

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4562814号
(P4562814)

(45) 発行日 平成22年10月13日 (2010.10.13)

(24) 登録日 平成22年8月6日 (2010.8.6)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08
C O 7 K 14/00 (2006.01)	C O 7 K 14/00
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04

請求項の数 16 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-542894	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成10年3月31日 (1998.3.31)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2002-510194 (P2002-510194A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(43) 公表日	平成14年4月2日 (2002.4.2)		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/006514		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W01998/045427	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成10年10月15日 (1998.10.15)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	平成16年11月8日 (2004.11.8)	(74) 代理人	100064908
(31) 優先権主張番号	08/825,852		弁理士 志賀 正武
(32) 優先日	平成9年4月4日 (1997.4.4)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン様成長因子アゴニスト分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、及び配列番号：16 からなる群から選択したアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 2】

配列番号：4、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、及び配列番号：16 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる請求項1記載のペプチド。

【請求項 3】

配列番号：4、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：15、又は配列番号：16であるアミノ酸配列からなる請求項1記載のペプチド。

【請求項 4】

配列番号：9、配列番号：10、配列番号：15、又は配列番号：16であるアミノ酸配列からなる請求項1記載のペプチド。

【請求項 5】

配列番号：10、配列番号：15、又は配列番号：16であるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 6】

配列番号：104であるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項7】

配列番号：105、配列番号：106、配列番号：107、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：113、配列番号：114、配列番号：115、又は配列番号：116であるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項8】

配列番号：109、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、又は配列番号：121であるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項9】

配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125、配列番号：126、配列番号：128、配列番号：129、配列番号：130、配列番号：132、又は配列番号：133であるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項10】

位置2, 3, 4, 又は6でD-アラニン置換を、又は位置7, 8, 9, 11, 12, 13, 又は14でアルファ-アミノイソブチラート置換を有する配列番号：15のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項11】

位置2, 3, 又は6でD-アラニン置換を、又は位置7, 8, 9, 11, 12, 13又は14でアルファ-アミノイソブチラート置換を有する請求項10記載のペプチド。

【請求項12】

位置6でD-アラニン置換を、又は位置8, 9, 又は13でアルファ-アミノイソブチラート置換を有する請求項10記載のペプチド。

【請求項13】

YFGではなくAAである配列番号：15のC末端を有する請求項10記載のペプチド。

【請求項14】

YFGではなくAAである配列番号：15のC末端を有する請求項11記載のペプチド。

【請求項15】

YFGではなくAAである配列番号：15のC末端を有する請求項12記載のペプチド。

【請求項16】

請求項1-15のいずれか1項記載のペプチドをコードしている核酸分子。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明はインスリン様成長因子（IGFs）のアゴニストとして有用な分子に関する。より詳細には、これらの分子は、IGFと、1またはそれ以上のそのIGF結合タンパク質との相互作用を抑制する。そのような分子は、例えばIGFsが使用されるいずれかの方法、例えば高血糖症、肥満に関連した、神経学的な、心臓の、腎臓の、免疫学的な及び同化作用の疾患の治療において使用され得る。

背景及び関連技術の説明

IGFs（IGF-I, IGF-II, 及びIGF変異体）の作用と活性についての文献の大きな一団がある。ヒトIGF-Iは、成長ホルモン（GH）の作用を調節するインスリン様の及びマイトジェンの生物学的活性を持ったソマトメジンのファミリーに属している8.4のpIを持つ（RinderknechtとHumbel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2365 (1976); RinderknechtとHumbel, J. Biol. Chem., 253: 2769 (1978)）7649-ダルトンのポリペプチドである。Van Wykら、Recent Prog. Horm. Res., 30:259 (1974); Binoux, Ann. Endocrinol., 41: 157 (1980); ClemmonsとVan Wyk, Handbook Exp. Pharmacol., 57: 161 (1981); Baxter, Adv. Clin. Chem., 25: 49 (1986); 米国特許第4,988,675号; WO 91/03253; WO 93/23071。

GHのような、IGF-Iは、有力な同化作用タンパク質である。Tannerら, Acta Endocrinol., 84: 681-696 (1977); Uthneら, J. Clin. Endocrinol. Metab., 39: 548-554 (1974)。危篤状態での同化作用剤としてのインスリン、GH、及びIGF-Iの役割を考察す

10

20

30

40

50

るRossら, *Intensive Care Med.*, 19 Suppl. 2: S54-57 (1993) も参照。I G F-Iは、インスリンのそれに類似の低血糖作用を有し、ポジティブな窒素バランスをも促進する。Underwoodら, *Hormone Res.*, 24: 166 (1986) ; Gulerら, *N. Engl. J. Med.*, 317: 137 (1987) 。活性のこの範囲のために、I G F-Iは、創傷治癒、糖尿病の治療、全身異化作用状態の逆転、鬱血性心不全のような心臓条件の治療、及び神経学的疾患の治療のような広い異種の使用のためにヒトにおいて試験されている。Gulerら, *Proc. Natl. Acad. Sci U SA*, 85: 4889-4893 (1988) ; Duerrら, *J. Clin. Invest.*, 95: 619-627 (1995) ; 及び *Science*, 264: 772-774 (1994) 。

米国特許第5,273,961; 5,466,670; 5,126,324; 5,187,151; 5,202,119; 5,374,620; 5,106,832; 4,988,675; 5,106,832; 5,068,224; 5,093,317; 5,569,648; 及び4,876,242; WO 92/11865; WO 96/01124; WO 91/03253; WO 93/25219; WO 93/08826; 及びWO 94/16722は、I G F-Iを用いる哺乳動物、特にヒトの患者の各種治療方法を開示する。加えて、I G F-Iの臨床的な使用は、例えばBondy, *Ann Intern. Med.*, 120: 593-601 (1994) に記載される。

一つの特有な使用において、I G F-Iは、腎臓中で各種の作用を発揮することが見出されている。HammermanとMiller, *Am. J. Physiol.*, 265: F1-F14 (1993) 。先端巨大症に罹った患者で観測された腎臓のサイズにおける増加が糸球体濾過率の顕著な増加によって達成されることが10年間認識されている。O'SheaとLayish, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 3: 157-161 (1992) 。米国特許第5,273,961号は、急性腎不全の危険のある哺乳動物の予防的治療のための方法を開示する。ヒトにおいてI G F-Iは手術後の腎機能を保護することが示されている。Franklinら, *Am. J. Physiol.*, 272: F257-F259 (1997) 。通常の腎機能を持つヒトにおける該ペプチドの注入は、糸球体濾過率と腎臓血漿流を増加する。Gulerら, *Acta Endocrinol.* 121: 101-106 (1989) ; Gulerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2868-2872 (1989) ; Hirschbergら, *Kidney Int.*, 43:387-397 (1993) ; 米国特許第5,106,832。さらに、中等度減少腎機能に罹ったヒトは、糸球体濾過率と腎臓血漿流を増加することによって短期間(4日) I G F-I投与に応答する。それ故にI G F-Iは、慢性腎不全を整復する潜在的な治療薬である。O'Sheaら, *Am. J. Physiol.*, 264: F917-F922 (1993) 。I G F-Iが最終段階の慢性腎不全を経験しているそれらの腎機能を増加できるという事実にもかかわらず、I G F-Iの短期で得られた糸球体濾過率と腎臓血漿流の増加は長期投与の間持続することはなく、副作用の発生は高い。Millerら, *Kidney International*, 46: 201-207 (1994) 。

腎臓についてのI G F-Iの作用を完全に再考するために、例えばHammermanとMiller, *Am. J. Physiol.*, 265: F1-F14 (1993) 及びHammermanとMiller, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 5: 1-11 (1994) 。

I G F-Iのためのアナボリックな指示として、I G F-Iによって連続的に治療したH I V-感染患者において、そのI G F-Iは、同化作用を促進したが、しかしタキフィラキシーは、その患者において急激に発達した。Liebermanら, *U.S. Endocrine Meeting*, June 1993 (Abst. 1664) ; Liebermanら, *J. Clin. Endo. Metab.*, 78:404-410 (1994) 。重症の頭部損傷を受けた患者において、深い異化亢進及び窒素損失に関連した条件下に、I G F-Iの注入は一時的な正の窒素バランスのみを誘導した。最初の週において患者は正の窒素バランスを経験したが、第2週の間に負の窒素バランスが発達した。Chenら, *U.S. Endocrine Meeting*, June 1993 (Abst. 1596) 。

I G F-Iは、静脈内ボラス注射により投与した場合、インスリンのそれと類似のヒトにおける低血糖作用を有する。Underwoodら, *Hormone Research*, 24: 166 (1986) 。I G F-Iは、正規インスリンと類似して記載された時間の経過と共に、通常者(Gulerら, *N. Engl. J. Med.*, supra) 及び糖尿病患者(Schoenleら, *Diabetologia*, 34: 675-679 (1991)) ; Zenobiら, *J. Clin. Invest.*, 90:2234-2241 (1992) ; Sherwinら, *Hormone Research*, 41 (Suppl. 2) :97-101 (1994) ; Takanoら, *Endocrinol. Japan*, 37:309-317 (1990) ; Gulerら, *Acta Paediatr. Scand. (Suppl.)*, 367:52-54 (1990)) の両方においてグルコース低下を発揮することが知られる。組換えヒトI G F-I (rhIGF-I) 投与に続く増

10

20

30

40

50

加した低血糖認識を報告したKerrら, “Effect of Insulin-like Growth Factor 1 on the responses to and recognition of hypoglycemia,” American Diabetes Association (ADA), 52nd Annual Meeting, San Antonio, Texas June 20-23, 1992も参照。加えて、rhIGF-Iの単独投薬が一晩GHレベルとIDDMと共に青年期におけるインスリン要求を減じる。Cheethamら, Clin. Endocrinol., 40:515-555 (1994); Cheethamら, Diabetologia, 36: 678-681 (1993)。

Schalchら, J. Clin. Metab., 77:1563-1568 (1993) で報告されたような、II型糖尿病に対するrhIGF-Iの投与は、血清インスリン同様にCペプチドレベルにおける並行した減少の両方での低下を実証した。これは、IGF-I治療の5日後の膵臓のインスリン分泌における減少を示した。この作用は、Froeschら, Horm. Res., 42:66-71 (1994) によって独立に確認されている。通常ラットにおけるインビボ実験でもまた、IGF-I注射が膵臓のインスリン放出を抑制することが示される。Fursinnら, Endocrinology, 135: 2144-2149 (1994)。加えて、膵臓の灌流調製において、IGF-Iはまた、インスリン分泌を抑制した。Leahyら, Endocrinology, 126: 1593-1598 (1990)。これらはヒト及び哺乳動物におけるインスリン分泌についてのIGF-Iのインビボでの抑制的作用を明確にしたにも関わらず、インビトロ実験ではそのような均一な結果が得られていない。

RhIGF-Iは、インスリン感受性を改善する能力を有する。例えば、rhIGF-I (70 µg/kg bid) は、筋緊張性ジストロフィーに罹った皮糖尿病、インスリン耐性患者においてインスリン感受性を改善した。Vlachopapadopoulouら, J. Clin. Endo. Metab., 12: 3715-3723 (1995)。Saadら, Diabetologia, 37: Abstract 40 (1994) は、肥満症に罹った成人においてインスリン感受性の投薬量依存的改善及びrhIGF-I治療 (25 µgと100 µg/kg bid) の15日の後グルコース耐性が改善されたことを報告した。RhIGF-Iもまた、重症A型インスリン耐性に罹った何名かの患者 (Schoenleら, Diabetologia, 34:675-679 (1991); Morrowら, Diabetes, 42 (Suppl.):269 (1993) (abstract); Kuzuyaら, Diabetes, 42: 696-705 (1993)) 及び非-インスリン依存糖尿病においてインスリン感受性と血糖コントロールを改善した。Schalchら, “Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in type II diabetes mellitus”, in: Spencer EM, ed., Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors (New York: Elsevier: 1991) pp. 705-715; Zenobiら, J. Clin. Invest., 90: 2234-2241 (1993)。

選択した典型被験者におけるIGF-Iの投与のインスリン耐性及び可能性のある効果を生起する幾つかの臨床的表現型の病因学のための一般的なスキームは、幾つかの参考文献中に与えられる。例えば、Elahiら, “Hemodynamic and metabolic responses to human insulin-like growth factor-1 (IGF-I) in men,” in: Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors, (Spencer, EM, ed.), Elsevier, New York, pp.219-224 (1991); Quinnら, New Engl. J. Med., 323: 1425-1426 (1990); Schalchら, “Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in type I diabetes mellitus”, in: Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors, (Spencer EM, ed.), Elsevier, New York, pp. 705-714 (1991); Schoenleら, Diabetologia, 34: 675-679 (1991); Usalaら, N. Eng. J. Med., 327: 853-857 (1992); Liebermanら, J. Clin. Endo. Metab., 75:30-36 (1992); Zenobiら, J. Clin. Invest., 90: 2234-2241 (1992); Zenobiら, J. Clin. Invest., 89: 1908-1913 (1992); Kerrら, J. Clin. Invest., 91: 141-147 (1993) を参照。IGF-Iが日に二回、120-160 µg/kgの投薬量で臨床においてII型糖尿病患者を治療するために使用された場合、その副作用は治療の有効性に勝る。Jabriら, Diabetes, 43: 369-374 (1994)。IGF-Iによる患者の治療において観測された副作用に関するWilton, Acta Paediatr., 383: 137-141 (1992) も参照。

IGF結合タンパク質 (IGFBPs) は、IGFと結合する可能性もある他の関連したタンパク質と共に、少なくとも6のタンパク質のファミリーである (Jones and Clemmons, Endocr. Rev., 16: 3-34 (1995); Bach and Rechler, Diabetes Reviews, 3:38-61 (1995))。IGFBPsは、変化するアフィニティーと特異性によってIGF-IとIGF-IIに結合する。JonesとClemmons, supra; Bach and Rechler, supra。例えば、IGFBP-3は、類似のア

10

20

30

40

50

フィニティーによって IGF-I と IGF-II に結合するが、IGFBP-2 と IGFBP-6 は、それが IGF-I に結合するよりも、より高いアフィニティーで IGF-II に結合する。Bach と Reicher, supra; Oh ら, *Endocrinology*, 132, 1337-1344 (1993)。

大部分の成長因子と異なり、循環器系において高濃度で存在するが、しかし IGFs の極少量のフラクションは、タンパク質結合していない。例えば、ヒト又は齧歯動物において、血中 IGFs の 1% 以下が“遊離”で又は未結合形である。Juul ら, *Clin. Endocrinol.*, 44: 515-523 (1996); Hizuka ら, *Growth Regulation*, 1: 51-55 (1991); Hasegawa ら, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80: 3284-3286 (1995)。IGF-I 又は IGF-II、IGFBP-3、及び大タンパク質から構成された非共有結合した三重複合体の一部として血液循環中の IGFs の圧倒的大多数は、酸-不安定サブユニット (ALS) と称される。この複合体は、3つの構成要素のそれぞれの等モル量から構成される。IGF、IGFBP-3、及び ALS の三重複合体は、ほぼ 150,000 ダルトンの分子量を有し、且つそれは循環系内でのこの複合体の機能がレザバーとして及び遊離 IGF-I 又は IGF-II への急激な変化を防止する、IGF-I と IGF-II のためのバッファーとして奉仕するためとされ得ることが示唆されている。

IGF-I は、ヒト体液、例えば血液及びヒト脳脊髄液において自然に生じる。たとえ IGF-I が多くの組織で生産されるとしても、大部分の循環性 IGF-I は、肝臓において合成されると確信する。IGFBPs は、最初の結合タンパク質がグルコース代謝中に包含されるとして関連させている、IGFBP-1 によって (Lee ら, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 204: 4-29 (1993))、IGF-I の生物学的活性を調節すると確信される (Jones と Clemmons, supra)。Baxter, “Physiological roles of IGF binding proteins”, in: Spencer (Ed.), *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors* (Elsevier, New York, 1991), pp. 371-380。肝臓における IGFBP-1 生産は、その生産を直接抑制するインスリンによって、栄養状態によって調節される。Suikkari ら, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 66: 266-272 (1988)。

インビボにおける IGFBP-1 の機能は、乏しく理解される。ラットに対する精製したヒト IGFBP-1 の投与は、急性の、しかし少量の、血中グルコースの増加を生じることが示されている。Lewitt ら, *Endocrinology*, 129: 2254-2256 (1991)。IGFBP-1 の調節は、幾分良好に理解される。それは、血中グルコースが上昇し且つインスリンが分泌される場合、IGFBP-1 は抑制され、グルコース輸送についてインスリン作用をアシストするであろう“遊離”

IGF-I レベルをゆっくりと増加することが提案されている (Lewitt と Baxter, *Mol. Cell Endocrinology*, 79: 147-152 (1991))。そのようなシナリオは、血中グルコースの直接調節として IGFBP-1 の機能を設定する。

IGF 系は IGF-I、IGF-II、及びインスリンのための膜結合レセプターをも構成する。I 型 IGF レセプターは、そのシグナリング通路の幾つかの構造と形状においてインスリンレセプターに密接に関係付けられる。Jones と Clemmons, supra。IGF-II レセプターは、細胞内のシグナルを移送することがないように見える排除レセプターである。Jones と Clemmons, supra。インスリンレセプターに対してよりも、より高い親和力を持った I 型 IGF-I レセプターに IGF-I と IGF-II が結合することから、IGF-I と IGF-II の大部分の作用が I 型レセプターによって仲介されることは、ほぼ間違いない。Ballard ら, “Does IGF-I ever act through the insulin receptor?”, in Baxter ら, (eds.), *The Insulin-Like Growth Factors and Their Regulatory Proteins*, (Amsterdam: Elsevier, 1994), pp. 131-138。

IGFBPs に結合する IGF-I と IGF-II 上のドメインを同定するための多くの研究がなされている。Bayne ら, *J. Biol. Chem.*, 265: 15648-15652 (1990); 米国特許第 5,077,276; 5,164,370; 5,470,828。例えば、それは IGF-I と IGF-II の N-末端領域が IGFBPs に結合するために臨界であることが発見されている。米国特許第 5,077,276; 5,164,370; 5,470,828。かくして、des (1-3) IG-1 と定義した自然な IGF-I 変異体は、IGFBPs に不完全に結合する。

リサーチの類似の量が、I 型 IGF レセプターに結合する IGF-I と IGF-II 上のドメ

インを同定するため進展している。Bayneら, *supra*; Ohら, *supra*。位置24, 31と60で I G F-I中のチロシン残基は、I 型 I G F レセプターへの I G F-Iの結合を困難にする。Bayneら, *supra*。これらのチロシン残基の1又はそれ以上が置換された変異 I G F-I分子は、I 型 I G F レセプターに対して漸次減じられる結合を示した。Bayneら, *supra*, もまた、I G F-Iのそのような変異体が I 型 I G F レセプターとIGFBPsとに結合できたことを調査した。彼らは I G F-Iと I G F-II上の完全に異なる残基が、I 型 I G F レセプターに結合するために用いたそれからのIGFBPsに結合するために使用されることを見出した。それは従って、IGFBPsへの減じられた結合を示すが、しかしそれが I 型 I G F レセプターに良く結合することから、インビトロでの活性測定において維持された活性を示す、I G F 変異体を生産する可能性がある。

10

IGFBPsに結合するが、I G F レセプターにはしない且つそれ故にインビトロでの活性測定における減じられた活性を示す I G F 変異体も報告される。Barら, *Endocrinology*, 127: 3243-3245 (1990)。この変異体において(1-27,gly⁴,38-70)-hIGF-Iと定義したヒト I G F-IのC領域の残基28-37は、4つのグリシンブリッジによって配置される。Barらは、変異 I G F に又は I G F 自身へのIGFBPs結合の配置に基づいて心臓を経てのIGFBPとの複合体として灌流させた場合の変異 I G F-Iの輸送を研究した。I G F 変異体とIGFBPの複合体の局在化についてのデータのみが単独で与えられた I G F 変異体の局在化についてのBarらによって供給されたデータはなかった。さらにBarらは I G F 変異体の投与に応答するいずれかの生物学的な又は有効性についてのデータは提供していない。

端を切り取った他の I G F-I変異体が開示される。例えば、特許文献において、WO 96/33 216は、確かな I G F-Iの1-69残基を有する端を切り取った変異体を記載する。EP 742,22 8は、省略されたCドメインを有する自然に生じる単鎖 I G F-Iの誘導体である2-鎖 I G F-I超アゴニストを開示する。その I G F-I類似体は、式： BC^n 、Aである、

20

式中、Bは I G F-I又はその機能的類似体のBドメインであり、Cは I G F-I又はその機能的類似体のCドメインであり、nはCドメイン中のアミノ酸の数であり且つ約6から約12までである、及びAは I G F-I又はその機能的類似体のAドメインである。

さらに、Cascieriら, *Biochemistry*, 27: 3229-3233 (1988) は、I G F-Iの4つの変異体、I 型 I G F レセプターへの減じられたアフィニティーを有する3つを開示する。これらの変異体は：(Phe²³,Phe²⁴,Tyr²⁵) IGF-1 (1及び2型 I G F 及びインスリンレセプターへのそのアフィニティーにおいてヒト I G F-Iの備品である)、(Leu²⁴) IGF-Iと (Ser²⁴) IGF-I (ヒト胎盤 I 型 I G F レセプター、該胎盤インスリンレセプター、及びラットとマウス細胞の I 型 I G F レセプターに対する I G F-Iよりもより低いアフィニティーを有する)、及びデスオクタペプチド (Leu²⁴) IGF-I (I 型 I G F レセプターのための (Leu²⁴) IGF-Iより低いアフィニティーとインスリンレセプターのためのより高いアフィニティーを有する、位置24での芳香性の欠損がh I G F-Iのカルボキシ末端D領域の削除と結合される)である。これらの4つの変異体は、ヒト血清結合タンパク質に対し通常のアフィニティーを有する。

30

Bayneら, *J. Biol. Chem.*, 263: 6233-6239 (1988) は、ヒト I G F-Iの4つの構造類似体を開示する：I G F-Iの最初の16アミノ酸におけるB鎖変異体は、インスリン、(Gln³,Ala⁴) IGF-I, (Tyr¹⁵,Leu¹⁶) IGF-I, 及び (Gln³,Ala⁴,Tyr¹⁵,Leu¹⁶) IGF-IのB鎖の最初の17アミノ酸と置換される。これらの研究は、血清結合タンパク質と I G F-IIレセプターとの高いアフィニティーを維持することに応答可能である I G F-Iのドメインの幾つかを同定する。

40

Bayneら, *J. Biol. Chem.*, 264: 11004-11008 (1988) は、I G F-Iの3つの構造類似物を開示する：I G F-Iのカルボキシ末端8アミノ酸D領域を欠いている、(1-62) IGF-I ; I G F-IのC領域の残基28-37が4つの残基グリシンブリッジによって置換された(1-27,Gly⁴,38-70) IGF-I ; 及びC領域グリシン置換及びD領域削除を伴う、(1-27,Gly⁴,38-62) IGF-I。Peterkofskyら, *Endocrinology*, 128: 1769-1779 (1991) は、Bayneら, *supra* (Vol. 264) のGly⁴変異体を用いるデータを開示する。米国特許第5,714,460号は、I G F-I又は神経ダメージを治療するための I G F-Iの活性濃度を増加する化合物を使用する

50

ことに関する。

Cascieriら, J. Biol. Chem., 264: 2199-2202 (1989) は、IGF-IのA領域中の特異的残基がインスリンのA鎖における一致する残基によって置換された3つのIGF-I類似体を開示する。その類似体は：(Ile⁴¹,Glu⁴⁵,Gln⁴⁶,Thr⁴⁹,Ser⁵⁰,Ile⁵¹,Ser⁵³,Tyr⁵⁵,Gln⁵⁶) IGF-I, A鎖変異体、ここで残基41はトレオニンからイソロイシンまで変えられ且つA領域の残基42-56は置換される；(Thr⁴⁹,Ser⁵⁰,Ile⁵¹) IGF-I；及び(Tyr⁵⁵,Gln⁵⁶) IGF-Iである。

Clemmonsら, J. Biol. Chem., 265: 12210-12216 (1990) は、IGFBP-1のリガンド特異性と、IGF-Iの生物学的活性を調節することにおけるIGFBP-1の役割を研究するためI型IGFレセプター又は結合タンパク質のいずれか一方のための減じられた結合アフィニティを有するIGF-I類似物の使用を開示する。

10

WO 94/04569は、自然のIGFBP以外の特異的結合分子、即ちIGF-Iに結合することができ且つIGF-Iの生物学的活性を増大できる分子を開示する。

米国特許第5,593,844号と5,210,017号は、抗体の使用によって液体サンプル中のGH結合タンパク質又はIGFBPの量を定量化するために使用することができるリガンド介在免疫機能結合タンパク質アッセイを開示し、ここでは複合体形成がこれら結合タンパク質の一つとそれと結合するホルモンリガンドとの間で起こる。

IGF変異体の中のリサーチの方向性は、IGFBPsを結合することはないが、IGFレセプターへの維持された結合を示すIGF変異体を作製することに最も向けられている。そのような分子の研究に隠されたアイデアは、IGFの活性の抑制をすることが企図されるIGFBPsの主要な働きである。これら変異体中の主たるものは、IGFレセプターのためのアフィニティを未だに維持したIGF結合タンパク質の幾つかのための選択的に減じられたアフィニティを示す、自然の分子、des(1-3) IGF-Iである。米国特許第5,077,276号；5,164,370号；5,470,828号, supra。

20

IGFアゴニストとして作用する分子のための、及び高いアフィニティによってIGF結合タンパク質に結合する分子のための、及び特別な治療又は診断的な目的のための技術の必要性がある。

発明の開示

本発明は、その作用の一部として、IGFの作用をアゴナイズするためにIGFBP-1への結合によるようなIGFBPへのIGFの結合を抑制する放出因子を提供するための新規な方法に関する。従って、本発明は、(1-27, gly⁴, 38-70) -hIGF-Iを除く、ヒトIGFレセプターに結合することがないIGFBPに対する抗体を除く、及び位置24, 31, 及び／又は60で置換又は削除したチロシン残基を持つヒトIGF-Iの自然の配列を有するペプチドを除く、そのIGFBPsのいずれか1つとIGFとの相互作用を抑制し且つヒトIGFレセプターに結合しない化合物を提供する。

30

好ましくは、ここでの該化合物はIGFBP、好ましくは血清IGFBPに結合する。また好ましくは、該化合物は、哺乳動物中の血漿インスリン分泌を減じ、血漿GHを減じ、及び／又は血中グルコースレベルを減じる。

他の好適な実施態様において、ここでの化合物は、ペプチド、特に、約10から約25のアミノ酸残基を有する及び／又はそのN末端から位置5, 6, 7, 又は8と番号付けしたシステイン残基を有する又はそのC末端から位置5, 6, 7, 又は8と番号付けしたシステイン残基を、又はそのようなシステイン残基の両方を、又はそのN末端から位置2と番号付けしたシステイン残基を有するペプチドである。

40

別な実施態様において、本発明は以下のペプチドからなる群から選択されたアミノ酸配列を含んでいるペプチドを提供する：

BP3-B23	ELDGWVCIKVGEQNLCYLAEG (SEQ ID NO: 1)	
BP3-24	WFKTVCYEWEDEVQCYTLEEG (SEQ ID NO: 2)	
BP3-25	RVGAYISCSETECWVEDLLDG (SEQ ID NO: 3)	
BP3-4D3.11 (BP14)	VAWEVCWDRHDQGYICTTDS (SEQ ID NO: 4)	
BP3-4D3.11DEL	AWEVCWDRHQGYICTTDS (SEQ ID NO: 5)	
BP13	CWDRHDQGYICTTDS (SEQ ID NO: 6)	
BP3-4B3.3	EESECFEGPGYVICGLVG (SEQ ID NO: 7)	10
BP3-02-ox	DMGVCADGPWMYVCEWTE (SEQ ID NO: 8)	
BP3-01-ox	SEEVWCWPVAEWYLCNMWG (SEQ ID NO: 9)	
BP15	SEEVWCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO: 10)	
BP16	VCWPVAEWYLCNMWG (SEQ ID NO: 11)	
BP17	VCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO: 12)	
BP06	TGVDCQCGPVHCVCMDDWA (SEQ ID NO: 13)	
BP08	TVANCDCYMPCLCLCYDSD (SEQ ID NO: 14)	20
bp1-01	CRAGPLQWLCEKYFG (SEQ ID NO: 15)	
bp1-02	SEVGCRAGPLQWLCEKYFG (SEQ ID NO: 16)	

別な実施態様において、該ペプチドは、配列番号：104であるアミノ酸配列を含む。別な実施態様において、該ペプチドは、配列番号：105、配列番号：106、配列番号：107、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：113、配列番号：114、配列番号：115、又は配列番号：116であるアミノ酸配列を含む。更なる実施態様において、該ペプチドは、配列番号：109、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、又は配列番号：121であるアミノ酸配列を含む。更なる実施態様において該ペプチドは、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125、配列番号：126、配列番号：128、配列番号：129、配列番号：130、配列番号：132、又は配列番号：133であるアミノ酸配列を含む。

更に別な実施態様において、該ペプチドは、位置2, 3, 4, 又は6でD-アラニン置換又は位置7, 8, 9, 11, 12, 13, 又は14でアルファ-アミノイソブチラート置換、又は上記のいずれかの組合せを有する配列番号：15のアミノ酸配列を含む。好ましくは、このペプチドは位置2, 3, 又は6でのD-アラニン置換又は位置7, 8, 9, 11, 12, 13, 又は14でのアルファ-アミノイソブチラート置換、又は上記のいずれかの組合せを有する。より好ましくは、このペプチドは、位置6でのD-アラニン置換又は位置8, 9, 又は13でのアルファ-アミノイソブチラート置換を有する。更に好ましくは、ペプチドのこれら後者のセットは、YFGではなくAAである配列番号：15のC末端を有する。

また、製薬的に許容される担体中に、上記化合物又はペプチドの一つを含む組成物をここに提供した。好ましくは、この組成物は無菌である。

これらの化合物及びペプチドの使用は、外因性又は内因性IGFsの少なくとも1の生物学的活性を開放する又は増大する全ての使用を含む。それらは、後述するように、IGF-IのようなIGFが使用される、治療、抑制、又は予防条件において使用され得る。

また、そのIGFBPsのいずれか1つとIGFの相互作用を抑制し且つヒトIGFレセプターと結合しない化合物の有効な量を哺乳動物に投与することを含んでいる哺乳動物における

10

20

30

40

50

生物学的活性 I G F の血清又は組織レベルを増加するための方法をここにさらに提供した。好ましくは、この化合物はまた、哺乳動物中の血漿インスリン分泌、血漿 G H 分泌、または血中グルコースレベルをも減じ、且ついずれかの種からの内因性 G H の分泌又は放出を直接刺激しない。他の好適な実施態様において、この化合物は、IGFBP-1 及び／又は IGF BP-3 のような I G F B P に結合し、及び／又はヒト I 型 I G F レセプターと結合しない。加えて、該哺乳動物は、好ましくはヒトであり、且つ該化合物は、好ましくはペプチド、より好ましくは約 10 から約 25 アミノ酸残基を有するそれである。また該化合物を、好ましくは体重増加を生じるために有効な量において、哺乳動物中の同化作用の増加を生じさせるために投与することが好適である。血糖値制御が、該化合物が投与された後の哺乳動物中でもたらされることが更に好適である。

10

もしそれがペプチドであるなら、該化合物をコードしている単離した核酸も又提供され、インビボで又はエクスピボ遺伝子治療のため使用され得る。

この化合物は、単独で、或いは G H、G H 放出ペプチド (GHRP)、G H 放出因子 (GHRF)、G H 放出ホルモン (GHRH)、G H 分泌促進剤、I G F、IGFBP との組み合わせにおいての I G F、IGFBP、G H 結合タンパク質 (GHBP) との組合せにおいての G H、インスリン、又は低血糖剤（以下に定義したチアゾリジンジオンのようなインスリン感作剤を含む）のような別の剤と一緒に投与され得る。

本発明の更に別な態様において、その IGFBPs のいずれか 1 つと I G F との相互作用を抑制する及びヒト I G F レセプターに結合しない化合物の有効な量を哺乳動物に投与することを含む哺乳動物において血糖値制御を生じさせるための方法が提供される。好ましくは、該化合物は、哺乳動物中の血漿インスリン分泌及び血中グルコースレベルをも減じ、且つ IGFBP を結合する。また好ましくは、該哺乳動物は、糖尿病のような高血糖症疾患を有する。この方法は、低血糖剤又はインスリンの有効量を該哺乳動物に投与することを補足的に含み得る。

20

また、哺乳動物における生物学的活性 I G F の血清及び組織レベルを増加するための方法及び哺乳動物において同化作用を増加するための方法、又はここでの化合物を含有する有効量の組成物を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において血糖値を制御するための方法が提供される。

別な実施態様において：

(a) 体液中の I G F のレベルを測定すること；

30

(b) 単一又は複数投薬を用いこの化合物と該液とを接触させること；及び

(c) 該液中の I G F のレベルを再測定すること、ここでもし該液の I G F レベルが、該化合物が投与されたために望まれる効力を生じさせるために十分な量によって低下しているならば、該化合物の投薬量が最大限の効力を生じさせるために調節可能であり又は調節される、

を含む、I G F とその IGFBPs のいずれか 1 つとの相互作用を抑制し且つヒト I G F レセプターに結合しない、化合物の妥当な投薬量を測定するための方法が提供される。

更に別の実施態様において、該化合物の投薬量が妥当に調節され得るように生物学的液体中の特有の IGFBP の量を又は特有の IGFBP に結合する該化合物の量を測定するための方法が提供される。この方法は：

40

(a) 該液体と、1) 固相担体に付着した第 1 の抗体とを接触させること、該第 1 の抗体は、抗体の存在中で I G F 結合サイトが該化合物に結合するための IGFBP 上に利用可能に残るように IGFBP 上のエピトープのために特異的であり、それによって該第 1 の抗体と IGFBP との間の複合体を形成すること；及び 2) IGFBP 上の全ての利用可能な I G F 結合サイトを飽和させるために十分な時間、上記同定した化合物と接触させること、それによって飽和した複合体を形成すること；

(b) 該化合物が IGFBP に結合される場合に結合に利用可能である該化合物上のエピトープに特異的である検出可能に標識した第 2 の抗体と該飽和した複合体とを接触させること；及び

(c) 生物学的液体中の IGFBP の指標として、且つそれ故に結合した該化合物の量の指標と

50

して、標識した第2の抗体結合の量を定量分析すること、を含む。

また、ここでの化合物を含む製薬組成物及び該組成物を使用するために使用者向けの指示書を含めた容器を含むキットがここに意図される。このキットは、GH、GHRP、GHRF、GHRH、GH分泌促進剤、IGF、IGFBPとのIGF複合体、IGFBP、GHPBと複合したGH、インスリン、又は低血糖剤を含む容器を任意に更に含み得る。

また、リガンドに結合するポリペプチドと競合するペプチドのリガンドに対する相対アフィニティを予測するための方法がここに包含され、該ペプチドはファージ-ディスプレイライブラリーから誘導され、該リガンドの存在において該ポリペプチドと、該ペプチドに一致するファージミドクロンをインキュベートすること、該ファージを順次希釈すること、及び該ペプチドによって抑制される該リガンドに対するファージミドクロンの結合に対する度合を測定すること、ここで低いファージ濃度でのみ抑制されるファージミドクロンは、高い及び低いファージ濃度の両方で抑制されるファージミドクロンよりもリガンドへのより高いアフィニティを有する、を含む方法である。

ここでの別な実施態様において、そのサイトに普及した、又は該サイトから不在のいずれかであるIGFBPに特異的であるここでの化合物の有効な量を哺乳動物に投与することを含む哺乳動物中の特有なサイトの別の方向に、又はその方向のいずれかに内因性IGFを導くための方法である。

更なる実施態様は、IGF結合タンパク質に結合した内因性又は外因性IGFを、又はIGF結合タンパク質に結合し且つIGF結合タンパク質に結合したヒトIGFレセプターに結合しない化合物の量を検出する、又は生物学的液体中の未結合IGFレベルを検出するための方法であり：

(a) 該液体と、1) 固相担体に付着した化合物を検出するための手段とを接触させること、該手段は、該化合物の存在中でIGF結合サイトがIGF結合タンパク質に結合するための化合物上に利用可能に残るよう該化合物に特異的であり、それによって該手段とIGF結合タンパク質との間の複合体を形成すること；及び2) IGF結合タンパク質上の利用可能なIGF結合サイトの全てを飽和するために十分な時間、該化合物と接触させること、それによって飽和した複合体を形成すること；

(b) 該化合物がIGF結合タンパク質に結合される場合に結合に利用可能であるIGF結合タンパク質のために特異的である検出可能に標識した第2の手段と、該飽和した複合体とを接触させること；及び

(c) IGFBPの指標として、且つそれ故に、結合した化合物とIGF結合タンパク質、結合したIGFとIGF結合タンパク質、又は該液体中に存在する活性IGFの指標として、結合した標識した手段の量を定量分析すること、を含む。

IGFの作用においてIGFBPsの役割についての多くの論議がある。各種の状況においてIGFsの活性は、抑制され、増大され、又はIGFBPsの存在によって影響されないいずれか一方とされることが示されている。JonesとClemmons, *supra*; BachとRechler, *supra*。もしIGFBPsがIGFsの何らかの作用の義務を負わされるなら不明確とされている。何らかの作用のために、IGFBPsに結合されるべきIGFsのために必要とされる、又はもしIGF-Iが完全に活性化されたならば、存在すべきIGFBPsのためにそれが必要とされたことが可能であると思われた。本研究の前に、何がそのIGFBPsのいずれか1つによってIGFの相互作用を抑制する分子を投与することのインビボでの正味の生物学的作用とされるであろうことは不明確であった。

ここでの化合物は、その後者が短い半減期と効果を有すること、それに対してここでの化合物が長い半減期と効果を有していること、及び、もしそれがIGFBPsに結合するならば、この結合が短鎖ペプチドと他の小さな分子に急速に他方を排除するであろう通常の腎臓の濾過を回避することから、des (1-3) IGF-IのようなIGF変異体に勝っている。更に、外因性GH又はGH分泌促進物質と一緒にここでの化合物を投与することは、そのようなGHと分泌促進剤の糖尿病誘発性作用を最上限にする有効性を有するであろう。ここでの

10

20

30

40

50

化合物の更に別の有効性は、ここでの I G F アゴニスト化合物の作用の上限を決めることである。即ち、それは、もしその最大効力を越える高い濃度で使用したならば、望ましくない副作用を有し得る、I G F -Iとは異なり、搬送 I G F s へのIGFBPsの最大許容量よりもより効果的に発揮できない。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、Y 2 4 L, Y 3 1 A, 又は (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1, 又は I G F -Mとしてここに定義した I G F -I変異体をコードしている D N A の 5 ' 末端で接合した lamB シグナルの核酸配列 (配列番号: 1 7) と翻訳したアミノ酸配列 (配列番号: 1 8) を表し、位置 2 4 で Tyr が Leu に変わり、位置 3 1 で Tyr が Ala に変えられる。

図 2 は、p131TGF のベクターフラグメントからの、pBKIGF-2B の 120-bp と 190-bp フラグメントからの、及び D N A の合成片からの、プラスミド pIGFMI の構築を表す。

図 3 は、pIGFMI の完全ヌクレオチド配列 (配列番号: 1 9) を表す。

図 4 は、I G F -I (四角) 又は (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 (丸) が KIRA リン酸化アッセイにおいて M C F -7 細胞に加えられる場合のレセプターリン酸化のための標準曲線である。

図 5 は、I G F -I 又は (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 を用いるマウス 3 T 3 細胞中へのチミジン混入を示す。

図 6 は、IGFBP-1 への (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 の結合アフィニティーを示す。

図 7 は、IGFBP-3 への (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 の結合アフィニティーを示す。

図 8 A と 8 B は、平均化し且つ 1 0 0 % にセットした前処置血液サンプルでの値のパーセンテージとして表した、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 (黒丸) 又はコントロール (PBS) (白四角) によって、第 1 の実験において処置した通常ラットの血漿グルコース (図 8 A) と血漿インスリン (図 8 B) の応答を表す。

図 9 A と 9 B は、平均化し且つ 1 0 0 % にセットした前処置血液サンプルでの値のパーセンテージとして表した、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 (黒三角)、又は I G F -I (黒丸)、又はコントロール (PBS) (白四角) によって、第 2 の実験において処置した通常ラットの血漿グルコース (図 9 A) と血漿インスリン (図 9 B) の応答を表す。

図 1 0 A と 図 1 0 B は、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1、I G F -I、又はコントロールによって処置した糖尿病ラットの基線 (1 0 0 % としてセット) からの血漿インスリン (図 1 0 A) 及び基線 (1 0 0 % としてセット) からの血漿グルコース (図 1 0 B) におけるパーセンテージ変化を示す。

図 1 1 A と 図 1 1 B は、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1、I G F -I、又はコントロールによって、第 2 の実験において処置した糖尿病 (ZDF) ラットの基線 (1 0 0 % としてセット) からの血漿インスリン (図 1 1 A) 及び基線 (1 0 0 % としてセット) からの血漿グルコース (図 1 1 B) におけるパーセンテージ変化を示す。

図 1 2 は、7 日間にわたり、2 つの投薬量での (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 によって、G H によって、G H と (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 の組合せによって、又はコントロールによって、処置したラットの最終体重を示す。

