、Thr(OtBu)、Trp(Boc)、及びTyr(OtBu)である。結合を、ジメチルホルムアミド(DMF)中のジイソプロピルカルボジイミド(DIC)及びヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)(モル比1:1:1)で活性化した当量約10のアミノ酸を用いて実行する。結合は、室温で90分~4時間実行される。

20

【0022】

同時の樹脂からの開裂及び側鎖保護基除去を、室温で2時間、トリフルオロ酢酸(TFA):トリイソプロピルシラン:1,2-エタンジチオール:水:チオアニソールを90:4:2:2:2(v/v)で含有する溶液中で実行する。溶液を濾過し、ペプチドを冷ジエチルエーテルで沈殿させ、4000rpmで3分間遠心分離させる(冷エーテルでの洗浄を3回繰り返す)。粗ペプチドを、10%の酢酸を含有する40mLの水中に再溶解させ、C₁₈逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)カラム(Waters Symmetry Prep 7µm, 19×300mm)上で18mL/分の流量にて精製する。試料を、100分間の15~55%Bの線形AB勾配で溶出させ、ここで、A=0.05%のTFA/H₂O及びB=0.04%のTFA/アセトニトリルである。産生物は、概して、約26~28%のアセトニトリルで溶出する。ペプチド純度及び分子量を、シングル四重極MS検出器を持つAgilent 1100 Series液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)システム上で確認する。分析的HPLC分離を、15分間の10~100%Bの線形AB勾配で、Waters Symmetry Shield RP18、3.5µm、4.6mm×100mmカラム上で行い、ここで、A=0.05%のTFA/H₂O及びB=0.04%のTFA/40%のH₂O/60%のアセトニトリルであり、流量は0.7mL/分(220nmの波長)である。化合物を、95%を超える純度に精製し、1原子質量単位(amu)以内の計算値と対応する分子量を有することを確認する。

30

40

【0023】

TFA塩を、AG 1-X8 Resin(Bio-RAD、酢酸形態、100~200メッシュ、3.2meq/乾燥g、含水率39~48重量%)(アニオン交換樹脂)を

50

使用して酢酸塩に変換する。例えば、422 mg のペプチドを、120 mL の30 %のアセトニトリル / H_2O 中に溶解させる。40 g の樹脂（ペプチドの正電荷に対して約100倍のモル比）を添加する。混合溶液を、室温で1時間、回転攪拌機によって混合する。混合溶液を濾過し、樹脂を30 %のACN / H_2O で5回洗浄する。原溶液と洗浄した溶液とを組み合わせ、凍結乾燥させる。

【0024】

溶解度及び化学的安定性

配列番号2の化合物を H_2O 中に溶解させて10 mg / mLの濃度（ペプチド含量）にし、0.22 μm のフィルタ（Millex, SLGV004SL）を通して濾過した後、緩衝液P5（10 mMのヒスチジン、 H_2O 中の150 mMのNaCl、pH 5.0）
、または緩衝液P6（10 mMのヒスチジン、 H_2O 中の150 mMのNaCl、pH 6.0）中で1 mg / mLに希釈する。各溶液を3つのバイアルに移し、加熱滅菌する。その後、試料を、4、30、及び40に維持する。試料を、濁度及び相分離について異なる時点で目視評価する。化合物の安定性を、1.2 mL / 分の流量（220 nmの波長）で、5分間の5 % B均一濃度、20分間の5 ~ 25 % B、30分間の25 ~ 30 % B、及び10分間の30 ~ 45 % BのAB（A = 0.05 %のTFA / H_2O 、B = 0.04 %のTFA / アセトニトリル）勾配で、60に加熱したPhenomenex Aeris Widepore、3.6 μm 、XB-C18 4.6 x 100 mmカラム（P / NO 00D-4482-E0）上で分析的逆相HPLC（RP-HPLC）によって評価する。

10

20

【0025】

配列番号2の化合物は、目視評価とRP-HPLCとの両方によって、4週間を越えて、pH 5（緩衝液P5）及びpH 6（緩衝液P6）にて、4、30、及び40で、良好な溶解度を維持する。物理的外観は無色透明であり、乳白光及び粒子はない。RP-HPLCによるリカバリーは定量であり、表1に示す通りである。