図 1 3 A と 1 3 B は、図 1 2 についての上述した実験における脾臓の重量を示し、図 1 3 A は絶対脾臓重量を示し、図 1 3 B は体重のパーセンテージとして表した脾臓重量を示す。

図 1 4 A と 1 4 B は、図 1 2 についての上述した実験における胸腺の重量を示し、図 1 4 A は絶対胸腺重量を示し、図 1 4 B は体重のパーセンテージとして表した胸腺重量を示す。

図 1 5 A と 1 5 B は、図 1 2 についての上述した実験における心臓の重量を示し、図 1 5 A は絶対心臓重量を示し、図 1 5 B は体重のパーセンテージとして表した心臓重量を示す。

図 1 6 は、図 1 2 についての上述した実験における 5 つの処置群からの骨端のプレート幅を示す。

図 1 7 A と 1 7 B は、図 1 2 について記載した実験における 5 つの処置群中のラット I G F -I の量 (図 1 7 A) と全 I G F -I の量 (図 1 7 B) を示す。

図18は、プラシーボ（白四角）、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1（白三角）、IGF-I（白丸）、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1とIGF-Iの組合せ（黒四角）、GH（半白／半黒四角）、及び(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1とGHの組合せ（黒四角）で処置したdwarfラットの7日間にわたる最終体重を表す。

図19Aと19Bは、図18についての上述した実験における脾臓の重量を示し、図19Aは絶対脾臓重量を示し、図19Bは体重のパーセンテージとして表した脾臓重量を示す。

図20Aと20Bは、図18についての上述した実験における腎臓の重量を示し、図20Aは絶対脾臓重量を示し、図20Bは体重のパーセンテージとして表した脾臓重量を示す。

図21Aと21Bは、図18について記載した実験における6つの処置群での血液中のラットIGF-Iの量（図21A）と全IGF-Iの量（図21B）を示す。

図22Aと22Bは、賦形剤コントロールで（黒三角）、150 µgの(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1でtid（一日に三度）（白四角）、50 µgの(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1でtid（白丸）及び50 µgのIGF-Iでtid（黒丸）、処置した糖尿病ラットの長期間にわたる体重増加（図22A）と血中グルコースレベル（図22B）を表す。

図23Aと23Bは、図22について記載した実験における血中グルコースレベルの増加（図23A）とインスリンレベルの変化（図23B）を示す。コントロールは黒バーで、150 µgの変異体は暗斜線バーで、50 µgの変異体は明斜線バーで、及びIGF-Iは白バーで示した。

図24はファージライブラリーを構築するためのテンプレートとして使ったプラスミドpt4.g8のDNA配列（配列番号：20）を表す。またバクテリオファージM13のg8pに融合した抗体-認識可能（gd-tag）ペプチドのアミノ酸配列（配列番号：20）も示される。

図25は、4つのライブラリープールのそれぞれと、標的IGF-I、IGFBP-1、及びIGFBP-3を用いる選択による遺伝子-8固有ファージライブラリー富化を示す。

図26は、IGFBP-3選択からのg8-ファージペプチドを用いるIGF-I遮断アッセイを示し、ここでファージ滴定は100nM IGF-Iによる。該図中、白丸はペプチド4A3.1であり、白三角はペプチド4B3.4であり、白四角はペプチド4C3.2であり、黒丸はペプチド4D3.3であり、黒三角はペプチド4D3.4であり、黒四角はペプチド4D3.5である。

図27は、IGFBP-3選択からのg8-ファージペプチドを用いるIGF-I遮断アッセイを示し、ここでファージ滴定はIGF-Iなしである。ペプチドのために定義は図26についての上記したそれと同じである。

図28は、IGFBP-1選択からのg8-ファージペプチドを用いるIGF-I遮断アッセイを示し、ここでファージ滴定は1 µM IGF-Iによる。

図29は、IGFBP-3選択からのg8-ファージペプチドを用いるIGF-I遮断アッセイを示し、ここでペプチド（4C3.2, 4D3.8, 4D3.9, 4D3.11, 及び4D3.12）は、NEUTRAVIDINTM/DTT選択からとする。黒バーは100 µM IGF-Iによるもので、白バーはIGF-I無しである。

図30は、IGFBP-3選択からのg8-ファージペプチドを用いるIGF-I遮断アッセイを示し、ここでペプチド（x軸上に示した）は、直接-被覆/HCl選択からとする。黒バーは100 µM IGF-Iによるもので、白バーはIGF-I無しである。

図31は、遊離結合タンパク質を測定するためにBIAcoreTM表面プラスモン-共鳴装置を用いIGFBP-3に結合するペプチド（BP3-01と定義した）によるIGFBP-3抑制の競合アッセイを表す。丸はIGF-Iの800応答単位（RU）を示し、四角は固定化したIGF-Iの400RUを示す。

図32は、遊離結合タンパク質を測定するためにBIAcoreTM表面プラスモン-共鳴装置を用いIGFBP-3に結合するペプチド（BP3-02と定義した）によるIGFBP-3抑制の競合アッセイを表す。丸はIGF-Iの800RUを示し、四角は固定化したIGF-Iの400RUを示す。

図33は、IGFBP-1又はIGFBP-3に結合するが、I型IGFレセプターに結合しない3つの

10

20

30

40

50

ペプチドによってプレート上の I G F -I へのビオチン化IGFBP-1結合の抑制を示す (bp1-01:黒丸、bp1-02:白丸、及びbp3-01-ox:白三角)。

図 3 4 は、IGFBP-1に結合するが、I 型 I G F レセプターに結合しない 2 つのペプチドによってプレート上の I G F -I へのビオチン化IGFBP-3結合の抑制を示す (bp1-01 (bp3) :黒丸、bp1-02 (bp3) :白丸)。

図 3 5 は、IGFBP-3を抑制するため、IGFBP-3に結合するが、I 型 I G F レセプターに結合しない 2 つのペプチドの能力の放射能標識 I G F -I プレートアッセイを示す (bp3-01-ox:丸、bp3-02:四角)。

図 3 6 は、IGFBP-1を抑制するため、図 3 5 について記載した 2 つのIGFBP-3結合ペプチドの能力の放射能標識 I G F -I プレートアッセイを示す (シンボルは同じ)。

図 3 7 は、3 つのペプチドを用いる I G F -I 活性のKIRAアッセイを表す (bp1-01:四角、bp1-02:丸、及びbp3-ox:三角)。図 3 7 A は、ペプチド単独を表し、図 3 7 B はペプチドプラス I G F -I プラスIGFBP-1を表し、図 3 7 C はペプチドプラス I G F -I を表し、図 3 7 D はペプチドプラス I G F -I プラスIGFBP-3を表す。

図 3 8 は、遊離結合タンパク質を測定するためBIAcoreTM表面プラスモン-共鳴装置を用い、bp3-01-ox (白四角)、BP14 (白丸)、BP15 (黒丸)、及びBP17 (黒四角) で定義した、4 つのペプチドによるIGFBP-3抑制の I G F -II 競合アッセイを表す。各ペプチド A 20nM IGFBP-3と固定化 I G F -II の約1500RUを用い試験した。

図 3 9 は、H₂O溶液中 3 0 °C でのIGFBP-1 (bp1-01) へのペプチド結合の一次元¹H NMR スペクトルを表す。

図 4 0 A と 4 0 B は、溶液中のペプチドbp1-01の構造の三次元モデルを開示する。これらはNMR データから得た制限を用いて計算した構造の総体からのp1-01の表現構造の立体表示である。バックボーン部分はリボンとして表し、側鎖重原子の全てが示され; 各非グリシン残基が標識される。二つの視界はほぼ 9 0 ° 相違する。その相対平面疎水性表面 (図 4 0 A 中の左、及び図 4 0 B 中の視界の方向) は、自己会合が含まれ、IGFBP-1 結合も含まれ得る。

図 4 1 は、通常のヒトからの血清中に存在する内因性IGFBPsから¹²⁵I - I G F -I を移す変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1の能力を実証するクロマトグラムである。データはフラクション (n=1) 当たりの c p m として表した。該図中、丸を伴う実線はインキュベーションの 1 の時点での変異体であり、丸を伴う長ダッシュ線はインキュベーションの 0.5 時間の時点での変異体であり、ダイヤモンドを伴う短ダッシュ線はインキュベーションの 3 時間の時点での変異体であり、及び四角を伴う短ドット線はインキュベーションの 1 6 時間の時点での変異体である。

図 4 2 は、プラシーボ (p) 又は一日二度の皮下注射によって 1 2 週間、rhIGF-1 の 10 (1)、20 (2)、40 (4)、又は 80 (8) µg/kg で処置した II 型糖尿病患者の血液中の I G F -I の濃度を示す。

図 4 3 は、図 4 2 について記した通りに処置した患者の血液中の I G F -II の濃度を示す。

図 4 4 は、図 4 2 について記した通りに処置した患者の血液中のIGFBP-3の濃度を示す。

好適な実施態様の記載

A. 定義

ここで用いた通り治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家畜、及び飼育動物、及び動物園、スポーツ用、又は愛玩用動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウシなどを含む、哺乳動物として分類されたいずれかの動物に関する。ここでの好ましい哺乳動物はヒトである。用語「非成人」は、周産期から (低誕生重乳児のような) 成熟期に達するまでの、その後者は完全な成長可能性にまで達していないそれらである、哺乳動物に関する。

ここで用いた通り「I G F」は、自然インスリン様成長因子-I及び自然インスリン様増殖因子-II、同様に他方ではdes (1-3) IGF-Iとして知られる脳 I G F のようなその自然変異体に関する。

10

20

30

40

50

ここで用いた通り「IGF-I」は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、及びヒトを含む何れかの種、好ましくはヒトからの、及びもし外因性投与に関係するならば、自然、合成又は組換えの何れかの1つの、何れかのソースからのインスリン様成長因子-Iに関する。ヒト自然-配列、成熟IGF-I、より好ましくはN末端メチオニンを除いたものが、例えば、1987年8月5日公開のEP 230,869; 1984年12月19日公開のEP 128,733; 又は1988年10月26日公開のEP 288,451中に記載された方法により調製される。より好ましくは、この自然-配列IGF-Iは、組換え的に生産され且つ臨床的研究のためにはジェネンテック社, South San Francisco, CAから利用可能とされる。

ここで用いた通り「IGF-II」は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、及びヒトを含む何れかの種、好ましくはヒトからの、及びもし外因性投与に関係するならば、自然、合成又は組換えの何れかの1つの、何れかのソースからのインスリン様成長因子-IIに関する。それは、例えば上記EP 128,733中に記載した方法によって調製され得る。

「IGFBP」又は「IGF結合タンパク質」は、それが循環性(即ち血清又は組織中)であろうとなかろうと、IGF-I又はIGF-IIと通常は結合する又は結合した又は複合化したタンパク質又はポリペプチドに関する。そのような結合タンパク質は、レセプターを含まない。この定義は、IGFBP-1、IGFBP-2、IGFBP-3、IGFBP-4、IGFBP-5、IGFBP-6、Mac25 (IGFBP-7)、及びプロスタサイクリン-刺激因子(PSF)又は内皮細胞-特異的分子(ESM-1)、同様にIGFBPsに高い相同性を持つ他のタンパク質を含む。Mac25は、例えば、Swiss elmら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 4472-4476 (1995) とOhら, J. Biol. Chem., 271: 30322-30325 (1996) 中に記載される。PSFは、Yamauchiら, Biochemical Journal, 303: 591-598 (1994) 中に記載される。ESM-1は、Lassalleら, J. Biol. Chem., 271: 20458-20464 (1996) 中に記載される。他に同定されたIGFBPsのため、例えば、1990年6月27日公開のEP 375,438; 1990年5月23日公開のEP 369,943; 1989年10月5日公開のWO 89/09268; Woodら, Molecular Endocrinology, 2: 1176-1185 (1988); Brinkmanら, The EMBO J., 7: 2417-2423 (1988); Leeら, Mol. Endocrinol., 2: 404-411 (1988); Brewerら, BBRC, 152: 1289-1297 (1988); 1988年12月7日公開のEP 294,021; Baxterら, BBRC, 147: 408-415 (1987); Leungら, Nature, 330: 537-543 (1987); Martinら, J. Biol. Chem., 261: 8754-8760 (1986); Baxterら, Comp. Biochem. physiol., 91B: 229-235 (1988); 1989年9月21日公開のWO 89/08667; 1989年10月19日公開のWO 89/09792; 及びBinkertら, EMBO J., 8: 2497-2502 (1989) を参照。

用語「体液」は、哺乳動物からの、好ましくはヒトからの液の生物学的サンプルに関する。そのような液は、血清、血漿、リンパ液、滑液、小胞液、精液、羊膜液、乳液、全血、尿、脳脊髄液、唾液、涙液、汗、粘液、組織培養培地、組織抽出液、及び細胞の抽出液のような水性流体を含む。

ここで用いた通り「ヒトIGFレセプター」は、ヒトにおいて見出されたIGFのための何れかのレセプターに関し、胎盤1型IGF-Iレセプター等のような、ヒトIGF-IとIGF-IIの両者に結合する、ヒトにおける1型と2型IGFレセプターを含む。

そのIGFBPsの何れか1つとIGFとの相互作用を「抑制する」又は「防止する」化合物は、たとえこの増加が生じるとしても、生物学的に活性なIGFの血清及び組織レベルを増加する分子に関する。例えば、該化合物は、IGFがそのIGFBPsの1又はそれ以上と結合した複合体から活性なIGFを部分的に又は完全に移し替えができる。この定義の下に該化合物は、IGFBPに結合でき、且つそれによってIGFBPに依然結合した内因性IGFを移し替えるように作用する可能性があり、又はそのIGFBPsの1又はそれ以上とIGFとの相互作用を抑制又は防止するためにレセプター相互作用に含まれたそれから離れたサイトでIGF自身に結合でき、しかしそのレセプターの何れかとIGFとの相互作用は抑制又は防止しない。更に、該化合物がIGFBPsを占めると同時に、その三重複合体における効果は、二重複合体が三重のそれを形成できるかどうかに基づくであろう。ALSと複合体を形成できるIGFアゴニスト化合物は、IGFsと置き換えられるであろうが、しかしIGFBP-3の又は三重複合体の濃度に影響を及ぼさない。ALSと複合体を形成できないIGFアゴニスト化合物は、IGFBP-3を占有するであろうし、ALS/IGFBP-3/IGF複合体の量は減じ

10

20

30

40

50

られるであろう。これは、三重複合体を形成し得る完全長 I G F 変異体とそれができない小さなペプチドとの間の相違であろう。ここでのペプチドの実例的な一つの構造と IGFBP とその相互作用に関しては、後述の実施例 9 を参照。

「I G F 結合タンパク質と結合する」化合物は、高いアフィニティーであろうとなかろうと、少なくともいくつかの度合で IGFBP を結合する化合物に関する。

「ヒト I G F レセプターに結合しない」化合物は、何れかのそのようなレセプターに全てが結合せず、又は約 200 倍より大きく、そのようなレセプターに結合する野生型ヒト I G F -I (hIGF-I) 又は野生型ヒト I G F -II (hIGF-II) より小さいアフィニティーを持つそのようなレセプターに結合する。好ましくは、該化合物は約 250 倍よりも大きく、同じレセプターに結合する野生型 hIGF-I 又は hIGF-II よりも小さいか又は全てに結合しないアフィニティーを持ったそのようなレセプターに結合する。そのような化合物は、ヒト I 型 I G F レセプターをリン酸化せず、KIRA 及び実施例 1 のマウス 3 T 3 アッセイを用いるマウス 3 T 3 細胞内のチミジン取込みにより測定した通りのマウス I G F -I レセプターを刺激しない、即ち該化合物は (Leu²⁴, Ala³¹) hIGF-I と同様に作用し又はこれらアッセイにおいてこの変異体よりも一様に低くレセプターと結合する、一つとして補足的に定義される。更に、I G F -II は、I G F -I アゴニストとして説明され得るし、I G F -I は I G F -II アゴニストとして説明され得る。しかしながら、I G F -I と I G F -II の両方は I 型 I G F レセプターに結合し、且つレセプター活性分子とここで定義した通りの化合物の範囲内ではない両方である。

「疾患」は、制限されること無しに、例えば、肺病、後述するような高血糖疾患、腎疾患、急性及び慢性腎不全のような、最終段階の慢性腎不全、糸球体腎炎、間質性腎炎、腎盂腎炎、糸球体硬化症、例えば、糖尿病患者と腎臓移植後の腎疾患におけるキンメルスティーール-ウィルソン病、肥満症、G H -不全、ターナー症候群、ラロン症候群、小人症、肥満症及び体重対身長比の増加のような老化に関連した望ましくない徴候、減少した C D 4 及び減少した免疫体性又は化学療法で誘発された組織ダメージを含む免疫欠損症のような免疫学的疾患、骨髄移植、心臓機能不全とうっ血性心不全のような心臓構造又は機能の疾患又は不全、ニューロンの、神経学的な、又は神経筋の疾患、例えば周辺神経症、多発性硬化症、筋ジストロフィー、又は筋緊張性ジストロフィー、及び例えば、外傷又は創傷又は細菌又は H I V のようなヒトウイルスによる感染、創傷、皮膚病、復元を要する腸構造と機能、その他を含む何れかの状態によって生じたり関連した異化作用の状態、を含む I G F による治療により利益を得るであろう何れかの状態である。治療されるべき疾患は上記の 2 又はそれ以上の組合せとされ得る。ここでの治療のために標的とされる好適な疾患は、糖尿病と肥満症、心臓機能不全、腎臓疾患、神経学的疾患、全身体成長疾患、及び免疫学的疾患である。

ここで用いた通り用語「高血糖疾患」は、糖尿病及び I 型と II 型糖尿病のようなインスリン耐性の結果生じる疾患、同様に重症のインスリン耐性、高インスリン血症、及び高脂血症、例えば肥満患者、及びインスリン耐性糖尿病、Mendenhall 's 症候群のような、ヴェルナー症候群、妖精症、脂肪組織萎縮性糖尿病、及び他の脂肪組織萎縮症の全ての形態に関する。好ましい高血糖症疾患は、糖尿病、とりわけ I 型と II 型糖尿病である。「糖尿病」それ自身は、インスリンの不十分な生産又は利用を含む炭水化物代謝の発展的疾患に関し及び高血糖症と糖尿によって特徴付けされる。

ここで用いた通り用語「治療」は、治療的な処置と予防又は予防手段の両方に関する。治療が必要なそれらは、既に疾患に罹っているそれら、同様に疾患に罹る傾向にある又は疾患と診断されたそれら又は該疾患を予防するべきそれらを含む。連続した治療又は投与は、1 又はそれ以上の日数による治療において中断すること無しに、少なくとも毎日を基本とする治療に関する。間欠的な治療又は投与、又は間欠的形態における治療又は投与は、連続的ではないが、ある程度まで事実上周期的である治療に関する。ここでの治療体制は、連続的又は間欠的の何れか一方とすることができる。

ここで用いた通り用語「低血糖剤」は、グルコース代謝を調節するために有用な、好ましくは経口剤である化合物に関する。ここでヒトに使用するためにより好適には、インスリ

10

20

30

40

50

ン及び膵臓によるインスリンの分泌を生じさせる経口低血糖剤のスルホニル尿素クラスである。事例は、グリブリド、グリピジド、及びグリクラジンを含む。加えて、ビッグアニド（メトホルミンとフェンホルミンを含む）及びREZULINTM（troglitazone）ブランド インスリン感作剤のようなチアゾリデンジオンのようなインスリン感受性を増加する又はインスリン感作とする剤、及びこの定義の中にある、PPARガンマ核レセプターに結合する他の化合物も好適とされる。

ここで用いた通り、「インスリン」は、何れかの種からのインスリンの何れかの形態、及び天然又は合成又は組換えから得られた何れかに関する。好ましくはそれはN P Hインスリンである。

ここで用いた通り、内因性 I G F の血清及び組織レベルの変更の状況において「活性」又は「生物学的活性」 I G F は、そのレセプターに、又は上記に関する内因性又は外因性 I G F のその生物学的活性のような、生じる生物学的活性の原因となる他の物に結合する I G F に関する。

10

そのIGFBPsの何れか一つと I G F の相互作用を抑制し、ヒト I G F レセプターを結合しない「分子」又は「化合物」は、G H 分泌促進剤、ここに与えた三次元モデルでモデル化後の有機化学分子、及び後述のペプチドにより実例化される、高い経口生物利用能を持つ分子を含む。そのような化合物はまた、「 I G F アゴニスト」又は「 I G F アゴニスト化合物」としてここに関連される。

「ペプチド」は、少なくとも2つのアミノ酸を有する分子を含み、且つ少なくとも約50アミノ酸を有するポリペプチドを含む。好ましくは、該ポリペプチドは約10から約25アミノ酸を、より好ましくは約12-25、最も好ましくは15-25アミノ酸を有する。その定義はペプチド誘導体、その塩、又は光学異性体を含む。

20

「成長ホルモン放出ペプチド又は因子」（“GHRP”又は“GFRF”）は、分泌促進剤として後述される。「成長ホルモン放出ホルモン」（“GHRH”）は、細胞又は組織からG H を放出する何れかのホルモンとされ得る。「成長ホルモン結合タンパク質と組み合わせた成長ホルモン」（“GH”プラス“GHBP”）は、その結合タンパク質の一つを持つ又は他と結合したG H 複合体を意味する。同様に「 I G F 結合タンパク質と組み合わせた I G F 」 (“IGF”プラス“IGFBP”)は、そのIGFBPの一つを持つ又は他と結合した I G F 複合体に関する。

B. 本発明を実施するための態様

30

この場合本発明は、(1-27, gly⁴, 38-70) -hIGF-Iを除く、IGFBP（に結合する）抗体アゴニストを除く、 I G F （に結合する）抗体アゴニストを除く、及び位置24, 31, 及び／又は60で置換又は削除したチロシン残基を持つヒト I G F -I の自然の配列を有するペプチドを除く、そのIGFBPsの1又はそれ以上と I G F との相互作用を抑制し且つヒト I G F レセプターに結合しない化合物に関する。好ましくは、該化合物はIGFBPに及び／又は I G F に、とりわけIGFBP-1、又はIGFBP-3に、又はIGFBP-1とIGFBP-2の両方に、又は I G F -I に、又は I G F -II に、又は I G F -I と I G F -II の両方に、又はIGFBP-1又は-3と I G F -I 又は I G F -II に結合する。また好ましくは、該化合物はペプチドである。より好ましくは、それはIGFBP、とりわけ血清IGFBPに結合するペプチドである。また、好ましくは、該化合物は哺乳動物中の血漿インスリン分泌を減じ、血漿G H を減じ、又は血中グルコースレベルを減じる。

40

より好ましくは、該ペプチドは約10から約25アミノ酸残基を有し及び／又はそのN末端から番号付けした位置5, 6, 7, 又は8でシステイン残基を又はそのC末端から番号付けした位置5, 6, 7, 又は8でシステイン残基を、又はそのようなシステイン残基の両方を、又はそのN末端から番号付けした位置2でシステイン残基を有する。好ましくは、上述したペプチドは、12から25、より好ましくは15から25、アミノ酸残基を有する。より好ましくは、該ペプチドはそのN末端から番号付けした位置1, 2, 3, 4, 又は5でトリプトファン残基を有する。更に好ましくは、該ペプチドはN末端システイン残基までに補足的にバリン、セリン、又はグルタミンN末端を有する。更に好ましくは、該ペプチドはN末端システインまでの残基N末端がバリン残基である。更に好ましくは、

50

該ペプチドはN末端システインまでの3つの残基C末端である位置で始まる残基のグリシン-プロリン又はバリン-アラニン配列を有する。このペプチドはさらに好ましくは、残基のグリシン-プロリン又はバリン-アラニン配列までに3つの残基C末端の中にトリプトファン残基を有する。このペプチドはより好ましくは、C末端システイン残基までの2つの残基N末端の中にロイシン又はバリン残基を有する。このペプチドは更に好ましくは、そのC末端から番号付けした位置2又は3でトリプトファン残基を有する。

また好適には、配列番号：1-16からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。好ましくは、このペプチドは、配列番号：4、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、及び配列番号：16からなる群から選択される配列を含む。より好ましくは、このペプチドは、配列番号：4、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：15、又は配列番号：16であるアミノ酸配列を含む。さらに好ましくは、このペプチドは配列番号：9、配列番号：10、配列番号：15、又は配列番号：16であるアミノ酸配列を含む。最も好ましくは、このペプチドは配列番号：10、配列番号：15、又は配列番号：16であるアミノ酸配列を含む。

代替的に、このペプチドは、配列番号：104であるアミノ酸配列を含み、又はこのペプチドは、配列番号：105、配列番号：106、配列番号：107、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：113、配列番号：114、配列番号：115、又は配列番号：116であるアミノ酸配列を含み、又はこのペプチドは、配列番号：109、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、又は配列番号：121であるアミノ酸配列を含み、又はこのペプチドは、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125、配列番号：126、配列番号：128、配列番号：129、配列番号：130、配列番号：132、又は配列番号：133であるアミノ酸配列を含む。

別の好適な実施態様において、該ペプチドは、位置2, 3, 4, 又は6でD-アラニン置換を、又は位置7, 8, 9, 11, 12, 13, 又は14でアルファ-アミノイソブチレート置換を、又は上記の何れかの組合せを有する配列番号：15のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、このペプチドは、位置2, 3, 又は6でD-アラニン置換を、又は位置7, 8, 9, 11, 12, 13又は14でアルファ-アミノイソブチレート置換を、又は上記の何れかの組合せを有する。更に好ましくは、このペプチドは位置6でD-アラニン置換を、又は位置8, 9, 又は13でアルファ-アミノイソブチレート置換を有する。後者のペプチドの何れかは好ましくは、YFGではなくAAである配列番号：15のC末端を有する。

該化合物は好ましくは、式： BC^n , A、[式中、BはIGF-I又はその機能的類似物のBドメインであり、CはIGF-I又はその機能的類似物のCドメインであり、nはCドメイン中のアミノ酸の数であり且つ約6から約12までである、及びAはIGF-I又はその機能的類似物のAドメインである]の何れかのIGF-I類似物を除く。ここでの化合物は特に(Leu²⁴) IGF-Iと(Ser²⁴) IGF-Iを除く。該化合物はまた、IGF-Iの最初の16アミノ酸がインスリンのB-鎖の最初の17アミノ酸で置換されたB-鎖ヒトIGF-I変異体；(Gln³,Ala⁴) IGF-I；(Tyr¹⁵,Leu¹⁶) IGF-I；(Gln³,Ala⁴,Tyr¹⁵,Leu¹⁶) IGF-I；IGF-Iのカルボキシ末端8アミノ酸D領域を欠いた(1-62) IGF-I；C領域グリシン置換及びD領域削除を伴う(1-27,Gly⁴,38-62) IGF-I；残基41がトレオニンからイソロイシンまで変更され且つA領域の残基42-56が置換されたA鎖変異体、(Ile⁴¹,Glu⁴⁵,Gln⁴⁶,Thr⁴⁹,Ser⁵⁰,Ile⁵¹,Ser⁵³,Tyr⁵⁵,Gln⁵⁶) IGF-I；(Thr⁴⁹,Ser⁵⁰,Ile⁵¹) IGF-I；及び(Tyr⁵⁵,Gln⁵⁶) IGF-Iをも除く。

ペプチドではないここでの化合物は、高い経口生物利用能を持った非ペプチド分子(GH分泌促進剤のような)及び他の経口的に活性な有機分子を作製するための当該分野における化学合成又は他の適当な方法によって作製され得る。

本発明のペプチドは、化学合成によって又は組換え技術を利用することによって作製され得る。これらの方法は当該分野で周知である。化学合成、特に固相合成は、短鎖(例えば

10

20

30

40

50

、50残基より小さい)ペプチド又はD-Tyr、オルニチン、アミノアジピン酸、等のような非天然又は例外的なアミノ酸を含むそれが好適である。組換え方法は、長鎖ポリペプチドのために好適である。組換え方法が選択される場合、合成遺伝子は新規に構築することができ又は自然遺伝子が、例えばカセット式変異誘発によって変異させ得る。後述の記載は一般的な組換え方法の典型である。

生成したIGFとそのアミノ酸配列のために、例えばIGFのペプチドの変異体であるIGFアゴニストを用い、組換えDNAを用い実行され得る。これらの技術は、簡略化した形式において、ペプチドをコードしている天然の又は合成の何れか一方の遺伝子を得ること；それを適当なベクター内に挿入すること；そのベクターを適当な宿主細胞内に挿入すること；その遺伝子の発現を生じさせるよう該宿主を培養すること；及びそれによって生産したペプチドを回収又は分離することを意図する。好ましくは、回収したペプチドは次いで適当な度合まで精製される。

特に、ペプチドのIGFアゴニストをコードしているDNA配列は、クローン化され、そして好適な宿主中で発現され得るように操作される。親のポリペプチドをコードしているDNAは、ゲノムのライブラリーから、該ペプチドを発現している細胞からのmRNAから誘導したcDNAから、又はDNA配列を合成的に構築することによって(Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1989)得ることができる。

親のDNAは、次いで宿主細胞を形質転換するために使用される適当なプラスミド又はベクター内に挿入される。一般に、宿主細胞と和合できる種から得られる複製及び制御配列を含んでいるプラスミドベクターが、その宿主と結合して使用される。該ベクターは普通、レプリコンサイト、同様に形質転換した細胞における表現型選択を提供することができるタンパク質又はペプチドをコードする配列を搬送する。

例えば、大腸菌(E. coli)は、大腸菌種から得られたプラスミド、pBR322を用いて形質転換され得る。Mandelら, J. Mol. Biol. 53: 154 (1970)。プラスミドpBR322は、アンピシリンとテトラサイクリン耐性用の遺伝子を含有し、かくして選択のために容易な手段を提供する。他のベクターは、発現においてしばしば重要な異なるプロモーターのような異なる特徴を含む。例えば、プラスミドpKK223-3、pDR720、及び広く利用可能であるtac, trp, 又はP_Lプロモーターを持つpPL-ラムダ表現発現ベクター(Pharmacia Biotechnology)。

好適なベクターはpB0475である。このベクターはそれがそのような宿主間を往復されることを許すファージと大腸菌の間の複製の起源を含み、それによって変異誘発と発現の両方を容易にする。Cunninghamら, Science, 243: 1330-1336 (1989)；米国特許第5,580,723号。他の好適なベクターは、pR1T5とpR1T2T(Pharmacia Biotechnology)である。これらのベクターは、融合タンパク質として発現されるベクターに挿入した遺伝子を与える、プロテインAのZドメインの後に適当なプロモーターを含む。

他の好適なベクターは、上述したベクターの適切な特徴を結合することによって標準的な技術を用い構築され得る。適切な特徴は、プロモーター、リボソーム結合サイト、デコルシン又はオルナチン遺伝子又は遺伝子融合(プロテインAのZドメインとデコルシン又はオルナチンとそのリンカー)、抗生物質耐性マーカー、及び複製の適切な起源を含む。

宿主細胞は、原核生物又は真核生物とされ得る。原核生物は、親のIGF-Iポリペプチド、セグメント-置換したペプチド、残基-置換したペプチド、及びペプチド変異体を生産するためのDNA配列をクローン化する及び発現するために好適である。例えば、大腸菌K12株294(ATCC No.31446)は、大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC No.31537)、及び大腸菌c600とc600hfl、大腸菌W3110(F-, ガンマ-, プロトトロピー/ATCC No. 27325)、Bacillus subtilisのようなバチルス属、及びSalmonella typhimurium又はSerratia marcescens、及び各種のPseudomonas種のような他の腸内細菌科と同様に使用され得る。好ましい原核生物は大腸菌W3110(ATCC 27325)である。原核生物により発現した場合、そのペプチドはN末端メチオニン又はホルミルメチオニンを典型的に含み、且つグリコシル化されていない。融合タンパク質のケースにおいて、N末端メチオニン又はホルミルメチオニンは、

10

20

30

40

50

該融合タンパク質のアミノ末端上又は融合タンパク質のシグナル配列に存在する。これら実施例は、勿論、制限するものでなく説明することが意図される。

原核生物に加えて、酵母培養、または多細胞生体から得られる細胞のような真核生物が使用され得る。原則として、何れかのそのような細胞培養は、使用可能である。しかしながら、脊椎動物細胞において興味が増大しており、培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は再生可能な方法になっている。Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, Editors (1973)。そのような使用宿主細胞系の実例は、VERO及びHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系、W 1 3 8、2 9 3、B H K、COS-7及びMDCK細胞系である。

上記方法に関するバリエーションは遺伝子融合の使用を意図し、望まれるペプチドをコードしている遺伝子は、ベクター中で別なタンパク質をコードする遺伝子又は別なタンパク質のフラグメントと結合される。これは、別なタンパク質又はペプチドとの融合物として該宿主細胞により生産されている望ましいペプチドの結果となる。「他の」タンパク質又はペプチドはしばしば、培地から望まれるペプチドを分離し且つ精製することを可能にするよう、及びその望ましいペプチドが細胞の内部に残る場合に生じる宿主細胞の破壊の必要性を省くよう、その細胞によって分泌され得るタンパク質又はペプチドである。代替的に、該融合タンパク質は、細胞内で発現され得る。それは高度に発現される融合タンパク質を使用するために有用である。

必須ではないけれども、遺伝子融合の使用は、大腸菌中の異種ペプチドの発現、同様にそれら遺伝子生産物の次の精製を容易にすることができる。Harris, in Genetic Engineering, Williamson, R., Ed. (Academic Press, London, Vol.4, 1983), p.127; Ljungquistら, Eur. J. Biochem., 186: 557-561 (1989) とLjungquistら, Eur. J. Biochem., 186: 563-569 (1989)。プロテインA融合は、Ig GへのプロテインAの、とりわけプロテインAのZドメインの結合が融合したタンパク質の精製用の「アフィニティーハンドル」を提供するために、しばしば使用される。それはまた、多くが異種タンパク質が大腸菌において直接発現した場合に減成されるが、しかし融合タンパク質として発現する場合安定であることが示されている。Marston, Biochem J., 240: 1 (1986)。

融合タンパク質は、メチオニンで切断する臭化シアン、又はAsnとGly残基の間を切断する、ヒドロキシルアミンのような化学薬品を用いて切断され得る。標準的な組換えDNA方法論を用い、これらアミノ酸をコードしているヌクレオチド塩基対は、望まれるペプチドをコードしている遺伝子の5'末端の直前に挿入され得る。

代替的に、それは融合タンパク質のタンパク分解的切断を利用できる。Carter, in Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes, Ladischら, eds. (American Chemical Society Symposium Series No. 427, 1990), Ch 13, pages 181-193。

因子X a、トロンビン、及びサブチリシンまたはその変異体、及び多数の他の物のようなプロテアーゼは、融合タンパク質を切断するために首尾良く使用されている。典型的に、使用したプロテアーゼによって切断するために服しやすいペプチドリinkerは、「他の」タンパク質（例えば、プロテインAのZドメイン）と望まれたペプチドの間に挿入される。組換えDNA方法論を用い、該リンカーをコードしているヌクレオチド塩基対は、該他のタンパク質をコードしている遺伝子又は遺伝子フラグメントの間に挿入される。修正リンカーを含む部分的に精製した融合タンパク質の蛋白分解的切断は、自然の融合タンパク質、または減じた又は分解した融合タンパク質のいずれか一方について実行され得る。

該ペプチドは、融合タンパク質として発現する場合に適切に折り重ねでき又はできない。また、切断サイトを含んでいる特異的ペプチドリinkerは、プロテアーゼに接し易くでき又はできない。これらのファクターは、該融合タンパク質が分解され及び再折重されねばならないかどうか、及び、もしそうであれば、これらの方法が切断の前又は後で用いられるかどうかによって決定する。

分解と再折重が必要とされる場合、典型的に該ペプチドは、グアニジン塩酸のようなカオトロップによって処理される。次いで、例えば、該ペプチドがその固有の構造に再折重さ

10

20

30

40

50

れるような、適当な割合、pH、及び温度で還元した及び酸化したジチオトレイトール又はグルタチオンを含んでいる還元緩衝液によって処理される。

ペプチドが組み換えDNA技術を用いて調製されない場合、それは、たとえ当該分野で周知の同等の化学合成が利用可能であるとしても、Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1963) により全般的に記載されたような、固相合成法を用いて好適に調製される。

固相合成は、適当な樹脂に保護した α -アミノ酸をカップリングすることによってペプチドのC末端から開始される。そのような出発材料は、クロロメチル化樹脂又はヒドロキシメチル化樹脂へのエステル結合によって、又はBHA樹脂又はMBHA樹脂へのアミド結合によって α -アミノ-保護したアミノ酸を付着することによって調製され得る。該ヒドロキシメチル化樹脂の調製は、Bodanskyら, Chem. Ind. (London), 38: 1597-1598 (1966) によって記載されている。クロロメチル化樹脂は、BioRad Laboratories, Richmond, CA から、及びLab. Systems社から商業的に利用可能である。そのような樹脂の調製は、Stewartら, "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969), Chapter 1, pp. 1-6によって記載される。BHAとMBHA樹脂支持体は、商業的に利用可能であり、合成される望まれるペプチドがC末端で非置換アミドを有する場合のみ一般に使用される。

該アミノ酸は、ペプチド結合を形成するための当該分野において周知の技術を用いてペプチド鎖に連結される。一つの方法は、そのカルボキシル基を該ペプチドフラグメントの遊離N末端アミノ基との反応により影響を受け易くするであろう誘導体でそのアミノ酸を転換することを含む。例えば、アミノ酸は、クロロギ酸エチル、クロロギ酸フェニル、クロロギ酸sec-ブチル、クロロギ酸イソブチル、塩化ピバロイル又は同様の酸塩化物と、保護したアミノ酸の反応によって混合した無水物に変換され得る。代替的に、該アミノ酸は、2,4,5-トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、p-ニトロフェニルエステル、N-ヒドロスクシンアミドエステル、又は1-ヒドロキシベンゾトリアゾールから形成したエステルのような活性エステルに変換され得る。

別なカップリング法は、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド又はN,N'-ジイソプロピル-カルボジイミドのような適当なカップリング剤の使用を含む。当業者において明らかな他の適当なカップリング剤は、E. Gross & J. Meienhofer, The Peptides: Analysis, Structure, Biology. Vol. I: Major Methods of Peptide Bond Formation (Academic Press, New York, 1979) 中に記載される。

該ペプチド合成において用いた核アミノ酸の α -アミノ基が、その活性 α -アミノ機能を含む副反応を防止するため該カップリング反応の間保護される必要があることを認識すべきである。また、ある種のアミノ酸が反応性側鎖官能基（例えばスルフィドリル、アミノ、カルボキシル、及びヒドロキシル）を含むこと、及びそのような官能基は、開始と次のカップリング工程の両方の間そのサイトで生じる化学反応を防止するために適当な保護基によって保護される必要があることも認識すべきである。当該分野で周知の、適当な保護基は、GrossとMeienhofer, The Peptides: Analysis, Structure, Biology. Vol. 3: "Protection of functional Groups in peptide Synthesis" (Academic Press, New York, 1981) 中に記載される。

該ペプチドの合成において使用すべき特有の側鎖保護基の選択において、次の一般的なルールが求められる。 α -アミノ保護基は、(a) カップリング反応で用いた条件下で α -アミノ機能を不活性にする必要がある、(b) 側鎖保護基を取り外すことがないであろう及びペプチドフラグメントの構造を変えないであろう条件下でのカップリング反応の後に容易に除去可能とされる必要がある、及び(c) カップリングの直前に活性化によりラセミ化の可能性が排除される必要がある。側鎖保護基は、(a) カップリング反応で用いた条件下で α -アミノ機能を不活性にする必要がある、(b) α -アミノ保護基の除去に用いた条件下で安定である必要がある、及び(c) ペプチド鎖の構造を変えないであろう反応条件下で、望まれるアミノ酸ペプチドの完成により容易に取り外し可能とされる必要がある。

ペプチド合成用に有用とされる周知の保護基は、それを除去するために用いるその剤との反応性において変更されるであろうことは当業者に明らかであろう。例えば、トリフェニルメチル及び2-(p-ビフェニリル)イソプロピルオキシカルボニルのようなある種の保護基は、非常に適応性があり且つ中度の酸性条件で切断され得る。t-ブチルオキシカルボニル(BOC)、t-アミルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、及びp-メトキシベンジルオキシカルボニルのような他の保護基は、適応性に劣っており、それを除去するためにトリフルオロ酢酸塩酸、又は酢酸中の四フッ化ホウ素のような適度な強酸を要求する。ベンジルオキシカルボニル(CBZ又はZ)、ハロベンジルオキシカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、シクロアルキルオキシカルボニル、及びイソプロピルオキシカルボニルのような更に他の保護基は、一様に適応性に劣っており、それを除去するためにフッ化水素酸、臭化水素酸、またはトリフルオロ酢酸中の四フッ化ホウ素のような強酸を要求する。