【表1】

表1

緩衝液	0日目の 総ピーク面積	4週目の 4℃の 総ピーク面積	4週目の 30℃の 総ピーク面積	4週目の 40℃の 総ピーク面積	4週目の 30℃対4℃の リカバリー	4週目の 40℃対4℃ のリカバリー
P5	4903	4933	4932	4932	100%	100%
P6	4885	4918	4911	4960	100%	101%

30

【0026】

配列番号2の化合物はまた、4週間、4、30、及び40に維持する場合、pH 5（緩衝液P5）及びpH 6（緩衝液P6）にて化学的安定性を維持する。表2に示すように、RP-HPLCにより試料の評価は、30対4で4週間後にpH 5（緩衝液P5）とpH 6（緩衝液P6）との両方について1 %未満、40対4で4週間後にpH 5（緩衝液P5）にて6 %未満、40対4で4週間後にpH 6（緩衝液P6）にて4 %未満の主ピークの変化を示す。

40

【表2】

表2

緩衝液	主ピーク% 0日目	4℃ 主ピーク%	30℃ 主ピーク%	40℃ 主ピーク%
P5	99.55	98.01	97.07	92.64
P6	99.02	98.60	97.71	95.00

50

【 0 0 2 7 】

チオフラビン T 結合アッセイを使用する物理的安定性試験

フィブリル化は、グルカゴンが水溶液中に形成される場合に一般的な問題である。本発明の化合物のフィブリル化のレベルを評価するために、チオフラビン T 結合アッセイを行う。

【 0 0 2 8 】

配列番号 2 の化合物を、ノミサイズの攪拌棒 (F i s h e r s カタログ # 1 4 5 1 3 6 4) を含む 2 . 5 m L の平底 F i s h e r バイアル (F i s h e r F S 6 0 9 6 5 D) 中で、1 m g / m L で種々の試験緩衝液中に溶解させる。試験緩衝液を H₂O 中で調製し、全て p H 6 . 0 に調整する。

緩衝液 1 = 2 0 m M のヒスチジン

緩衝液 2 = 1 0 m M のヒスチジン、1 5 0 n M の N a C l

緩衝液 3 = 1 0 m M のヒスチジン、3 0 0 m M のソルビトール

緩衝液 4 = 1 0 m M のヒスチジン、0 . 0 2 % の T w e e n 8 0

緩衝液 5 = 1 0 m M のヒスチジン、3 0 0 m M のアルギニン

緩衝液 6 = 1 0 m M のヒスチジン、3 0 0 m M のスクロース

【 0 0 2 9 】

加えて、ヒトグルカゴン (配列番号 1) を p H 2 . 8 の 1 2 m g / m L のグリセロール溶液中に溶解させて、1 m g / m L の最終グルカゴン濃度にする。全ての試料を、3 0 0 r p m に設定した磁気攪拌プレートにおいて 2 5 で機械的に圧力を加える。異なる試料のアリコート (各 1 0 0 μ L のアリコート、3 連で行う) を、0、4 0、及び 1 2 0 時間の時点で取り、プレートに加えた後、1 0 μ L の 1 m M チオフラビン T (T 3 5 5 1 6 - 2 5 G、S i g m a A l d r i c h) (H₂O 中の p H 2 . 8 の 1 m M 原液) を添加する。試料を 3 0 分間インキュベートする。励起波長として 4 4 0 n m を使用する S p e c t r a m a x M 5 (M o l e c u l a r D e v i c e s) を使用して蛍光を測定し、発光波長は、4 7 5 n m のカットオフ及び自動感度調整で、4 8 0 n m に設定する。S o f t m a x P r o 5 . 4 . 1 (M o l e c u l a r D e v i c e s) を用いて生データ収集し、エクセルに取り込む。各時点あたり 3 つのウェルの平均が、以下の表 3 に示す報告する蛍光単位となる。