10

有用なアミノ酸保護基のクラスの中では：

(1) α-アミノ基のために、(a)フルオレニルメチルオキシカルボニル(FMOC)CBZのような芳香族ウレタントイプ保護基、及び置換したCBZ、例えばp-クロロベンジルオキシカルボニル、p-6-ニトロベンジルオキシカルボニル、p-ブロモベンジルオキシカルボニル、及びp-メトキシベンジルオキシカルボニル、o-クロロベンジルオキシカルボニル、2,4-ジクロロベンジルオキシカルボニル、2,6-ジクロロベンジルオキシカルボニル、など；(b)BOC、t-アミルオキシカルボニル、イソプロピルオキシカルボニル、2-(p-ビフェニリル)-イソプロピルオキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、などのような脂肪族ウレタントイプ保護基；(c)シクロペンチルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、及びシクロヘキシルオキシカルボニルのようなシクロアルキルウレタントイプ保護基；及びd)アリールオキシカルボニルを含む。好ましいα-アミノ保護基はBOC又はFMOCである。

20

(2) Lys中に存在する側鎖アミノ基のために、保護は(1)BOC、p-クロロベンジルオキシカルボニル、等において上述した基の何れかによってなされ得る。

(3) Argのグアニジノ基のために、保護は、ニトロ、トシル、CBZ、アダマンチルオキシカルボニル、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル又は2,3,6-トリメチル-4-メトキシフェニルスルホニル、又はBOCによってなされ得る。

(4) Ser, Thr, 又はTyrの水酸基のために、保護は、例えば、t-ブチルのようなC1-C4アルキル；ベンジル(BZL)；p-メトキシベンジル、p-クロロベンジル、o-クロロベンジル、及び2,6-ジクロロベンジルのような置換したBZLによりなされ得る。

30

(5) Asp又はGluのカルボキシル基のために、保護は、例えばBZL、t-ブチル、シクロヘキシル、シクロペンチル、等のような基を用いるエステル化によりなされ得る。

(6) Hisのイミダゾール窒素のために、トシル部分が好適に利用される。

(7) Tyrのフェノール性水酸基のために、テトラヒドロピラニル、tert-ブチル、トリチル、BLZ、クロロベンジル、4-ブロモベンジル、又は2,6-ジクロロベンジルのような保護基が好適に利用される。好適な保護基は2,6-ジクロロベンジルである。

(8) Asn又はGlnの側鎖アミノ基のためにはキサントイル(Xan)が好適に利用される。

(9) Metについて、該アミノ酸は好ましくは未保護のままとする。

40

(10) Cysのチオ基のために、p-メトキシベンジルが典型的に利用される。

C末端アミノ酸、例えばLysは、適切に選択した保護基により、Lysの場合においてはBOCにより、N-アミノ位置で保護される。そのBOC-Lys-OHは、Horikiら、Chemistry Letters, 165-168 1978)中に記載された方法に従ってベンジヒドリルアミン又はクロロメチル化樹脂に、又は攪拌しつつ約25℃で二時間、イソプロピルカルボジイミドを用いて最初に連結され得る。樹脂支持体へのBOC-保護したアミノ酸のカップリングの後、塩化メチレン中トリフルオロ酢酸(TFA)又はTFA単独を用いることによって、そのα-アミノ保護基が除去される。その脱保護基は約0℃と室温の間の温度で実行される。ジオキサン中HClのような他の標準的な切断試薬、及び特異的なα-アミノ保護基の除去のための条件は文献中に記載される。

50

α -アミノ保護基の除去後、残る α -アミノ及び側鎖保護したアミノ酸は望まれる順番の中で段階的に連結される。該合成中で別個に各アミノ酸を加えることの代替として、何れかは固相シンセサイザーに加える前に別の一つに連結され得る。適当なカップリング剤の選択は当業者の理解の範囲内である。カップリング試薬として特に好適なものは、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド又はジイソプロピルカルボジイミドである。

それぞれの保護したアミノ酸又はアミノ酸配列は、過剰に固相リアクター内に導入され、カップリングがジメチルホルムアミド (DMF) 又は CH_2Cl_2 又はその混合物の媒体中で実行される。もし不完全なカップリングが生じるなら、そのカップリングプロセスは次のアミノ酸のカップリングの前にN-アミノ保護基の事前除去を繰り返す。合成の各段階でのカップリング反応の成功がモニターされ得る。その合成のモニタリングの好ましい方法は、Kaiserら, Anal. Biochem. 34: 595 (1970) に記載されたニンヒドリン反応によるものである。該カップリング反応は、周知の方法、例えばBIOSEARCH9500TMペプチドシンセサイザーを用い自動的に実行され得る。

望まれるペプチド配列の完成により、その保護したペプチドは樹脂支持体から切断する必要がある、且つ全ての保護基を除去する必要がある。その切断反応と保護基の除去は、好ましくは同時に又は段階的に達成される。その樹脂支持体がクロロメチル化ポリスチレン樹脂である場合、該樹脂に該ペプチドを繋ぎ止めている結合は、C末端残基の遊離カルボキシル基と、樹脂マトリックス上に存在する多くのクロロメチル基の一つとの間に形成されたエステル結合である。その繋ぎ止め結合は、エステル結合を壊すこと及び樹脂マトリックスに貫徹できることが知られる試薬によって切断され得る。

特に便利な方法の一つは、液体無水フッ化水素での処理による。この試薬は該樹脂からの切断のみでなく、全ての保護基を除去するであろう。それ故に、この試薬の使用は、完全に保護を脱したペプチドを直接もたらすであろう。クロロメチル化樹脂が使用される場合フッ化水素処理は、直接遊離ペプチド酸をもたらす結果になる。ベンズヒドリルアミン樹脂が使用される場合、フッ化水素酸処理は直接遊離ペプチドアミンをもたらす結果となる。0℃で1時間、アニソールとジメチルスルフィドの存在中でのフッ化水素との反応は、側鎖保護基が除去されると同時に樹脂から該ペプチドが放出されるであろう。

保護基を除去すること無しに該ペプチドを切断することが望まれる場合、その保護ペプチド-樹脂は、C末端カルボキシル基がメチル化される保護ペプチドが生じるようにメタノリシスを受けることができる。そのメチルエステルは、遊離C末端カルボキシル基を与えるように中度のアルカリ性条件下で加水分解される。次いでペプチド鎖上の保護基は、液体フッ化水素のような強酸での処理によって除去される。メタノリシスのための特に有用な技術は、保護ペプチド-樹脂がクラウンエーテルの存在中メタノールとシアン化カリウムにより処理される、Mooreら, Peptides, Proc. Fifth Amer. Pept. Symp., M. GoodmanとL. Meienhofer, Eds., (John Wiley, N.Y., 1977), p.518-521のそれである。

クロロメチル化樹脂が使用される場合、該樹脂から保護したペプチドを切断するための別な方法は、アンモノリシスによる又はヒドラジンによる処理によるものである。望むなら、得られるC末端アミン又はヒドラジドは、遊離C末端カルボキシ部分に加水分解でき、且つその保護基は通常的に除去され得る。

N末端の α -アミノ基上に存在する保護基は、該保護基が支持体から切断される前又は後の何れか一方で優先的に除去され得る。

本発明のポリペプチドの精製は、予備HPLC (逆相HPLCを含む) 又は他の周知のクロマトグラフィー技術、例えばゲル透過、イオン交換、分配クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー (モノクローナル抗体カラムを含む) 又は交流分配のような通常の方法を用い典型的に達成される。

本発明のペプチドは、重合化によって安定化され得る。これは、多価ポリマーを経て、直接的又は間接的の何れか一方で多価架橋剤でのモノマー鎖架橋化により達成され得る。通常、2つの実質的に同一のポリペプチドは、二官能架橋剤を用いてそのC-又はN-末端で架橋される。該剤は、末端アミノ及び/又はカルボキシル基を架橋するように用いられる。一般に、たとえ適切な架橋剤の選択によって、一方のポリペプチドのアルファアミノが

10

20

30

40

50

他方のポリペプチドの末端カルボキシル基に架橋されるとしても両方の末端カルボキシル基又は両方の末端アミノ基は、互いに架橋される。好ましくは、該ポリペプチドはシステインによってC末端で置換される。当該分野で周知の条件下でジスルフィド結合が末端システイン間に形成され、それによって該ポリペプチド鎖が架橋されている。例えば、ジスルフィドブリッジは遊離システインの金属触媒酸化によって又は適当に修正したシステイン残基の求核的置換によって都合良く形成される。架橋剤の選択は、ポリペプチド中に存在するアミノ鎖の反応性側鎖の同定に基づくであろう。例えば、もしシステインがC末端以外の付加的なサイトでポリペプチド中に存在するならば、ジスルフィド架橋は好ましいとは言えないであろう。メチレンブリッジによって架橋されたペプチドはここでの範囲内である。

10

ペプチド上の適当な架橋化サイトは、N末端アミノ及びC末端カルボキシル基は別として、リシン残基上に見られるイプシロンアミノ基、同様に該ペプチドの内部残基又はフランキング配列内に導入した残基の側鎖上に配されたアミノ、イミノ、カルボキシル、スルフィドリル及びヒドロキシル基を含む。外部に加えた架橋剤を通しての架橋は、例えば当業者にとって普通の多数の試薬の何れかを用い、例えばポリペプチドのカルボジイミド処理を経て、好適に達成される。適当な多価（普通二官能）架橋剤の他の実例は文献中に見出される。

本発明のペプチドは、環化によって構造的に安定化され得る。そのペプチドは、2又はそれ以上の繰り返しペプチド配列を含むシクロオリゴマー、各内部ペプチドは実質的に同じ配列を有している、を形成するために本発明の別のペプチドの一致するドメインに一方のペプチドのN-及びC-末端ドメインを共有結合することによって普通に環化される。更に、環化したペプチド（シクロオリゴマー又はシクロモノマーのいずれか）は、その中に含まれた2から6までのペプチドを有する1-3環式構造を形成するように架橋される。該ペプチドは好ましくは α -アミノ及び主鎖カルボキシル基を通して共有結合しないが、しかしある程度はN-及びC-末端ドメインに配された残基の側鎖を経て架橋される。架橋サイトはかくして一般には、該残基の側鎖間とされるであろう。

20

多くの好適な方法それ自身は、ここに意図したようにモノ-又はポリ-環化ポリペプチドを調製するために周知である。Lys/Asp環化は、Lys/Asp用のFmoc/9-フルオレニルメチル（Fm）側鎖保護によって固相支持体上のN- α -Boc-アミノ酸を用い達成されている；該方法は環化に続くピペリジン処理によって完成される。

30

GluとLys側鎖もまた、環式又は二環式ペプチド調製において架橋されている；該ペプチドは、p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂上での固相化学により合成される。そのペプチドは樹脂から切断され且つ脱保護される。環式ペプチドはメチルホルムアミドで希釈したジフェニルホスホリルアジドを用い形成される。代替の方法については、Schillerら、*Peptide Protein Res.*, 25: 171-177 (1985)を参照。米国特許第4,547,489号も参照。

ジスルフィド架橋した又は環化したペプチドは通常の方法により生成される。Peltonら、(*J. Med. Chem.*, 29: 2370-2375 (1986))の方法は、シクロオリゴマーの大きな比率がシクロモノマーの生産のためのPeltonらによって記載された希釈反応混合物よりも、より濃縮した溶液中で反応を導くことによって製作されることを除いて、好適である。同じ化学薬品はダイマー又はシクロオリゴマー又はシクロモノマーの合成のために有用である。また有用性はチオメチレンブリッジにもある。LeblとHruby, *Tetrahedron letters*, 25: 2067-2068 (1984)。Codyら, *J. Med. Chem.*, 28: 583 (1985)も参照。

40

望まれる環式又はポリマー性ペプチドは、ゲル濾過の後、逆相高圧液体クロマトグラフィー又は他の通常の手法により精製される。ペプチドは無菌濾過され、且つ通常の製薬上許容される賦形剤中で処方される。

ここに記載した方法のために要求される出発材料は、文献において周知であり、且つ周知の方法及び周知の出発材料を用い調製され得る。

もし4つの同一でない置換基に結合した炭素原子が精製されているペプチドにおいて不斉があれば、その化合物はジアステレオマー、エナンチオマー又はその混合物として存在できる。上述した合成は、出発材料又は中間体としてラセミ体、エナンチオマー又はジアス

50

テレオマーを使用できる。そのような合成で得られるジアステレオマーの生産物は、クロマトグラフィー又は結晶化法によって分離され得る。さらに、エナンチオマーの生成混合物は同じ技術を用い又は当該分野で周知の方法により分離され得る。存在する場合、それぞれの不斉炭素原子は2つの配置(R又はS)の一つとされ且つ両者は本発明の範囲内である。

本発明において記載した化合物は、遊離の酸又は塩基として分離され又は各種の無機及び有機酸及び塩基の塩に変換され得る。そのような塩の実例は、アンモニウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムとマグネシウムのような金属塩；ジシクロヘキシルアミン、N-メチル-D-グルカミンなどのような有機塩基との塩；及びアルギニン又はリシンのようなアミノ酸との塩を含む。無機及び有機の酸との塩は、さらに例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸などを用いて調製され得る。たとえ他の望ましくない塩が分離と精製のプロセス中で使用できるとしても、無毒性で且つ生理的に和合できる塩が特に有用である。

多くの方法が上述した塩の調製のために有用であり、当業者に周知である。実例は、その塩が不溶性である溶媒又は溶媒混合液中で；又は濃縮、蒸留又は凍結乾燥によりその溶媒を留去した後で水のような溶媒中で、望ましい酸又は塩基の1又はそれ以上のモル当量と共に該ペプチドの遊離酸又は遊離塩基形態との反応を含む。代替的に、その生産物の遊離酸又は塩基形態は、望まれる塩を形成するためイオン交換樹脂を通過させることができ又は生産物の一つの塩形態は同じ一般的プロセスを用い別のものに変換され得る。

ペプチドの化学合成のために適当とされ得るある種の特有なスキームが、参考によりここに併合される開示の、1996年5月23日公開のWO 96/15148中に示される。

本発明の化合物は、その結合タンパク質の1又はそれ以上とIGFとの相互作用を抑制すること、及びそれによってIGF作用をアゴナイズすることが示される。IGFsのための多くの使用があることは当業者に周知である。それ故に、IGF作用をアゴナイズする目的での本発明の化合物の投与は、外因性IGFそれ自身の投与と同じ効果又は使用を有することができる。IGFのこれらの使用は、先に定義した疾患に追加され得る又は同じである、次のものを含む：通常の及び下垂体機能低下動物における全身、骨、及び筋肉成長率の増加；異化作用状態（断食、窒素制限、高くしたコルチコステロイドレベル、及び／又は糖尿病）の間の体重及び窒素損失の保護；腎臓再生；末梢及び中枢神経系（CNS）変性疾患の治療及びCNSダメージ又は損傷に続く神経保護又は再生の促進；低酸素症の治療；創傷治癒の促進；心臓の再生；癌の悪液質の逆転；新脈管形成の抑制；胃腸管の再生；乳房機能の刺激；代謝ストレス、GH活性における年齢関連減退、及び成人GH欠乏のようなGHのIGF-I依存作用を無効にすること；成人発症型糖尿病の治療；及び／又は特異的IGF-I欠乏の治療。

ここでの化合物が有用である追加された及び特有の疾患は、GH-耐性小人症、GH-不感受性症候群、骨粗しょう症、及び異化状態のような成長疾患；組織又は細胞、例えば末梢神経及び支持細胞、神経及びグリアを含む中枢神経系細胞及び稀突起神経膠細胞、筋肉、皮膚、及び骨のような他の細胞の再生の治療が要求される疾患；心臓疾患、例えば心臓虚血、心筋障害、及びうっ血性心不全；インスリン依存性及び非インスリン依存性糖尿病及び極インスリン耐性のような高血糖性疾患；及び腎不全のような腎臓疾患を含む。これらはまた、初老のヒトにおける同化応答の刺激、グルココルチコイドの異化副作用の防止、骨粗しょう症の治療、免疫系の刺激、肥満症の低減、創傷治癒の促進、骨折結合再生の促進、成長遅延の治療、腎不全又は成長遅延の結果の未成熟の治療、生理学的小人症の治療、成長ホルモン欠乏児を含む、慢性疾患に関連した小人症の治療、肥満症及び肥満症に関連した成長遅延の治療、プラダー-ヴィリ症候群及びターナー症候群に関連した成長遅延の治療、やけどの患者の入院における回復と軽減の促進、子宮内成長遅延、骨格形成異常、副腎皮質機能亢進症、及びクッシング症候群の治療、拍動性成長ホルモン放出の誘導、ストレス性患者における成長ホルモンの置換、骨軟骨異形成症、Moonans症候群、精神分裂症、うつ病、末梢ニューロパシー、ALS、うつ病、アルツハイマー病、脱髄の疾患、多発性硬化症、及び遅れた創傷治癒の治療、免疫系の刺激、心理墮落の治療、肺の機能

10

20

30

40

50

不全及び換気依存の治療、大手術の後のタンパク質異化応答の減衰化、癌又はエイズのような慢性病のための悪液質及びタンパク質損失の減少、I型及びII型糖尿病を含む高インスリン血症の治療、排卵誘発のためのアジュバント治療、胸腺発達の刺激及び胸腺機能の年齢関連減退の予防、免疫抑制患者の治療、骨髄移植患者の治療、筋肉強度、可動化筋域機能の疾患、筋ジストロフィーにおける改善、皮膚厚さ、及び代謝恒常性の維持、急性及び慢性腎疾患を含む腎臓の機能と恒常性の増強、骨形成細胞の刺激、骨の再造形、及び軟骨成長、免疫系の刺激、及び家畜における成長促進を含む。各種のIGF-I使用が、例えば、Wo 94/04569; WO 96/33216; 及びBondy, Ann Intern. Med., 120: 593-601 (1994) 中に見られる。これらの全ては「疾患」の定義中に含まれる。

一つの実施例において、化合物は、成長及び身体組織での飼料のその変換の有効性を促進及びその割合を増加及び進展するために、ブタ、ウシなどのような商業上重要な動物に投与され得る。該化合物はIGF作用を刺激するために成人及び児童にインビボで投与され得る。

本発明の化合物は、経口、非経口（例えば、筋肉内、腹腔内、静脈内、又は皮下注射又は注入、又はインプラント）、経鼻、吸入、経膈、直腸、舌下、又は投与の局所ルートを含む何れかの適用な技術によって哺乳動物に投与でき、且つ投与の各ルートのために適切な投薬量で処方され得る。投与の特有のルートは、該化合物を用いて何れかの認められた又は予期された副作用を含む、その患者の医学的履歴、投与される化合物のタイプ、及び治療すべき特有の疾患に基づくであろう。とりわけ、その投与は経口又は連続的な注入（例えば除放装置又は浸透ポンプのようなミニポンプ又は皮膚パッチを用いる）、又は注射（例えば静脈内又は皮下手段を用いる）である。その治療に用いられる化合物は、個人の患者の臨床的な状態（特に該化合物による治療の副作用）、輸送のサイト、投与の方法、投与のスケジュール、及び開業医に周知の他のファクターに関して、良好な医療行為と密着した形態において処方され且つ投薬されるであろう。ここで意図される化合物の「有効量」は、かくして、そのような観点で決定され且つ哺乳動物に対する薬剤の生物学的利用能及び望ましい効果が得られる量とされる必要がある。

小さい分子アンタゴニストがIGFアゴニストとして使用されるなら、周期的な効果を有し得るし、効力のために、その適切な投与の摂生が要求され、血液中のIGFBP-1の可変の濃度は実例とされる。JonesとClemmons, supra. ペプチドのために好適な投与は、IGF-Iの効果を再誘導するため4-8週間、一日約2回の慢性投与である。たとえ注射が好適であろうとも、長期の注入も、連続した皮下(SC)注射のための注入装置を用いて利用され得る。小さいペプチドは経口投与され得る。静脈内バッグ溶液も又利用され得る。糖尿病のための適用な投薬量を選択する上での鍵となるファクターは、血中グルコースが妥当な通常範囲となるような減少によって、又は開業医によって妥当と思われるような糖尿病の治療を測定するための他の基準による測定として得られた結果である。

一般的な提案として、非経口的な投薬当たり投与されるIGFアゴニスト化合物のトータルの製薬学的有効量は、投薬量応答曲線によって評価され得る範囲内とされるであろう。例えば、IGFBPsに結合した又は血液中のIGFsは投薬量を決定するために処置される哺乳動物の体液中で測定され得る。代替的に、それは患者へのIGFアゴニスト化合物の浄化した量で投与すること及びIGF-I及びIGF-IIの患者の血清レベルをチェックできる。使用されるIGFアゴニストの量はIGF-IとIGF-IIのこれらの血清レベルに基づいてモルベースで計算され得る。ヒト血清中に存在するIGFBPsからIGF-Iトレーサの置換についての後述の実施例を参照。

特に、化合物の適当な投薬量を決定するための一つの方法は、体液又は血液のような生物学的液体中のIGFレベルを測定することを伴う。そのようなレベルの測定は、RIAとELISAを含む何れかの手段によってなされ得る。IGFレベル測定の後、その液体は単一又は複数投薬量を用いる化合物と接触させる。この接触工程の後、そのIGFレベルは液体中で再測定される。もしその液体IGFレベルが投与されるべきものであるための望ましい効力を生じるために十分な量によって降下しているならば、その分子の投薬量は最大の効力を生じるように調整され得る。この方法は、インビトロ又はインビボで実行され得る。

10

20

30

40

50

好ましくは、この方法はインビトロで実行され、即ち液体が哺乳動物から抽出され且つ I G F レベルが測定された後、ここでの化合物が単一又は複数投薬量を用い投与され（即ち、該接触工程は哺乳動物への投与により達成される）、次いで I G F レベルが哺乳動物から抽出した液体から再測定される。化合物の投薬量が適切に調整できるように生物学的液体中の特別な IGFBP の量又は特別な IGFBPs に結合した化合物の量を測定するための別な方法は：

(a) 液体と、1) 固相担体に付着した第 1 の抗体とを接触させること、該第 1 の抗体は抗体の存在中でその I G F 結合サイトが該化合物への結合のための IGFBP 上に利用可能に残るように IGFBP 上のエピトープのために特異的であり、それによって第 1 の抗体と IGFBP の間に複合体を形成すること；及び 2) IGFBP 上の全ての利用可能な I G F 結合サイトを飽和するために十分な時間該化合物と接触させること、それによって飽和した複合体を形成すること；

10

(b) 該化合物が I G F 結合タンパク質に結合される場合に結合に利用可能である I G F 結合タンパク質のために特異的である検出可能に標識した第 2 の手段と、該飽和した複合体とを接触させること；及び

(c) IGFBP の指標として、且つそれ故に、結合した化合物と I G F 結合タンパク質、結合した I G F と I G F 結合タンパク質、又は該液体中に存在する活性 I G F の指標として、結合した標識した手段の量を定量分析すること、を含む。

リガンド-介在免疫機能化法 (LIFA) と称される、抗体を用いる上述した定量分析技術は、米国特許第 5,593,844 号中に I G F との接触により IGFBP の量を測定するために、及び米国特許第 5,210,017 号中に G H との接触によって GHBP の量を測定するために記載されているこれら特許の開示は抗体と他の材料及び該アッセイにおいて使用され得る条件に関して参考によりここに併合される。

20

投薬量を測定するための別の方法は、I G F アゴニストに対する抗体を使用すること及び L I F A フォーマットにおける I G F アゴニストのための別な検出方法である。これは、IGFBP に結合した内因性又は外因性 I G F s の検出及び IGFBP に結合した I G F アゴニストの量を与えるであろう。

投薬量を測定するための別な方法は、血液中の「遊離」又は活性 I G F のレベルを測定するものとされるであろう。何れかの使用のために「遊離」I G F のレベルは、効力及び投薬有効性または投薬量の適当なマーカーとされるであろう。

30

例えば、一つの方法は、I G F 結合タンパク質に結合した内因性又は外因性 I G F を、又は I G F 結合タンパク質に結合するが I G F 結合タンパク質に結合したヒト I G F レセプターに結合しない化合物の量を検出すること又は生物学的液体中の未結合 I G F のレベルを検出することのために記載される。この方法は：

(a) 該液体と、1) 該化合物の存在中で I G F 結合サイトが I G F 結合タンパク質に結合するための化合物上に利用可能に残るよう固相担体に付着した該化合物（該化合物上のエピトープの特異的な第 1 の抗体のような）に特異的である、化合物を検出するための手段とを接触させること、それによって該手段と I G F 結合タンパク質との間の複合体を形成する；及び 2) I G F 結合タンパク質上の利用可能な I G F 結合サイトの全てを飽和するために十分な時間、該化合物と接触させること、それによって飽和した複合体を形成する；

40

(b) 該化合物が I G F 結合タンパク質に結合される場合に結合に利用可能である I G F 結合タンパク質（IGFBP 上のエピトープに特異的な第 2 の抗体のような）のために特異的である検出可能に標識した第 2 の手段と、該飽和した複合体とを接触させること；及び

(c) IGFBP の指標として、且つそれ故に、結合した化合物と I G F 結合タンパク質、結合した I G F と I G F 結合タンパク質、又は該液体中に存在する活性 I G F の指標として、結合した標識した手段の量を定量分析すること、を含む。

投薬量を測定するための上記方法で与えられ、且つ仮定した投薬量は、全般的に、使用さ

50

れ得る I G F アゴニスト化合物の量が評価され得る、I G F -I についての実施例 1 1 において実証した少なくとも幾つかの特徴を共有する。経口的に活性な小さい I G F アゴニストは、I G F -I と I G F -II の 7500 ダルトンに比較して、ほぼ 500 ダルトンの分子量を有するであろう。I G F アゴニストが I G F -I 又は I G F -II よりも IGF BPs に 16 倍劣る結合が可能と仮定して、たとえ上述したようにこれが多くの治療的な自由裁量を受けるであろうとしても、患者の体重 k g に基づいて、約 10 μ g/kg/日 から 200 μ g/kg/日 が使用され得たように、I G F -I 又は I G F -II とこれらの分子の等しい重量は等しい有効性を得ることができた。

更なる方法は、L I F A フォーマットを用い、特異的な IGF BPs、例えば IGF BPs-1 又は IGF BPs-3 についての I G F s の分配を見積もることが提供される。

その化合物は持続放出性システムにより好ましくは投与される。持続放出性組成物の好適な実施例は、適切な形の物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスを含む。持続放出性材料は、ポリラクチド（米国特許第 3,773,919, EP 58,481）、L-グルタミン酸とガンマ-エチル-L-グルタマートのコポリマー（Sidman ら, Biopolymers, 22, 547-556 (1983)、ポリ（メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル）（Langer ら, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)、及び Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)、エチレン酢酸ビニル（Langer ら, supra）又はポリ-D-（-）-3-ヒドロキシブチル酸（EP 133,988）を含む。持続放出性組成物はまた、リポソーム性エンタラップ化合物を含む。該化合物を含むリポソームは、それ自身周知の方法により調製される：DE 3,218,121; Epstein ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985); Hwa

ng ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 日本特許出願 83-118008; 米国特許第 4,485,045 と 4,544,545 号; 及び EP 102,324。普通、該リポソームは、小さな（約 200 から 800 オングストロームまで）、脂質含量が約 30 モルパーセントコレステロールよりも大きい単層ラメラタイプであり、選択した比率は大部分の有効な治療のために調整される。

より長い寿命を有する PEGylated ペプチドもまた、例えば 1995 年 11 月 30 日公開の WO 95/320 03 中に記載された共役技術に基づいて利用できる。非経口的投与のために一つの実施態様において、該化合物は、製薬上、又は非経口的に許容される賦形剤、即ち、その投薬量及び使用される濃度で受容者に無毒性であり、且つ製剤の他の成分と和合できるそれと共に、単位投薬量注入可能形態（溶液、懸濁液、又はエマルジョン）中に、複数の望ましい度合でそれぞれを混合することによって処方される。例えばその調剤は、酸化剤及びポリペプチドに害のあることが知られる他の化合物を好ましくは含んでいない。

一般に、その調剤は、液状賦形剤又は微細に分割された固体賦形剤又は両方と該化合物とを均一に且つ親密に接触することによって調製される。次いで、もし必要であれば、その生産物は望ましい調剤に成型される。好ましくはその賦形剤は非経口賦形剤、より好ましくは受容者の血液と等張である溶液である。そのような賦形剤媒体の実例は、水、生理食塩水、リンゲル液、緩衝化溶液、及びブドウ糖溶液を含む。不揮発性油とオレイン酸エチルのような非水性媒体もここでは有用である。

賦形剤は、等張性及び化学的安定性を増加する物質のような少量の添加剤を好ましくは含む。そのような添加物は、その投薬量及び使用される濃度で受容者に無毒性であり、且つリン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸、及び他の有機酸又はその塩のような緩衝剤；アスコルビン酸のような酸化防止剤；低分子量（約 10 残基以下）ペプチド、例えばポリアルギニン又はトリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、又はアルギニンのようなアミノ酸；単糖類、二糖類、及びセルロース又はその誘導体、グルコース、マンノース、トレハロース、又はデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA のようなキレート剤；マンニトール又はソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのようなカウンターイオン；ポリソルベート、ポロキサマー、ポリエチレングリコール（PEG）のような非イオン性界面活性剤；及び／又は中性塩、例えば N

10

20

30

40

50

aCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, などを含む。

該化合物は、約4.5から8までのpHでそのような媒体中で典型的には処方される。前述の賦形剤、賦形剤、又は安定化剤の特定の使用は、該化合物の塩の形成をもたらすであろうことが理解されるであろう。最終的な調製物は安定な液状又は凍結乾燥した固体とされ得る。

製薬組成物としての該ペプチド又は経口分泌促進剤の典型的な製剤が以下に論じられる。遊離の酸又は塩基として又は製薬上許容される塩として、該化合物又は該化合物の混合物の約0.5から500mgは、製薬実施に許容されると称されるような、生理学的に許容される媒体、賦形剤 (carrier)、賦形剤 (excipient)、バインダー、保存料、安定化剤、フレーバー、などと共に混合される。これら組成物中の活性成分の量は、示された範囲内の適切な投薬量が得られるようになされる。

錠剤、カプセル、などの中に混合され得る典型的な佐剤は、アカシア、コーンスターチ又はゼラチンのようなバインダー；微晶質セルロースのような賦形剤；コーンスターチ又はアルギン酸のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような滑剤；ショ糖又は乳糖のような甘味剤；ペパーミント、ウィンターグリーン又はチェリーのような香味剤である。投薬形態がカプセルである場合、上記材料に加えて、脂肪油のような液状媒体をも含ませ得る。各種のタイプの他の材料がコーティングとして又は投薬単位の物理的形態の修正剤として使用され得る。シロップ又はエリキシルは、活性化合物、ショ糖のような甘味料、プロピルパラベンのような保存料、着色料及びチェリーのような香味料を含め得る。注射のための滅菌した組成物は、通常の製薬上の慣行に従って製剤され得る。例えば、水又はゴマ油、落花生油、又は綿実油のような天然由来の植物油のような媒体又はオレイン酸エチルのような合成脂質媒体中に活性化合物の溶液又は懸濁液が望まれ得る。緩衝剤、保存料、酸化防止剤、などは許容された製剤上の慣習に従い併合され得る。

治療的な投与のため使用される化合物は、滅菌される必要がある。滅菌は、無菌濾過膜（例えば、0.2ミクロン膜）を通すことによって容易に達成される。治療組成物は一般に、無菌通路口を有する容器内、例えば静脈輸液バッグ又は皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアルに配される。

該化合物は普通、単位又は多投薬コンテナ、例えば封止アンプル又はバイアル中に、水性溶液として又は復元のための凍結乾燥製剤として保存されるであろう。凍結乾燥製剤の実例として、10-mLバイアルは、該化合物の滅菌濾過した1% (w/v) 水性溶液の5mLで満たされ、生じた混合物が凍結乾燥される。注入溶液は、注入用静菌性水を用い凍結乾燥化合物を復元することによって調製される。

ここでのIGFアゴニスト化合物と、血液中の全IGFを増加する又はIGFアゴニストの効果を増すI又はそれ以上の適切な試薬との組合せ治療は、本発明の一部でもある。これらの試薬は一般に、生成したIGFの放出をここでのIGFアゴニストに与え、且つ成長促進剤を含む。この目的のための成長促進剤は、制限されること無しに、血液中のIGFの濃度を増加するように哺乳動物中の内因性GHの放出を促進するGH分泌促進剤を含む。実例は、TRH、ジエチルスチルベストロール、テオフィリン、エンケファリン、Eシリーズのプロスタグランジン、VIP-セクレチン-グルカゴン-GRFファミリーのペプチド、及び米国特許第4,411,890号中に記載されたようなGHRP-6、GHRP-1のような他のGH分泌促進剤、および米国特許第5,206,235号中に開示されたようなベンゾ-融合化ラクタムを含む。例えば1996年5月23日公開のWO 96/15148も参照。他の成長促進剤は、GHRPs, GHRFs, GH及びその類似体を含む。例えば、GHRPsは、1995年6月29日に両方公開のWO 95/17422とWO 95/17423; Bowers, J. *Pediatr. Endocrinol.*, 6: 21-31 (1993); 及びSchoenら, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 28: 177-186 (1993)。GHRFsとその類似体は、例えば1996年11月28日公開のWO 96/37514中に記載される。

加えて、GHRH、何れかのIGFBPs、長期作用性GH、GHプラスGHBP、インスリン、又は低血糖剤が、この目的のためにここでのIGFアゴニスト化合物と共に使用され得る。加えて、IGF-I又はIGF-II又はIGFBP-3に複合したIGF-IのようなIGFBPを伴うIGFもまた、ここでのIGFアゴニスト化合物と共に使用され得る。例えば、1994年8月4日公開の

WO 94/16723中に記載した通り賦形剤中に I G F -I と IGFBP を含んでいる製薬組成物は該化合物と共に使用され得る。その物は I G F アゴニスト化合物と逐次に又は同時に投与され得る。加えて、食事又はエクササイズのような I G F 状態を操作する他の手段も又、本発明の一部として治療に組み合わせるべきと考慮される。

もしインスリンが投与されるなら、それは何れかのインスリンの製剤とすることができるが、しかし N P H インスリンが好適であり、更に N P H インスリンの投薬量は、皮下的に日に二回約 5 から 5 0 単位／注射まで（即ち、約 0.2 から 2mg まで）である。インスリンと該化合物の組合せのために、この製剤中の化合物に対するインスリンの重量比は、一般に約 10:1 から 1:50 まで、好ましくは約 1:1 から 1:20 まで、より好ましくは約 1:1 から 1:10 まで、更により好ましくは約 1:1 から 1:5 まで、最も好ましくは 1:1 から 1:3 までである。

更に、その製剤は、スルホニル尿素のような低血糖剤の有効量と一緒に好適に投与される。その低血糖剤は、非経口、鼻腔内、経口を含む何れかの適当な技術によって、または何れかの他のルートによって哺乳動物に投与される。最も好ましくは、該投与は経口ルートによりなされる。例えば、1.25, 2.5, 及び 5mg 錠剤濃度において Upjohn によって販売される。MICRONASETM 錠剤（グリブライド）が経口投与のために好適である。この治療に配される、II 型糖尿病用の通例維持投与量は、単一投薬として又は適切と思われるようならその日中に分割して投与され得る、一日当たり約 1.25 から 20mg までの範囲内である。Physician's Desk Reference, 2563-2565 (1995)。処方のために利用可能なグリブライド-ベースの錠剤の他の実例は、GLYNASETM ブランド薬（Upjohn）と DIABETATM ブランド薬（Hoechst-Roussel）を含む。GLUCOTROLTM（Pratt）は、5- 及び 10-mg の強さで利用可能なグリピジド（1-シクロヘキシル-3-（p-（2-（5-メチルピラジンカルボキシアミド）エチル）フェニル）スルホニル）尿素）錠剤であり、食事コントロールに続いて低血糖治療が要求される II 型糖尿病に又は他のスルホニル尿素への応答を中止している患者において処方される。Physician's Desk Reference, 1902-1903 (1995)。ビッグアニド（例えばメトホルミンとフェンホルミン）又はチアゾリジンジオン（例えばトログリトゾン）、又はインスリン作用に影響を与える他の薬剤のようなスルホニル尿素以外の低血糖剤もまた使用され得る。チアゾリジンジオンが該化合物と共に使用される場合、それは現状で使用されると同じレベルで、又は該化合物単独で又はそのジオンと一緒に見られる効果のために調節され得る、いくらか低いレベルで使用される。それ自身により使用されるトログリタゾン（REZULINTM）の局部投薬量は、一日当たり約 100-1000mg、より好ましくは 200-800mg/日であり、この範囲がここにおいて適用可能である。例えば、Ghazzi ら、Diabetes, 46: 433-439 (1997) を参照。トログリタゾンよりもより強いインスリン感作剤である他のチアゾリジンジオンがより低い投薬量で用いられるだろう。

本発明の別な態様は、I G F とチアゾリジンジオン、又は I G F の組合せ、チアゾリジンジオン、及び本発明の化合物を含む組成物である。さらに、血糖値の制御をもたらす方法が、それを必要とする哺乳動物に、I G F とチアゾリジンジオンの有効量、又は I G F、チアゾリジンジオン、及び本発明の化合物の有効量を投与することによって提供される。活性剤は、同じ調剤又は共同での何れかで、逐次に又は一緒に哺乳動物に投与され得る。有効量は、上述したように開業医により決定され、且つ一般に当該の状態を治療するために用いられる I G F の量と同じか又は少ない量（例えば、糖尿病用の I G F -I の約 10 から約 250 µg/kg/日まで）及び当該状態を治療するために有効であることが知られるジオンの量、又はその 3 つが使用されるなら、先に決定したような投薬量を用いる化合物の量を意味する。

加えて、本発明は、もしそれがペプチドであるなら、I G F アゴニスト化合物をコードしている核酸を用い、哺乳動物を治療するための遺伝子治療を用いることを意図する。一般に遺伝子治療は、哺乳動物における I G F レベルを増加（又は過剰発現）するために用いられる。I G F アゴニストペプチドをコードする核酸は、この目的のために使用され得る。一度アミノ酸配列が知られれば、それはその遺伝子コードの縮重を用い各種の核酸分子を生成すること、及び遺伝子治療のために使用するように選択できる。遺伝子治療の目的のために患者の細胞の中にその核酸（任意にベクターを含んだ）を受け取らせるための 2

10

20

30

40

50

つの主要なアプローチ：インビボとエクスピボがある。インビボ搬送のため、その核酸は、通例は I G F アゴニスト化合物が要求されるサイトで、患者の中に直接注射される。エクスピボ治療のため、患者の細胞は、取り出され、核酸を分離した細胞内に導入され、その修正した細胞は直接に又は、例えば患者の中に移植される多孔質膜の内部にカプセル内包される、の何れか一方が患者に投与される。例えば、米国特許第4,892,538号と5,283,187号を参照。生存細胞の中に核酸を導入するための利用可能な各種の技術がある。その技法は、意図した宿主の細胞においてインビトロ又はインビボで、培養した細胞内に該核酸が移入されるかどうかに基づいて変更する。インビトロで哺乳動物細胞の核酸の移入のために適当な技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-dextran、リン酸カルシウム沈澱法、などの使用を含む。遺伝子のエクスピボ搬送のために慣習的に使用されるベクターは、レトロウイルスである。

現在好適なインビボでの核酸移入技術は、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ随伴ウイルスのような）及び脂質ベースのシステム（遺伝子の脂質介在移入のために有用な脂質は、例えばDOTMA, DOPE及びDC-Cholである）によるトランスフェクションを含む。幾つかの場面において、細胞膜表面タンパク質に特異的な抗体又は標的細胞、該標的細胞上のレセプターのためのリガンドなどのような、標的細胞を標的化する剤と共に該核酸を提供することが望ましい。リポソームが使用される場合、エンドサイトーシスと関連した細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特有の細胞型のためのカプシドタンパク質又はそのフラグメントトロピック、循環におけるインターナリゼーションを受けるタンパク質のための抗体、及び細胞内局在化を標的化する及び細胞内半減期を増すタンパク質は、標的化及び／又は取込みの促進のために使用され得る。レセプター介在エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987) ; 及びWagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3410-3414 (1990) により記載される。現在知られる遺伝子の作製及び遺伝子治療プロトコルの説明は、Andersonら, Science, 256: 808-813 (1992) を参照。WO 93/25673及びその中に引用した参考文献も参照。

キットもまた本発明のために意図される。典型的なキットは、容器、好ましくはバイアル、製薬的に許容される緩衝液中に I G F アゴニスト化合物を含む I G F アゴニストのための化合物製剤及び該製薬的製剤を利用するためのユーザーに向けた、挿入文又はラベルのような指示書とを含むであろう。該キットは、GH, GHRP, GHRH, GH分泌促進剤, IGF, IGF BPに複合化したIGF, IGFBP, GHBPと複合化したGH; インスリン、又は低血糖剤のための容器、好ましくはバイアルを任意に含む。

リガンドへの結合のためにポリペプチドと競合するペプチド、該ペプチドはファージ-ディスプレイライブラリーから得られ、のリガンドへの結合のための相対アフィニティを予測するための方法もまた提供され、該方法は、該リガンドの存在中で該ポリペプチドと共に該ペプチドに一致するファージミドクロンをインキュベートすること、該ファージを連続的に希釈すること、及び該リガンドへの該ファージミドクロンの結合が該ペプチドによって抑制される度合を測定することを含み、ここで低ファージ濃度でのみ抑制されるファージミドクロンは、高い及び低いファージ濃度の両方で抑制されるファージミドクロンよりもリガンドに対するより高いアフィニティを有する。詳細は後述の実施例7において提供される。好ましくは、該リガンドはIGFBP-1又はIGFBP-3のようなIGFBPであり、該ポリペプチドは I G F である。

ここでの別な実施態様において、そのサイトで、普及又は不在の何れか一方であるIGFBPに特異的であるここでの化合物の有効な量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における特有なサイトから離れた又は向かってのいずれか一方に内因性 I G F を導くための方法が提供される。この目的のための「サイト」は、心臓のような、又は脳-特異的IGFBPsを経る脳のような特有の組織又は器官を含む。そのサイトでの普及は、当該のIGFBPが該サイトで局在され及び該サイトでのIGFBPの本質的な又は生物学的に重要な部分を構成することを示す。この示唆は、ここで実証した該化合物のIGFBP-1対IGFBP-3のための特異性に従う。

10

20

30

40

50

本発明は、以下の実施例を参考することによりより完全に理解されるであろう。それは、しかしながら、本発明の範囲を制限することとして考慮されるべきでない。ここに記載した全ての文献と特許引用例は、参考により明白に併合される。

実施例

IGFBPsに結合し I G F レセプターにはしない分子の効果を発見するために、Bayneら, J. Biol. Chem., supraにより記載された変異体ヒト I G F -Iを、大腸菌 (E. coli) 中での組換え D N A 技術により生産した。特に、プラスミド pIGFMI を、残基24と31で変わったアミノ酸 (Y24L,Y31A) を持った I G F -I変異体の生産のために設計し、またこれら実施例において (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1又は I G F -Mと表示した。該プラスミドは、phGH1の構築のために記載した通り pBR322 (Sutcliffe, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 43: 77-90 (1978)) の基本的バックボーンから構築した。Changら, Gene, 55: 189-196 (1987)。その遺伝子の発現のために要求される転写の及び翻訳の配列は、アルカリホスファターゼプロモーターと trp Shine-Dalgarno配列により提供された。Changら, supra。さらに、ラムダ転写終結配列は、その遺伝子の下流に配される。ScholtissekとGrosse, Nucleic Acids Res., 15: 3185 (1987)。細胞質から細胞周辺腔までのタンパク質の分泌は、lambシグナル配列によって導かれる。ClementとHofnung, Cell, 27: 507-514 (1981)。Lambシグナル配列と I G F -I変異体 (Y24L,Y31A) のヌクレオチド及びアミノ酸配列が図1中に示される。

pIGFMIの構築のためのベクターフラグメントは、XbaIとClaIによるp131TGFの消化によって分離した。そのベクターp131TGTは、アルカリホスファターゼプロモーター、アンピシリンとテトラサイクリン耐性マーカー、及び trp Shine-Dalgarno配列のための配列を含む。I G F -IのLambシグナル配列とアミノ酸1-15は、XbaIとPstIによるpBKIGF-IIB (米国特許第5,487,980号) の消化により提供した。ほぼ120bpのフラグメントを分離し、Y24LとY31Aの変わった (コドンに下線を付した) アミノ酸をコードしている合成 D N A の以下の鎖に予備結紮した:

**5'-G TTC GTA TGT GGT GAT CGA GGC TTC CTG TTC AAC AAA CCG ACT GGG GCT G
3'-ACGT C AAG CAT ACA CCA CTA GCT CCG AAG GAC AAG TTG TTT GGC TGA CCC CGA
CCTAG**

(それぞれ、配列番号: 22と23)

残る I G F -Iコード化配列とラムダ転写終結は、pBKIGF-IIBの適切な190bp BamHIからClaIフラグメントを分離することによって提供した。これらの配列は、図2中に示した通り、pIGFMIを構築するために一緒に結紮した。pIGFMIの完全なヌクレオチド配列は図3中に示される。

Bayneら, J. Biol. Chem., supraは、I G F 結合タンパク質への又は I G F 又はインスリンレセプターへのその結合に関して I G F -I変異体の特性を記載した。この研究はヒト I G F -I上の位置24,31,及び60でチロシン残基が1型 I G F -Iレセプターに対する結合のために重要であることを示した。これらチロシン残基の2つが変異した、変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1は、8.7mMの野生型hIGF-Iのアフィニティーに比べて2,000nMのリガンド結合の半最大抑制を有する。これは、野生型hIGF-Iと比較して約250倍 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1による1型 I G F レセプターのアフィニティーの相対的減少を示す。

インビトロでの活性に関して I G F における変異の機能的な効果は、Bayneら, J. Biol. Chem., supra.によっても研究された。L7ネズミ線維芽細胞内への³Hチミジンの併合を用いたそのアッセイ系は、1型レセプターに結合することの I G F 変異体の能力と、D N A 合成を刺激することの能力との間に良好な相関関係を示した。これは、このインビトロ活性化アッセイにおいて200倍以上の (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1の活性における減少に反映される。しかしながら、ヒト血清IGFBPsへの (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1の結合は、野生型 I G F -Iで見られるそれに類似する。Bayneら, supra.従って、以下の実施例において、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1は動物において試験されるべく選択した。この分子は、その変異体が2つの変異体のみを含むため、1型 I G F レセプター結合が200倍以上減じられるため、及びIGFBPsへの結合が大部分は維持されるために選択した。

実施例 1

(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1のインビトロでの活性

I G F レセプターについての I G F -I 変異体の直接活性を試験するため、2つの異なるアッセイを利用した。第3のアッセイは、もしその変異体が競合環境においてIGFBPsをI G F に移し替えることができたならば測定するために使用した。

アッセイ 1 : ヒト 1 型レセプターのためのKIRA

このアッセイは、ヒト 1 型レセプター用の直接活性アッセイである。1 型 I G F レセプターのようなチロシンキナーゼファミリー中のレセプターが活性化される場合、それはチロシン残基上でリン酸化される。このアッセイにおいて、1 型 I G F レセプターを含んでいる細胞は、インビトロで活性化し、次いで分離し、そして該レセプターに対する抗体が、I G F レセプターを沈殿するために使用される。次に、抗-ホスホチロシン抗体がリン酸化される 1 型 I G F レセプターの量をアッセイするために使用される。もし固定した多数の細胞が使用されるなら、リン酸化されるレセプターの量は、1 型 I G F レセプター上の分子の活性の直接的な指標である。

ヒト 1 型 I G F レセプター用のKIRAは、ヒトMCF-7細胞を用いて発展した。この細胞系は、ヒト乳ガン腫瘍から最初分離され、ATCCから利用可能である。これら細胞の増殖は、I G F -I の添加に応答することが知られる。I G F -I がこれら細胞 I G F -I 加えられる場合、I G F -I のリン酸化において投薬量絡みの増加が生じる (図 4)。I G F 変異体の添加は、レセプターリン酸化においていずれかの変化の原因とならない (図 4)。変異体 I G F の非常に高い濃度での一様なリン酸化の徴候はなかった。

特に、該アッセイは以下の通り：

細胞

M C F - 7、ヒト胸部アデノカルシノーマから分離した癒着細胞系は、American Type Culture Collection (ATCC-HTB22; American Type Culture Collection, Rockville, MD) から入手した。M C F - 7 細胞は、F A C S 分析によって表面 I G F -IRの測定可能なレベルを発現することが示されている。培養経過のために、該細胞は、150cm²組織培養フラスコ (コーニング社) 中、1.5x10⁶/フラスコで4-7日間培養した。アッセイのために、細胞は、PBS/5mM E D T A で組織培養フラスコから分離し、定量化し、さらに平底マイクロタイター板 (Falcon 3072, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) 中、ウェル当たり2x10⁵で、5% C O₂ 中 3 7 °C で一晚培養した。

媒体

細胞は、ジェネンテック社の媒体施設中で調製したF12/DMEM50:50 (特別処方としてGibco から得た、Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) 中で培養した。該媒体は、10% F B S (HyClone, Logan, Utah), 25mM H E P E S (Gibco), 及び2mM L - グルタミン (Gibco) を追加した。

KIRA-ELISA

100 µl 媒体中の M C F 7 細胞 (2x10⁵) は、平底の 9 6 - ウェル培養板中の各ウェルに加え、5% C O₂ 中 3 7 °C で一晚培養した。翌朝、該ウェルの上清をデカントし、該プレートをペーパータオル上で軽く水気を拭った。次いで実験サンプル又は組換えhIGH-I標準品のいずれか一方を含んでいる刺激媒体 (25mM H E P E S と 2.0% B S A を含む F12/DMEM50:50) を各ウェルに加えた。該細胞を 3 7 °C で 3 0 分間刺激し、該ウェルの上清をデカントし、該板をペーパータオル上で今一度軽く水気を拭った。細胞を溶解し且つレセプターを可溶化するため、溶解緩衝液の 100 µl を各ウェルに加えた。溶解緩衝液は、50mM H E P E S (Gibco)、0.5% Triton-X 100 (Gibco)、0.01% チメロソール、30KIU/ml アプロトニン (ICN Biochemicals, Aurora, OH)、1mM 4 - (2 - アミノエチル) - ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸 (AEBSF; ICN Biochemicals)、及び2mM オルトバナジン酸ナトリウムを含む 150mM N a C l からなる。該板は次いで、6 0 分間室温でプレートシェーカー (Bellco Instruments, Vineland, NJ) 上で温和に攪拌した。

該細胞を可溶化している一方、ポリクロナル抗 - I G F -IR (ヒト 1 型 I G F -I レセプターに対する抗体、カタログ 3B7, Santa Cruz Biotech, P B S 中 5.0 µg/ml、100 µl/ウェ

ル)によって4℃で一晩被覆したE L I S Aマイクロタイター板(Nunc Maxisorp, Inter Med, Denmark)をデカントし、ペーパータオル上で水気を取り、ブロック緩衝液(0.5% B S A (Intergen Company, Purchase, NY)と0.01%チメロソールを含むP B S)によって60分間室温で温和に攪拌することによりブロックした。60分後、抗-I G F-IR被覆プレートを、自動プレートワッシャー(Scan Washer 300, Skatron Instruments, Inc, Sterling, VA)を用いて洗浄緩衝液(0.05%Tween-20と0.01%チメロソールを含むP B S)で6回洗浄した。

細胞培養マイクロタイターウェルからの可溶化したI G F-IRを含む溶解液は、抗-I G F-IR-被覆と-ブロック化ELISAウェルに移し、且つ温和な攪拌とともに室温で2時間インキュベートした。未結合レセプターは、洗浄緩衝液で洗浄することにより取り除き、次いで希釈緩衝液(0.5%B S A、0.05%Tween-20、5mM E D T Aと0.01%チメロソールを含むP B S)中に0.1μg/mlに希釈したビオチン化抗体4 G 1 0(抗ホスホチロシン)の100μgを各ウェルに加えた。室温で2時間のインキュベーションの後、該板を洗浄し、さらに希釈緩衝液中に1:50,000に希釈したHRP-接合デキストラン-ストレプタビジン(Amdex Laboratories)の100μlを各ウェルに加えた。該プレートは、温和な攪拌とともに室温で30分間インキュベートした。遊離アビジン-接合体を洗い流し、さらに新たに調製した基質溶液(テトラメチルベンジジン; T M B; 2-コンポーネント基質キット; Kirkegard and Perry, Gaithersburg, MD)を各ウェルに加えた。反応は10分間継続させた後、着色発生を1.0M H₃P O₄の100μl/ウェルの添加で停止した。450nmでの吸収は、マッキントッシュCENTRIS 650TMコンピューター(Apple Computers, Cupertino, CA)とSOFTMAXTMソフトウェア(Molecular Devices)によって制御したv m a xプレートリーダー(Molecular Devices, Palo Alto, CA)を用い、650nmの参照波長(Abs₄₅₀)によって読み取った。標準曲線(図4)は、300, 100, 33.3, 11.1, 3.7, 1.2, 0.4, 又は参考標準として(ジェネンテック社、lot 1189-2又は均等物)0ng/ml I G F-IによってM C F 7細胞を刺激することによって作成した。サンプル濃度は、標準曲線上のその吸収の挿入によって得られ、I G F-I ng/ml活性に換算して表した。変異体はこのアッセイにおいてレセプターをリン酸化しない。

アッセイ2: マウス3 T 3細胞の細胞数の増加

I G F変異体の活性は、D N A合成と細胞複製についてのI G F-Iの活性のためのバイオアッセイにおいても測定した。このアッセイにおいてマウス3 T 3細胞を培養し、さらにI G F変異体又はI G Fを加え、次いで³H-チミジンを滴定した。取り込まれた³H-チミジンの量は、D N Aの複製及び従って細胞複製の指標である。I G F-Iは、投薬量絡みの方法においてチミジン取り込みを増加した(図5)。I G F変異体は、非常に高い濃度を加えた場合に一樣にこのアッセイにおいて活性なしを示した。

アッセイ3: IGF-BPsへの(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1のインビトロでの結合

変異体(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1は、競合結合アッセイにおいてIGFBPsからの放射能標識化rhIGF-Iを移動するその能力を試験した。このアッセイは、一晩96-ウェル板上に、組換えヒト(rh)IGFBP-1又はrhIGFBP-3(160ng/ml)を被覆すること、0.5%B S Aで1時間プレートをブロックすること、1時間rhIGF-1(250-0.08ng/ml)又は(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1を加えること、次いで¹²⁵I-IGF-1の20,000cpmを加えること、及び洗浄と計測の前に2時間インキュベートすることを含む。図6は、変異体(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1が野生型hIGF-Iのそれと異なり数倍のみのアフィニティーによって組換えIGFBP-1に結合することを示す。図7は、変異体(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1が野生型hIGF-Iのそれと異なり数倍のみのアフィニティーによって組換えIGFBP-3に結合することを示す。

結論

2つのインビトロアッセイにおいて、変異体(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1は、1型I G F-レセプターへのわずかな又は無の直接活性を示した。第1に、それはKIRAアッセイにおいて該レセプターのリン酸化によって測定されたようなヒトI G F-Iレセプターを活性化しない。第2に、それは3 T 3細胞の中に取り込まれたチミジンにより測定されたようなマウスI G F-Iレセプターを直接的に刺激しない。従って、I G Fレセプターのその活性の欠落

10

20

30

40

50

に基づいて、IGF変異体はインビトロで不活性となることも予想されるであろう。しかしながら、変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1は、インビトロでIGFBP-1とIGFBP-3への顕著な結合を示さない。このインビトロのデータは、インビトロでの変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1を試験するための基礎を提供した。

実施例 2

(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1のインビトロでの活性

緒言

実施例 1 で試験した変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1をインビトロで試験した。たとえ該変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1がインビトロで不活性であったとしても、このクラスの分子 (レセプター上で直接的には不活性であるが、IGFBPsに結合することができる分子) がインビボで何らかの活性を示すであろうと仮定した。第 1 の実験において (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1は意識のあるラットに I V 注射により与えられ且つ血糖値制御の作用を測定した。

方法

7 週齢オスWistarラット (240-250g, Charles Rivers Laboratories, Hollister, CA) を、KETAMINE/XYLAZINETM麻酔で意識喪失し、右頸静脈を慢性的血液サンプリング用に開発したシリコンラバーカニューレによってカニューレ挿入した。Clarkら, J. Endocrinol., 111: 27-35 (1986)。2、3 日の回復期間の後、2つの基礎の血液サンプルを -10 と -5 分で採取し、その試験物質を I V 注射によりラットに投与し、次いで血液サンプルを、5, 10, 20, 30, 45, 60, 及び 120 分後に採集し、その血漿を遠心分離によって直ちに分離した。グルコースとインスリン濃度は、Chem 1A 血清化学分析装置を用いる結合ヘキソキナーゼ方法又は、後者の場合において、ラットインスリン R I A キット (Linco Research, Inc., St. Charles, MO) によるいずれかで測定した。

統計学的比較は、ダンカンの多重範囲試験によって変数 (ANOVA) の分析によって作成した。 < 0.05 の p 値は統計学的有意差であると見なした。全てのデータは平均値 ± SEM として表した。

結果

実験 1

群当たり 5 匹のラットを持つ 2 つの処置群は、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 (100 µg) 又は P B S のいずれか一方を I V 投与した。

該処置に対する血漿グルコースと血漿インスリンの応答は、それぞれ図 8 A と 8 B 中に示した。該データは、平均化し且つ 100% でセットした前処置血液サンプルにおける値のパーセンテージとして表した。(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 の I V 注射の一つは、血漿インスリンレベルを即座に (5 分後に)、劇的に且つ有意に (10 分後、コントロールに対し P < 0.001)、コントロール群のその 25% に減少し、60 分間低下を維持した。血漿インスリンにおけるこの落下は、短時間のしかし統計学的に有意な (10 分後、コントロールに対し P < 0.05) 血中グルコースの落下を伴った。

実験 2

群当たり 4 - 5 匹のラットを持つ 3 つの処置群中のラットは、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 (100 µg) 又は rhIGF-1 (100 µg) のいずれか一方を I V 投与し、コントロール群は P B S を与えた。

図 9 A と 9 B は、平均化し且つ 100% にセットした前処置血液サンプルにおける値のパーセンテージとして表した血漿グルコース (図 9 A) と血漿インスリン (図 9 B) の応答を示す。血漿インスリンレベルは有意に減少し (10 分後、コントロールに対し p < 0.001)、rhIGF-1 の I V 注射に応答して 120 分間低下を維持した。加えて、短時間のしかし統計学的に有意な (10 分後、コントロールに対し p < 0.01) 血中グルコースの落下があった。これらは rhIGF-1 の注射に対して予想した応答であった。(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 が注射された場合、野生型 rhIGF-1 を与えたラット中のインスリンにおける落下に対して統計学的に有意な (10 分後、コントロールに対し p < 0.001) の類似の大きさと度合のインスリン濃度における低下があった。(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 投与後のインスリンレベルは、実験の終わりまで有意な抑制を維持した (120 分後、コントロールに対し p < 0.05)。少な

いがしかし統計学的に有意な（10分後、コントロールに対し $p<0.05$ ）血中グルコースの落下があった。

結論

2つの個別の実験において、高いアフィニティーでIGFBPsに結合するIGFレセプターには乏しく結合する分子、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1は、通常のラットにおいてIVによって与えた場合、血糖応答変数についてIGF-様の活性を示す。この活性は文献におけるデータから予測することができなかった。該IGF変異体は、野生型rhIGF-Iの作用に類似した程度であったインスリン分泌における抑制作用を示した。この作用のサイズ、及びrhIGF-Iそれ自身の投与の後に見られたその類似性は予期しないものであった。グルコースレベルの落下は、rhIGF-Iの投与の後に見られたと同じく大きくはなかった。応答のこの理法、血中グルコースレベルについてよりもインスリン分泌に関するより大きな作用は、rhIGF-Iに対するこれらの応答の感受性の結果として起こる。インスリン分泌の抑制は、より低い血中グルコースレベルが必要とされるよりもrhIGF-Iのより低い投薬量で見られる。Furnsinnら, Endocrinology, 135: 2144-2149 (1994)。

10

実施例3

糖尿病ラット内への(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1の注射

緒言

実施例2において、IGF-I変異体は、通常为非糖尿病ラットにおいてインスリン分泌を減じ且つ血中グルコースを低下した。糖尿病状態において、内因性IGF系を操作することで血糖コントロールの同様の变化に至るであろうことは不明であった。それ故に、II型糖尿病の動物モデルをIGF-I変異体の血糖活性を試験するために選択した。選択した動物、Zuckerラットは、ラットにおける糖尿病に関連した肥満症の良く知られたモデルである。Sternら, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 139: 66-69 (1972)。これらラットの垂系統、Zucker糖尿病肥満系統(ZDF)は、それが進行性 β -細胞不全とさらに明らかな糖尿病とともに、早期で肥満とインスリン耐性になることから、II型糖尿病の良好なモデルである。Johnsonら, Science, 250: 546-549 (1990)。IGF-I投与がII型糖尿病の開始と重篤度を長期に遅らせ得ることがZDFラットにおいて先に示されている(1996年5月23日公開のWO 96/15148)。従って、ZDFラットは、血糖制御に関してIGFアゴニスト化合物の効果を検査するためのII型糖尿病の適当で敏感な動物モデルを提供する。

20

本実施例においてIGF変異体の静脈内ボラス注射を与え、血中グルコース及びインスリン濃度についての効果を実験した。

30

方法

18匹の7週齢オスZucker糖尿病肥満ラット(250-300g, Genetic Models社)を、KETAMINETM (62.5mg/kg) /ROMPUN XYLAZINETM (12.5mg/kg) 麻酔を用い意識喪失した。右頸静脈がシリコンゴムカテーテルを用いカニューレ挿入され、該ラットを回復させた。

実験1

手術後2日目、該ラット(5-6/群)を3つの処置群に分割し、頸静脈カテーテルを経て、200 μ lの:

- 1) PBS賦形剤;
- 2) IGF変異体(100 μ g); 又は
- 3) rhIGF-1(100 μ g)

40

をIV投与した。

rhIGF-1の投薬量は、血中グルコースレベルと血中インスリンレベルの少ない落下が生じ得る投薬量として選択した。IGF変異体の同じ投薬量が比較のために投与された。

実験2

3日後、同じラットを用い該実験を繰り返した。最初の実験においてIGF-Iを投与した該ラットは繰り返しの実験においてIGF変異体を受けさせ、逆の場合も同じとした。コントロール動物は両方の実験においてPBSを受けさせた。

測定

2つの血液サンプルは、ホルモンをIV投与する前に頸静脈のカニューレを経て各ラット

50

から採集し、次いで血液サンプルを10, 30, 60, 及び120分後に採集した。その血漿は遠心分離によって直ちに分離した。グルコース濃度はChem 1A血清化学分析機を用い結合ヘキソキナーゼ方法により測定した。インスリン濃度は、ラットインスリンRIAキット (Linco Research, inc., St. Charles, MO) を用い測定した。

各時間点での統計学的比較は、Duncan's多重範囲試験によるANOVAによって作成した。 $p < 0.05$ のp値は、統計学的に有意とされるとして見なした。全てのデータは、処置群当たり5または6動物による平均値 $\pm$ SEMで表した。

結果

実験1の結果を図10Aと10Bに、実験2の結果を図11Aと11Bに示した。各図において上部パネル(A)は基線(100%としてセット)からの血漿インスリンのパーセンテージ変化を、下方パネル(B)は基線(100%としてセット)からの血漿グルコースのパーセンテージ変化を示す。

実験1において、rhIGF-IのIV注射は、直ちに、適度な、且つ統計学的に有意の($p < 0.01$ 対コントロール、賦形剤処置動物)血中グルコースの低下を生じた(図10B)。反対に、賦形剤処置ラットにあっては、血中グルコースのわずかな増加があった。血中グルコースは次いでコントロール動物におけるレベルに復元した。少量であるが、しかし統計学的に有意な($p < 0.05$ 対コントロール、賦形剤処置動物)血中グルコースの低下が、IGF変異体で処置した動物において10分後に見られた。血中グルコースは次いでコントロールレベルに復元した。120分後、血中グルコースはrhIGF-IとIGF変異体の両方で処置した動物において低いレベルを漂った。これは、血中グルコースについてのIGF変異体の長期間の作用の示唆である。

血中グルコースにおけるこれらの変化は、血液中のインスリンの濃度における変化により達成された。コントロールラットの血中インスリンレベルは高く、そのレベルはサンプリングの2時間を通して維持された。rhIGF-Iの注射は、血漿インスリンにおける統計学的に有意な($p < 0.01$ 対コントロール、賦形剤処置動物)、大きな、且つ維持された低下を生じた。IGF変異体の注射もまた、統計学的に有意な($p < 0.01$ 対コントロール、賦形剤処置動物)血中インスリン濃度を抑制した。この群においてインスリンは注射の2時間後にコントロールレベルまでゆっくり戻った。

実験2において(図11Aと11B)、実験1と図10Aと10Bにおいて示したそれら知見と類似の結果が得られた。実験2において、rhIGF-IのIV注射は、直ちに、適度な、且つ統計学的に有意の($p < 0.01$ 対コントロール、賦形剤処置動物)10分後での血中グルコースの低下を生じた。血中グルコースは30分後にコントロールレベルに復元した。この実験において、類似の且つ統計学的に有意な($p < 0.05$ 対コントロール、賦形剤処置動物)血中グルコースの低下が、IGF変異体で処置した動物において10分後に見られた。血中グルコースは次いでコントロールレベルに復元し、次いで低レベルを漂った。再度、これは、血中グルコースについてのIGF変異体の長期間の作用の示唆である。

血中グルコースにおけるこれらの変化は、血液中のインスリンの濃度における変化により達成された。コントロールラットの血中インスリンレベルは高く、そのレベルはサンプリングの2時間を通して維持された。rhIGF-Iの注射は、血漿インスリンにおける統計学的に有意な($p < 0.01$ 対コントロール、賦形剤処置動物)、大きな、且つ維持された低下を生じた。IGF変異体の注射は、同様に且つ統計学的に有意な($p < 0.01$ 対コントロール、賦形剤処置動物)血中インスリン濃度の低下を生じた。両方の群において、インスリンはゆっくりとコントロールレベルに戻ったが、しかし2時間後、前注射レベル又はコントロールラットにおけるレベルに完全に戻っているとは思えない。

これらの実験は、IGFアゴニストの急性投与が、1)インスリンレベルを減じ、及び2)血中グルコースレベルを減じることを示す。本実験において、一度だけの注射が与えられ、その輸送は静脈中であつた。IGF変異体の一度の注射が血糖値パラメーターに関して効力を示したこと、多数回の注射は、有益な長期間の累積的な効果に至る同様の急性血糖値作用を示すであろうことがほぼ確実であろう。また、皮下で与えた注射がここで用いた静脈内注射と類似の効果を有するが、しかし皮下注射部位からその緩やかな吸収

10

20

30

40

50

のために時間差の原因を示し得ることも予期されるであろう。

ヒトにおいて、rhIGF-Iの注入は、血中グルコースを減じるのに必要とされたそれよりもより低い投薬量でインスリン放出を抑制し（Hartmanら, J. Clin. Invest., 91: 2453-2462 (1993)）、且つrhIGF-Iのそのような低投薬量オイグリセミック注入はまた、断食-増加拍動GH分泌をも急速に抑制する。それ故に、インスリンの落下は、IGFアゴニストが、増加する内因性活性IGF-Iレベルを生じる、IGF-Iの生物学的利用能を増加すると仮定して、そのIGFBPsの一つとIGFとの相互作用を抑制する分子の投与の後にIGF-Iの放出の感受性マーカーとされることが予期される。

通常の動物と糖尿病動物を用いる、ここに示した実施例において、十分なIGF-Iが血中インスリン及び血中グルコース濃度の有意な低下を誘導することを活性化したことが推定され得る。

10

実施例 4

Hypoxラットへの (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1の長期投与

緒言

先の一連の実験は、IGF-Iレセプターに対してではなくIGFBPsに優先的に結合する分子を投与することの急性作用を述べた。これらの分子投与の短期間での効果は、血中グルコースとインスリンレベルの低下により示した通り、IGF様アゴニスト作用を生起することが現に示された。

次に現れる重要な関心事はIGFアゴニストの投与の長期間の効果である。もしこれらの活性のメカニズムがIGFの単純な置換であるなら、時間によって、長期間さらされることによって、継続的にさらされることによって又は高い投薬量にさらされることによって、IGFアゴニストの応答がタキフィラキシーを示すであろう及び急性応答が減少するであろう可能性がある。もし作用のそのメカニズムはIGFの単純な置換以外であるならば、IGFアゴニストの動物における長期間の作用は確実でない。加えて、グルコース調節についての短期間実験は、IGF-Iの長期間の作用、例えば同化作用、分化作用、有糸分裂作用、及び生体機能における作用を示していない。それ故に動物に対するIGFアゴニストの長期間投与は重要であった。

20

第1のモデルは下垂体切除ラットとした。下垂体切除ラットは、GHとIGF-Iの両方に対して非常に感受性である。Gulerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1998), supra; Clarkら, Endocrine, 3: 297-304 (1995)。しかしながら、内因性IGF-Iレベルは、下垂体切除ラットにおいて非常に低く（恐らく通常の10%のみ）、IGF変異体がそれ自身によって活性を示し得ないと思われた。それ故に、下垂体切除ラットの群は、組換えヒトGHをも与えた。下垂体切除ラットにおけるGH処置は血液中のIGF-Iレベルを引き上げ（Gulerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1988), supra; Clarkら, Endocrine, supra）、且つこのIGF-Iの増加した血中レベルがIGF変異体の共投与によって活性化され得るとの仮定は合理的であった。

30

方法

若いメスのSDラットはTaconic実験室で下垂体切除し、数日後に届いた。そのラットは頻繁に体重計測し、下垂体が切除された該実験の後2週と3週の間7グラムの体重増加又は減少した。25匹のラットをその体重に基づく5つのグループにランダムにグループ分けし、1ケージ当たりラット4匹でケージにランダムに割り当てた。その動物は食物と水を自由摂取し、温度と光を制御した室内で飼育した。

40

実験群

- 1) 賦形剤ポンプ、賦形剤注射；
- 2) (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 (10 µg/日、SCミニポンプにより)、賦形剤注射；
- 3) (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 (50 µg/日、SCミニポンプにより)、賦形剤注射；
- 4) 組換えヒトGH（ジェネンテック社からのNUTROPINTMブランド、20 µg/日、SC注射により、各10 µg/日で2回注射）、賦形剤ミニポンプ；又は
- 5) (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 (50 µg/日、SCミニポンプにより) プラス組換えヒトGH (20 µg/日、SC注射により、各10 µg/日で2回注射)。

50

ラットには1週間投薬した。

ホルモン

変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1は、KETAMINETM/XYLAZINETM麻酔で麻酔した間にそのラットの背部の首部位中の皮下トンネル中に配した浸透性ミニポンプ (ALZET2001TM, Alza, Palo Alto, CA) により投与した。そのポンプは、24 μ lの溶液が1週間毎日輸送されると仮定し、計算した一日投薬量が50 μ g又は10 μ gとなるように溶液で満たした。

組換えヒトGHは、100 μ l容量中10 μ gの日に二度のSC注射により一週間投与した。

rhGHの注射を受けない動物は賦形剤の注射を受け、且つIGF-Iを投与しない動物は塩溶液充填ポンプ移植している。

測定

体重は毎朝測定した。投薬の週の終わりに、その動物をCO₂を経て麻酔し、心臓穿刺を経て放血した。残りの血液は凝血させ且つ血清を分離し、更なる分析用に保存した。

脾臓、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、及び腎周囲脂肪を取り出し、秤量した。その脛骨を取り出し、骨端板の幅を組織学的に測定するために中性緩衝ホルマリン中で固定した。

血清化学は自動化Chem 1分析機により測定した。血清インスリン濃度は、Linco社によって提供されたRIAキットを用い測定した。IGF-I濃度を測定するため、血清をエタノールを用いて抽出し、その上清を中性状態まで希釈し、RIAによってIGF-Iを測定した。血清抽出液中のラットIGF-Iの濃度は、Diagnostic Systems Laboratories社からのキットを用いるRIAによって測定した。ヒトIGF-I濃度はジェネンテック社でRIAによって測定した。

頸骨は長手方向に分割し、トルエンブルーで染色し、顕微鏡のスライドガラス上に搭載した。その頸骨の骨端板の幅は顕微鏡に接続した接眼マイクロメーターを用いて測定した。データは1のファクター及び2のファクターANOVAを用いる変数の分析の分析によって統計学的に分析した。

結果と考察

体重：

図12は実験の終了時点での動物の最終体重増を示す。hGH注射の結果として体重の顕著な増加があった。これは、賦形剤で処置した場合、体重増とならないこれらのGH不足下垂体切除ラットにおける予期された応答である。それ自身により、IGFアゴニストは、一日当たり50 μ gで少量の活性のみを示した。IGFアゴニストの一日当たり10 μ g群は、コントロール群のそれよりもより少ない平均体重増を有した。しかしながら、IGFアゴニストがhGHと一緒に与えられた場合、IGFアゴニストは全身体の成長についてhGHの活性の増大を示した。これは図12中の最終体重において示される。

器官成長：

器官重量データは、脾臓 (図13Aと13B)、胸腺 (図14Aと14B)、及び心臓 (図15Aと15B) で示される。各図において、絶対器官重量が上部パネル、A中に示され、体重のパーセンテージとして表した器官重量が下部パネル、Bにおいて示される。

絶対脾臓重量 (図13A) は、それがhGHのためであるとして、IGF変異体単独の両方の投薬によって増加した。hGHの応答は、IGFアゴニストに対するそれよりもより大きかった。しかしながら、hGHプラスIGFアゴニストの組み合わせは、相乗効果の証拠と共に脾臓サイズを倍増した。脾臓サイズを全身の成長で補正した場合 (全体中のパーセンテージとしてのデータで表現することによって)、IGFアゴニストは再度、単独投与の場合に活性化の証拠を示した。しかしながら、現にhGHとIGF変異体の組み合わせの相乗効果は、組み合わせ処置への非常に大きな応答があるとして、より明白であった。

絶対胸腺重量 (図14A) は、高投薬量IGFアゴニストによってもまた増加した。hGHに対する及びIGF置換物に対する応答は大体等しかった。hGHプラスIGFアゴニストの組み合わせは胸腺重量をも増加した。胸腺サイズを全身の成長で補正した場合 (全体中のパーセンテージとしてのデータで表現することによって)、IGFアゴニストは再度、単独投与の場合に、hGHによって生起されたそれに類似している再度応答によって

、活性化の証拠を示した。

本実施例において、10-及び、50- μg 投薬量で I G F アゴニストは、心臓の絶対及び相対サイズにおける有意な増加を生じた（図 1 5 A と 1 5 B）。一方、h G H による処置は、絶対心臓重量と相対的な心臓重量をわずかに増加した。h G H との組み合わせにおいて I G F 変異体による処置は、心臓の絶対重量をより大きく増加し、相対心臓重量において G H 誘導化減退を逆転した。

骨の成長：

この実験中の 5 つの処置群からの骨端板の幅を図 1 6 中に示した。コントロール下垂体切除ラットにおける頸骨の幅（約 200 ミクロン）は、同じラットにおける文献中に報告されたそれと同じだった。Clark ら, *Endocrine*, 3: 717-725 (1995)。それ自身により与えられた場合、50 μg /日での (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 は、骨の成長において有意の増加を誘導した ($P < 0.01$ 対コントロール)。低い投薬量の (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 は、骨成長が増加しない。一方、rhGH の注射は、周囲 400 μm まで板の幅が増大する、骨の成長における非常に大きな増加を誘導した。rhGH と (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 の組み合わせは骨の成長における更なる増加を生じない。しかしながら、400 μm の頸骨板幅は、更なる増加が使用した投薬量で投薬する組み合わせによって生じることが起こりそうもないとされる最大値に近い。単独で与えた (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1 に応答する成長があったことから、h G H の低い投薬量で、単独で与えた各剤よりもその組み合わせの大きな効果が見られるであろうことが予期されるであろう。

血清 I G F -I レベル：

血液中の I G F -I のレベルは、2 つのアッセイで測定した：一方のアッセイでは、血液中のラット I G F -I の量を、他方は血液中のヒト I G F -I の量を測定した。図 1 7 は、5 つの処置群における血液中のラット I G F -I の量（図 1 7 A）及び全 I G F -I の量（図 1 7 B）を示す。これらのデータの顕著な側面（図 1 7 A）は、レセプター-活性 I G F -I（内因性ラット I G F -I）の血中レベルが I G F アゴニストを与えた動物においてより低く、さらにこれらの低い血中 I G F -I レベルは各種の器官及び組織において顕著な I G F 様応答と関連したものである。明らかに、それはホルモンの血中レベルが減少される場合にホルモンの増加した活性の証拠を観測することと反対の認識である。

全 I G F -I 用のアッセイ（図 1 7 B）は、ラットとヒト I G F -I の両方を測定する。このアッセイにおいて、恐らく結合タンパク質への I G F -I アゴニストの結合のため及びそれ故に血液中に存在している、I G F -I アゴニストの 50 μg を与えたラットにおける全 I G F -I の上昇があった。I G F アゴニストの 10 μg の低い投薬量で、血液中の全 I G F の上昇はなかった。血液中の全 I G F は、この処置群において低下する傾向であったラット I G F -I のレベルに対して、G H と I G F アゴニストの組み合わせを与えたラットにおいて上昇する ($p < 0.05$ 対 hGH 単独)。これは、G H が I G F -I と IGF-BPs を生み出す場合に、スベアの結合容量があること、及びこの容量は I G F アゴニストによって部分的に満たされていることを示す。

結論

G H と I G F -I の組み合わせが、ヒトを含む動物と一緒に投与された場合、いずれかの剤単独よりもより大きな活性を示すことは先に示されている（米国特許第 5,126,324 号；Kupfer ら, *J. Clin. Invest.*, 91: 391-396 (1993)）。しかしながら、I G F アゴニストの投与が I G F 軸の活性化の結果を生じ且つ G H 投与の効果を増大するであろうことは不明確であった。本実験は、IGF-BPs に緊密に結合するが、I G F レセプターに乏しく結合する化合物の投与が、G H の活性を増大できることを示す。

I G F -I の投与が G H によって誘導されたそれに対する成長の異なるパターンを誘導することもまた報告されている。特に、I G F -I 投与は、脾臓、胸腺、及び腎臓の著しい過剰成長を示す原因となる。Guler ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4889-4893 (1988)；Skottner ら, *Endocrinology*, 124: 2519-2526 (1989)；Clark ら, *Endocrine*, 3: 297-304 (1995)。しかしながら、I G F 変異体単独で処置したラットの全身サイズが小さい応答のみ示したことから、処置した動物の器官のサイズにおけるわずかな変化があるであ

ろうことも予期され得る。これはそのケースではない；それは、I G F変異体が、I G F-Iに感受性であることが知られた器官、脾臓及び胸腺のいずれかについて非常に大きな「I G F様」効果を有することがこの実施例中に示される。

この実験における非常に驚くべき知見は、心臓のサイズについての処置の効果であった。下垂体切除又はG H欠乏ラットにおける以前の研究においては、I G F-Iの投与が心臓サイズに関して非常に少ないか効果がないことが示されていた。Gulerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4889-4893 (1988) ; Skottnerら, Endocrinology, 124: 2519-2526 (1989) ; Clarkら, Endocrine, 3: 297-304 (1995) 。

先に示した通り、I G F-IのアゴニストとしてのI G F変異体の効力に鑑みて、本発明は、血流中のI G F-Iの欠如に関連した、又はそれを特徴とした疾患の大きなグループの治療において適用を有することが予期される。そのような疾患の典型は、糖尿病、肥満症、同化作用疾患、免疫学的疾患、心臓疾患、及び腎臓疾患、同様に他に上述したものである。

実施例 5

Dwarfラットへの (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1の長期間投与
緒言

先の実施例では、(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1に相当するI G F-レセプターよりむしろIGFBPsに優先的に結合する分子を投与することの下垂体切除ラットにおける長期間の効果述べた。下垂体切除ラットは、それが下垂体ホルモンを欠くために、非常に少ない血清I G F-IレベルとIGFBPsの非常に少ないレベルを有する。Fielderら, Endocrinology, 137: 1913-1920 (1996) 。しかしながらこれら内因性タンパク質の低いレベルにも関わらず、I G F変異体は顕著な活性を示した。I G F変異体の活性を試験するため選択した次のモデルは、G HとI G F-Iの両方に応答する成長を示す、G H-欠乏dwarf (dw/dw) ラット (Charltonら, J. Endocr., 1198: 51-58 (1998)) とした。Skottnerら, Endocrinology, 124: 2519-2526 (1989) ; Clarkら, Endocrine 3: 717-727 (1995) 。dw/dwラットは、下垂体切除ラットであるように全体的なG H-欠乏ではなく、血清I G F-IとIGFBPsのより高いレベルを有する。従って、dw/dwラットに与えたI G F変異体の投薬量は、dw/dwラットの血液がより大きなI G F結合容量とより大きなI G Fを含むことが予想されたことから、増加した。

下垂体切除ラット (実施例 4) においてG HはI G FとIGFBPのより大きな量を生産するために与えられ、且つ外因性ホルモンの存在において試験した。この実施例において、外因性G Hの添加は、これら外因性投与したホルモンの存在においてI G F変異体の活性を発見するために、外因性I G F-Iの添加がされたように繰り返した。該実験の目的は、IGFBPsに良好に結合するがI G Fレセプターに乏しく結合する分子を投与することの効果を発見することであった。

方法

動物：

若いメスのdwarfラット (11-12週齢、115-140g) は、ホモ接合のマッチングによって繁殖され (Charles Rivers Laboratories) 、ジェネンテック動物舎に搬入し、それらはポリスチレンチップ上の5匹毎のケージに収容し、標準動物餌と水を自由に採取させ、制御した温度と光と共に定常湿度の室内で飼育した。その動物を秤量し、体重の統一性に基づき、37匹の動物を選択し、処置群に任意抽出し、等しい最初の体重 (ほぼ120g) の6つの処置群を与えるようにケージ分けした。

実験群：

実験は、群当たり6又は7匹のラットを持つ6つの群からなった。

- | | |
|--|-------|
| 1) 賦形剤コントロール
(賦形剤ポンプ) | 賦形剤注射 |
| 2) I G F変異体 (IGF-M)
(ポンプによって120 µg/日) | 賦形剤注射 |
| 3) I G F-M | 賦形剤注射 |

10

20

30

40

50

(ポンプによって120 µg/日)

4) I G F -M (120 µg/日) 賦形剤注射

プラス I G F -I (120 µg/日)

5) 賦形剤ポンプ hGH注射 (50 µg/日)

6) I G F -M hGH注射 (50 µg/日)

(ポンプによって120 µg/日)