【 表 3 】

表3

試料	t=0h	t=40h	t=120h
緩衝液1中の配列番号2	74. 6	76. 9	89. 2
緩衝液2中の配列番号2	130. 1	137. 3	137. 0
緩衝液3中の配列番号2	68. 1	71. 4	72. 4
緩衝液4中の配列番号2	51. 9	56. 2	57. 4
緩衝液5中の配列番号2	113. 9	120. 0	123. 2
緩衝液6中の配列番号2	78. 0	74. 1	88. 9
pH2. 8の12mg/mLのグリセロール中のヒトグルカゴン (配列番号1)	37. 9	620. 4	1416. 3
緩衝液1	33. 4	36. 4	34. 2
緩衝液2	30. 8	32. 7	31. 7
緩衝液3	34. 5	36. 5	36. 2
緩衝液4	27. 0	28. 8	26. 8
緩衝液5	43. 8	46. 1	44. 7
緩衝液6	51. 0	52. 8	55. 0
pH2. 8の12mg/mLのグリセロール	28. 2	31. 4	29. 4

表 3 に示すように、配列番号 2 の化合物は、目視評価とチオフラビン T 結合アッセイとの

両方によって評価して、機械的圧力の存在下で25及びpH6にて物理的安定性を維持する。配列番号2の化合物は、チオフラビンT結合アッセイによって測定して、フィブリル化を示さなかった。

【0030】

C57/B16雄マウスにおける化合物の血中グルコースレベルに対する効果

配列番号2の化合物の血中グルコースレベルに対する効果を決定するために、化合物をC57/B16マウスに投与する。生後3カ月の雄のC57BL6マウス(Harlan Laboratories)を使用する。動物を、12時間の明暗周期の温度制御された(24)設備中に個々に収容し、飼料及び水に自由にアクセスさせる。1週間設備に順化させた後、マウスを治療群に無作為に割り付ける(n=4/群)。試験化合物を緩衝液2中で調合する(チオフラビンT結合アッセイを使用する物理的安定性試験を参照されたい)。試験の朝、午前08:00に飼料を除去する。飼料を除去した2時間後、試験化合物を、0、1、3、または10µg/kgの用量で皮下に与える。血中グルコースを、ACCU-CHECK(登録商標)(Roche Diagnostics)血糖計を用いて、試験化合物投与後0、15、30、60、及び120分の時点で測定する。表4は、異なる時点でのグルコース値を示す。結果を、1群あたり4匹のマウスの平均±標準誤差平均(SEM)として表す。

【0031】

ED₅₀を、30分のグルコース測定値を元に計算する。10µg/kgの配列番号2の化合物での血中グルコースレベルを最大値とする。配列番号2の化合物については、ED₅₀は3.28µg/kgである(95%の信頼区間)。結果は、配列番号2の化合物が、血中グルコースを増加させることができることを示す。

【表4】

表4

時間(分)	配列番号2の化合物による投薬後の血中グルコースレベル(mg/dL)			
	0µg/kg	1µg/kg	3µg/kg	10µg/kg
0	141.0±2.0	165.3±16.7	148.0±4.6	155.4±10.1
15	185.1±11.5	212.0±12.6	234.1±9.8	270.0±12.7
30	193.5±14.6	203.1±13.1	242.1±8.3	308.5±2.6
60	170.8±6.2	169.9±10.1	169.4±7.3	212.4±8.3
120	140.2±3.0	141.0±4.2	148.2±10.9	152.4±1.5

【0032】

ヒトグルカゴン受容体結合アッセイ

配列番号2の化合物の結合を、ヒトグルカゴン受容体(hGR)(Lok Set al. Gene 140(2), 203-209(1994)、GenBank: L20316)を過剰発現している293HEK細胞株を使用することによって決定する。

【0033】

粗原形質膜を、懸濁または接着培養からの細胞を使用して調製する。細胞ペレットを、20µg/mlのデオキシリボヌクレアーゼ(Invitrogen, 18047-019)によって低張均質化緩衝液(25mMのトリスHCl、pH7.5、1mMのMgCl₂、及びEDTAなしのRoche Complete(商標)Inhibitor(Roche, 11873580001))中の氷上で融解させる。細胞懸濁液を、テフロン乳棒を25回使用してガラス製ダウンス型ホモジナイザーで均質化する。ホモジネートを、4で15分間、1800×gで遠心分離させた。上清を収集し、ペレットを、低張均質化緩衝液(デオキシリボヌクレアーゼなし)中に再懸濁させ、再度均質化した。混合