ラットは8日間投薬した。

ホルモン：

変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1と固有配列組換えヒト I G F -Iは、KETAMINETM/XYLAZINETM 10
麻酔で麻酔した間にそのラットの背部の首部位中の皮下トンネル中に配した浸透性ミニポン
プ (ALZET2001TM, Alza, Palo Alto, CA) により投与した。そのポンプは、製造者の記
載の通り (一日当たり24 µlの溶液) が輸送されると仮定し、計算した一日投薬量が120 µ
g (1mg/kg/日) となるように溶液で満たした。

組換えヒト G H (50 µg/日) は、100 µl容量中25 µgの日に二度の s c 注射により 8 日間
投与した。

rhGHの注射を受けない動物は賦形剤の注射を受け、且つ I G F -Mを投与しない動物は塩
溶液充填ポンプ移植している。

測定：

体重は毎朝測定した。8日後、その動物をC O₂を用いて麻酔し、心臓穿刺を経て放血し
た。残りの血液は凝血させ且つ血清を分離し、更なる分析用に保存した。 20

脾臓、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、及び腎周囲脂肪を取り出し、秤量した。その脛骨を取り
出し、骨端板の幅を組織学的に測定するために中性緩衝化ホルマリン中で固定した。

血清化学はTECHNICON Chem 1 PLUSTM分析機により測定した。血清インスリン濃度は、Lin
co社によって提供されたR I Aキットを用い測定した。I G F -I濃度を測定するため、血
清を酸性エタノールを用いて抽出し、その上清を中性状態まで希釈し、R I Aによって I
G F -Iを測定した。血清抽出液中のラット I G F -Iの濃度は、Diagnostic Systems Labor
atories社からのキットを用いるR I Aによって測定した。ヒト I G F -I濃度はジェネン
テック社でR I Aによって測定した。

頸骨は長手方向に分割し、トルエンブルーで染色し、顕微鏡のスライドガラス上に搭載し
た。その頸骨の骨端板の幅は顕微鏡に接続した接眼マイクロメーターを用いて測定した。 30
データは1のファクターANOVAを用いる変数の分析、続いてDuncan's範囲試験によって統
計学的に分析した。

結果と考察

体重：

図18は、該実験の8日間にわたる処置の体重増の効果を示す。該実験の7日において、
更なる1日間の実験を継続することを決定し、h G Hの新たな調製物を作製し且つ注射し
た。7日と8日の間の大きな体重増は、h G Hのこの調製物が0日と7日の間で使用した
それと異なることを示唆する。従って、7日についてのh G H用の体重増データは、8日
でのそれよりも全般的な実験を良好に反映する。これらのG H-欠乏dwarfラットにおける
予期された応答、I G F -Iの注入又はh G Hの注射の結果として体重における顕著な増加 40
があった。それ自身によって、I G F アゴニストは、6日での統計学的に有意なアプロ
ーチによってのみの体重増と共に (賦形剤1.3±1.1g対 I G F 変異体4.2±0.6g、p<0.10)、
成長促進活性の少ない量のみを示した。しかしながら、I G F 変異体がI G F -Iと一緒に
与えられた場合、始めに明瞭な重量増があり (一日目での賦形剤-0.6±0.8g、I G F 変異
体0.5±0.6g、I G F -I 1.2±0.4g、I G F 変異体プラス I G F -I 3.3±0.8g、p<0.05対
I G F 変異体と I G F -I単独)、しかしこの応答は経時と共に衰えた。一方、h G H単独
とh G Hプラス I G F 変異体の間の相違は経時に伴って増加し、5日で統計学的有意に達
した (h G H単独12.4±0.9g対h G Hプラス I G F 変異体15.5±0.6g、p<0.05)。従って
、I G F 変異体は全身成長についてh G Hの活性を増大した。これらの効果は成長曲線と
最終体重において示した (図18)。

器官成長：

器官重量データは、脾臓（図19）と腎臓（図20）を説明する。各図において、絶対器官重量がAで示され（上部パネル）、体重のパーセンテージとして表した器官重量をBで示した（底のパネル）。

絶対脾臓重量（図19A）は、IGF変異体で処置した全ての群で増加する傾向にあった。例えば、賦形剤コントロールラットにおける脾臓重量（ $308 \pm 6\text{mg}$ ）は、IGF変異体単独で処置することにより $350 \pm 14\text{mg}$ に増加した（ $p < 0.10$ 対賦形剤）。IGF-I又はhGH処置のいずれか一方とIGF-Mの組み合わせもまた、より大きな脾臓を与える傾向にあった（図19A）。脾臓重量が体重のパーセンテージとして表される場合、IGF変異体により生じた脾臓サイズにおける類似の増加が見られた（図19B）。

10

絶対腎臓重量と相対腎臓重量を図20Aと20B中にそれぞれ示した。IGF-I変異体に対する腎臓の応答は、脾臓のそれに似ていた。例えば、相対腎臓重量は、IGF変異体による処置により、特にそれがIGF-Iとの組み合わせにおいて与えられた場合に増加した（IGF-I単独、 $0.85 \pm 0.3\%$ 対IGF-IプラスIGF変異体 $0.92 \pm 0.04\%$ 、 $p < 0.05$ ）。

腹膜後脂肪蓄積物は、屠殺時にラットから取り出し、秤量した。脂肪組織貯蔵を減じるIGF変異体の傾向があった（プラシーボ $0.56 \pm 0.09\text{g}$ 、IGF変異体 $0.53 \pm 0.10\text{g}$ 、IGF-I $0.48 \pm 0.06\text{g}$ 、及びIGF-IプラスIGF変異体 $0.43 \pm 0.05\text{g}$ ）。

血清化学とホルモン：

表Iは、屠殺時に採集した血清の分析から採集したデータを示す。ラットにおいて血中グルコースレベルについて各種の処置のいくらかの効果があったが、インスリンレベルについて非常に顕著な効果があった。GHの糖尿病誘発性作用が、賦形剤処置コントロールと比較してGH処置ラットにおける有意に増加したインスリン濃度（ $p < 0.05$ ）によって示された。もし該ラットがIGF変異体と共-処置されたならば、共-処置群における血清インスリンレベルが賦形剤コントロール群中のインスリンレベルと相違していなかったように、これは血清インスリンを増加する（GHの糖尿病誘発性作用）。

20

表 1

Dwarf ラットにおける血清測定

群	グルコース (mg/dl)	インスリン (ng/ml)	BUN (mg/dl)	クレアチニン (mg/dl)	AST (U/l)	CK (u/l)
賦形剤	198 ± 25	0.82 ± 0.04	19.3 ± 0.6	0.28 ± 0.02	137 ± 9	245 ± 47
IGF-M	174 ± 18	0.88 ± 0.09	17.8 ± 0.4 *	0.23 ± 0.03	143 ± 8	301 ± 44
IGF-I	190 ± 24	0.54 ± 0.06	16.0 ± 0.7	0.22 ± 0.05	128 ± 11	225 ± 18
IGF-M + IGF-I	193 ± 19	0.69 ± 0.07	13.8 ± 0.8 *	0.18 ± 0.02 *	101 ± 2 *	138 ± 11 *
hGH	192 ± 10	1.48 ± 0.29 *	15.6 ± 0.7 *	0.33 ± 0.02	123 ± 13	184 ± 29
hGH + IGF-M	202 ± 27	1.03 ± 0.20 *	15.3 ± 0.6 *	0.25 ± 0.02	113 ± 9	229 ± 30

10

20

データは平均 ± SEM、*p<0.05 対賦形剤コントロール。

IGF 変異体 (IGF-M) は腎臓サイズを有意に増加した。腎機能の血清測定の 2 つの目安、血清クレアチニンと血液尿素窒素 (BUN) レベルは、IGF 変異体によって減じられた。表 I は、血中のクレアチニン濃度が IGF-I と IGF 変異体の両方によってそれらが単独で与えられた場合、減少される傾向を示す；しかしながら、これらの効果は統計学的に有意ではない。しかしながら IGF-I プラス IGF 変異体は、腎機能の改善の目安、血清クレアチニンを有意に (p<0.05) 減じた。腎機能の第 2 の目安、血液尿素窒素もまた、IGF-I によって及び IGF-I プラス IGF 変異体によって減じられ、その組み合わせに関して、IGF-I 単独のそれよりも有意に大きくなっている (p<0.05)。

30

IGF-I プラス IGF 変異体の組み合わせは、賦形剤コントロールに比べて血液中の酵素 AST (アラニンセリントランスフェラーゼ) と CK (クレアチニンキナーゼ) の量を減じた (p<0.05)。AST は、心臓のダメージと機能の目安であり、CK は骨格筋機能の目安である。これらのデータは、骨格筋と心筋に関して IGF 変異体の有益な効果を示すとして解釈され得る。

40

骨の成長：

頸骨板幅は、賦形剤コントロールと比べ、hGH によって及び IGF-I 処置によって有意に (p<0.05) 増加した。全てのケースにおいて IGF 変異体は個別の処置に比べて平均板幅を増加したが、これらの増加は統計学的有意には達しない。

血清 IGF-I レベル：

血液中の IGF-I のレベルは、2 つのアッセイにおいて測定した (図 21A と 21B)。一方のアッセイ (図 21A) はラット IGF-I の量を測定し、他方のアッセイ (図 21B) は 5 つの処置群において血液中のヒト及びラット IGF-I (全 IGF-I) の両方を測定

50

した。これらのデータ（図21A）の著しい側面は、レセプター-活性IGF-I（内因性ラットIGF-I）の血液レベルが変異体IGFを与えた動物においてより低く、さらにこれらの低い血液IGF-Iレベルは、各種器官と組織における顕著なIGF様応答に関連した。明らかに、それは、ホルモンの血液レベルが減じた場合、ホルモンの増加した活性の証拠が観測されることと反対の認識である。

全IGF-I用のアッセイ（図21B）はラットとヒトIGF-Iの両方を測定する。このアッセイにおいて、結合タンパク質へのIGF-Iアゴニストの結合とそれ故に血液中に存在していることによると思われる、IGF-Iアゴニストの150 μ gを与えたラットにおける全IGF-Iの上昇があった。血液中の全IGFレベルは、IGF-I又はGHとIGFアゴニストのいずれか一方の組み合わせを与えたラットにおいて、これら組み合わせ処置群において低下したラットIGF-Iのレベルとは反対に上昇した。（ $p<0.05$ 対IGF-I単独又はGH単独）。これは、GHがIGFとIGFBPsを生成する場合、スベアの結合容量があり、この容量がIGFアゴニストによって部分的に満たされていることを示す。

結論

GH-欠乏dwarfラットにおけるこれらの長期間データは、下垂体切除ラットにおいて採集した長期間データを確証し拡張する；IGF変異体は同化及び成長促進作用を生産した。加えて、この実験は、IGF変異体がGHと共に投与した場合に成長促進活性を示すことを確証した。さらに、IGF変異体がdwarfラットにIGF-Iと一緒に与えられた場合、そのIGF変異体は投与したIGF-Iの活性を増加できた。それ故、本実験は、IGFBPsと緊密に結合するが、IGFレセプターに乏しく結合する化合物の長期間投与が、内因性IGF-I、外因的に投与したGH、及び外因的に投与したIGF-Iの活性を増大できることを示す。

この実施例においていくつかの重量な知見は、下垂体切除ラットにおいて作られた発見を拡張することをもたらした。

第1に、IGF変異体で処置したラットにおける腎臓の増加したサイズは、血液中のクレアチニン及び血液尿素窒素の濃度における低下によって果たされた。血液代謝におけるこれらの低下は、腎臓の増加した機能の特徴である。心筋と骨格筋に関する機能効果の更なる証拠もまた与えられた。脂肪塊の減少の証拠はIGF変異体を用い得られた。これは、身体組成の制御における、特に肥満症のためのIGFの使用を示す。例えば、肥満症の予防又は治療へのGHとIGF-Iの使用についての米国特許第5,597,797号を参照。

第2に、GHの投与は、インスリンにおいてこの上昇が防止されたIGF変異体の共-投与と同時に、インスリンの血液濃度を有意に増加した。それ故に、GHのこの周知の糖尿病誘発性作用はIGF変異体の共-投与によって逆転できた。

第3に、IGF変異体へのこれらの応答は「活性」ラットIGF-Iの血液濃度における低下の存在において生じた。

それ故、IGF変異体の長期注入は、1) その血液中に検出不可能なGHと非常に低いIGF-I濃度を有する下垂体除去ラット、2) その血液中に低いGHと低いIGF-Iレベルを有するdwarfラットにおいて複数の活性を示した。

実施例6

糖尿病ラットへの（Leu²⁴,Ala³¹）hIGF-1の長期間投与

この実施例において糖尿病の動物モデルは、IGF変異体によって長期間処置された。選択した動物はII型糖尿病ラット（Zucker糖尿病脂肪（ZDF）ラット）とした。このラットは、相対的に通常の脳下垂体機能（GH分泌に関して）と相対的に通常の血清IGF-I濃度を有する。従って、この動物モデルは、GHの完全な欠如（下垂体除去ラット）又はGHの明確な欠乏（dw/dwラット）及びIGF欠乏の両方である先の2つのラットモデルとは異なる。加えて、この実施例において、IGF変異体の投与形態は、注入（先の2つの実施例で用いた）から複数注射まで変えた。さらに、IGF変異体の投薬量は、先に説明した通り、ZDFラットが下垂体切除又はdw/dwラットのようにIGF欠乏でないこと及びそれ故に放出されるべき大量の活性IGFを有するために増加した。先の実施例において効力の目安とするために用いた主要な終点は身体成長の目安であったが、本実施例におい

て主要な終点は、動物の糖尿病段階の測定値、血中グルコースとインスリン濃度とした。先の実施例において、I G Fアゴニストの一つの注射の急速な静脈内投与が、1) インスリンレベルを減じた及び2) グルコースレベルを減じたことを示した。I G Fアゴニストの1つの注射が血糖値パラメーターについての効力を示し且つ長期間の注入が効力を示した（成長パラメーターのタキフィラキシーなしに）ことから、複数注射が有益な長期間累積血糖値効果に至る急性血糖値効果をその度毎に示すであろうと仮定した。また、皮下的に与えた注射が効力を示すであろうと仮定した。それ故に、後述した糖尿病ラットにおける長期間実験を開始した。

方法と実験群：

動物：

10

肥満のオスZucker糖尿病脂肪質（Z D F）ラット（6-7週齢、225-250g、Genetic Models社、indianapolis, IN 46268）は、温度と光を制御した室内でグループ飼育（3/ケージ）し、供給元で推奨した固形化ラット食餌（Purina 5008, 6% fat breeder chow）と飲み口からの水を自由に与えた。3日間の順応化の後、血液サンプルをラット特異的R I A（Linc Research社, St. Charles, MO）によって測定した、血中グルコースとインスリンの測定のため尾の静脈から得た。動物は4つの処置群に任意抽出し均等な最初の血中グルコースレベル、インスリンレベル、及び体重を有するように群のバランスを与えるようにケージに入れた。

該実験は、群毎に7匹のラットを持つ4つの群からなった。

- 1) 一日3回賦形剤注射、
- 2) I G F変異体（I G F-M）の注射（一日50 μ g三度）
- 3) I G F-Mの注射（一日150 μ g三度）
- 4) rhIGF-Iの注射（一日150 μ g三度）

20

該注射はそれぞれ100 μ lで一日三度与えた。

ホルモン：

変異体（Leu²⁴,Ala³¹）hIGF-1は、一日三回の注射によって二つの濃度を与える（総計450 μ g/日又は150 μ g/日）ように、二つの濃度（1.5mg/mlと0.5mg/ml）で調製した。rhIGF-Iは、一日三回の注射によって一つの投薬量（450 μ g/日）を与えるように一つの濃度（1.5mg/ml）で調製した。ラットの第4の群は賦形剤を与えた。それぞれ100 μ l容量の注射は、ビバリウム室の昼間の光を制御し混乱させることなしに15日間、午前7時、午後1時、及び午後7時に与えた。体重は毎日午後1時に測定した。

30

血液サンプリング：

血液サンプルは、投薬する最初の日前の晩に、及び3日、7日と10日に、非断食ラットから採集した。3, 7, 及び10日の血液サンプルは、昼間の注射の1時間後に尾の静脈から出血することによって採取した。その血液は凝固させ、血清を分離し、分析の前まで保存した。

グルコース耐性試験は、実験の14日目に実行した。ラットはその定例の朝の注射を受けさせ、その食餌を取り上げた。3-5時間後、出血サンプル（400 μ l）を尾の静脈を経て採取した。次にラットは腹腔内（ip）注射によって2g/kgブドウ糖（50%）を受けさせた。血液サンプル（200 μ l）を、ブドウ糖投与の10、60、及び120分後に尾の静脈を経て採取した。血液は凝固させ血清を分離し、グルコースとインスリン濃度の測定まで保存した。グルコース耐性試験が完了した後、動物は再度食餌を与えた。

40

15日目、朝の注射の1時間後、ラットは二酸化炭素によって仮死状態とし心臓穿刺によって放血した。血液は凝固させ、血清を分離し且つ凍結した。脾臓、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、及び腎周囲脂肪を取り出し、水気を切り乾燥し、直接秤量した。

統計学的分析：

各時間点の統計学的比較は、Duncan's多重範囲試験による変数の分析によって行った。<0.05のp値は統計学的有意であると見なした。全てのデータは、処置群当たり7匹の動物による平均 $\pm$ SEMとして表される。

結果

50

時間に対してプロットした体重増が図 2 2 A 中に 4 つの異なる処置群として示される。13 日目の体重増は、コントロール（コントロール、 $93.3 \pm 2.9\text{g}$ ）に対し、 $50 \mu\text{g}$ での I G F 変異体（ $100 \pm 2.1\text{g}$ 、 $p < 0.05$ 対コントロール）、 $150 \mu\text{g}$ での I G F 変異体（ $105.1 \pm 2.3\text{g}$ 、 $p < 0.01$ 対コントロール）、及び I G F -I（ $114.5 \pm 1.6\text{g}$ 、 $p < 0.0001$ 対コントロール）において有意に増加した。I G F 変異体の体重についての投薬-関連同化作用は、先の実施例における下垂体除去及びdwaftラットにおけるデータで確認される。

これらの糖尿病動物において、体重増の理由は、その処置が動物の糖尿病状態を改善したために同化作用ではなく間接的な作用ともされ得る。Carlssonら, J. Endocrinol., 122: 661 (1989)。データのこの解釈は、これら同じ動物における経時による血中グルコースの変化を示す図 2 2 B における説明によって裏付けられる。血中グルコースは、注射を始める前に測定し、その図はこの基本レベルからの変化パーセンテージを示す。図 2 2 B は、10 日で基礎の $141 \pm 21\%$ に達するまで賦形剤の繰り返し注射で処置したラットにおいて血中グルコースは堅実な上昇を示す一方、この時点で I G F -I の注射（一日 $150 \mu\text{g}$ 三度）は血中グルコースのこの上昇を大きく防止した（ $25 \pm 10\%$ 、 $p < 0.001$ 対コントロール）ことを示す。 $50 \mu\text{g}$ での I G F 変異体の注射（ $84 \pm 20\%$ 、 $p < 0.05$ 対コントロール）及び $150 \mu\text{g}$ での I G F 変異体の注射（ $74 \pm 22\%$ 、 $p < 0.05$ 対コントロール）もまた、10 日目でのこれら糖尿病ラットにおける血中グルコースの上昇を遅らせた。より早い時点で、例えば 7 日目で、高投薬 I G F 変異体及び I G F -I は血中グルコースの上昇を抑制することで等しく有効であった。

図 2 3 A と 2 3 B は、血中グルコースについてとインスリン濃度についてこれらの糖尿病ラットにおけるグルコース耐性試験の効果を示す。グルコース耐性試験は、模擬の食事として見なすことができる。そのラットは出血させ、次いで体重の 2g/kg でグルコースの腹腔内注射を与え、注射の後に再度出血させた。図 2 3 A は、グルコース負荷試験の後 2 時間の血中グルコースの変化を示す。賦形剤で処置した糖尿病ラットにおいて、血中グルコースは実質的に上昇した（ $105 \pm 21\text{mg/dl}$ ）。I G F -I による処置は、血中グルコースのより少ない上昇を生じ（ $39 \pm 12\text{mg/dl}$ 、 $P < 0.05$ 対コントロール）、同じく I G F 変異体による処置（ $150 \mu\text{g}$, tid）もまた、この上昇を弱めた（ $59 \pm 11\text{mg/dl}$ 、 $p < 0.1$ 対コントロール）。

I G F -I 又は I G F -変異体による処置の有益な効果の可能性のある理由は、図 2 3 B 中に示したインスリンによって提供される。I G F -I で処置したラットにおいて、 $50 \mu\text{g}$ での I G F 変異体（ $10.2 \pm 0.7\text{ng/ml}$ 、 $p < 0.05$ 対コントロール）又は $150 \mu\text{g}$ （ $10.6 \pm 0.6\text{ng/ml}$ 、 $p < 0.05$ 対コントロール）で処理したラットにおいてなされたそれよりも、より多くのインスリン分泌がグルコース負荷試験への応答において生じた（コントロール、 $81 \pm 0.6\text{ng/ml}$ 対 I G F -I, $12.2 \pm 0.7\text{ng/ml}$ 、 $p < 0.01$ ）。従って、I G F 変異体による長期処置は、グルコース負荷を処理する改善された能力に関係した模擬の食事に応答して多くのインスリン分泌を与えた。

考察

糖尿病ラットへの I G F -変異体を長期間投与するこの実験は、血中グルコースが内因性 I G F 系を操作することにより制御され得ることを示す。多分、糖尿病動物における改善されたグルコース制御の間接的なマーカー、及びグルコース制御の直接の目安（血中グルコースとインスリン）、体重増は糖尿病状態の改善においてレセプター不活性分子のこのクラスの驚くべき有効性を示す。

本実施例において一日複数回の皮下注射はタキフィラキシーの徴候なしに 15 日間与えられた。先の実施例においてこの分子の注入は、維持された同化応答を生じた。従ってそれは、輸送の多くのルートとパターンが同様の効力を示すであろうことを合理的に仮定する。例えば、長い半減期を持つ分子の経口処方、経口又は他のルートによって運ばれた分子の半減期効力がより短くなるであろうような効力となることが予期されるであろう。

実施例 7

I G F -I と結合タンパク質を結合するためのファージ誘導化ペプチド

次の一連の実施例において、通例の α -アミノ酸は、中間体と最終生産物に言及している

10

20

30

40

50

場合には標準の1又は3文字アミノ酸コードによって記載され得る。普通の α -アミノ酸は、mRNA指令の下でタンパク質に組み入れるそれらアミノ酸を意味する。標準の略字は、The Merck Index, 10th Edition, pp Misc-2-Misc-3中にリストされる。別の定義がない限りは、通例の α -アミノ酸は天然の又はアルファ炭素原子で“L”-立体配置を有する。もしそのコードが“D”によって先行されたなら、これは通例の α -アミノ酸の反対の鏡像異性体を表示する。ノルロイシン(Nle)とオルニチン(Orn)のような修飾した又は例外的な α -アミノ酸は、米国特許庁オフィシャルガゼット1114 TMOG, 1990年5月15日中に記載された通り定義される。

上述したIGF変異体を用いる実験の結果に基づき、IGFBPとIGFの相互作用を抑制し、且つIGF-Iレセプターに全てではなく乏しく結合する、ペプチド又は小さい有機分子のような他の分子が処理されている対象における活性IGFレベルを増加するであろうことが予期される。加えて、別のクラスの分子、特にペプチド又は小さい分子は、IGFBPsとIGF-Iの相互作用を抑制する又は防止するためのそのような手法においてレセプター相互作用を包含したそれから離れたサイトでIGF-Iそれ自身結合し得るが、そのレセプターとIGF-Iの相互作用ではない。

タンパク質のような標的分子に特異的に結合する及び測定可能なアフィニティーを持つペプチドは、バクテリオファージ被覆-タンパク質融合体を用いる結合選択を経て多くの結合及び非結合ペプチドの最初のライブラリーから同定され得る。Smith, Science, 228: 1315 (1985); ScottとSmith, Science, 249: 386 (1990); Cwirlaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8: 309 (1990); Devlinら, Science, 249:404 (1990); WellsとLowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 597 (1992)により再考された; 米国特許第5,223,409号。加えて、ファージを表示したタンパク質とペプチドの両方は、変異誘発、選択及び増殖の繰り返しサイクルを通してアフィニティー-増幅され得る。

特有の残基位置で配列において相違しているペプチドの文献は、合成オリゴヌクレオチドを用い構築され得る。ペプチドは、特有のペプチド変異体をコードしている一重鎖DNAゲノムをそれぞれ含み、ファージ被覆タンパク質(g3p又はg8p)によって融合タンパク質として表示されるアフィニティー精製のサイクルの後、固定化した標的分子を用い、個別のバクテリオファージクローンを分離し、それを表示するペプチドのアミノ酸配列をそのDNA配列から推定した。

I. ペプチド-ファージライブラリーの構築

IGF-I又はIGF結合タンパク質に結合でき得る能力を有している一連のペプチド分子を同定するために、IGFBP-1又はIGFBP-3のような、18から20残基までの範囲内の長さの、ペプチドのいくつかの多様なファージライブラリーを構築した。このサイズのペプチドは、溶液中で良好に定義された構造を維持できるペプチドの選択に好都合であるため選択した。このサイズの天然-アミノ酸ペプチドが 20^{18} - 20^{20} (即ち、 2.6×10^{23} から 1.0×10^{26}) 変異体の潜在的な配列多様性を有するために、そのような変異体の全てを構築し且つ試験することは実施できない。その代わりに、ある種の残基は、各ペプチドの中の、ジスルフィド結合又はベータ-ターンのようなペプチド構造の安定要因を与える又は促進することが予期され得たものと固定し又は定常化した。

構造的な抑制又はフレームワークは、ファージに関するペプチドライブラリー提示のため及び続いて、変異と選択を通しての結合アフィニティーの首尾の良い増加のために予め使用されている。そのように構成されたフレームワークは、ペプチドセグメントの安定な結合構造に好都合となり得る。類似体により、免疫グロブリンは、異なる抗原に結合できる異なるペプチドループ(CDR's, 相補決定領域)の多様性の提示のための安定な(及び保存された)構造フレームワークを提供する。

ライブラリー構築用のテンプレートとして用いたのは、バクテリオファージM13のg8pに融合した抗体認識可能(gD-tag)ペプチドを発現するプラスミド、pt4.g8(完全なDNA配列を図24中に示した)とした。このプラスミドはDNA複製の単鎖及び二重鎖基点を含む。phoAプロモーターとSTII分泌-シグナル配列は、「リンカー」ペプチド(下記の二重下線)、及びバクテリオファージM13のg8pの後ろにあるgDペプチド(下記の下線

)の上流である：

**SGTAMADPNRFRGKDLAGSPGGGSGGGAEGDDPAKAAFNSLQASATEYIGYAWAMVVVIVGATIG
IKLFFKKFTSKAS** (配列番号：24)

幾つかのランダム配列ペプチドライブラリー(表I I)は、後述したオリゴヌクレオチドと共に、単鎖テンプレート規制変異誘発(Kunkelら, Methods. Enzymol., 204:125 (1991))を用い構築した。

表 I I

g8 ディスプレイのための大きな自然ライブラリー

ライブラリー	オリゴ no.	ペプチドモチーフ	
-----	-----	-----	
A	HL-300	SGTACX ₂ GPX ₄ CSLAGSP	配列番号：25
B	HL-301	X ₄ CX ₂ GPX ₄ CX ₄	配列番号：26
C	HL-302	X ₂₀	配列番号：27
D	HL-303	X ₇ CX ₄ CX ₇	配列番号：28
D	HL-304	X ₇ CX ₃ CX ₆	配列番号：29
D	HL-305	X ₆ CX ₆ CX ₆	配列番号：30
D	HL-306	X ₆ CX ₇ CX ₅	配列番号：31
D	HL-307	X ₃ CX ₆ CX ₅	配列番号：32
D	HL-308	X ₃ CX ₃ CX ₄	配列番号：33
D	HL-309	X ₄ CX ₁₀ CX ₄	配列番号：34

A. ベータ-ターン配列モチーフ

周知の三次元構造のペプチドの実施例は、ファージディスプレイによってエリトロポイエチンレセプター(EPO-R)のためのペプチドアゴニストを選択した、Wrightonらによって与えられるWrightonら, Science, 273: 458 (1996)。ペプチドGGTYSCHFGPLTWCKPQGG(配列番号：35)(二つのCys残基を接合しているジスルフィド結合を有している)は、EPO-Rと結晶化した複合体において、二つのベータヘアピンのダイマーを形成する。Livnahら, Science, 273: 464 (1996)。たとえ溶液中のこのペプチドの非結合形の構造が報告されていないとしても、EPO-Rとの複合体中のこのペプチドによって形成されたベータ-ターン構造は、類似の構造が、CX₂GPX₄C(配列番号：36)型のペプチドによって形成され得たことを示唆した。

構築されたペプチドライブラリーの一つのタイプとして、該gDペプチドは、開始プラスミドのそれから変化していない上流及び下流(「フランキング」)残基をそのままにしてある、モチーフCX₂GPX₄C(配列番号：36)により置換された。かくして、このライブラリーはファージ粒子上にディスプレイすることで定義され、該ペプチドSGTACX₂GPX₄CSLAGSP(配列番号：37)(ここでXは20の天然L-アミノ酸の何れかを表す)は、該リンカーと上述したg8pに融合した。このライブラリーはオリゴヌクレオチドHL-300：

**5'-GCC TAT GCA TCT GGT ACC GCC TGC NNS NNS GGT CCT NNS NNS NNS TGT TCT CTG
GCA GGT TCA CCA G-3'** (配列番号：38)、

(ここでNはヌクレオチドA,G,C,及びTの混合を示し、且つSはヌクレオチドGとCの混合物を表す)を用いて構築した。

補足のライブラリーは、該ペプチド及び／又はフランキング配列もまた任意抽出することによって標的タンパク質との更なる相互作用を許すように構築された。このライブラリーは、オリゴヌクレオチドHL-301：

5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS GGT CCT NNS NNS NNS NNS TGT NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA G-3' (配列番号：40)

を用いることによって $X_4CX_2GPX_4CX_4$ (配列番号：39) 型によって構築した。

B. ジスルフィド-ループモチーフ

多くの補足のペプチド構造が、与えられた標的タンパク質に結合するために生産され得るため、ファージ-ディスプレイしたライブラリー中のペプチド配列モチーフの他のタイプを試験することが望まれた。例えば、小さいペプチドの中の単一ジスルフィド結合は、制限されない構造におけるよりも相対的に高い結合アフィニティーを与える安定構造を支持し得る。Geysenら, Mol. Immunol., 23: 709 (1986) ; Woodら, Science, 232: 633 (1986) ; Oldenburgら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5393 (1992) ; O'Neilら, Proteins, 14: 509 (1992) ; McLaffertyら, Gene, 128: 29 (1993) ; Giebelら, Biochem., 34: 15430 (1995)。幾つかのペプチド-ファージライブラリーは、それ故に、 $X_mCX_nCK_k$ (配列番号：41) 型、式中 $m=4$ 、 $n=10$ 、及び $k=4$ 、又は式中 $m=5$ 、 $n=8-9$ 、及び $k=4-5$ 、又は $m=6$ 、 $n=6-7$ 、及び $k=5-6$ 、又は $m=7$ 、 $n=4-5$ 、及び $k=6-7$ (配列番号：28から34) を構築した。これらのペプチドにおいて、ジスルフィド結合はペプチド構造のための安定した抑制を形成すると予測される。

これらペプチドライブラリー (表II参照) は、オリゴヌクレオチドHL-303：

5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA G-3' (配列番号：43)；

を用いて、 $X_7CX_4CX_7$ (配列番号：42)、

オリゴヌクレオチドHL-304：

5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA

G-3' (配列番号：45)；

を用いて、 $X_7CX_5CX_6$ (配列番号：44)、

オリゴヌクレオチドHL-305：

5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA

G-3' (配列番号：47)；

を用いて、 $X_6CX_6CX_6$ (配列番号：46)、

オリゴヌクレオチドHL-306：

5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA

G-3' (配列番号：49)；

を用いて、 $X_6CX_7CX_5$ (配列番号：48)、

オリゴヌクレオチドHL-307：

5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA G-3'

(配列番号：51)；

を用いて、 $X_5CX_8CX_5$ (配列番号：50)、

オリゴヌクレオチドHL-308：

**5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS
NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA**

G-3'

(配列番号：53)；

を用いて、 $X_5CX_9CX_4$ （配列番号：52）、

オリゴヌクレオチドHL-309：

**5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS
NNS NNS TGC NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA**

G-3'

(配列番号：55)；

を用いて、 $X_4CX_{10}CX_4$ （配列番号：54）、

として構築した。

C. 非抑制ペプチド

非抑制ライブラリー（即ち、そのペプチド内に固定した残基を有さない）もまた特異的結合物を生じている。ScottとSmith, Science, supra; Cwirlaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, supra; Devlinら, Science, supra; Kayら, Gene, 128: 59 (1993)。

そのようなライブラリーは、非共有的な相互作用が結合及び／又は非結合形における構造をさらに誘導し得ることから、それにもかかわらず、構築したペプチドを生じ得る。 X_{20} （配列番号：56）型の、非抑制ペプチドライブラリーは、オリゴヌクレオチドHL-302：

**5'-GCT ACA AAT GCC TAT GCA NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS
NNS NNS NNS NNS NNS NNS GGT GGA GGA TCC GGA GGA G-3'** **(配列番号：57)**

を用いて構築された。

II. 多価 (g8) ファージ結合選択

ランダム変異誘発反応の生産物は、エレクトロポレーションによってXL1-BLUETM大腸菌細胞 (Stratagene) 内に形質転換し、M13K07 (VieiraとMessing, Methods Enzymol., 153: 3-11 (1987)) 又はVCSM13ヘルパーファージ (Stratagene社) と共に15-16時間増殖することによって増幅した。最初の形質転換体の平板培養に基づいて、ライブラリー毎の形質転換体の数はほぼ、ライブラリーHL-300が 1.8×10^8 、HL-301が 7.9×10^8 、HL-302が 5.0×10^8 、HL-303が 5.3×10^8 、HL-304が 5.6×10^8 、HL-305が 5.0×10^8 、HL-306が 6.3×10^8 、HL-307が 4.5×10^8 、HL-308が 1.9×10^8 、及びHL-309が 2.1×10^8 であった。

IGFBP-1、IGFBP-3、及びIGF-Iは、製造元の指示を用い、タンパク質に対して、切断可能ビオチン試薬、EZ-LINKTMNHS-SS-Biotin (Pierce) の1.5:1モル比によってビオチン化した。

IGFBP-1、IGFBP-3、及びIGF-Iへの結合のためのペプチドの最初の選択は、ほぼ 10^{10} ファージ/ml (100 μ l全量) のファージプールを用いて実行した。MAXISORPTM 96-ウェルのプラスチック板 (Nunc) は、50mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6中にNEUTRAVIDINTMブランドのアビジン (Pierce) の2 μ g/mlの溶液により4℃で一晩被覆した。NEUTRAVIDINTM溶液を取り除き、該板を、50mM炭酸ナトリウム緩衝液中にウシ血清アルブミンの5g/l、又はオボアルブミンの5g/l、又は即席ミルクの5g/lのブロッキング溶液と共に、室温で1-2時間インキュベートした。次いでブロッキング溶液を取り除き、ビオチン化標的タンパク質の溶液を加えた。室温で1-2時間後、その標的溶液を取り除き、その板をPBS/TWEENTM界面活性剤 (PBS緩衝液中0.05%のTWEEN-20TM) で十回洗浄した。

上述したライブラリーからのファージは次のようにプールした：プールAはHL-300ファージ、プールBはHL-301ファージ、プールCはHL-302ファージ、及びプールDはHL-303、HL-304、HL-305、HL-306、HL-307、HL-308、及びHL-309ライブラリーからのファージからなる。ファージは、それぞれの標的によって被覆されたウェル、及びNEUTRAVIDINTMにより又はアルブミン、しかし標的をビオチン化していない、により被覆されたコントロールウェルと共に、PBS/TWEENTM/アルブミン/ビオチンの中に加えた。そのファージは室温で5-15時間結合することを許した。そして、その板をPBS/TWEENTM緩衝液で十回洗浄した。

板に結合した残りのファージは、50mM D T Tと室温で1-2時間インキュベートすることによって溶離した。溶離したファージは大腸菌の中にトランスフェクトし、該ファージを増幅するために37℃で一晩増殖させた。

結合選択の第2及び第3のサイクルは、ストレプトタビジン (0.1mg/mL) をビオチンと一緒にファージカクテルに含めたこと以外は、上記の通り実行した。アリコートそれぞれの標的被覆した及びそれぞれのライブラリーとインキュベートしたコントロールウェルから採取し、希釈したファージの連続希釈液は標的への特異結合の測定を実行した。その希釈したファージは、大腸菌細胞内にトランスフェクトし、コロニー計測のために平板培養した。

結合選択の第4のラウンドは、それぞれの標的タンパク質の2 µg/mlで、又はアルブミンのみで直接被覆したMAXISORP™板上で実行した。サイクル2-4におけるファージ結合選択の結果を図25に示した。

同じ開始ファージライブラリー (A,B,C,D) はまた、直接被覆したIGFBP-3に対する結合選択のためにも使用した。この場合、MAXISORP™ 96-ウェルプラスチック板 (Nunc) は、50 mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6中、IGFBP-3の2 µg/ml溶液によって4℃で一晩被覆した。その標的溶液を取り除き、さらにその板をウシ血清アルブミンの5g/Lのブロッキング溶液と室温で1-2時間インキュベートした。ファージは上記の通り板とインキュベートし、未結合ファージを洗い流した。結合して残っているファージを20mM H C lと室温で10分間インキュベートすることによって溶離した。その後、酸溶離ファージは1Mトリス-HCl, pH8.0の5分の1容量によって中性化した。ファージは上述した通り、コロニー計測のためにトランスフェクトした。

III. 多価ファージクロンのスクリーニング (IGF-ブロッキングファージアッセイ)

ペプチド-ファージクロンは、大腸菌細胞とファージプールとを混合すること、及び抗生物質含有培地上で平板培養することによって分離した。クロンを分離し、配列決定のために単鎖DNAを得るためにヘルパーファージ (上記の通り) と培養した。結合IGFBP-3、IGFBP-1、又はIGF-I用に選択したペプチド配列は、ファージミドクロンのDNA配列から推定した。そのようなクロンの数は、それぞれ表III-V中のペプチド配列により表示される。(以下の表中、「SEQ ID NO:」=「配列番号:」)

10

20

表 I I I

g8 ディスプレー、IGFBP-3 選択からのペプチド配列

名称	ペプチド配列	
4A3.1	SGTACYGGPEWWCCSLAGSP (SEQ ID NO:58)	
4A3.3	SGTACYGGPEWWCCSLAGSP (SEQ ID NO:59)	
4A3.4	SGTACYGGPEWWCCSLAGSP (SEQ ID NO:60)	
4B3.1	DLAICAEGPEIWVCEETS (SEQ ID NO:61)	10
4B3.2	DFWICLSGPGWEECLEWW (SEQ ID NO:62)	
4B3.3	EESECFEGPGYVICGLVG (SEQ ID NO: 7)	
4B3.4	DMGVCADGPWMYVCEWTE (SEQ ID NO: 8)	
4B3.5	DMGVCADGPWMYVCEWTE (SEQ ID NO: 8)	
4C3.1	GSAGQGMTEEWAWIWEWWKE (SEQ ID NO:63)	
4C3.2	ELDGWVCIKVGEQNLCYLAE (SEQ ID NO:64)	
4C3.4	ELDGWVCIKVGEQNLCYLAE (SEQ ID NO:65)	
4C3.4	ELDGWVCIKVGEQNLCYLAE (SEQ ID NO:65)	20
4C3.5	ELDGWVCIKVGEQNLCYLAE (SEQ ID NO:66)	
4D3.1	AIGGWCFIELDSLWCEEQIG (SEQ ID NO:67)	
4D3.2	SEDVECWQVWENLVCSVEHR (SEQ ID NO:68)	
4D3.3	SEEVCPVPAEWYLCNMWGR (SEQ ID NO:69)	
4D3.4	RVGAYISCSETECWVEDLLD (SEQ ID NO:70)	
4D3.5	WFKTVCYEWEDEVQCYTLEE (SEQ ID NO:71)	
4D3.6	SEDVECWQVWENLVCSVEHR (SEQ ID NO:72)	
4D3.7	RLEEQCVEVNYPSCSFTAN (SEQ ID NO:73)	30
4D3.8	SEEVCPVPAEWYLCNILGP (SEQ ID NO:74)	