物を15分間 $1800 \times g$ で遠心分離させる。第2の上清を、第1の上清と組み合わせ、15分間 $1800 \times g$ で遠心分離させて澄ませる。この澄ませた上清を、4で30分間、 $25000 \times g$ で更に遠心分離させる。膜ペレットを、低張均質化緩衝液（デオキシリボヌクレアーゼなし）中に再懸濁させ、使用まで -80 で凍結アリコートとして貯蔵する。

【0034】

ヒトグルカゴンを、Perkin-Elmer/NEN（NEX207）にて、 ^{125}I -ラクトペルオキシダーゼ手順によって放射性ヨウ素標識し、逆相HPLCによって精製する。比放射能は約 2200 Ci/mmole である。 K_D 決定は、 ^{125}I 標識化グルカゴン物質中のプロパノール含量が高いため、飽和結合の代わりに相同競合アッセイによって行う。 K_D は 1.24 nM であると見積もり、これを使用して、試験した全ての化合物についての K_i 値を計算する。

10

【0035】

受容体結合アッセイを、1%の脂肪酸不含ウシ血清アルブミン（BSA）（Gibco、7.5% BSA）で事前にブロックしたコムギ胚芽凝集素（WGA）ビーズ（Perkin-Elmer）を用いて、シンチレーション近接アッセイ（SPA）（Sun, S., Almaden, J., Carlson, T. J., Barker, J. and Gehring, M. R. Assay development and data analysis of receptor-ligand binding based on scintillation proximity assay. Metab Eng. 7: 38-44 (2005))を使用して行う。グルカゴン（配列番号1）及び化合物（配列番号2）を、2 mMの濃度でジメチルスルホキシド（DMSO）中に溶解させ、 -20 で凍結貯蔵する。

20

【0036】

グルカゴン及び配列番号2の化合物をDMSO中で連続希釈する。 $10 \mu\text{L}$ の希釈した試料を、 $40 \mu\text{L}$ のアッセイ結合緩衝液（pH 7.4の25 mMの4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）、2.5 mMの CaCl_2 、1 mMの MgCl_2 、0.1%の脂肪酸不含BSA、0.003%のTween 20、及びEDTAなしのRoche Complete Inhibitorまたは冷グルカゴン（最終の $1 \mu\text{M}$ で非特異的結合（NSB））を含むCorning 3632透明底アッセイプレートに移す。 $90 \mu\text{L}$ の膜（ $3 \mu\text{g}$ /ウェル）、 $50 \mu\text{L}$ の ^{125}I 標識化グルカゴン（反応物中 0.15 nM の最終濃度）、及び $50 \mu\text{L}$ のWGAビーズ（ $150 \mu\text{g}$ /ウェル）を添加する。DMSO濃度は4.2%を超過しない。プレートを密封し、回転させて混合し、室温での12時間の沈降時間の後、MicroBeta（登録商標）シンチレーションカウンターで読み取る。

30

【0037】

結果を、化合物の存在下での特異的な ^{125}I 標識化グルカゴン結合のパーセントとして計算する。化合物の絶対 IC_{50} 濃度を、 ^{125}I 標識化グルカゴンの特異的結合パーセント対添加した試料の濃度（ $8.5 \times 10^{-12} \sim 0.5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ）の非線形回帰によって導く。 IC_{50} 用量を、Cheng-Prusoff等式を使用して K_i に変換する（Cheng Y., Prusoff W. H., Biochem. Pharmacol. 22: 3099-3108 (1973)）。配列番号2の化合物の K_i は、hGR結合については $0.397 \pm 0.062 \text{ nM}$ （ $n=7$ ）であった（ヒトグルカゴンの K_i は、hGR結合について $1.66 \pm 0.09 \text{ nM}$ （ $n=47$ ）であった）。このデータは、配列番号2の化合物が、ヒトグルカゴンと比較して増加した親和性でhGRと結合し、その受容体を活性化することでグルカゴン依存性生理的応答を引き起こし得ることを示す。

40

【0038】

マウスグルカゴン受容体結合アッセイ

配列番号2の化合物がマウスグルカゴン受容体（mGR）と結合するかどうかを決定す

50

るために、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに本質的に記載するような結合アッセイを行う。クローン化mGRを発現している懸濁培養液中の293HEK細胞から粗原形質膜を調製する。(Burcelin R, Li J, Charron MJ. Gene 164(2), 305-10(1995) GenBank: L38613)。膜ペレットを、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに記載のように調製し、均質化緩衝液中に懸濁させ、使用まで-80℃で凍結アリコートとして貯蔵する。