4D3.9	ETVANCDCYMDLCLCYGSDR (SEQ ID NO:75)	
4D3.10	YHPISCMDHYLYLICDETVDN (SEQ ID NO:76)	
4D3.11	VAWEVCWDRHDQGYICTTDS (SEQ ID NO: 4)	
4D3.12	AEWAECWIAGDQLLCVGKDN (SEQ ID NO:77)	
23A3.1	EPWLCQYYEAAMLVLCWEEG (SEQ ID NO:78)	
23A3.2	AEEGMVWGWGTGGWYNLDEL (SEQ ID NO:79)	
23A3.3	SGGAIYWPVEQFI AFMAVGK (SEQ ID NO:80)	
23A3.4	EPWLCQYYEAAMLVLCWEEG (SEQ ID NO:81)	10
23A3.5	SGGAIYMPVEQFI AFMAVGK (SEQ ID NO:82)	
23B3.1	TGVDCQC GPVHCVCM DWA (SEQ ID NO: 13)	
23B3.2	EVLLCSDGPQLYLCELYA (SEQ ID NO:83)	
23B3.4	SGVECVWGPQWGFCVEEY (SEQ ID NO:84)	
23B3.5	DKEVCYLG PETWLCFWWP (SEQ ID NO:85)	
23B3.6	EVLLCSDGPQLYLCELYA (SEQ ID NO:86)	
23B3.7	GDVECI EG PWGELCVWAD (SEQ ID NO:87)	
23D3.1	FGGWSCQPTWVDVYVCNFEE (SEQ ID NO:88)	20
23D3.2	AMWVCVSDWETVEECIQYMY (SEQ ID NO:89)	
23D3.3	AMWVCVSDWETVEECIQYMY (SEQ ID NO:90)	
23D3.4	AMWVCVSDWETVEECIQYMY (SEQ ID NO:91)	
23D3.5	AMWVCVSDWETVEECIQYMY (SEQ ID NO:92)	
23D3.6	TNWFFVCESGHQDICWLAEE (SEQ ID NO:93)	

表 I V

g8 ディスプレー、IGFBP-1 選択からのペプチド配列

クローン	ペプチド配列	ライブラリー	頻度	
HL-1	SEVGCRAGPLQWLCEKYF (SEQ ID NO:94)	A	6/6	
HL-14	SEVGCRAGPLQWLCEKYF (SEQ ID NO:94)	B	5/6	
HL-13	KDPVCGEGPLMRICERLFG (SEQ ID NO:95)	B	1/6	
HL-31	EVDGRWWIVETFLAKWDHMAG (SEQ ID NO:96)	C	6/6	40

表V

g8 ディスプレー、IGFBP-3 選択からのペプチド配列

クローン	ペプチド配列	ライブラリー	頻度
HL-8	WVMECGAGPWPEGCTFML (SEQ ID NO:97)	B	5/6
HL-26	RKTSQGRGQEMCWETGGCS (SEQ ID NO:98)	C	1/6
HL-25	SWERGELTYMKLCEYMRLQQ (SEQ ID NO:99)	C	4/6
HL-30	EHGRANCLITPEAGKLARVT (SEQ ID NO:100)	C	1/6

そのようなペプチドファージクローンは、ブロックリガンド (IGFBPへの I G F -I) 結合を
 するかしなくのいずれかの、又は選択したプールの多数の非結合又は背景要員のい
 ずれかの特異な標的-結合ペプチドを表示できた。これらの可能性の中から識別するた
 め、ファージクローンは、I G F -Iの存在又は不在においてIGFBP-1又はIGFBP-3に結合する能
 力を試験した。

IGFBP-1又はIGFBP-3は、上記の通りMAXISORP™板上に直接被覆した。クロンの培養から
 のファージは、I G F -I (100nMの最終濃度)で混合し、そして固定化IGFBPと室温で1時
 間インキュベートした。そして、上記の通りその板を十回洗浄し、ホースラディッシュペ
 ルオキシダーゼのヤギ抗ウサギ結合体と混合したウサギ抗ファージ抗体の溶液を加えた。
 室温で一時間のインキュベートの後、その板は、色素の基質、o-フェニレンジアミン (Si
 gma) によって現像した。その反応は2.5M H₂SO₄の1/2容量で停止した。490nmでの吸光
 度を分光プレートリーダー上で測定した。

いくつかのIGFBP-3選択したペプチド-ファージクローンで示された滴定値は、いくつかの
 ファージ濃度でIGFBP-3への結合のため I G F -Iにより全てが抑制された (図26と27)。
 これらペプチドはかくして、IGFBP-3上の I G F 結合エピトープを持つオーバーラッピング
 グサイトを占有するように思われた。IGFBP-1選択したペプチド-ファージクローンの滴定
 値は、それがいくつかのファージ濃度でIGFBP-1への結合のため I G F -Iにより抑制され
 たことを示した (図28)。補足のペプチド-ファージクローンは、I G F -Iと共に又は
 それなしで、ファージの低い濃度で、同じくスクリーンされた。

図29は、上述した通り、H C l 溶離の1ラウンドに続いて、D T T 溶離の3ラウンドから
 得られたいくつかのファージミドクロンのブロッキングアッセイの結果を示す。各ケ
 ースにおいて、ファージミドクロンは5mlの培養容量において37℃で一晩、単一のクロ
 ーンから培養した。そのファージ粒子は、沈殿させ、P B S 緩衝液の0.5ml中で再懸濁し
 た。各ファージ溶液の50倍希釈液を、PBS/TWEEN™緩衝液で作製し、該ファージをIGFBP-3
 被覆したMAXISORP™板上で100nM I G F -Iとともにまたはそれなしでインキュベートした
 。図29中に示した通り、大部分のクロンは、たとえクロン4D3.11がこれら条件下で
 わずか5%抑制したとしても、これらのファージ濃度でIGFBP-3への結合を、>40%抑制した
 。

図30は上述した通りH C l 溶離の3ラウンドから得たいくつかのファージミドクロンの
 ブロッキングアッセイの結果を示す。各ケースにおいて、ファージミドクロンは、5m
 lの培養容量で37℃で一晩、単一コロニーから培養した。ファージ粒子は上記の通り調製
 した。このケースにおいて、図30中に示した通り、たとえクロン23A3.3と23A3.5がこ
 れら条件下で約20%抑制したとしても、大部分のクロンは、これらのファージ濃度でIGF
 BP-3への結合を>80%抑制した。

ファージ希釈の機能として（図26,28）、又はディスプレイしたペプチドの機能として（図29-30）、IGF-Iの一定濃度によってファージ結合が阻止される度合いにおける変化は、いずれか一つの理論に制限されることなしに、それが（1）IGF-IとIGFBP-3上のペプチド結合エピトープの間のオーバーラップの度合、及び／又は（2）IGF-I対IGFBP-3に結合するためのファージディスプレイペプチドの相対アフィニティを予測し得るために、興味深い。ここで試験した全てのペプチド-ファージクローンがIGF-Iとの抑制の幾らかの度合を示したことから、エリア内にあるそれぞれのIGFBP-3上のペプチド-結合のためのエピトープが結合したIGF-Iによって占有されたと思われる。ペプチドアッセイ（以下を参照）はこの結論を裏付ける（即ち、ケース1）。一方、いずれか1つの理論に制限されることなしに、幾つかのペプチドエピトープは、そのようなペプチドをディスプレイしているファージ粒子が結合したIGF-Iによって立体的に排除されるためにエリアの中とすることができた可能性がある。

10

ファージ濃度の抑制の依存、及びファージクローンの中の違い（図26）は、ケース2を反映し得る。特に、IGFBP-3被覆した板に結合しているファージクローンは、IGFBP-3被覆した板への結合が高い及び低いファージ濃度での両方で（例えば、ペプチドBP3-23及びBP3-24にそれぞれ一致する4C3.2、4D3.5）抑制したそれらファージクローンが成すよりもIGFBP-3により、より高いアフィニティペプチド（以下を参照）を生産することが明らかな低いファージ濃度でのみ（例えばペプチドBP3-01-ox及びBP3-02-oxにそれぞれ一致する4D3.3、4B3.4）抑制した。

かくして、ファージ-滴定ブロッキングアッセイのこのタイプは、相対アフィニティ及びファージディスプレイライブラリーから得たペプチドの抑制効力を予測するための手段として、全般的に有用とされ得る。

20

IV. IGFBP-3結合ペプチドの一価（g3）ディスプレイ

ランダム変異誘発、選択、及び増殖の連続したラウンドによってペプチド又はタンパク質配列のアフィニティ成熟は、ディスプレイしたペプチド又はタンパク質のコピー数が制限される場合、能率的に達成され得る。Bassら, Proteins 8: 309 (1990)。そのようなアフィニティ成熟プロセスは、hGHのアフィニティ成熟により示される。米国特許第5,534,617号。このケースにおいて、ディスプレイしたhGHのコピー数は、hGHの発現レベルを制限している、且つファージミド包装と増殖のための野生型g3pを与えるためのヘルパーファージを用いている、バクテリオファージ粒子のg8にではなくg3に、ディスプレイしたタンパク質を有効することにより制限された。g8p上のファージディスプレイ化ペプチドのプールからより高いアフィニティのペプチドの選択のために、2ラウンド4g8ライブラリープール、4Bと4DからのペプチドcDNAsは、一価ファージディスプレイのためのg3ベクターに転移させた。結合選択は、結合ファージの酸溶離によって上述した通り、3つのラウンドで実行した。

30

選択の3ラウンドの後に得られたペプチド配列は表VI中に示される。2つのクローン、4B3.3と4D3.11は、選択したプール、及び初期に見られた、g8ファージ選択を支配した。第3のクローン3Ai.2は、g8と同一でない新規なペプチド配列を表す。ファージ-ELISA競合アッセイにおいて、g3-4B3.3とg3-4D3.11クローンの外形上のアフィニティは<100nMであり、しかしながら一致するペプチドはより弱い抑制を示した（以下参照）。

40

表V I

g3 ディスプレー、IGFBP-3 選択からのペプチド配列

クローン	ペプチド配列	ライブラリー	頻度
3Ai.1= 4B3.3	EESECFEGPGYVICGLVG (SEQ ID NO: 7)	4B	6/10
3Ai.2	VEDECWMGPDWAVCWTWG (SEQ ID NO:101)	4B	4/10
3Bi.1= 4D3.11	VAWEVCWDRHDQGYICTDS (SEQ ID NO: 4)	4D	10/10

アフィニティー改善が、hGHのために記載した通り、反復の変異誘発、選択及びペプチド-ファージライブラリーの増殖によって得ることができると予想される。例えば米国特許第5,534,617号を参照。

V. ペプチドアッセイ

ペプチドは、多数のファージ-誘導した配列に一致させて合成した。2つのCys残基がそのペプチド配列中に見出されたケースにおいて、そのペプチドのジスルフィド（酸化した又は“ox”を付した）モノマー形を調製し且つ精製した。4つのCys残基が見出されたケースにおいて、その{1-4,2-3}ジスルフィド形を調製及び精製した。

IGFBP-1又はIGFBP-3を結合する又はI G F-I結合を阻止することのこれらペプチドの能力は、以下のアッセイの1又はそれ以上で試験した。

A. BIAcore™競合アッセイ（IGFBP-3バインダー用）

I G F-Iは、遊離結合タンパク質を測定するために、BIAcore™2000表面プラスモン共鳴装置（BIAcore社、Piscataway, NJ）を用いて抑制アッセイ用デキストラランチップ上に固定化した。I G F-Iは上述した通りビオチン化し、更に固定化したI G F-Iの400から800 RU（応答単位）を与えるように結合されている（BIAcore社）ストレプトタビジンにチップを越えて注入した。そのI G F-Iは、それぞれの時間経過にわたり検出可能な解離を示さなかった。ペプチドの連続希釈は、IGFBP-3の一定濃度（40nM）と混合した。室温で≥1時間インキュベーションの後、20μLのアリコートをし、I G F-Iチップを越えて20μL/分の流速で注入した。注入に続いて、応答の読み取りをし、I G F-Iに結合したIGFBP-3の相対量を測定することで実行した。

その結果（図31-32）は、チップへのIGFBP-3結合の各ペプチドの抑制についての投薬量-応答曲線を示す。特に、試験したIGFBP-3結合の最も有効なインヒビターは、ペプチドBP3-01-ox（ファージクローン4D3.3に一致）であり、且つこのペプチドの端を切り取った形態、BP15であった（表VII参照）。その表において、ジスルフィド結合は、それぞれの2-Cys含有ペプチドの2つのCys残基の間に形成される。4つのシステインを含有しているペプチドのために、2つのCys*残基はジスルフィドを形成し、且つ残りの2つは第2のジスルフィドを形成する。これらペプチドは、それぞれ2μMと0.75μMのIC50'sを示した。BP3-4D3.11のような他のペプチド（g8ディスプレーからのファージクローン4D3.11とg3ディスプレーからの3Bi.1）は、<10μMのIC50'sを持つ抑制を示した。

IGFBP-1は、この手法において固定化したI G F-Iに対する結合を示していない。

表 V I I

合成ペプチドによる IGFBP-3 への I G F-I 結合の抑制

ペプチド	配列	BIACore™ アッセイ IC50 (μ M)	
BP3-23	ELDGWVCIKVGEQNLCYLAEG-nh2 (SEQ ID NO: 1)	220	
BP3-24	WFKTVCYEWEDEVQCYTLEEG-nh2 (SEQ ID NO: 2)	100-300	
BP3-25	RVGAYISCSETECWVEDLLDG-nh2 (SEQ ID NO: 3)	>1000	10
BP3-4D3.11	VAWEVCWDRHDQGYICTTDS (SEQ ID NO: 4)	<10	
BP3-4D3.11DEL	AWEVCWDRHQGYICTTDS (SEQ ID NO: 5)	80	
BP13	CWDRHDQGYICTTDS (SEQ ID NO: 6)	>1000	
BP3-4B3.3	EESECFEGPGYVICGLVG (SEQ ID NO: 7)	80	20
BP3-02-ox	DMGVCADGPWMYVCEWTE (SEQ ID NO: 8)	12	
BP3-01-ox	SEEVCWPVAEWYLCNMWG (SEQ ID NO: 9)	2	
BP15	SEEVCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO: 10)	0.75	
BP16	VCWPVAEWYLCNMWG (SEQ ID NO: 11)	30	30
BP17	VCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO: 12)	9	
BP06	TGVDCQC*GPVHC*VCMDWA (SEQ ID NO: 13)	5	
BP08	TVANCDC*YMPLC*LCYDSD (SEQ ID NO: 14)	15	

nH2 は、そのペプチドがアミドで阻止されていることを意味し、C*はそのペプチド中の別なシステインに結合しているシステインを示す。

B. 平板培養アッセイ

1. ビオチン-B P アッセイ (IGFBP-1 バインダー用)

IGFBP-1 結合の抑制のため、IGFBP-1 を上述した通りビオチン化した。MAXISORP™ 板を、2 μg/mL I G F-I を用いて上述した通り被覆し、且つブロック化した。分離板において、ペプチドの連続希釈をビオチン化IGFBP-1 の一定濃度 (20nM) と予備混合した。20分後、室温で、その混合物を I G F-I 板に加えた。次いでそのペプチド/IGFBP 混合物を取り出し、0.05% TWEEN-20™ 界面活性剤を含む P B S 緩衝液で十回洗浄した。結合したビオチン-IGFBP-1 は、ストレプトタビジン-結合したホースラディッシュペルオキシダーゼ、及び色素の基質を用いて検出した。

10

20

30

40

50

IGFBP-1抑制アッセイの結果（図33と34）は、ペプチドbp1-01とbp1-02（表VIII）が、それぞれ約0.18と0.05 μM のIC50'によりIGFBP-1結合を抑制したことを示す。一方、IGFBP-3選択体BP3-01-oxは、IGFBP-1結合の僅かな又は抑制のないことを示した。反対に、bp1-01とbp1-02は、このアッセイにおいてビオチン化IGFBP-3を抑制しないことを示した。Cys残基がセリンに変化したbp1-01変異体は、10 μM よりも大きなIC50を示した。

表VIII

合成ペプチドによるIGFBP-1へのIGF-I結合の抑制

ペプチド	配列	ELISA IC50(μM)
bp1-01	CRAGPLQWLCEKYFG-nh2 (SEQ ID NO: 15)	0.18
bp1-02	SEVGCRAGPLQWLCEKYFG-nh2 (SEQ ID NO: 16)	0.05

10

2. 放射能標識IGFアッセイ（IGFBP-3バインダー用）

ペプチド活性の補足のアッセイとして、幾つかのペプチドを、実施例1（アッセイ3）中に記載した通り、IGFBP-1結合の抑制を測定するために¹²⁵I-IGF-Iを用いるアッセイにおいて試験した。ペプチドの連続希釈液は、IGFBP-1又はIGFBP-3板に加えた。その後、¹²⁵I-IGF-Iを加え、その板を2時間インキュベートした。次いで、その板を洗淨し、結合したIGF-Iの量を測定するため計測した。

20

図35は、IGFBP-3板へのIGF-I結合において、二つのIGFBP-3選択ペプチド、bp3-01-oxとbp3-02-oxの抑制を示す。反対に、これらのペプチドはIGFBP-1被覆した板へのIGF-I結合を抑制しない（図36）。

C. インビトロ活性化（KIRA）

IGF-I結合を阻止すること及び機能性IGF-Iを放出することの幾つかの合成ペプチドの能力は、実施例1に記載した通り、IGF-I活性のKIRAアッセイにおいて試験した。細胞は、IGF-I単独、ペプチド単独、ペプチドプラスIGF-I、IGF-Iプラス結合タンパク質（IGFBP-1又はIGFBP-3）、又はIGF-Iプラス結合タンパク質（IGFBP-1又はIGFBP-3）とペプチドにより試験した。

30

その結果（図37）は、ペプチド単独は活性を有さないことを示す。更に、IGF-Iと混合した場合、そのペプチドはIGF-I活性を顕著に変えない。ペプチドBP-01-oxもまた、IGF-IプラスIGFBP-1又はIGFBP-3と混合した場合にIGF-I活性に付いて顕著な作用は示さない。しかしながら、ペプチドbp1-01とbp1-02の両者は、それぞれ397nMと187nMのIC50'sによって、IGFBP-1によるIGF-I活性の抑制を阻止することを現した。これらペプチドはIGF-IとIGFBP-3による活性は何れも示さない。

加えて、IGFBP-3ペプチドBP15は、KIRAアッセイの活性化をもたらすIGFBP-3:IGF-I（3:1比で）とインキュベートし、IGFBP-3の阻止はBP15用の95 μM のIC50と共に生じた。それは、これが1:1比によって30 μM まで低下するであろうと確信される。

D. BIAcoreTM競合アッセイ（IGFBP-3バインダー用）

40

IGF-IIは、遊離結合タンパク質を測定するためにBIAcoreTM2000表面プラスモン共鳴装置（BIAcore社、Piscataway, NJ）を用いる抑制アッセイ用のデキストラチップ上に固定した。IGF-IIは、上述した通りビオチン化し、更に固定化したIGF-IIのほぼ1500 RUを与えるよう結合されているストレプトアビジン（BIAcore社）をチップを越えて注入した。そのIGF-IIは、各実験の時間経過にわたり検出可能な解離を示さなかった。ペプチドの連続希釈液は、IGFBP-3の一定濃度（20nM）と混合した。室温で $\geq$ 一時間のインキュベーションの後、20 μl のアリコートをし、IGF-IIチップを越えて20 μl /分の割合で注入した。その注入に続き、応答の読み取りをし、IGF-IIに結合したIGFBP-3の相対量を測定することによって行った。

その結果（例えば、図38を参照）は、IGF-IIへのIGFBP-3結合の各ペプチドの抑制の

50

ために投薬量応答曲線を示す。ペプチドbp3-01-ox, BP14, BP15, 及びBP17は、それぞれ0.92 μM 、1.0 μM 、0.78 μM 、及び5.1 μM のIC50 'sを示した。

実施例 8

ペプチドbp1-01のNMRスペクトル

^1H MRデータは、6.7ミリモルの濃度で、30°C及びpH5.2で H_2O 溶液中のペプチドbp1-01について採集した。図39の一次元NMRスペクトルの生成のために、全量5.0mgの生成したペプチドを、スペクトロメーターのフィールド周波数ロック用の7% (v/v) $^2\text{H}_2\text{O}$ を含む440 μl H_2O に溶解したそのサンプルのpHは、1N NaOHの3 μl の添加によって5.2に調整した。32トランジエントからなるスペクトルが、5-mm三重軸パルス化-フィールド勾配プローブを装備したBRUKER AMX-500TMスペクトロメーター (500.13MHzの ^1H 10
周波数)で採集された。化学シフトスケールは、4.75p.p.m.での水共鳴に関して百万分の一部である。水共鳴は、励起スカルプティング法によって抑制した。HwangとShaka, J. Magn. Reson., 112A: 275-279 (1995)。

図39の一次元スペクトルに加えて、二次元二重量子濾過相関分光法 (2QF-COSY)、トータル相関スペクトル (TOCSY)、及び回転フレームOverhauser効果スペクトル (ROESY)を採集した。その実験は、パルス化フィールド勾配を2QF-COSYにおいてコヒーレンス選択用に用いたこと (van Zijlら, J. Magn. Reson., 113A: 265-270 (1995))、及び励起スカルプレイングをTOCSY及びROECY実験において水共鳴を抑制するために (HwangとShaka, supra) 用いたことを除いて、“Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice” (Academic Press, San Diego: ISBN 0-12-164490, 1995) 中、Cavanaghらによって記載され 20
た通り記録した。 $^2\text{H}_2\text{O}$ 中のペプチドの凍結乾燥と溶解の後、35°Cパルス混合 (Cavanaghら, supra) によって2-D ROESYスペクトル (Cavanaghら, supra) とCOSYスペクトルを得た。完全 ^1H 共鳴割当ては、標準的な方法によりこれらデータから得られた。“NMR of proteins and nucleic acids” 中、Wuethrich (John Wiley & Sons, New York: ISBN0-471-82893-9, 1986)。

bp1-01のための定義の明確な三次元構造の証拠は、以下のものから得られた：1) 一次元スペクトルにおける共鳴位置 (図39) が、非構造ペプチドにおいて置きしたそれとは顕著に相違した。例えば、アミドプロトンは8.73-6.64p.p.m.の範囲に及び (構造未定ペプチドは8.50-8.00p.p.m.の範囲内である)；そのメチル基は、次の非構造分子 (0.90-0.85 p.p.m.) のため低い化学シフトにある (Leu6の0.82p.p.m.、及びLeu9の0.66, 0.59p.p.m. 30
)。2) アミドとアルファプロトン間のスカラーカップリング定数 (2QF-COSYから得た) は、非構造ペプチドにおいて観測した平均化した値とは異なった。Gln7、Trp8、Cys10、Glu11とPhe14についての5.5Hzより低いその値は、これら残基のヘリックススパンニングの表れである。Leu6、Tyr13、及びPhe14で観測された8.0Hzより大きなその値は、これらの領域において拡張した構造の表れである。スカラーカップリング定数は、COSY-35スペクトル中のアルファとベータプロトン間でも測定された。これらのデータは、Cys1、Gln7、Trp8、Cys10、Tyr13、及びPhe14の側鎖がchi-1角に固定していること、即ち、これらの側鎖が非構造ペプチドに集合されるchi-1回転異性体の範囲の見本を示さないことを示す。

3) ROESYスペクトル中のピークは、最初の配列中に近接していない残基間に多くプロトン-プロトン接触 (< 5 Å) のあることを示す。これらは、もしそのペプチドが良く定義された構造の中に折重されるならば、そのみで生じることができる。最初の配列中の位置iとi+3での残基間の接触は、この領域中のヘリックスの存在と一致する、Leu6とTyr13間で優勢である。多数の接触が、そのヘリックスの一面に沿うミニ-疎水性コアの存在を示す、三つの芳香族側鎖 (Trp8、Tyr13、及びPhe14) と、ロイシンメチル基 (Leu6とLeu9) との間で観測される。 40

そのNMRデータは、bp1-01構造の三次元モデルを決定するために使用され得た。二面角抑制は、適切なKarplus相関関係を経てアミド-アルファとアルファ-ベータスカラーカップリング定数から得られた。Karplus, J. Phys. Chem., 30: 11-15 (1959)。ディスタンス抑制は、ROESYスペクトルにおいて通過-空間相互作用を表したプロトンの間に誘導した；上の界のサイズ、及び上の界への修正は、ピークの重複又は共鳴の縮重が、Skeltonら 50

、Biochemistry, 33: 13581-92 (1994) によって記載された通りであることが原因である。これらの抑制は、AMBER全原子力場を用いてプログラムDiscover (MSI, San Diego) によって抑制した分子運動により連続的に精製した、プログラムDGII (Havel, Prog. Biophys. Mol. Biol., 56: 43-78 (1991)) を用いて構造のファミリーを産生するために用いた。Weinerら, J. Comput. Chem., 7: 230-252 (1986)。その得られた構造は、単一グローバル折重に集中した (N, C-アルファ、及び残基4-14のカルボニル炭素の0.37 Åの平均構造からの平均二乗根偏差の平均)。最良の25構造 (入力抑制の最小の妨害) は非常に良好な入力データに一致し (0.1 Åより大きい間隔抑制妨害が無く、更に1.4度より大きい二面角角度妨害のない)、且つプログラムPROCHECKTMによる判定としての幾何図形的配列を良好に共有していた。Laskowskiら, J. Appl. Cryst., 26: 283-291 (1993)。

総体の典型的なメンバーは、図40Aと40B中に示した。PROCHECKTMの中のKabschとSander二次構造アルゴリズムに従って、bp1-01はPro5-Leu6 (I型) とGln7からLys12間でのアルファヘリックスを中心においた逆ターンを含む; Leu6とTyr13は、主ヘリックスの延長である。残基Cys1、Arg2、Ala3、及びGly15は、NMRによって良好に表されず、残基Gly4からPhe14よりも溶液中でよりフレキシブルとされ得る。図40Aと40Bは、Trp8、Tyr13、及びPhe13の芳香族環が、そのペプチドの一方の面上に、相対的にフラットな疎水性の面を形成するように、Leu6、Leu9、及びLys12の脂肪族部分にパックされる。このパッキングは、そのヘリックスの周期性 (Leu6、Leu9、及びTyr13と一緒に持っている)、Trp8のchi-1角 (+60度の該chi-1、このアミノ酸に相対的に独特の、Leu9上にパックすることをTrp8に与える)、及びPhe14のペプチドバックボーンの拡張した本質 (Leu9への折り返しのためのPhe14の側鎖を与える) によって達成される。

たとえばbp1-01が何れかの条件下で自己会合の傾向があるとしても、その三次元構造は、そのような分子間相互作用により安定化されない。ヘリックスの中への疎水性パッキングは、その折重の安定性を疑いなく付与する。Cys1とCys10間のジスルフィド結合はまた、構造と機能のためにも重要である。システイン残基の両方がセリンによって置換されるペプチドは、IGFBP-1へのより減じられたアフィニティーを有し (実施例7を参照)、且つbp1-01によってディスプレイした構造がその機能付与のために重要であることを示唆する、1-又は2-次元NMRスペクトルにおけるヘリカル又は他の安定な構造の証拠を提示するものでない。何れか一つの理論に制限されること無しに、一つの可能性は、逆ターン (Pro5-Leu6) 及びジスルフィド結合が、ヘリックス (Glu11-Phe14) の第二のターン中に残基を含んでいる疎水性側鎖-側鎖接触によって普及される、ヘリックスの第1のターン (Gln7-Cys10) を開始することを助けることである。

図40中に示したbp1-01の構造は、IGFBP-1に結合することができ、それによって活性IGF-Iのレベルを増すペプチドにおけるその手法のための幾つかの可能性を示唆する。1) bp1-01モノマー中のLeu6、Leu9、Trp8、Tyr13、及びPhe14の側鎖により形成したフラットな疎水性表面は、IGFBP-1の露出した疎水性領域上にパックし得る; このケースにおいて、ヘリックスはIGFBP-1によって認識された鍵となる構造特徴である2) BP-1は、該ヘリックスの疎水性表面以外の幾つかの部分、例えば該ヘリックスに先行する5つのN末端残基、又はこれらの残基と、疎水性側鎖から離れたヘリックスの面との組合せ、を認識し得る。このケースにおいて、該ヘリックスは、該ペプチドのどこか他の場所でIGFBP-1-結合のために適切な幾何図形的配置を組み立てるための骨格として、一層重要となされ得る。3) bp1-01は、凝集した形態においてIGFBP-1に結合し得る。ヘリックスの疎水性面 (Leu6、Trp8、Leu9、Tyr13、及びPhe14) を経てbp1-01の自己-会合の可能性を与えた、該ペプチドの幾つかの他の領域は、IGFBP-1接触において含まれるであろう。このケースにおいて、そのヘリックスと、それらの間の接触は、IGFBP-1-結合領域を提供するための骨格として作用するであろう。

下記は、図39中に示される典型的な構造のための座標である (標準的なタンパク質データベースフォーマット)。

寸評 BP1-01 IGF-I-結合タンパク質結合ペプチド

寸評 NMR-誘導した抑制によって計算した総体

10

20

30

40

50

寸評 からの典型的な構造

ATOM	1	N	CYS	1	-5.022	-1.559	0.892	1.00	0.00
ATOM	2	CA	CYS	1	-4.328	-1.133	-0.335	1.00	0.00
ATOM	3	C	CYS	1	-3.837	0.310	-0.220	1.00	0.00
ATOM	4	O	CYS	1	-2.646	0.544	-0.024	1.00	0.00
ATOM	5	CB	CYS	1	-5.220	-1.340	-1.567	1.00	0.00
ATOM	6	SG	CYS	1	-4.498	-0.877	-3.166	1.00	0.00
ATOM	7	1H	CYS	1	-5.842	-0.987	1.034	1.00	0.00
ATOM	8	2H	CYS	1	-5.296	-2.527	0.807	1.00	0.00
ATOM	9	3H	CYS	1	-4.400	-1.455	1.682	1.00	0.00
ATOM	10	HA	CYS	1	-3.456	-1.777	-0.448	1.00	0.00
ATOM	11	1HB	CYS	1	-5.484	-2.396	-1.625	1.00	0.00
ATOM	12	2HB	CYS	1	-6.143	-0.773	-1.446	1.00	0.00
ATOM	13	1LG	CYS	1	-4.970	-1.181	-3.550	1.00	0.00
ATOM	14	2LG	CYS	1	-4.093	-0.385	-2.924	1.00	0.00
ATOM	15	N	ARG	2	-4.756	1.275	-0.336	1.00	0.00
ATOM	16	CA	ARG	2	-4.410	2.685	-0.348	1.00	0.00
ATOM	17	C	ARG	2	-3.778	3.012	-1.703	1.00	0.00

10

20

ATOM	18	O	ARG	2	-2.559	3.112	-1.836	1.00	0.00
ATOM	19	CB	ARG	2	-3.519	2.999	0.862	1.00	0.00
ATOM	20	CG	ARG	2	-3.052	4.460	0.950	1.00	0.00
ATOM	21	CD	ARG	2	-4.211	5.459	0.892	1.00	0.00
ATOM	22	NE	ARG	2	-3.742	6.823	1.164	1.00	0.00
ATOM	23	CZ	ARG	2	-4.455	7.940	0.945	1.00	0.00
ATOM	24	NH1	ARG	2	-5.701	7.877	0.455	1.00	0.00
ATOM	25	NH2	ARG	2	-3.914	9.134	1.222	1.00	0.00
ATOM	26	H	ARG	2	-5.723	1.024	-0.475	1.00	0.00
ATOM	27	HA	ARG	2	-5.340	3.246	-0.248	1.00	0.00
ATOM	28	1HB	ARG	2	-4.084	2.770	1.767	1.00	0.00
ATOM	29	2HB	ARG	2	-2.647	2.346	0.839	1.00	0.00
ATOM	30	1HG	ARG	2	-2.523	4.585	1.896	1.00	0.00
ATOM	31	2HG	ARG	2	-2.356	4.680	0.142	1.00	0.00
ATOM	32	1HD	ARG	2	-4.657	5.430	-0.103	1.00	0.00
ATOM	33	2HD	ARG	2	-4.962	5.189	1.635	1.00	0.00
ATOM	34	HE	ARG	2	-2.813	6.913	1.550	1.00	0.00
ATOM	35	2HH1	ARG	2	-6.227	8.724	0.294	1.00	0.00
ATOM	36	1HH1	ARG	2	-6.122	6.981	0.254	1.00	0.00
ATOM	37	1HH2	ARG	2	-2.979	9.192	1.599	1.00	0.00
ATOM	38	2HH2	ARG	2	-4.442	9.979	1.061	1.00	0.00
ATOM	39	N	ALA	3	-4.640	3.150	-2.718	1.00	0.00
ATOM	40	CA	ALA	3	-4.259	3.352	-4.106	1.00	0.00
ATOM	41	C	ALA	3	-3.843	4.805	-4.352	1.00	0.00
ATOM	42	O	ALA	3	-4.546	5.555	-5.027	1.00	0.00
ATOM	43	CB	ALA	3	-5.430	2.931	-5.001	1.00	0.00
ATOM	44	H	ALA	3	-5.626	3.058	-2.522	1.00	0.00
ATOM	45	HA	ALA	3	-3.412	2.706	-4.345	1.00	0.00
ATOM	46	3HB	ALA	3	-5.643	1.872	-4.851	1.00	0.00
ATOM	47	1HB	ALA	3	-6.320	3.511	-4.753	1.00	0.00
ATOM	48	2HB	ALA	3	-5.182	3.096	-6.049	1.00	0.00
ATOM	49	N	GLY	4	-2.681	5.191	-3.818	1.00	0.00
ATOM	50	CA	GLY	4	-2.069	6.481	-4.087	1.00	0.00
ATOM	51	C	GLY	4	-0.636	6.488	-3.558	1.00	0.00
ATOM	52	O	GLY	4	0.272	6.072	-4.276	1.00	0.00
ATOM	53	H	GLY	4	-2.169	4.528	-3.249	1.00	0.00
ATOM	54	1HA	GLY	4	-2.035	6.637	-5.166	1.00	0.00
ATOM	55	2HA	GLY	4	-2.666	7.280	-3.648	1.00	0.00
ATOM	56	N	PRO	5	-0.410	6.939	-2.314	1.00	0.00

10

20

30

40

ATOM	57	CA	PRO	5	0.917	7.007	-1.721	1.00	0.00
ATOM	58	C	PRO	5	1.505	5.610	-1.509	1.00	0.00
ATOM	59	O	PRO	5	2.698	5.413	-1.731	1.00	0.00
ATOM	60	CB	PRO	5	0.739	7.773	-0.407	1.00	0.00
ATOM	61	CG	PRO	5	-0.715	7.501	-0.026	1.00	0.00
ATOM	62	CD	PRO	5	-1.419	7.411	-1.380	1.00	0.00
ATOM	63	HA	PRO	5	1.586	7.574	-2.370	1.00	0.00
ATOM	64	1HB	PRO	5	1.439	7.458	0.368	1.00	0.00
ATOM	65	2HB	PRO	5	0.857	8.840	-0.600	1.00	0.00
ATOM	66	1HG	PRO	5	-0.781	6.542	0.486	1.00	0.00
ATOM	67	2HG	PRO	5	-1.126	8.290	0.603	1.00	0.00
ATOM	68	1HD	PRO	5	-2.270	6.732	-1.322	1.00	0.00
ATOM	69	2HD	PRO	5	-1.752	8.405	-1.683	1.00	0.00
ATOM	70	N	LEU	6	0.670	4.646	-1.098	1.00	0.00
ATOM	71	CA	LEU	6	1.043	3.246	-0.926	1.00	0.00
ATOM	72	C	LEU	6	0.520	2.418	-2.110	1.00	0.00
ATOM	73	O	LEU	6	0.206	1.241	-1.944	1.00	0.00
ATOM	74	CB	LEU	6	0.497	2.733	0.422	1.00	0.00
ATOM	75	CG	LEU	6	1.343	3.106	1.651	1.00	0.00
ATOM	76	CD1	LEU	6	1.406	4.613	1.920	1.00	0.00
ATOM	77	CD2	LEU	6	0.748	2.411	2.883	1.00	0.00
ATOM	78	H	LEU	6	-0.298	4.883	-0.937	1.00	0.00
ATOM	79	HA	LEU	6	2.127	3.131	-0.913	1.00	0.00
ATOM	80	1HB	LEU	6	-0.520	3.095	0.556	1.00	0.00
ATOM	81	2HB	LEU	6	0.465	1.645	0.409	1.00	0.00
ATOM	82	HG	LEU	6	2.359	2.738	1.507	1.00	0.00
ATOM	83	2HD1	LEU	6	1.891	4.795	2.879	1.00	0.00
ATOM	84	3HD1	LEU	6	1.994	5.109	1.150	1.00	0.00
ATOM	85	1HD1	LEU	6	0.400	5.032	1.947	1.00	0.00
ATOM	86	2HD2	LEU	6	1.368	2.612	3.757	1.00	0.00
ATOM	87	3HD2	LEU	6	-0.261	2.780	3.069	1.00	0.00
ATOM	88	1HD2	LEU	6	0.707	1.332	2.728	1.00	0.00
ATOM	89	N	GLN	7	0.441	3.001	-3.316	1.00	0.00
ATOM	90	CA	GLN	7	0.009	2.262	-4.497	1.00	0.00
ATOM	91	C	GLN	7	1.046	1.194	-4.848	1.00	0.00
ATOM	92	O	GLN	7	0.696	0.030	-5.022	1.00	0.00
ATOM	93	CB	GLN	7	-0.227	3.214	-5.677	1.00	0.00
ATOM	94	CG	GLN	7	-0.648	2.494	-6.968	1.00	0.00
ATOM	95	CD	GLN	7	-1.990	1.773	-6.841	1.00	0.00

10

20

30

40

ATOM	96	OE1	GLN	7	-3.015	2.295	-7.270	1.00	0.00
ATOM	97	NE2	GLN	7	-1.991	0.566	-6.271	1.00	0.00
ATOM	98	H	GLN	7	0.702	3.971	-3.428	1.00	0.00
ATOM	99	HA	GLN	7	-0.936	1.778	-4.245	1.00	0.00
ATOM	100	1HB	GLN	7	-1.007	3.925	-5.415	1.00	0.00
ATOM	101	2HB	GLN	7	0.690	3.769	-5.878	1.00	0.00
ATOM	102	1HG	GLN	7	-0.742	3.247	-7.752	1.00	0.00
ATOM	103	2HG	GLN	7	0.120	1.787	-7.282	1.00	0.00
ATOM	104	1HE2	GLN	7	-2.855	0.049	-6.189	1.00	0.00
ATOM	105	2HE2	GLN	7	-1.129	0.171	-5.919	1.00	0.00
ATOM	106	N	TRP	8	2.319	1.596	-4.940	1.00	0.00
ATOM	107	CA	TRP	8	3.449	0.700	-5.154	1.00	0.00
ATOM	108	C	TRP	8	3.434	-0.449	-4.141	1.00	0.00
ATOM	109	O	TRP	8	3.652	-1.602	-4.505	1.00	0.00
ATOM	110	CB	TRP	8	4.756	1.500	-5.048	1.00	0.00
ATOM	111	CG	TRP	8	5.026	2.107	-3.702	1.00	0.00
ATOM	112	CD1	TRP	8	4.543	3.290	-3.263	1.00	0.00
ATOM	113	CD2	TRP	8	5.753	1.533	-2.573	1.00	0.00
ATOM	114	NE1	TRP	8	4.896	3.483	-1.944	1.00	0.00
ATOM	115	CE2	TRP	8	5.643	2.425	-1.466	1.00	0.00
ATOM	116	CE3	TRP	8	6.450	0.324	-2.354	1.00	0.00
ATOM	117	CZ2	TRP	8	6.203	2.134	-0.213	1.00	0.00
ATOM	118	CZ3	TRP	8	7.061	0.049	-1.117	1.00	0.00
ATOM	119	CH2	TRP	8	6.933	0.948	-0.045	1.00	0.00
ATOM	120	H	TRP	8	2.521	2.575	-4.803	1.00	0.00
ATOM	121	HA	TRP	8	3.378	0.286	-6.161	1.00	0.00
ATOM	122	1HB	TRP	8	5.585	0.835	-5.293	1.00	0.00
ATOM	123	2HB	TRP	8	4.739	2.297	-5.793	1.00	0.00
ATOM	124	HD1	TRP	8	3.930	3.966	-3.841	1.00	0.00
ATOM	125	HE1	TRP	8	4.624	4.279	-1.384	1.00	0.00
ATOM	126	HE3	TRP	8	6.504	-0.411	-3.142	1.00	0.00
ATOM	127	HZ2	TRP	8	6.053	2.799	0.624	1.00	0.00
ATOM	128	HZ3	TRP	8	7.623	-0.862	-0.986	1.00	0.00
ATOM	129	HH2	TRP	8	7.382	0.719	0.911	1.00	0.00
ATOM	130	N	LEU	9	3.164	-0.117	-2.872	1.00	0.00
ATOM	131	CA	LEU	9	3.155	-1.044	-1.753	1.00	0.00
ATOM	132	C	LEU	9	2.024	-2.054	-1.956	1.00	0.00
ATOM	133	O	LEU	9	2.239	-3.260	-1.862	1.00	0.00
ATOM	134	CB	LEU	9	3.025	-0.233	-0.448	1.00	0.00