【0039】

ヒトグルカゴンを、Perkin-Elmer/NEN(NEX207)にて、 125 I-ラクトペルオキシダーゼ手順によって放射性ヨウ素標識し、逆相HPLCによって精製する。比放射能は約2200Ci/mmolである。 K_D 決定は、 125 I標識化グルカゴン物質中のプロパノール含量が高いため、飽和結合の代わりに相同競合アッセイによって行う。 K_D は2.05 nMであると見積もり、これを使用して、試験した全ての化合物についての K_i 値を計算する。

10

【0040】

S PA受容体結合アッセイ及び結果の計算を、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに記載のように実行する。配列番号2の化合物の K_i は、mGR結合については 0.494 ± 0.054 nM ($n=7$)であった(ヒトグルカゴンの K_i は、mGR結合について 1.37 ± 0.07 nM ($n=33$)であった)。このデータは、配列番号2の化合物が、ヒトグルカゴンと比較して増加した親和性でmGRと結合し、その受容体を活性化することでグルカゴン依存性生理的応答を引き起こし得ることを示す。

20

【0041】

グルカゴン様ペプチド1受容体結合アッセイ

配列番号2の化合物がヒトグルカゴン様ペプチド1受容体(hGLP-1R)と結合するかどうかを決定するために、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに本質的に記載するような結合アッセイを行う。粗原形質膜を、293HEK膜から単離したクローン化ヒトグルカゴン様ペプチド1受容体(hGLP-1R)(Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 196(1):141-6(1993) GenBank: NM_002062)を発現している293HEK懸濁細胞から調製する。膜ペレットを、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに記載のように調製し、均質化緩衝液中に懸濁させ、使用まで-80℃で凍結アリコートとして貯蔵する。

30

【0042】

グルカゴン様ペプチド1アミド(GLP-1アミド)(配列番号3)を、Perkin-Elmer/NEN(NEX308)にて、 125 I-ラクトペルオキシダーゼ手順によって放射性ヨウ素標識し、逆相HPLCによって精製する。比放射能は約2200Ci/mmolである。 K_D 決定は、 125 I標識化GLP-1物質中のプロパノール含量が高いため、飽和結合の代わりに相同競合アッセイによって行う。 K_D は 0.329 nMであると見積もり、これを使用して、試験した全ての化合物についての K_i 値を計算する。

【0043】

S PA受容体結合アッセイ及び結果の計算を、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイの放射性ヨウ素標識化グルカゴンの代わりに放射性ヨウ素標識化GLP-1アミドを使用することを除き、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに記載のように実行する。

40

【0044】

配列番号2の化合物の K_i は、hGLP-1R結合について 1221 ± 78 nM ($n=6$)であり、グルカゴン(配列番号1)の K_i は、 2098 ± 91 nM ($n=17$)であった(ヒトGLP-1 7-36アミドの K_i は、hGLP-1R結合について 0.427 ± 0.169 nM ($n=64$)であった)。このデータは、配列番号2の化合物が低い親和性でhGLP-1Rと結合するため、GLP-1R媒介性生理学的応答を引き起こさないことを示す。

【0045】

50

グルコース依存性インスリン分泌促進ペプチド受容体結合アッセイ

配列番号2の化合物がグルコース依存性インスリン分泌促進ペプチド受容体 (GIP-R) と結合するかどうかを決定するために、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに本質的に記載するような結合アッセイを行う。粗原形質膜を、懸濁培養からの細胞を使用して、ヒトGIP-R (R (Uzdin, T. B., Gruber, C., Modi, W., 及び Bonner, T. I., GenBank: A A A 8 4 4 1 8 . 1) を発現している懸濁チャイニーズハムスター卵巢細胞 (CHO-S) から調製する。膜ペレットを、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに記載のように調製し、均質化緩衝液中に懸濁させ、使用まで - 80 で凍結アリコートとして貯蔵する。

【0046】

GIP (配列番号4) を、Perkin-Elmer / NEN (NEX-402) にて、I-125-ラクトペルオキシダーゼ手順 (Markalonis, J. J., Biochem. J. 113: 299 (1969)) によって放射性ヨウ素標識し、逆相HPLCによって精製する。比放射能は2200 Ci / mmol である。K_Dの決定は、飽和結合の代わりに、冷ヒトGIPを使用する相同競合によって行う。K_Dは0.174 nM であると見積もり、これを使用して、試験した全ての化合物についてのK_i値を計算する。

【0047】

SPA受容体結合アッセイ及び結果の計算を、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイの放射性ヨウ素標識化グルカゴンの代わりに放射性ヨウ素標識化GIPを使用することを除き、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイに記載のように実行する。

【0048】

配列番号2の化合物のK_iは、ヒトGIP-R結合について1054 ± 167 nM (n = 7) であり、グルカゴン (配列番号1) のK_iは、3010 (n = 1) を超えた (ヒトGIP1-42のK_iは、0.279 ± 0.021 nM、n = 2であった)。このデータは、配列番号2の化合物が低い親和性でhGIP-Rと結合するため、hGIP-R媒介性生理学的応答を引き起こさないことを示す。

【0049】

ヒトグルカゴン受容体刺激cAMP機能アッセイ

hGR刺激cAMP機能アッセイは、ヒトグルカゴン受容体結合アッセイにおいて上に記載したhGR結合アッセイに使用したものと同一クローン化hGRを発現している細胞株を使用する。細胞を、グルカゴン、緩衝液対照、または試験試料で刺激し、細胞内で生成されたcAMPを、CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF Assay Kit (62AM4PEC) を使用して定量化する。手短に述べると、細胞内のcAMPレベルは、細胞融解緩衝液の存在下でのcAMP-d2捕捉抗体との結合によって検出される。キットで提供される第2の検出抗体である抗cAMPクリプテートを添加して、競合サンドイッチアッセイを創出する。検出抗体複合体が形成されると、Perkin-ElmerのEnvision (登録商標) 計器で測定される信号が増加する。

【0050】

hGR-HEK293細胞を、酵素不含細胞解離溶液 (Specialty Media 5-004-B) を用いてサブコンフルエント状態の組織培養皿から採取する。細胞を、室温で5分間100 × gでペレット化した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で2回洗浄する。洗浄した細胞ペレットを、Recovery (商標) 凍結培地 (Gibco 2044) 中に1 × 10⁷ 細胞 / ml で再懸濁させ、液体窒素中で凍結させる。処理当日に、細胞の凍結アリコートを、事前に温めた再懸濁細胞培地 (0.5%の既知組成FBS (HyClone SH30070) を含有するDMEM, Gibco (31053P)、pH7.4の20mMのHEPES、及び2mMのグルタミン) に移す。その後、細胞を、室温で5分間、100 × gでペレット化する。上清を除去し、細胞ペレットを、1.25 × 10⁵ 細胞 / ml で細胞培地 (0.1%の脂肪酸不含ウシ血清アルブミン、BSA、7.5% (Gibco 15620) を含むDMEM, Gibco (31053P)、pH7.4の20mMのHEPES、及び2mMのグルタミン) 中に再懸濁させる。試

10

20

30

40

50

験試料を、DMSO中の2mMの原液として調製し、必要時まで-20℃で凍結させる。
 グルカゴン、緩衝液対照、及び配列番号2の化合物を、DMSO中に連続希釈し、続いて、
 化合物希釈媒体(500μMのIBMXを含有するアッセイ媒体(0.1%の脂肪酸不
 含ウシ血清アルブミン、BSA、7.5%(Gibco 15620)を含むDMEM,
 Gibco(31053P)、pH7.4の20mMのHEPES、及び2mMのグルタ
 ミン))中に逡減希釈する。20μLの細胞(2500細胞/ウェル)またはcAMP標
 準曲線試料を黒色の96ウェルプレートハーフエリアプレート(Costar 3694
)に添加し、続いて、20μLの2倍濃縮グルカゴン、緩衝液対照、または配列番号2の
 化合物のいずれかを化合物希釈媒体に添加することによって、40μL中で反応を行う。
 最終DMSO濃度は1.1%を超過せず、最終IBMX濃度は250μMである。Cis
 Bio融解緩衝液中に希釈した20μLのcAMP-d2-捕捉抗体(CisBio)を
 添加することで反応を停止させた後、TITERTEKシェーカー中で穏やかに混合した。
 5分の融解の後、20μLの検出抗体である抗cAMPクリプテート(CisBio)
 を添加し、600rpmで1分間混合した後、300rpmで振盪させる。融解させた細
 胞と抗体との混合物を、Perkin-Elmer Envision(登録商標)を使用
 して、1時間後に室温で読み取る。Envision(登録商標)単位を、cAMP標
 準曲線を使用してpmol/L cAMP/ウェルに変換した。各ウェルで生成されたc
 AMPのピコモルを、グルカゴン対照で観察された最大応答のパーセントに変換する。相
 対EC₅₀値を、最大応答パーセント対添加したペプチドの濃度(0.17×10^{-12}
 $\sim 1 \times 10^{-8}$ M)を使用する非線形回帰分析によって導く。