10

20

30

40

ATOM	135	CG	LEU	9	3.830	-0.813	0.726	1.00	0.00
ATOM	136	CD1	LEU	9	3.898	0.197	1.877	1.00	0.00
ATOM	137	CD2	LEU	9	3.197	-2.091	1.264	1.00	0.00
ATOM	138	H	LEU	9	2.975	0.853	-2.669	1.00	0.00
ATOM	139	HA	LEU	9	4.112	-1.567	-1.754	1.00	0.00
ATOM	140	1HB	LEU	9	3.418	0.768	-0.625	1.00	0.00
ATOM	141	2HB	LEU	9	1.977	-0.133	-0.166	1.00	0.00
ATOM	142	HG	LEU	9	4.846	-1.031	0.399	1.00	0.00
ATOM	143	3HD1	LEU	9	4.523	-0.200	2.678	1.00	0.00
ATOM	144	1HD1	LEU	9	4.326	1.137	1.535	1.00	0.00
ATOM	145	2HD1	LEU	9	2.899	0.384	2.267	1.00	0.00
ATOM	146	2HD2	LEU	9	3.808	-2.482	2.077	1.00	0.00
ATOM	147	3HD2	LEU	9	2.197	-1.867	1.630	1.00	0.00
ATOM	148	1HD2	LEU	9	3.135	-2.835	0.479	1.00	0.00
ATOM	149	N	CYS	10	0.830	-1.551	-2.288	1.00	0.00
ATOM	150	CA	CYS	10	-0.347	-2.351	-2.581	1.00	0.00
ATOM	151	C	CYS	10	-0.090	-3.354	-3.706	1.00	0.00
ATOM	152	O	CYS	10	-0.370	-4.536	-3.533	1.00	0.00
ATOM	153	CB	CYS	10	-1.528	-1.430	-2.894	1.00	0.00
ATOM	154	SG	CYS	10	-3.024	-2.270	-3.462	1.00	0.00
ATOM	155	H	CYS	10	0.733	-0.547	-2.354	1.00	0.00
ATOM	156	HA	CYS	10	-0.598	-2.913	-1.684	1.00	0.00
ATOM	157	1HB	CYS	10	-1.764	-0.865	-1.995	1.00	0.00
ATOM	158	2HB	CYS	10	-1.251	-0.720	-3.670	1.00	0.00
ATOM	159	1LG	CYS	10	-2.931	-2.146	-4.124	1.00	0.00
ATOM	160	2LG	CYS	10	-3.134	-2.620	-2.887	1.00	0.00
ATOM	161	N	GLU	11	0.449	-2.907	-4.846	1.00	0.00
ATOM	162	CA	GLU	11	0.729	-3.800	-5.964	1.00	0.00
ATOM	163	C	GLU	11	1.792	-4.838	-5.593	1.00	0.00
ATOM	164	O	GLU	11	1.609	-6.024	-5.859	1.00	0.00
ATOM	165	CB	GLU	11	1.168	-3.009	-7.206	1.00	0.00
ATOM	166	CG	GLU	11	0.102	-2.037	-7.727	1.00	0.00
ATOM	167	CD	GLU	11	-1.243	-2.716	-7.973	1.00	0.00
ATOM	168	OE1	GLU	11	-1.333	-3.451	-8.980	1.00	0.00
ATOM	169	OE2	GLU	11	-2.154	-2.493	-7.146	1.00	0.00
ATOM	170	H	GLU	11	0.669	-1.924	-4.942	1.00	0.00
ATOM	171	HA	GLU	11	-0.182	-4.348	-6.204	1.00	0.00
ATOM	172	1HB	GLU	11	2.075	-2.446	-6.979	1.00	0.00
ATOM	173	2HB	GLU	11	1.396	-3.721	-8.001	1.00	0.00

10

20

30

40

ATOM	174	1HG	GLU	11	-0.034	-1.231	-7.014	1.00	0.00
ATOM	175	2HG	GLU	11	0.452	-1.601	-8.663	1.00	0.00
ATOM	176	N	LYS	12	2.909	-4.388	-5.010	1.00	0.00
ATOM	177	CA	LYS	12	4.080	-5.221	-4.779	1.00	0.00
ATOM	178	C	LYS	12	3.824	-6.277	-3.701	1.00	0.00
ATOM	179	O	LYS	12	4.069	-7.459	-3.936	1.00	0.00
ATOM	180	CB	LYS	12	5.280	-4.325	-4.444	1.00	0.00
ATOM	181	CG	LYS	12	6.590	-5.123	-4.400	1.00	0.00
ATOM	182	CD	LYS	12	7.820	-4.206	-4.385	1.00	0.00
ATOM	183	CE	LYS	12	7.961	-3.450	-3.061	1.00	0.00
ATOM	184	NZ	LYS	12	9.120	-2.542	-3.084	1.00	0.00
ATOM	185	H	LYS	12	2.989	-3.401	-4.803	1.00	0.00
ATOM	186	HA	LYS	12	4.306	-5.736	-5.715	1.00	0.00
ATOM	187	1HB	LYS	12	5.366	-3.568	-5.225	1.00	0.00
ATOM	188	2HB	LYS	12	5.107	-3.827	-3.490	1.00	0.00
ATOM	189	1HG	LYS	12	6.604	-5.776	-3.526	1.00	0.00
ATOM	190	2HG	LYS	12	6.650	-5.743	-5.296	1.00	0.00
ATOM	191	1HD	LYS	12	8.711	-4.820	-4.529	1.00	0.00
ATOM	192	2HD	LYS	12	7.754	-3.496	-5.210	1.00	0.00
ATOM	193	1HE	LYS	12	7.068	-2.857	-2.869	1.00	0.00
ATOM	194	2HE	LYS	12	8.098	-4.170	-2.255	1.00	0.00
ATOM	195	2HZ	LYS	12	9.000	-1.861	-3.820	1.00	0.00
ATOM	196	3HZ	LYS	12	9.192	-2.066	-2.196	1.00	0.00
ATOM	197	1HZ	LYS	12	9.962	-3.073	-3.250	1.00	0.00
ATOM	198	N	TYR	13	3.345	-5.856	-2.524	1.00	0.00
ATOM	199	CA	TYR	13	3.118	-6.740	-1.388	1.00	0.00
ATOM	200	C	TYR	13	1.704	-7.312	-1.433	1.00	0.00
ATOM	201	O	TYR	13	1.537	-8.530	-1.445	1.00	0.00
ATOM	202	CB	TYR	13	3.347	-5.993	-0.069	1.00	0.00
ATOM	203	CG	TYR	13	4.787	-5.600	0.198	1.00	0.00
ATOM	204	CD1	TYR	13	5.300	-4.391	-0.305	1.00	0.00
ATOM	205	CD2	TYR	13	5.596	-6.412	1.016	1.00	0.00
ATOM	206	CE1	TYR	13	6.582	-3.958	0.070	1.00	0.00
ATOM	207	CE2	TYR	13	6.896	-6.000	1.354	1.00	0.00
ATOM	208	CZ	TYR	13	7.385	-4.766	0.892	1.00	0.00
ATOM	209	OH	TYR	13	8.639	-4.357	1.241	1.00	0.00
ATOM	210	H	TYR	13	3.140	-4.873	-2.402	1.00	0.00
ATOM	211	HA	TYR	13	3.826	-7.571	-1.417	1.00	0.00
ATOM	212	1HB	TYR	13	2.720	-5.102	-0.042	1.00	0.00

10

20

30

40

ATOM	213	2HB	TYR	13	3.018	-6.640	0.745	1.00	0.00
ATOM	214	HD1	TYR	13	4.707	-3.781	-0.968	1.00	0.00
ATOM	215	HD2	TYR	13	5.218	-7.350	1.396	1.00	0.00
ATOM	216	HE1	TYR	13	6.948	-3.005	-0.278	1.00	0.00
ATOM	217	HE2	TYR	13	7.514	-6.626	1.982	1.00	0.00
ATOM	218	HH	TYR	13	8.872	-3.497	0.883	1.00	0.00
ATOM	219	N	PHE	14	0.685	-6.443	-1.441	1.00	0.00
ATOM	220	CA	PHE	14	-0.707	-6.851	-1.269	1.00	0.00
ATOM	221	C	PHE	14	-1.342	-7.174	-2.628	1.00	0.00
ATOM	222	O	PHE	14	-2.470	-6.768	-2.906	1.00	0.00
ATOM	223	CB	PHE	14	-1.488	-5.752	-0.525	1.00	0.00
ATOM	224	CG	PHE	14	-0.808	-5.116	0.680	1.00	0.00
ATOM	225	CD1	PHE	14	0.044	-5.862	1.519	1.00	0.00
ATOM	226	CD2	PHE	14	-1.039	-3.756	0.964	1.00	0.00
ATOM	227	CE1	PHE	14	0.722	-5.231	2.578	1.00	0.00
ATOM	228	CE2	PHE	14	-0.370	-3.129	2.027	1.00	0.00
ATOM	229	CZ	PHE	14	0.523	-3.862	2.826	1.00	0.00
ATOM	230	H	PHE	14	0.882	-5.453	-1.475	1.00	0.00
ATOM	231	HA	PHE	14	-0.751	-7.755	-0.659	1.00	0.00
ATOM	232	1HB	PHE	14	-1.708	-4.956	-1.237	1.00	0.00
ATOM	233	2HB	PHE	14	-2.441	-6.169	-0.195	1.00	0.00
ATOM	234	HD1	PHE	14	0.196	-6.918	1.352	1.00	0.00
ATOM	235	HD2	PHE	14	-1.733	-3.185	0.367	1.00	0.00
ATOM	236	HE1	PHE	14	1.396	-5.800	3.201	1.00	0.00
ATOM	237	HE2	PHE	14	-0.539	-2.080	2.228	1.00	0.00
ATOM	238	HZ	PHE	14	1.053	-3.370	3.629	1.00	0.00
ATOM	239	N	GLY	15	-0.607	-7.896	-3.480	1.00	0.00
ATOM	240	CA	GLY	15	-0.995	-8.181	-4.849	1.00	0.00
ATOM	241	C	GLY	15	0.182	-8.794	-5.604	1.00	0.00
ATOM	242	O	GLY	15	1.159	-9.233	-4.999	1.00	0.00
ATOM	243	H	GLY	15	0.302	-8.231	-3.186	1.00	0.00
ATOM	244	1HA	GLY	15	-1.832	-8.881	-4.853	1.00	0.00
ATOM	245	2HA	GLY	15	-1.295	-7.254	-5.340	1.00	0.00
ATOM	246	N	NH2	16	0.095	-8.822	-6.935	1.00	0.00
ATOM	247	1HN	NH2	16	-0.720	-8.445	-7.397	1.00	0.00
ATOM	248	2HN	NH2	16	0.854	-9.209	-7.476	1.00	0.00

=====

実施例 9

(Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1を用いる IGFBPsからの I G F-Iの移動

この実施例は、上記動物実験において使用した I G F変異体 (Leu²⁴,Ala³¹) hIGF-1が、ヒト血清中に存在する IGFBPsから I G F-Iトレーサーを移動できることを示す。

10

20

30

40

50

該 I G F-I 変異体がヒト血清中に存在する内因性 IGFBPs から I G F-I を移動できるであろうことを測定するために、以下の実験を実行した。放射能標識した rhIGF (^{125}I -IGF-I) は、 ^{125}I -IGF-I:IGFBP 複合体の形成を許すために、4 °C で 16 時間、33ng/ml の濃度で通常のヒト血清サンプルとインキュベートした。複合体形成に続き、I G F 変異体 (Leu²⁴, Ala³¹) hIGF-1 (40 µg/ml) を、0, 0.5, 3, 又は 16 時間でそのインキュベーションに加えた。そのサンプル (n=3) は、次いで ^{125}I -IGF-I:IGFBP 複合体の相対的なサイズと量を測定するために、FPLC サイズ-排除クロマトグラフィー (FPLC-SEC) によって分析した。

図 4 1 は、通常のヒトからの血清中に存在する内因性 IGFBPs から ^{125}I -IGF-I を移動するための I G F 変異体の能力を示すクロマトグラムである。データはフラクション毎の c p m (n=1) として表した。この実験は三回繰り返し、定量化し、そして表 I X 中に提示した

10

表 I X

通常のヒト血清中の内因性 IGFBPs から ^{125}I -IGF-I を移動するための I G F 変異体の能力示す FPLC-SEC データの定量化*

	~150 kDa	~44 kDa	Free (~7 kDa)
IGF 変異体 (0 hr)	30.3 ± 1.4	60.5 ± 0.8	9.3 ± 2.3
IGF 変異体 (0.5 hr)	24.4 ± 0.8	37.3 ± 2.9	38.2 ± 3.7
IGF 変異体 (3 hr)	10.3 ± 1.1	27.8 ± 1.5	61.9 ± 2.6
IGF 変異体 (24 hr)	5.5 ± 0.1	12.6 ± 0.4	81.9 ± 0.5

20

* データ (平均 ± SD, n=3) は、三つの分子量範囲の全てにおける全放射能によって、各分子量範囲における放射能の量を割ることによって計算した、全放射能のパーセントとして表される。

30

^{125}I -IGF-I と通常のヒト血清との 16 時間のインキュベーションの後、放射能の 3 つのピークが FPLC-SEC に続いて観測された (図 42)。これらのピークは次の ^{125}I -IGF-I 複合体と一致するように思われる: ~150kDa (^{125}I -IGF-I:IGFBP-3:ALS); ~44kDa (^{125}I -IGF-I:IGFBPs 1-4); ~7kDa (遊離 ^{125}I -IGF-I)。図 42 中に見ることができる通り、該血清への I G F 変異体の添加は、 ^{125}I -IGF-I:IGFBP 複合体に結合した ^{125}I -IGF-I の減少と遊離 ^{125}I -IGF-I の量の増加の結果を生じた。これらの結果は、上記の表において概要される。その ^{125}I -IGF-I は、~150kDa ^{125}I -IGF-I:IGFBP 複合体よりも ~44kDa から、より容易にディスプレイされ、低分子量 IGFBPs に結合した I G F-I がより生物学的に利用可能な形態であることを示唆する。これらのデータは、I G F 変異体が通常のヒト血清中に存在する内因性 IGFBPs から I G F-I をディスプレイする能力を有することを明確に示し、従ってヒトにおいてインビボで活性化とされるものと思われる。

40

結論において、この証拠は、ラットにおいて示されているヒトにおいて活性を示す変異体の特質の分子を予測するであろう。

実施例 1 0

BP15 を用いる IGFBPs からの I G F-I の移動

この実施例は、ヒト血清中の ^{125}I -IGF-I の結合を阻止するその能力について、IGFBP-3-特異的ペプチド、BP15 を試験する。ヒト血清は、 ^{125}I -IGF-I ± そのペプチドと共にインキュベートし、サイズ排除クロマトグラフィーを通して IGFBPs に結合したトレーサーの量を測定した。ペプチドの添加は、150-KD IGF/IGFBP-3/ALS 複合体と結合した ^{125}I -IGF-I のほ

50

ば42%の減少及び遊離¹²⁵I-IGF-Iの量の59%増加の結果を生じた。そのペプチドは44-KD IGF-BPsを減少せず（実際、それをわずかに増加した）、該ペプチドがIGFBP-3への結合のためにIGF-Iとのみ競合することを示している。

これらの結果は、その類似物が（0.2mMで）ヒト血清中でIGFBP-3への結合のためにIGF-Iと競合できることを示す。

実施例 1 1

ヒト IGF-Iによるヒトの治療

この実施例は、内因性IGFsを移動するためのIGFBPs作用の1又はそれ以上に結合する化合物をどのように外因的に投与するか、及びヒトにおいて使用するためにIGFアゴニストをどのような投薬量とするかの原理を示す。

この実験において、ヒトII型糖尿病に、12週間、4つの投薬量（10, 20, 40又は80 µg/kg）で一日二回の注射によって、組換えヒトIGF-I又はプラシーボを投与した。血液サンプルは、治療の前、2週間毎に、及び治療の12週後（EP）で採血した。IGF-I、IGF-II、及びIGFBP-3の濃度を、IGF-IIがIGF-Iの10 µg/日で治療した患者から採取したサンプルにおいて測定していないことを除いて、全てのサンプルで測定した。

図43は、患者の血中IGF-Iの濃度を示す。予期されない知見は、IGF-Iの40と80 µgの投与の「プラトー」効果であった；IGF-Iの同じ全血中濃度はこれら2つの投薬量で到達された。

図44は、患者の血中IGF-IIの濃度を示す。IGF-Iの上昇しているレベルに対し、IGF-IIのレベルはIGF-I濃度における上昇に対して大部分がマイナーなイメージパターンで落下した。上昇しているIGF-I濃度のプラトー化のように、落下しているIGF-II濃度もまたプラトーに達した。

図45は、患者の血中IGFBP-3濃度を示す。血中IGF-IとIGF-IIのパターンにおける明瞭な変化に対して、IGFBP-3の濃度は変化の統計学的に有意な又は明確なパターンは示さなかった。

図43と44の精査は、全IGF濃度（IGF-IプラスIGF-II）が治療に伴いほとんど変化無く示されたことを明らかにする。これは、IGF-IIの濃度の落下に密接に適合したIGF-Iの濃度における上昇のためであった。3つの図の全ての精査は、患者の血中IGF-IとIGF-IIの濃度における投薬量関連変化が、減少したIGFBP-3結合タンパク質容量に伴って起こるものではないことを示す（IGFBP-3は血中の主要な結合タンパク質である）。

IGF-IIの濃度における落下、及びIGF-IとIGF-II濃度のプラトー化のための以前の説明は、IGF結合タンパク質容量の限定された量があること、及びこの実験において使用したIGF-Iの投薬量は、結合タンパク質からIGF-IIの投薬量に関連した移動の原因となったことである。

それは、活性IGFのレベルを増すための能力を持ついずれかの分子がこの実施例においてIGF-Iで示されたそれらと類似した活性を示すであろうことを予測するこの実施例中の観測の論理的な拡張である。加えて、使用したIGF-Iの投薬量及び示されたIGFBPとIGF-I及びIGF-IIの濃度から、それは活性の内因性IGFのレベルを増加するためにどのようにIGFアゴニストを与えるべきかを計算するために簡単である。IGF-Iに関するモルサイズ、IGFBPのためのIGFアゴニストのアフィニティー、及びその生物学的利用能は、ヒトにおける活性IGFが増加したその投薬量に至ることを考慮して他の可変のものとされるであろう。

実施例 1 2

bp1-01の構造／機能及びアフィニティー成熟

A. IGFBP-1へのbp1-01結合の運動

bp1-01ペプチド変異体の運動は、デキストランチップにEDC/NHS（作製により記載した通り）を経て共有結合したIGFBP-1を用いるBiacoreTM（Biacore社, Piscataway, NJ）アッセイで検査した。ペプチドbp1-01（配列番号：15）は、あまりに急激なので測定できない解離運動を表示した。しかしながら、bp1-02、19-マー変異体（配列番号：16）は、

10

20

30

40

50

測定可能な運動を表示した。その会合率定数は $2.30 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ であり、解離率定数は $5.03 \times 10^2 \text{sec}^{-1}$ であった。その後者は、ほぼ28秒のIGFBP-1からペプチド解離の半減期を含む。その会合率定数は、該ペプチドがIGFBP-1への結合について顕著な構造変化を受けていないとの見解に一致する中度の速さである。

B. bp1-01ペプチドの変異誘発スクランニング

合成ペプチド変異体の2つのシリーズがbp1-01ペプチドの側鎖がIGFBP-1結合に直接寄与し得たことを測定するために作製された。第1のシリーズにおいて、アラニン-スクランニングアプローチ (CunninghamとWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)) は、ベータ炭素に属する各側鎖部分を取り除くために使用した。IGFBP-1への該ペプチドの結合の遊離エネルギーに対するこれら原子の寄与は、IGFBP-3のために記載したそれに類似した (実施例7参照)、BIAcoreTM競合アッセイにおいてIGF-I又はIGF-IIへのIGFBP-1の結合を抑制するための該変異体の効果 (IC50) を測定することによって評価した。その結果を表X中に示した。

作製したペプチドの第2のシリーズは、アルファ炭素で加えられたメチル基のような他の構造的特徴又はアイソマー (D-アラニン) であろうとなかろうとプローブのための非天然アミノ酸の使用がIGFBP-1へのペプチドの結合に影響を及ぼすことができた。これらのペプチドの有効性は、表XI中に示した結果とともに、ビオチン化IGFBP-1 ELISAアッセイによって測定した。これらの結果は、IGFBP-1へのbp1-01の結合において側鎖L6, L9, W8, 及びY13の重要性を確認する。構造寄与はまた、R2とA3での置換の効果によって示唆された。

一方、G4, Q7, E11, K12, 及びF14でのaib置換のような幾つかの置換は、結合アフィニティーについてわずかしき又は効果がない。これら置換体の1又はそれ以上を含むペプチドは、非天然アミノ酸が、蛋白分解に対して大きな抵抗性のペプチドをしばしば与えるために、それにも関わらず有用となり得る (Schumacherら, Science, 271: 1854 (1996) とその中の参考文献を参照)。そのようなペプチドは、天然アミノ酸のみを有するそれよりもより長い血清中の半減期を達成し得る。

表XI中に示した結果に鑑みて、bp1-01の位置2, 3, 又は6で置換されたD-アラニンを持つ又は位置7, 8, 9, 11, 12, 13, 又は14でアルファ-アミノイソブチラート置換を持つペプチドは、インビトロでの細胞培養アッセイにおいてIGF-Iの利用能を増加するであろうことが予想される。

最後に、各種のC末端bp1-01変異体の相対アフィニティーは、表XII中に示した通り、ELISAによって測定された。これらのデータは、該ペプチドのC末端領域が結合のために重要であることを示す。ペプチドbp1-18 (配列番号: 104) のみは、IGF-I:IGFBP-1結合のための測定可能な抑制的活性を保有した。それは、このペプチドがインビトロでの細胞培養アッセイにおいてIGF-Iの利用能を増加するであろうことを予想させる。

一緒に採取した、その構造-機能データは、より小さな、非ペプチドを含む化合物が、側鎖L6, L9, W8, 及びY13との組み合わせにおけるこのペプチドのC末端の構成要素を含むことによる該bp1-01ペプチドの効果を真似るように設計され得る。

表 X

BIAcore™ による bp1-01 Ala-スキャン
 ペプチド変異体の相対アフィニティー

変異体	I G F -I 抑制	I G F -II 抑制	
—	<u>IC50(mut)/IC50(wt)</u>	<u>IC50(mut)/IC50(wt)</u>	
C1	n.d.	n.d.	10
R2A	0.9	0.9	
A3	-1-	-1-	
G4	n.d.	n.d.	
P5	n.d.	n.d.	
L6A	30.3	34.7	
Q7A	0.7	0.6	
W8A	7.4	6.4	
L9A	33.2	29.7	
C10	n.d.	n.d.	20
E11A	2.9	2.4	
K12A	7.9	5.3	
Y13A	12.5	14.6	
F14A	6.2	5.8	
(wt)	-1-	-1-	

表 X I

ELISA による bp1-01 非天然ペプチド変異体の相対アフィニティー

(a=D-アラニン; aib=アルファ-アミノイソブチレート)

変異体	I G F-I 抑制 <u>IC50(mut)/IC50(wt)</u>	
—		
C1	n.d.	10
R2a	50	
A3a	34	
G4a	0.6	
P5	n.d.	
L6a	400	20
Q7 aib	1.6	
W8aib	24	
L9aib	400	
C10	n.d.	
E11aib	1.0	
K12aib	2.0	
Y13aib	7.1	
F14aib	3.0	
(wt)	-1-	

表 X I I

ELISA による C 末端 bp1-01 変異体の相対アフィニティー

変異体 ^a 7°チド	I G F-I 抑制	
名称 配列	<u>IC50(mut)/IC50(wt)</u>	
bp1-01 CRAGPLQWLCEKYFG (SEQ ID NO:15)	-1-	30
bp1-04 CRAGPLQWLCE (SEQ ID NO:102)	>1000	
bp1-17 CRAGPLQWLCEK (SEQ ID NO:103)	>1000	
bp1-18 CRAGPLQWLCEKAA (SEQ ID NO:104)	148	40

C. bp1-01 第二次ライブラリーの多価 (g8) 選択

NNS コドンは、実施例 7 中に記載した通りの種々のペプチドライブラリーを作製するために用いた。アフィニティー選択は、親和力効果を最小化するために溶液においてビオチン化 IGFBP-1 (実施例 7 で記載した通り調製した) へのファージの溶液結合によって実行した。類似の計画は、Hawkins ら, J. Mol. Biol., 226: 889 (1992) による抗体-ファージ選択のために使用した。選択の各ラウンドのために、標的の量は、増加したアフィニティー変異体用の選択で減じられた。典型的に、 10^9 - 10^{10} の精製したファージを、室温で一時間、MPBST (PBS 中 5% スキムミルク + 0.05% TWEENTM20) によって予備ブロック化し、且つ

ビオチン化標的への結合のため選択した。結合条件は以下の通り。標的に結合したファージは、室温で2-5分間、ストレプトタビジン-マグネチックビーズ（Promega社，Madison，WI）と共にインキュベートすることによって捕捉した。結合の後、そのビーズは、0.1M HClによる溶離の前に、PBS-TWEENTM/MPBSTで十回洗浄した。その溶離液は、0.1M トリス、pH8.0の1/3容量で直接中性化した。溶離したファージは、次の選択サイクル用のXL1に感染することによって増殖した。ラウンド1，2，3は、一時間のインキュベーションによって、それぞれ400nM、200nM、及び20nM標的によって実行した。ラウンド4は、4nM標的によって一晩実行した。全ての結合反応は、室温で実行した。

同定した変異体を表X I I I中に示し、さらにELISAプレートアッセイ又はBIAcore^T_Mによる相対アフィニティーを表X I V中に示した。bp1-10（配列番号：105）、bp1-11（配列番号：106）、bp1-12（配列番号：107）、bp1-13（配列番号：108）、bp1-15（配列番号：110）、bp68（配列番号：112）、bp1027（配列番号：113）、bp1028（配列番号：114）、bp1029（配列番号：115）、及びbp1030（配列番号：116）は、bp1-02とbp1-01に匹敵する又はより高いアフィニティーであり、インビトロ細胞培養アッセイにおいてIGF-Iの利用能を増加することが予期される。

表X I I I

多価(g8)bp101 ライブ・ラーから同定した変異体と(no.配列)

位置	Lib. 121(40)	Lib. 122(61)	Lib. 123(93)	Lib. 124
S(-4)				
E(-3)				
V(-2)				
G(-1)			E(27);V(13);S(10); T(6);Q(8);L(3);K(5); R(4);M(2);G(6);D(2);A(7)	10
C1				
R2		K(22);R(16);F(4); A(3);Y(2);V(2);T(2); N(3);S(3);E(2);D;H		
A3			E(31);R(13);K(11);S(8); D(5);Q(6);V(5);T(4)G(3); A(4);P(2);I	20
G4	G(39);N			
P5	P(32);R(3); K;A;S;V;E			
L6	L(40)			
Q7		E(20);L(15);Q(7); K(5);R(2);H(5);Y(4); T;F;W		
W8	W(40)			
L9		L(61)		30
C10				
E11		E(29);V(11);L(9);D(3); N(2);Q(2);I(2);M(2);R		
K12			R(31);L(28);M(21); K(8);V(3);I(2)	
Y13			Y(65);F(15);M(5); V(3);K(3);H;I	40
F14				

表X I V

ELISA プレート又は BIAcore™*による g8 bp1-01 変異体の相対アフィニティー

変異体 名称	ペプチド 配列	IGF-1 抑制 IC50(mut)/IC50(wt)	
bp1-02	SEVGCRA ^G PLQWLCEKYFG (SEQ ID NO:16)	0.37	
bp1-01	CRA ^G PLQWLCEKYFG (SEQ ID NO:15)	-1-	10
bp1-10	CRKG ^G PLQWLCELYF (SEQ ID NO:105)	1.1*	
bp1-11	CRKG ^G PLQWLCEKYF (SEQ ID NO:106)	1.9*	
bp1-12	CKEG ^G PLQWLCEKYF (SEQ ID NO:107)	2.9*	
bp1-13	CKEG ^G PLLWLCEKYF (SEQ ID NO:108)	2.5*	20
bp1-14	SEVGCREG ^G PLQWLCEKYF (SEQ ID NO:109)	0.26	
bp1-15	CAAG ^G PLQWLCEKYF (SEQ ID NO:110)	0.68	
bp67	CRA ^G PLQWLCERYF (SEQ ID NO:111)	0.34	
bp68	CRA ^G PLQWLCEKFF (SEQ ID NO:112)	0.39	30
bp1027	CKAG ^G PLLWLCERFF (SEQ ID NO:113)	8.8	
bp1028	CRA ^G PLQWLCERFF (SEQ ID NO:114)	4.6	
bp1029	CREG ^G PLQWLCERFF (SEQ ID NO:115)	1.7	
bp1030	CKEG ^G PLLWLCERFF (SEQ ID NO:116)	4.3	40

D. bp1-01第二次ライブラリーの1価(g3)選択
 bp1-01第二次ライブラリーの1価(g3)選択は、上記のパートC中に記載した通り必須に実行した。テンプレートは、無作為化のために標的化したサイトでのTAA停止コドン又はbp1-01からの完全に関係のない結合配列のいずれかを含む。選択条件は、ブロッキング緩衝液中のBSA置換ミルクと共に以下に記載した通りとした。ファージ標的複合体は、マグネチックスプレタビジンビーズ(Promega社, Madison, WI)により捕捉した。ピオチン化標的は、ラウンド1中で200-500nMから、ラウンド2での50-100nM、ラウンド3での10-50nM、及びラウンド4での1-20nMまでに減じられた標的濃度と共に、各ラウンドにおいて室温で1-3時間ファージと予備インキュベートした。

同定した変異体を表X Vに示し、及び選択した幾つかのペプチドのBIAcore™競合アッセイによって又はELISAプレートアッセイ（5%アセトニトリルをペプチドの可溶化のために使用したことを除いて、上記の通り実行した）によって測定した相対アフィニティーを表X V I 中に示した。bp1-01の13-残基変形体、bp1-16（配列番号：1 1 7）は、BP1-01のそれに類似したアフィニティーを有した。N末端又はC末端での置換は、アフィニティー改善を生じた。例えば、bp1-16と比べて、C末端でのSTY配列の添加は、ペプチドbp1-21B（配列番号：1 2 1）でのアフィニティーの約3倍の改善を生じた。類似の効果は18-マーの前後において見られた：即ち、3倍の改善がbp1-14（配列番号：1 0 9）とbp1-21A（配列番号：1 2 0）との間で観測された。N末端SからGモチーフの置換もまた、ペプチドbp1-19（配列番号：1 1 8）とbp1-20（配列番号：1 1 9）において2倍から3倍アフィニティーが改善された。これらペプチドの全ては、bp1-01とbp1-02との比較として、IGFBP-1のための類似の又は改善された外見上のアフィニティーを有し、且つインビボでの細胞培養アッセイにおけるIGF-Iの利用能を増加させることが予期される。

表X V

1 価(g3)bp1-01 ライブラリーから同定した変異体

<u>位置</u>	<u>Lib. 126(22)</u>	<u>Lib. 133(10)</u>	<u>Lib. 135(11)</u>	<u>Lib. 124</u>
S(-4)			E(5);Q(2);D;T;S	
E(-3)			A(3);K(2);D;E;T;S;Q	
V(-2)	M(19)	R(9);K(1)		
G(-1)	V(19)	V(5);Q(2);Q(2);S;T;I		
C1				
R2				
A3				
G4				
P5				
L6				
Q7				
W8				
L9				
C10				
E11				
K12	I(19)			
Y13				
F14				
15				A(3);Q(2);S(2);K;D
16				T(10)
17				Y(10)
18				G(9);T

表X V I

BIAcore™ 又は ELISA プレートアッセイ*による g3 bp1-01 選択物の相対アフィニティー

変異体 名称	ペプチド 配列	IGF-1 抑制 IC50(116)/ IC50(mut)	IGF-I 抑制 IC50(114)/ IC50(mut)
bp1-14	SEVGCRA ~~G~~ PLQWLCEKYFG-nh2 (SEQ ID NO:109)	4.8	-1-
bp1-16	CRA ~~G~~ PLQWLCEKYF-nh2 (SEQ ID NO:117)	-1-	0.21
bp1-19	SEMVCRA ~~G~~ PLQWLCEIYF-nh2* (SEQ ID NO:118)	9.9	2.1
bp1-20	EARVCRA ~~G~~ PLQWLCEKYF-nh2 (SEQ ID NO:119)	12	2.6
bp1-21A	SEVGCRA ~~G~~ PLQWLCEKYFSTY-nh2 (SEQ ID NO:120)	15	3.2
bp1-21B	CRA ~~G~~ PLQWLCEKYFSTY-nh2 (SEQ ID NO:121)	3.1	0.67

10

20

実施例 1 3

IGFBP-3結合ペプチド変異体の相対アフィニティー

各種のbp3-01-ox変異体の相対アフィニティーは、BIAcore™競合アッセイによって測定した。その結果は表X V I I中に示した。4d3.3（配列番号:122）、bp3-30（配列番号:123）、bp3-41（配列番号:124）、bp3-40（配列番号:125）、bp3-39（配列番号:126）、bp3-28（配列番号:128）、bp3-27（配列番号:129）、及びbp3-25（配列番号:130）は、bp3-01-oxのそれと類似した又はそれよりもより大きなアフィニティーを有することを見ることができ、そしてインビトロでの細胞培養アッセイにおいてIGF-Iの利用能を増加することが予期される。ペプチドbp3-24（配列番号:131）の測定可能な活性の欠如は、完全なジスルフィドが、ペプチドのこのシリーズのIGFBP-3への結合のために有利なペプチド構造を維持することにおいて演じる重大な役割を示す。

30

表X V I I

BIAcore™ 競合アッセイによる bp3-01 変異体の相対アフィニティー

変異体 名称	ペプチド 配列	IGF-1 抑制		
		IC50(uM)	IC50(mut)/IC50(wt)	
4d3.3	ASEEVCWPVAEWYLCNMWGR (SEQ ID NO:122)	5.6	2.8	10
bp3-30	ASEEVCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO:123)	5.6	2.8	
bp3-41	GPETCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO:124)	4.0	2.0	
bp3-01-ox	SEEVCWPVAEWYLCNMWG (SEQ ID NO:9)	2.0	-1-	
bp3-40	ac-SEEVCWPVAEWYLCN-nh2 (SEQ ID NO:125)	0.66	0.33	20
bp3-39	SEEVCWPVAEWYLCN-nh2 (SEQ ID NO:126)	0.66	0.33	
bp3-15	SEEVCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO:127)	0.72	0.36	
bp3-28	EEVCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO:128)	5.4	2.7	
bp3-27	EVCWPVAEWYLCN (SEQ ID NO:129)	2.8	1.4	30
bp3-25	CWPVAEWYLCN (SEQ ID NO:130)	46	23	
bp3-24	WPVAEWYLCN (SEQ ID NO:131)	>1000	>500	

実施例 1 4

IGFBP-3への結合のための補足ライブラリーのスクリーニング

補足の多価 (g8) ペプチド-ファージライブラリーは、IGF-IへのIGFBP-3結合を抑制した2つのペプチドを生産したそれに設計及び挿入した。その結果は、表X V I I Iに示した通り、bp3-107 (配列番号:132) とbp3-108 (配列番号:133) がインヒビターであること及びそれがインビトロでの細胞培養アッセイにおいてIGF-Iの利用能を増加することが

表XV I I I

BIAcore™ 競合アッセイによる I G F -I への IGFBP-3 のペプチド抑制

<u>ペプチド ファージ親</u>	<u>配 列</u>	<u>IC50(uM)</u>
bp3-107 t4H3.6	suc-CQLVRPDL LLCQ-nh2 (SEQ ID NO:132)	100
bp3-108 t4H3.9	suc-IPVSPDWFVCQ-nh2 (SEQ ID NO:133)	20

10

本発明は必要に応じて、ある種の特有の方法と材料に関してここに言及している。本発明の目的を達成するために適切な代替の材料と方法のいずれか又は全てに拡張され、本発明の範囲に関するいずれかの制限を構成するためではないこれら特有の方法と材料の言及であると解される。

配列表

(1) 一般情報:

- (i) 出願人: ジェネンテック、インコーポレーテッド
- (ii) 発明の名称: インスリン様成長因子アゴニスト分子
- (iii) 配列の数: 109

20

(iv) 住所

- (A) 住所: ジェネンテック、インコーポレーテッド
- (B) ストリート: 1 ディー・エヌ・エー ウェイ
- (C) 市: サウス サン フランシスコ
- (D) 州: カリフォルニア
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号: 94080

(v) コンピューター読解可能形式:

- (A) 媒体形式: 3.5 インチ、1.44 Mb フロッピーディスク
- (B) コンピューター: IBM PC コンパチブル
- (C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: WinPatIn (ジェネンテック)

30

(vi) 現出願データ:

- (A) 出願番号: PCT/US98/06514
- (B) 出願日: 1998年3月31日
- (C) 分類:

(vii) 基礎出願データ:

- (A) 出願番号: 08/825852
- (B) 出願日: 1997年4月4日

40

(viii) 代理人情報:

- (A) 名称: ハザック・ジャネット・イー
- (B) 登録番号: 28,616
- (C) 参考/整理番号: P1071P1PCT

(ix) テレコミュニケーション情報:

- (A) 電話: 650/225-1896
- (B) テレファックス: 650/952-9881

(2) 配列番号: 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 配列の長さ: 21 アミノ酸

50

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1：

Glu Leu Asp Gly Trp Val Cys Ile Lys Val Gly Glu Gln Asn Leu
 1 5 10 15

Cys Tyr Leu Ala Glu Gly
 20 21

(2) 配列番号：2 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：21 アミノ酸

10

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：2：

Trp Phe Lys Thr Val Cys Tyr Glu Trp Glu Asp Glu Val Gln Cys
 1 5 10 15

Tyr Thr Leu Glu Glu Gly
 20 21

(2) 配列番号：3 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：21 アミノ酸

20

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：3：

Arg Val Gly Ala Tyr Ile Ser Cys Ser Glu Thr Glu Cys Trp Val
 1 5 10 15

Glu Asp Leu Leu Asp Gly
 20 21

(2) 配列番号：4 の情報：

(i) 配列の特徴：

30

(A) 配列の長さ：20 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：4：

Val Ala Trp Glu Val Cys Trp Asp Arg His Asp Gln Gly Tyr Ile
 1 5 10 15

Cys Thr Thr Asp Ser
 20

(2) 配列番号：5 の情報：

(i) 配列の特徴：

40

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：5：

Ala Trp Glu Val Cys Trp Asp Arg His Gln Gly Tyr Ile Cys Thr
 1 5 10 15

Thr Asp Ser
 18

(2) 配列番号：6 の情報：

(i) 配列の特徴：

50

(A) 配列の長さ：15 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：6：

Cys Trp Asp Arg His Asp Gln Gly Tyr Ile Cys Thr Thr Asp Ser
 1 5 10 15

(2) 配列番号：7 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

10

(xi) 配列の詳細：配列番号：7：

Glu Glu Ser Glu Cys Phe Glu Gly Pro Gly Tyr Val Ile Cys Gly
 1 5 10 15

Leu Val Gly

18

(2) 配列番号：8 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

20

(xi) 配列の詳細：配列番号：8：

Asp Met Gly Val Cys Ala Asp Gly Pro Trp Met Tyr Val Cys Glu
 1 5 10 15

Trp Thr Glu

18

(2) 配列番号：9 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

30

(xi) 配列の詳細：配列番号：9：

Ser Glu Glu Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 15

Met Trp Gly

18

(2) 配列番号：10 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：15 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

40

(xi) 配列の詳細：配列番号：10：

Ser Glu Glu Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 15

(2) 配列番号：11 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：15 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：11：

50

Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn Met Trp Gly
 1 5 10 15

(2) 配列番号：1 2 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 2 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 2：

Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 12

10

(2) 配列番号：1 3 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 8 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 3：

Thr Gly Val Asp Cys Gln Cys Gly Pro Val His Cys Val Cys Met
 1 5 10 15

Asp Trp Ala

18

20

(2) 配列番号：1 4 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 8 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 4：

Thr Val Ala Asn Cys Asp Cys Tyr Met Pro Leu Cys Leu Cys Tyr
 1 5 10 15

Asp Ser Asp

18

30

(2) 配列番号：1 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 5 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 5：

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys Tyr Phe Gly
 1 5 10 15

(2) 配列番号：1 6 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 9 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 6：

Ser Glu Val Gly Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu
 1 5 10 15

40

Lys Tyr Phe Gly

19

(2) 配列番号：1 7 の情報：

(i) 配列の特徴：

50

(A) 配列の長さ：400塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：17：

TCACGTAAAA AGGGTATCTA GAATTATGAT GATTACTCTG CGCAAACCTC 50
CTCTGGCGGT TGCCGTCGCA GCGGGCGTAA TGTCTGCTCA GGCCATGGCC 100
GGTCCCGAAA CTCTGTGCGG TGCTGAACTG GTTGACGCTC TGCAGTTCGT 150
ATGTGGTGAT CGAGGCTTCC TGTTCACAA ACCGACTGGG GCTGGATCCT 200
CCTCTCGTCG TGCTCCCCAG ACTGGTATTG TTGACGAATG CTGCTTTCGT 250
TCTTGCGACC TCGTCGTCT GGAAATGTAT TCGCTCCCC TGAAACCCGC 300
TAAATCTGCT TAGAAGCTCC TAACGCTCGG TTGCCGCCGG GCGTTTTTTA 350
TTGTTAACTC ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG 400

10

(2) 配列番号：18の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：95アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：18：

Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala
1 5 10 15
Ala Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Gly Pro Glu Thr Leu
20 25 30
Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp
35 40 45
Arg Gly Phe Leu Phe Asn Lys Pro Thr Gly Ala Gly Ser Ser Ser
50 55 60
Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg
65 70 75
Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys
80 85 90
Pro Ala Lys Ser Ala
95