10

20

【0051】

配列番号2の化合物は、 0.0356 ± 0.0071 nM (n=8)のEC₅₀でhGR
 と結合した(ヒトグルカゴンのEC₅₀は 0.0142 ± 0.0018 nM、n=6
 あった)。このデータは、配列番号1の化合物が、hGRと結合し、hGRを活性化し、
 それによりグルカゴン受容体媒介性生理学的応答を引き起こし得ることを示す。

【0052】

配列一覧

ヒトグルカゴン：

His - Ser - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Tyr -
 Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - Ser - Arg - Arg - Ala - Gln -
 Asp - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Met - Asn - Thr (配列番号
 1)

30

実施例 1

His - Ala - Gln - Gly - Thr - Phe - Leu - Ser - Asp - Tyr -
 Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - (Aib) - Lys - Lys - Ala - Gln -
 Glu - Phe - Val - Glu - Trp - Leu - Leu - Lys - Thr - Gly
 - Pro - Ser - Ser - Gly - Ala - Pro - Pro - Lys - Ser - Lys
 - NH₂ (配列番号2)

ヒトGLP-1：

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val -
 Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly - Gln - Ala - Ala - Lys -
 Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Arg -
 NH₂ (配列番号3)

40

ヒトGIP：

Tyr - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Ile - Ser - Asp - Tyr -
 Ser - Ile - Ala - Met - Asp - Lys - Ile - His - Gln - Gln -
 Asp - Phe - Val - Asn - Trp - Leu - Leu - Ala - Gln - Lys -
 Gly - Lys - Lys - Asn - Asp - Trp - Lys - His - Asn - Ile -
 Thr - Gln (配列番号4)

【配列表】

50

2017509584000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年6月16日(2016.6.16)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y s - A l a - G l n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y s - T h r - G l y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y s - S e r - L y s - N H ₂ (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む、化合物。

【請求項 2】

前記化合物が、H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r - A s p - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y s - A l a - G l n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y s - T h r - G l y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y s - S e r - L y s - N H ₂ (配列番号 2) のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の前記化合物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の前記化合物と、薬学的に許容される緩衝液とを含む、薬学的組成物。

【請求項 4】

前記薬学的に許容される緩衝液が、ヒスチジン緩衝生理食塩水である、請求項 3 に記載の前記薬学的組成物。

【請求項 5】

低血糖症を治療するための、請求項 3 又は 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

療法における使用のための、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

低血糖症の治療における使用のための、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記低血糖症治療用の医薬品の製造における使用のための、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】

請求項 2 に記載の前記化合物と、薬学的に許容される緩衝液とを含む、薬学的組成物。

【請求項 10】

前記薬学的に許容される緩衝液が、ヒスチジン緩衝生理食塩水である、請求項 9 に記載の前記薬学的組成物。

【請求項 11】

低血糖症を治療するための、請求項 9 又は 10 に記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

療法における使用のための、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 13】

前記低血糖症の治療における使用のための、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 14】

前記低血糖症治療用の医薬品の製造における使用のための、請求項 2 に記載の化合物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

配列一覧

ヒトグルカゴン：

H i s - S e r - G l n - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - T y r -
S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - S e r - A r g - A r g - A l a - G l n -
A s p - P h e - V a l - G l n - T r p - L e u - M e t - A s n - T h r (配列番号
1)

実施例 1

H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r - A s p - T y r -
S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y s - A l a - G l
n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y s - T h r - G l
y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y s - S e r - L y
s - N H ₂ (配列番号 2)

ヒトGLP-1：

H i s - A l a - G l u - G l y - T h r - P h e - T h r - S e r - A s p - V a l -
S e r - S e r - T y r - L e u - G l u - G l y - G l n - A l a - A l a - L y s -
G l u - P h e - I l e - A l a - T r p - L e u - V a l - L y s - G l y - A r g -
N H ₂ (配列番号 3)

ヒトGIP：

T y r - A l a - G l u - G l y - T h r - P h e - I l e - S e r - A s p - T y r -
S e r - I l e - A l a - M e t - A s p - L y s - I l e - H i s - G l n - G l n -
A s p - P h e - V a l - A s n - T r p - L e u - L e u - A l a - G l n - L y s -
G l y - L y s - L y s - A s n - A s p - T r p - L y s - H i s - A s n - I l e -
T h r - G l n (配列番号 4)

本発明は、以下の態様を含む。

[1]

H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r - A s p - T y r
- S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y s - A l a - G
l n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y s - T h r - G
l y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y s - S e r - L
y s - N H ₂ (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む、化合物。

[2]

前記化合物が、H i s - A l a - G l n - G l y - T h r - P h e - L e u - S e r -
A s p - T y r - S e r - L y s - T y r - L e u - A s p - (A i b) - L y s - L y
s - A l a - G l n - G l u - P h e - V a l - G l u - T r p - L e u - L e u - L y
s - T h r - G l y - P r o - S e r - S e r - G l y - A l a - P r o - P r o - L y
s - S e r - L y s - N H ₂ (配列番号 2) のアミノ酸配列からなる、[1]に記載の前
記化合物。

[3]

[1] または [2] に記載の前記化合物と、薬学的に許容される緩衝液とを含む、薬学
的組成物。

[4]

前記薬学的に許容される緩衝液が、ヒスチジン緩衝生理食塩水である、[2] に記載の
前記薬学的組成物。

[5]

有効量の [1] または [2] に記載の化合物を投与することを含む、対象における低血糖症を治療する方法。

[6]

療法における使用のための、 [1] または [2] に記載の化合物。

[7]

低血糖症の治療における使用のための、 [1] または [2] に記載の化合物。

[8]

低血糖症治療用の医薬品の製造における使用のための、 [1] または [2] に記載の化合物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/069643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/605 ADD.		
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) 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 practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/143208 A1 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; MARCADIA BIOTECH INC [US]; DIMARCHI) 17 November 2011 (2011-11-17) whole document esp. seq id no 1262 -----	1-8
A	WO 2013/004983 A1 (IMP INNOVATIONS LTD [GB]; BLOOM STEPHEN ROBERT [GB]) 10 January 2013 (2013-01-10) whole document esp. seq id no UPI000392A987 -----	1-8
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 April 2015		09/04/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brück, Marianne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/069643

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☒ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/069643

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011143208 A1	17-11-2011	AR 081042 A1	30-05-2012
		CA 2797089 A1	17-11-2011
		CN 103179976 A	26-06-2013
		EP 2568993 A1	20-03-2013
		JP 2013533849 A	29-08-2013
		KR 20130111923 A	11-10-2013
		RU 2012153753 A	20-06-2014
		TW 201143791 A	16-12-2011
		US 2013116172 A1	09-05-2013
		WO 2011143208 A1	17-11-2011
WO 2013004983 A1	10-01-2013	EP 2729493 A1	14-05-2014
		JP 2014520789 A	25-08-2014
		US 2014221280 A1	07-08-2014
		WO 2013004983 A1	10-01-2013

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	3/08	(2006.01)	A 6 1 P	3/08
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00
				A

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. テフロン

(72) 発明者 アルシナ - フェルナンデス, ジョルジ
 アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72) 発明者 カミンズ, ロバート チャドウィック
 アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72) 発明者 グオ, リリ
 アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

F ターム(参考) 4C076 AA12 BB13 BB15 BB16 BB31 CC21 DD23D DD60Z FF36
 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA19 CA59 DB35 MA17 MA55 NA14
 ZC35
 4H045 AA10 AA30 BA19 CA40 DA30 EA27 FA33