20

30

40

(2) 配列番号：19の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：5115塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：19：

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC 50
TCATTGCTGA GTTGTATTATTT AAGCTTGCCC AAAAAGAAGA AGAGTCGAAT 100
GAACTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT 150
TCGCAATATG GCGCAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG 200
GGGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCCTGA CGACGATACG 250
GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA 300
AAAAGTTAAT CTTTTCACAA GCTGTCATAA AGTTGTCACG GCCGAGACTT 350
ATAGTCGCTT TGTTTTTATT TTTAATGTA TTTGTAAC TA GTACGCAAGT 400

TCACGTAAAA AGGGTATCTA GAATTATGAT GATTACTCTG CGCAAACCTC 450
CTCTGGCGGT TGCCGTCGCA GCGGGCGTAA TGTCTGCTCA GGCCATGGCC 500
GGTCCCGAAA CTCTGTGCGG TGCTGAACTG GTTGACGCTC TGCAGTTCGT 550
ATGTGGTGAT CGAGGCTTCC TGTTCACAA ACCGACTGGG GCTGGATCCT 600
CCTCTCGTCG TGCTCCCCAG ACTGGTATTG TTGACGAATG CTGCTTTCGT 650
TCTTGCGACC TGCCTCGTCT GGAAATGTAT TCGCTCCCC TGAAACCCGC 700
TAAATCTGCT TAGAAGCTCC TAACGCTCGG TTGCCGCCGG GCGTTTTTTA 750
TTGTAACTC ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG 800
TTTATCACAG TTAAATTGCT AACGCAGTCA GGCACCGTGT ATGAAATCTA 850
ACAATGCGCT CATCGTCATC CTCGGCACCG TCACCCTGGA TGCTGTAGGC 900
ATAGGCTTGG TTATGCCGGT ACTGCCGGGC CTCTTGCGGG ATATCGTCCA 950
TTCCGACAGC ATCGCCAGTC ACTATGGCGT GCTGCTAGCG CTATATGCGT 1000
TGATGCAATT TCTATGCGCA CCCGTTCTCG GAGCACTGTC CGACCGCTTT 1050
GGCCGCCGCC CAGTCCTGCT CGCTTCGCTA CTTGGAGCCA CTATCGACTA 1100
CGCGATCATG GCGACCACAC CCGTCCTGTG GATCCTCTAC GCCGGACGCA 1150
TCGTGGCCGG CATCACCGGC GCCACAGGTG CGGTTGCTGG CGCCTATATC 1200
GCCGACATCA CCGATGGGGA AGATCGGGCT CGCCACTTCG GGCTCATGAG 1250
CGCTTGTTTC GCGTGGGTA TGGTGGCAGG CCCCGTGGCC GGGGGACTGT 1300
TGGGCGCCAT CTCCTTGCA TGCACCATTC TTGCGGCGGC GGTGCTCAAC 1350
GGCCTCAACC TACTACTGGG CTGCTTCCTA ATGCAGGAGT CGCATAAGGG 1400
AGAGCGTCGA CCGATGCCCT TGAGAGCCTT CAACCCAGTC AGCTCCTTCC 1450
GGTGGGCGCG GGGCATGACT ATCGTCGCCG CACTTATGAC TGTCTTCTTT 1500
ATCATGCAAC TCGTAGGACA GGTGCCGGCA GCGCTCTGGG TCATTTTCGG 1550
CGAGGACCGC TTTCGCTGGA GCGCGACGAT GATCGGCCTG TCGCTTGCGG 1600
TATTCGGAAT CTTGCACGCC CTCGCTCAAG CCTTCGTAC TGGTCCCGCC 1650
ACCAAACGTT TCGGCGAGAA GCAGGCCATT ATCGCCGGCA TGGCGGCCGA 1700
CGCGCTGGGC TACGCTTTCG TGGCGTTCGC GACGCGAGGC TGGATGGCCT 1750
TCCCCATTAT GATTCTTCTC GCTTCCGGCG GCATCGGGAT GCCCGCGTTG 1800
CAGGCCATGC TGTCCAGGCA GGTAGATGAC GACCATCAGG GACAGCTTCA 1850

10

20

30

40

AGGATCGCTC GCGGCTCTTA CCAGCCTAAC TTCGATCACT GGACCGCTGA 1900
TCGTACCGGC GATTTATGCC GCCTCGGCGA GCACATGGAA CGGGTTGGCA 1950
TGGATTGTAG GCGCCGCCCT ATACCTTGTC TGCCTCCCCG CGTTGCGTCG 2000
CGGTGCATGG AGCCGGGGCCA CCTCGACCTG AATGGAAGCC GGCGGCACCT 2050
CGCTAACGGA TTCACCACTC CAAGAATTGG AGCCAATCAA TTCTTGCGGA 2100
GAACTGTGAA TGCGCAAACC AACCCTTGGC AGAACATATC CATCGCGTCC 2150
GCCATCTCCA GCAGCCGCAC GCGGCGCATC TCGGGCAGCG TTGGGTCCTG 2200
GCCACGGGTG CGCATGATCG TGCTCCTGTC GTTGAGGACC CGGCTAGGCT 2250
GGCGGGGTTG CTTTACTGGT TAGCAGAATG AATCACCGAT ACGCGAGCGA 2300
ACGTGAAGCG ACTGCTGCTG CAAAACGTCT GCGACCTGAG CAACAACATG 2350
AATGGTCTTC GGTTCCTGTC TTTCGTAAAG TCTGGAAACG CGGAAGTCAG 2400
CGCCCTGCAC CATTATGTTT CGGATCTGCA TCGCAGGATG CTGCTGGCTA 2450
CCCTGTGGAA CACCTACATC TGTATTAACG AAGCGCTGGC ATTGACCCTG 2500
AGTGATTTTT CTCTGGTCCC GCCGCATCCA TACCGCCAGT TGTTTACCCT 2550
CACAACGTTT CAGTAACCGG GCATGTTTAT CATCAGTAAC CCGTATCGTG 2600
AGCATCCTCT CTCGTTTCAT CGGTATCATT ACCCCCATGA ACAGAAATTC 2650
CCCCTTACAC GGAGGCATCA AGTGACCATA CAGGAAAAAA CCGCCCTTAA 2700
CATGGCCCGC TTTATCAGAA GCCAGACATT AACGCTTCTG GAGAAACTCA 2750
ACGAGCTGGA CGCGGATGAA CAGGCAGACA TCTGTGAATC GCTTCACGAC 2800
CACGCTGATG AGCTTTACCG CAGCTGCCTC GCGCGTTTCG GTGATGACGG 2850
TGAAAACCTC TGACACATGC AGTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT 2900
AAGCGGATGC CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGGCGCGTC AGCGGGTGTT 2950
GGCGGGTGTC GGGGCGCAGC CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT 3000
GTATACTGGC TTAACATATG GGCATCAGAG CAGATTGTAC TGAGAGTGCA 3050
CCATATGCGG TGTGAAATAC CGCACAGATG CGTAAGGAGA AAATACCGCA 3100
TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT 3150
CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC 3200
CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC 3250
AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG 3300

10

20

30

40

CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG 3350
GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT 3400
CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC 3450
GCCTTTCTCC CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCATAGCT CACGCTGTAG 3500
GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG 3550
AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT 3600
GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG 3650
TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CCGTGCTACA GAGTTCTTGA 3700
AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC 3750
GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATE 3800
CGGCAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC 3850
AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT 3900
ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT 3950
CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 4000
GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT 4050
TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCTG 4100
TTCATCCATA GTTGCCTGAC TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG 4150
AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC 4200
TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA 4250
GCGCAGAAGT GGTCCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT 4300
GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC 4350
GTTGTTGCCA TTGCTGCAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT 4400
GGCTTCATTC AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC 4450
CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT TCGGTCCTCC GATCGTTGTC 4500
AGAAGTAAGT TGGCCGAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA 4550
TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 4600
AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC 4650
TCTTGCCCGG CGTCAACACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT 4700
AAAAGTGCTC ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA 4750

10

20

30

40

TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC 4800
TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGCGGT GAGCAAAAAC 4850
AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT 4900
GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT 4950
TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA 5000
AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG 5050
AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG 5100
CCCTTTCGTC TTCAA 5115

(2) 配列番号：20の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：5140塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：20：

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC 50
TCATTGCTGA GTTGTTATTT AAGCTTGCCC AAAAAGAAGA AGAGTCGAAT 100
GAACTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT 150
TCGCAATATG GCGCAAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG 200
GGGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCCCTGA CGACGATACG 250
GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA 300
AAAAGTTAAT CTTTTCAACA GCTGTCATAA AGTTGTCACG GCCGAGACTT 350
ATAGTCGCTT TGTTTTATT TTTTAATGTA TTTGTAACTA GTACGCAAGT 400
TCACGTAAAA AGGTATCTA GAGGTTGAGG TGATTTTATG AAAAAGAATA 450
TCGCATTTCT TCTTGCACT ATGTTGTTTT TTTCTATTGC TACAAATGCC 500
TATGCATCTG GTACCGCCAT GGCTGATCCG AACCGTTTCC GCGGTAAAGA 550
TCTGGCAGGT TCACCAGGTG GAGGATCCGG AGGAGGCGCC GAGGGTGACG 600
ATCCCGCAAA AGCGGCCTTT AACTCCCTGC AAGCCTCAGC GACCGAATAT 650
ATCGGTTATG CGTGGGCGAT GGTGTTGTC ATTGTCGGCG CAACTATCGG 700
TATCAAGCTG TTTAAGAAAT TCACCTCGAA AGCAAGCTGA TAAACCGATA 750
CAATTAAAGG CTCCTTTTGG AGCCTTTTTT TTTGGAGATT TTCAACGTGA 800

10

20

30

40

AAAAATTATT ATTCGCAATT CCTTTAGTTG TTCCTTTCTA TTCTCACTCC 850
GCTGAAACTG TTGAAAGTTG TTTAGCAAAA CCCCATACAG AAAATTCATT 900
TACTAACGTC TGGAAAGACG ACAAACCTTT AGATCGTTAC GCTAACTATG 950
AGGGTTGTCT GTGGAATGCT ACAGGCGTTG TAGTTTGTAC TGGTGACGAA 1000
ACTCAGTGTC TAGCTAGAGT GGCGGTGGCT CTGGTTCCGG TGATTTTGAT 1050
TATGAAAAGA TGGCAAACGC TAATAAGGGG GCTATGACCG AAAATGCCGA 1100
TGAAAACGCG CTACAGTCTG ACGCTAAAGG CAAACTTGAT TCTGTCGCTA 1150
CTGATTACGG TGCTGCTATC GATGGTTTTCA TTGGTGACGT TTCCGGCCTT 1200
GCTAATGGTA ATGGTGCTAC TGGTGATTTT GCTGGCTCTA ATTCCCAAAT 1250
GGCTCAAGTC GGTGACGGTG ATAATTCACC TTTAATGAAT AATTTCGTC 1300
AATATTTACC TTCCCTCCCT CAATCGGTTG AATGTCGCCC TTTTGTCTTT 1350
AGCGCTGGTA AACCATATGA ATTTTCTATT GATTGTGACA AAATAAACTT 1400
ATTCCGTGGT GTCTTTGCGT TTCTTTTATA TGTTGCCACC TTTATGTATG 1450
TATTTTCTAC GTTTGCTAAC ATACTGCGTA ATAAGGAGTC TTAATCATGC 1500
CAGTTCTTTT GGCTAGCGCC GCCCTATACC TTGTCTGCCT CCCC GCGTTG 1550
CGTCGCGGTG CATGGAGCCG GGCCACCTCG ACCTGAATGG AAGCCGGCGG 1600
CACCTCGCTA ACGGATTCAC CACTCCAAGA ATTGGAGCCA ATCAATTCTT 1650
GCGGAGAACT GTGAATGCGC AAACCAACCC TTGGCAGAAC ATATCCATCG 1700
CGTCCGCCAT CTCCAGCAGC CGCACGCGGC GCATCTCGGG CAGCGTTGGG 1750
TCCTGGCCAC GGGTGCGCAT GATCGTGCTC CTGTCGTTGA GGACCCGGCT 1800
AGGCTGGCGG GGTGCGCTTA CTGGTTAGCA GAATGAATCA CCGATACGCG 1850
AGCGAACGTG AAGCGACTGC TGCTGCAAAA CGTCTGCGAC CTGAGCAACA 1900
ACATGAATGG TCTTCGGTTT CCGTGTTTCG TAAAGTCTGG AAACGCGGAA 1950
GTCAGCGCCC TGCACCATTA TGTTCGGAT CTGCATCGCA GGATGCTGCT 2000
GGCTACCCTG TGGAACACCT ACATCTGTAT TAACGAAGCG CTGGCATTGA 2050
CCCTGAGTGA TTTTCTCTG GTCCCGCCGC ATCCATACCG CCAGTTGTTT 2100
ACCCTCACAA CGTTCCAGTA ACCGGGCATG TTCATCATCA GTAACCCGTA 2150
TCGTGAGCAT CCTCTCTCGT TTCATCGGTA TCATTACCCC CATGAACAGA 2200
AATCCCCCT TACACGGAGG CATCAAGTGA CCAAACAGGA AAAAACCGCC 2250

10

20

30

40

CTTAACATGG CCCGCTTTAT CAGAAGCCAG ACATTAACGC TTCTGGAGAA 2300
ACTCAACGAG CTGGACGCGG ATGAACAGGC AGACATCTGT GAATCGCTTC 2350
ACGACCACGC TGATGAGCTT TACCGCAGGA TCCGGAAATT GTAAACGTTA 2400
ATATTTTGTG AAAATTCGCG TTAAATTTTT GTTAAATCAG CTCATTTTTT 2450
AACCAATAGG CCGAAATCGG CAAAATCCCT TATAAATCAA AAGAATAGAC 2500
CGAGATAGGG TTGAGTGTTG TTCCAGTTTG GAACAAGAGT CCACTATTAA 2550
AGAACGTGGA CTCCAACGTC AAAGGGCGAA AAACCGTCTA TCAGGGCTAT 2600
GGCCCACTAC GTGAACCATC ACCCTAATCA AGTTTTTTGG GGTGAGGGTG 2650
CCGTAAAGCA CTAAATCGGA ACCCTAAAGG GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT 2700
GACGGGGAAA GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA AGGAAGGGAA GAAAGCGAAA 2750
GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTGTA GCGGTCACGC TCGCGGTAAC 2800
CACCACACCC GCCGCGCTTA ATGCGCCGCT ACAGGGCGCG TCCGGATCCT 2850
GCCTCGCGCG TTTCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC 2900
CCGGAGACGG TCACAGCTTG TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAAGC 2950
CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG GTGTCGGGGC GCAGCCATGA 3000
CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGAGTGATATA CTGGCTTAAC TATGCGGCAT 3050
CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGCGGTGTGA AATACCGCAC 3100
AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTTCCG CTTCTCGCT 3150
CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC 3200
ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA 3250
AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGGC 3300
CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA 3350
AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA 3400
TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC 3450
CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG 3500
CGCTTTCTCA TAGCTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT 3550
CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTTCAGC CCGACCGCTG 3600
CGCCTTATCC GGTAACATATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT 3650
TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT 3700

10

20

30

40

GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC 3750
TAGAAGGACA GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG 3800
GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC 3850
GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC 3900
TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAACG 3950
AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC 4000
ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT 4050
ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC 4100
CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTTCA CCATAGTTGC CTGACTCCCC 4150
GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCCCCAGTGC 4200
TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA 4250
TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA 4300
TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG 4350
TTCGCCAGTT AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT GCAGGCATCG 4400
TGGTGTACCG CTCGTCGTTT GGTATGGCTT CATTAGCTC CGGTTCCCAA 4450
CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG 4500
CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTTAT 4550
CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC 4600
GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA 4650
ATAGTGTATG CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ACACGGGATA 4700
ATACCGCGCC AGATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT 4750
TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA GATCCAGTTC 4800
GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT TTTACTTTCA 4850
CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG 4900
GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA 4950
ATATTATTGA AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT 5000
TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTTCCGCG CACATTTCCC 5050
CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC 5100
CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAA 5140

(2) 配列番号: 21 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 77 アミノ酸

10

20

30

40

50

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：2 1：

Ser Gly Thr Ala Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp
 1 5 10 15
Leu Ala Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Glu Gly
 20 25 30
Asp Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asn Ser Leu Gln Ala Ser Ala
 35 40 45
Thr Glu Tyr Ile Gly Tyr Ala Trp Ala Met Val Val Val Ile Val
 50 55 60
Gly Ala Thr Ile Gly Ile Lys Leu Phe Lys Lys Phe Thr Ser Lys
 65 70 75
Ala Ser
 77

10

(2) 配列番号：2 2 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：5 0 塩基対

20

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：2 2：

GTTCGTATGT GGTGATCGAG GCTTCCTGTT CAACAAACCG ACTGGGGCTG 50

(2) 配列番号：2 3 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：5 8 塩基対

(B) 配列の型：核酸

(D) トポロジー：直鎖状

30

(xi) 配列の詳細：配列番号：2 3：

GATCCAGCCC CAGTCGGTTT GTTGAACAGG AAGCCTCGAT CACCACATAC 50

GAACTGCA 58

(2) 配列番号：2 4 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：2 0 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：2 4：

40

Ser Gly Thr Ala Cys Xaa Xaa Gly Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Ser Pro
 20

(2) 配列番号：2 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 8 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：2 5：

50

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Gly Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa
 18

(2) 配列番号：26の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：26：

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

(2) 配列番号：27の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：27：

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15

20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

(2) 配列番号：28の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：28：

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

(2) 配列番号：29の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：29：

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

40

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

(2) 配列番号：30の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

50

(xi) 配列の詳細：配列番号：30：

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

(2) 配列番号：31の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

10

(xi) 配列の詳細：配列番号：31：

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

(2) 配列番号：32の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

20

(xi) 配列の詳細：配列番号：32：

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

(2) 配列番号：33の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

30

(xi) 配列の詳細：配列番号：33：

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

(2) 配列番号：34の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

40

(xi) 配列の詳細：配列番号：34：

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys
 1 5 10 15

Lys Pro Gln Gly Gly
 20

(2) 配列番号：35の情報：

(i) 配列の特徴：

50

(A) 配列の長さ：10 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：35：

Cys Xaa Xaa Gly Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10

(2) 配列番号：36の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：70塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：36：

GCCTATGCAT CTGGTACCGC CTGCNNSNNS GGTCCTNNSN NSNNSNNSTG 50

TTCTCTGGCA GGTTCACCAG 70

(2) 配列番号：37の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：91塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：37：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS TGCNNSNNSG GTCCTNNSNN 50

SNNSNNSTGT NNSNNSNNSN NSGGTGGAGG ATCCGGAGGA G 91

(2) 配列番号：38の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：97塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：38：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS NNSNNSNNST GCNNSNNSNN 50

SNNSTGCNNS NNSNNSNNSN NSNNSNNSGG TGGAGGATCC GGAGGAG 97

(2) 配列番号：39の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：97塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：39：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS NNSNNSNNST GCNNSNNSNN 50

SNNSNNSTGC NNSNNSNNSN NSNNSNNSGG TGGAGGATCC GGAGGAG 97

(2) 配列番号：40の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：97塩基対

(B) 配列の型：核酸

10

20

30

40

50

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：40：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS NNSNNSTGCN NSNNSNNSNN 50

SNNSNNSSTGC NNSNNSNNSN NSNNSNNSGG TGGAGGATCC GGAGGAG 97

(2) 配列番号：41の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：97塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：41：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS NNSNNSTGCN NSNNSNNSNN 50

SNNSNNSNNS TGCNNSNNSN NSNNSNNSGG TGGAGGATCC GGAGGAG 97

(2) 配列番号：42の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：97塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：42：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS NNSTGCNNSN NSNNSNNSNN 50

SNNSNNSNNS TGCNNSNNSN NSNNSNNSGG TGGAGGATCC GGAGGAG 97

(2) 配列番号：43の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：97塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：43：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS NNSTGCNNSN NSNNSNNSNN 50

SNNSNNSNNS NNSTGCNNSN NSNNSNNSGG TGGAGGATCC GGAGGAG 97

(2) 配列番号：44の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：97塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：44：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS TGCNNSNNSN NSNNSNNSNN 50

SNNSNNSNNS NNSTGCNNSN NSNNSNNSGG TGGAGGATCC GGAGGAG 97

(2) 配列番号：45の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

10

20

30

40

50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：45：

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

(2) 配列番号：46の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：97塩基対

(B) 配列の型：核酸

10

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：46：

GCTACAAATG CCTATGCANN SNNSNNSNNS NNSNNSNNSN NSNNSNNSNN 50

SNNSNNSNNS NNSNNSNNSN NSNNSNNSGG TGGAGGATCC GGAGGAG 97

(2) 配列番号：47の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

20

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：47：

Ser Gly Thr Ala Cys Tyr Gly Gly Pro Glu Trp Trp Cys Cys Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Ser Pro
 20

(2) 配列番号：48の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

30

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：48：

Asp Leu Ala Ile Cys Ala Glu Gly Pro Glu Ile Trp Val Cys Glu
 1 5 10 15

Glu Thr Ser
 18

(2) 配列番号：49の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

40

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：49：

Asp Phe Trp Ile Cys Leu Ser Gly Pro Gly Trp Glu Glu Cys Leu
 1 5 10 15

Glu Trp Trp
 18

(2) 配列番号：50の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：5 0：

Gly Ser Ala Gly Gln Gly Met Thr Glu Glu Trp Ala Trp Ile Trp
 1 5 10 15

Glu Trp Trp Lys Glu

20

(2) 配列番号：5 1 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：2 0 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

10

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：5 1：

Glu Leu Asp Gly Trp Val Cys Ile Lys Val Gly Glu Gln Asn Leu
 1 5 10 15

Cys Tyr Leu Ala Glu

20

(2) 配列番号：5 2 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：2 0 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

20

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：5 2：

Ala Ile Gly Gly Trp Cys Phe Ile Glu Leu Asp Ser Leu Trp Cys
 1 5 10 15

Glu Glu Gln Ile Gly

20

(2) 配列番号：5 3 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：2 0 アミノ酸

30

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：5 3：

Ser Glu Asp Val Glu Cys Trp Gln Val Trp Glu Asn Leu Val Cys
 1 5 10 15

Ser Val Glu His Arg

20

(2) 配列番号：5 4 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 9 アミノ酸

40

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：5 4：

Ser Glu Glu Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 15

Met Trp Gly Arg

19

(2) 配列番号：5 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：2 0 アミノ酸

50

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：55：

Arg Val Gly Ala Tyr Ile Ser Cys Ser Glu Thr Glu Cys Trp Val
 1 5 10 15

Glu Asp Leu Leu Asp
 20

(2) 配列番号：56の情報：

(i) 配列の特徴：

10

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：56：

Trp Phe Lys Thr Val Cys Tyr Glu Trp Glu Asp Glu Val Gln Cys
 1 5 10 15

Tyr Thr Leu Glu Glu
 20

(2) 配列番号：57の情報：

(i) 配列の特徴：

20

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：57：

Arg Leu Glu Glu Gln Cys Val Glu Val Asn Tyr Glu Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Ser Phe Thr Ala Asn
 20

(2) 配列番号：58の情報：

(i) 配列の特徴：

30

(A) 配列の長さ：19アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：58：

Ser Glu Glu Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Pro
 19

(2) 配列番号：59の情報：

40

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：59：

Glu Thr Val Ala Asn Cys Asp Cys Tyr Met Asp Leu Cys Leu Cys
 1 5 10 15

Tyr Gly Ser Asp Arg
 20

(2) 配列番号：60の情報：

50

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：60：

Tyr His Pro Ile Ser Cys Met Asp His Tyr Tyr Leu Ile Ile Cys
 1 5 10 15

Asp Glu Thr Val Asn

20

(2) 配列番号：61の情報：

10

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：61：

Ala Glu Trp Ala Glu Cys Trp Ile Ala Gly Asp Gln Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Val Gly Lys Asp Asn

20

(2) 配列番号：62の情報：

20

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：62：

Glu Pro Trp Leu Cys Gln Tyr Tyr Glu Ala Ala Met Leu Tyr Leu
 1 5 10 15

Cys Trp Glu Glu Gly

20

(2) 配列番号：63の情報：

30

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：63：

Ala Glu Glu Gly Met Val Trp Gly Trp Thr Gly Gly Trp Tyr Asn
 1 5 10 15

Leu Asp Glu Leu Cys

20

(2) 配列番号：64の情報：

40

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：64：

Ser Gly Gly Ala Ile Tyr Trp Pro Val Glu Gln Phe Ile Ala Phe
 1 5 10 15

Met Ala Val Gly Lys

20

(2) 配列番号：65の情報：

50

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：65：

Ser Gly Gly Ala Ile Tyr Met Pro Val Glu Gln Phe Ile Ala Phe
 1 5 10 15

Met Ala Val Gly Lys
 20

10

(2) 配列番号：66の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：66：

Glu Val Leu Leu Cys Ser Asp Gly Pro Gln Leu Tyr Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Leu Tyr Ala
 18

20

(2) 配列番号：67の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：67：

Ser Gly Val Glu Cys Val Trp Gly Pro Gln Trp Gly Phe Cys Val
 1 5 10 15

Glu Glu Tyr
 18

30

(2) 配列番号：68の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：68：

Asp Lys Glu Val Cys Tyr Leu Gly Pro Glu Thr Trp Leu Cys Phe
 1 5 10 15

Trp Trp Pro
 18

40

(2) 配列番号：69の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：69：

Gly Asp Val Glu Cys Ile Glu Gly Pro Trp Gly Glu Leu Cys Val
 1 5 10 15

Trp Ala Asp
 18

50

(2) 配列番号：70の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：70：

Phe Gly Gly Trp Ser Cys Gln Pro Thr Trp Val Asp Val Tyr Val
 1 5 10 15

Cys Asn Phe Glu Glu

10

(2) 配列番号：71の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：71：

Ala Met Trp Val Cys Val Ser Asp Trp Glu Thr Val Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Ile Gln Tyr Met Tyr

20

20

(2) 配列番号：72の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：72：

Thr Asn Trp Phe Phe Val Cys Glu Ser Gly His Gln Asp Ile Cys
 1 5 10 15

Trp Leu Ala Glu Glu

20

30

(2) 配列番号：73の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：73：

Ser Glu Val Gly Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Lys Tyr Phe

18

40

(2) 配列番号：74の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：19アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：74：

Lys Asp Pro Val Cys Gly Glu Gly Pro Leu Met Arg Ile Cys Glu
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Gly
 19

(2) 配列番号：75の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：21アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：75：

Glu Val Asp Gly Arg Trp Trp Ile Val Glu Thr Phe Leu Ala Lys
 1 5 10 15

Trp Asp His Met Ala Gly
 20 21

(2) 配列番号：76の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：76：

Trp Val Met Glu Cys Gly Ala Gly Pro Trp Pro Glu Gly Cys Thr
 1 5 10 15

Phe Met Leu
 18

(2) 配列番号：77の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：19アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：77：

Arg Lys Thr Ser Gln Gly Arg Gly Gln Glu Met Cys Trp Glu Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Cys Ser
 19

(2) 配列番号：78の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：78：

Ser Trp Glu Arg Gly Glu Leu Thr Tyr Met Lys Leu Cys Glu Tyr
 1 5 10 15

Met Arg Leu Gln Gln
 20

(2) 配列番号：79の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：79：

Glu His Gly Arg Ala Asn Cys Leu Ile Thr Pro Glu Ala Gly Lys
 1 5 10 15
Leu Ala Arg Val Thr
 20

(2) 配列番号：80の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

10

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：80：

Val Glu Asp Glu Cys Trp Met Gly Pro Asp Trp Ala Val Cys Trp
 1 5 10 15

Thr Trp Gly
 18

(2) 配列番号：81の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：11アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

20

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：81：

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu
 1 5 10 11

(2) 配列番号：82の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：12アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：82：

30

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys
 1 5 10 12

(2) 配列番号：83の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：83：

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys Ala Ala
 1 5 10 14

40

(2) 配列番号：84の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：84：

Cys Arg Lys Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Leu Tyr Phe
 1 5 10 14

(2) 配列番号：85の情報：

(i) 配列の特徴：

50

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：85：

Cys Arg Lys Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys Tyr Phe
1 5 10 14

(2) 配列番号：86 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

10

(xi) 配列の詳細：配列番号：86：

Cys Lys Glu Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys Tyr Phe
1 5 10 14

(2) 配列番号：87 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：87：

Cys Lys Glu Gly Pro Leu Leu Trp Leu Cys Glu Lys Tyr Phe
1 5 10 14

20

(2) 配列番号：88 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：88：

Ser Glu Val Gly Cys Arg Glu Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu
1 5 10 15

30

Lys Tyr Phe

18

(2) 配列番号：89 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：89：

Cys Ala Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys Tyr Phe
1 5 10 14

40

(2) 配列番号：90 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：90：

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Arg Tyr Phe
1 5 10 14

(2) 配列番号：91 の情報：

(i) 配列の特徴：

50

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：91：

Cys Lys Ala Gly Pro Leu Leu Trp Leu Cys Glu Arg Phe Phe
 1 5 10 14

(2) 配列番号：92 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

10

(xi) 配列の詳細：配列番号：92：

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys Phe Phe
 1 5 10 14

(2) 配列番号：93 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：93：

20

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Arg Phe Phe
 1 5 10 14

(2) 配列番号：94 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：94：

Cys Arg Glu Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Arg Phe Phe
 1 5 10 14

30

(2) 配列番号：95 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：95：

Cys Lys Glu Gly Pro Leu Leu Trp Leu Cys Glu Arg Phe Phe
 1 5 10 14

(2) 配列番号：96 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：14 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

40

(xi) 配列の詳細：配列番号：96：

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys Tyr Phe
 1 5 10 14

(2) 配列番号：97 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：97：

Ser Glu Met Val Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Ile Tyr Phe

18

(2) 配列番号：98の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：18アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

10

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：98：

Glu Ala Arg Val Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Lys Tyr Phe

18

(2) 配列番号：99の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：21アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

20

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：99：

Ser Glu Val Gly Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Lys Tyr Phe Ser Thr Tyr

20 21

(2) 配列番号：100の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：17アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

30

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：100：

Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys Tyr Phe Ser
 1 5 10 15

Thr Tyr

17

(2) 配列番号：101の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：20アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

40

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：101：

Ala Ser Glu Glu Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys
 1 5 10 15

Asn Met Trp Gly Arg

20

(2) 配列番号：102の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：16アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 0 2：

Ala Ser Glu Glu Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys
 1 5 10 15

Asn

16

(2) 配列番号：1 0 3 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 5 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

10

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 0 3：

Gly Pro Glu Thr Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 15

(2) 配列番号：1 0 4 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 4 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 0 4：

20

Glu Glu Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 14

(2) 配列番号：1 0 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 3 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 0 5：

Glu Val Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 13

30

(2) 配列番号：1 0 6 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 1 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 0 6：

Cys Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10 11

(2) 配列番号：1 0 7 の情報：

(i) 配列の特徴：

40

(A) 配列の長さ：1 0 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：1 0 7：

Trp Pro Val Ala Glu Trp Tyr Leu Cys Asn
 1 5 10

(2) 配列番号：1 0 8 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：1 2 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

50

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：108：

Cys Gln Leu Val Arg Pro Asp Leu Leu Cys Gln
 1 5 10 12

(2) 配列番号：109の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：11アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列の詳細：配列番号：109：

Ile Pro Val Ser Pro Asp Trp Phe Val Cys Gln
 1 5 10 11

10

【図1】

TCAAGTAAAG AGCTATCTA GATTATGAT GATTACTCTG CCAAACTTC CTCTGGCGT TCGCGTCGCA GCGGCGTAA TGTCTCTCA GGCATGCGC
 AGTGCATTTT TCCATGAT CTATATCTA CTATGAGAC GCGTTTGAAG GAGACGCCA AGCGAGCGT CCGCGCATT ACAGAGAGT CCGTACCGG
 MetMe ttlePheLeu ArgLysLeuP roLeuAlaVala lAlaValaAla AlaglyValM etSerAlaG l nAlaMetAla
 ~ lamB シグナル配列の出発
 GGTCCCGAAA CTCTGTGCGG TGTGAGCTG TGTGAGCTG TGTGAGCTG TGTGAGCTG TGTGAGCTG TGTGAGCTG TGTGAGCTG TGTGAGCTG
 CCAAGGCTTT GAGACAGCC AGACTTTCG CACTGTGAG AGCTGAGAG TACACCTCA CTCTCGAAG ACAGCTTGT TGGCTGAGCC GACTTGGCG
 GlyProGluT hrLeuCysG l ValagluLeu ValaspAlaL euGlnPheVa lCysglyAsp ArgglyPheL euPheAsnly sproThrgly AlaglySerSer
 ~ IGF-Iの出発 (Y24L, Y31A)
 CCTCTCTCG TGTCCCGCAG ACTGTGATG TTAGCAATG CTCTGTGCT TGTCTGAGC TGTCTGAGC TGTCTGAGC TGTCTGAGC TGTCTGAGC
 SerArgar gAlaProGln ThrGlyIleV alAspGluCy scysPheArg serCysaspL eukargArgle uGluMerTyr CysAlaProL eulyaspAla
 TAAATCTCT TAGAAGCTC TTAGCTGCG TGTCCGCGCG GGGTTTTTT TGTCTGAGC TGTCTGAGC TGTCTGAGC TGTCTGAGC TGTCTGAGC
 ATTTAGACGA ATCTTCGAGG ATTTCGAGC AACGCGCGC CGCAAAAT AACATGAG TACACTGCT CGATGAGT CTAATCGAA TTACGCCATC
 LysSerAla An*

FIG. 1

LamB シグナル配列と IGF-I (Y24L, Y31A) のヌクレオチドとアミノ酸配列

【図2】

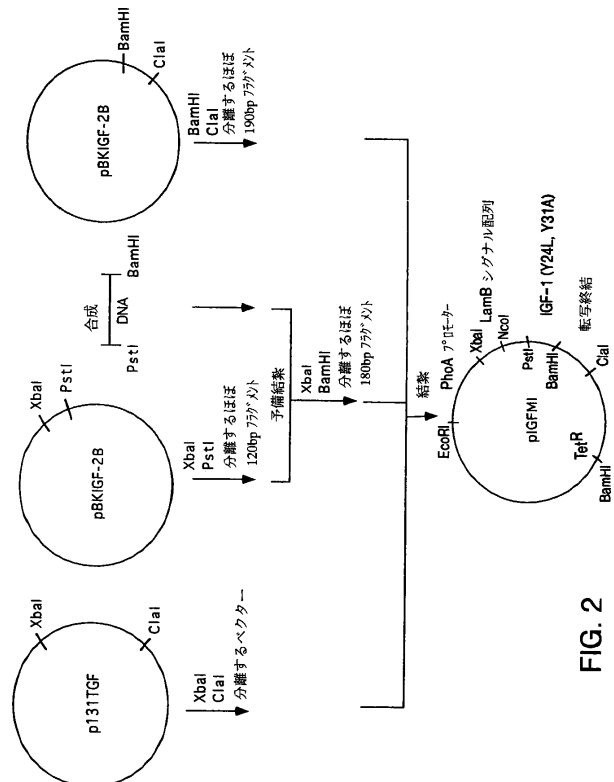


FIG. 2

【図 4】

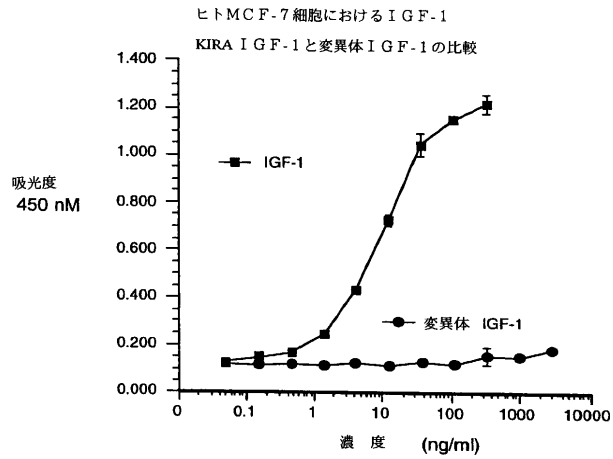


FIG. 4

【図 5】

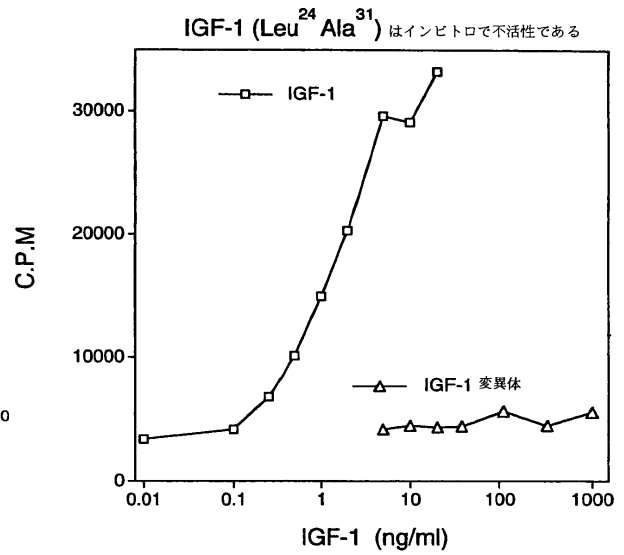


FIG. 5

【図 6】

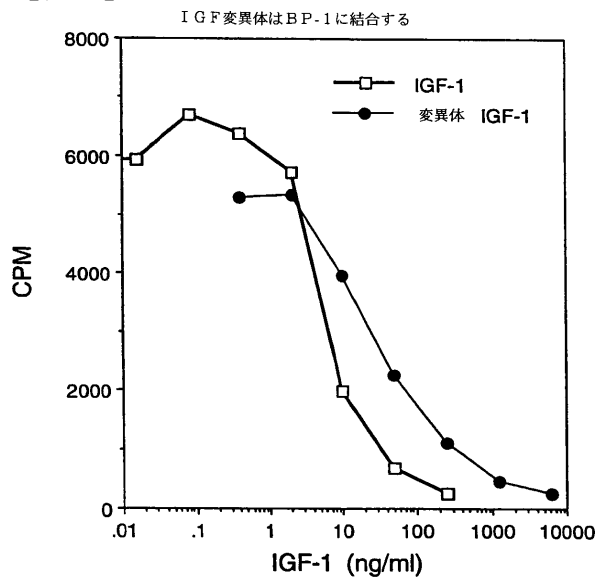


FIG. 6

【図 7】

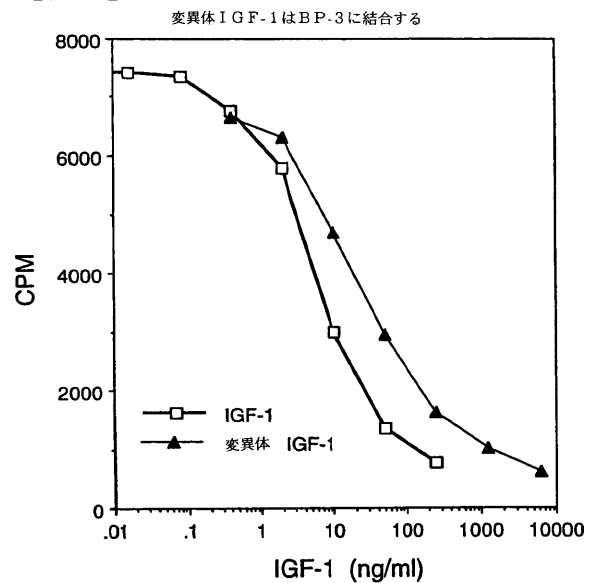
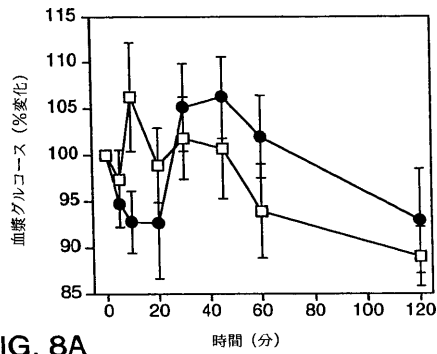
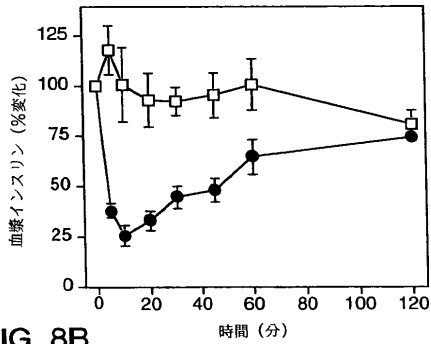


FIG. 7

【図 8 A】

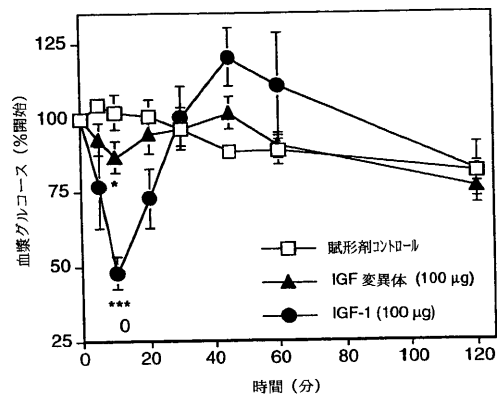


【図 8 B】

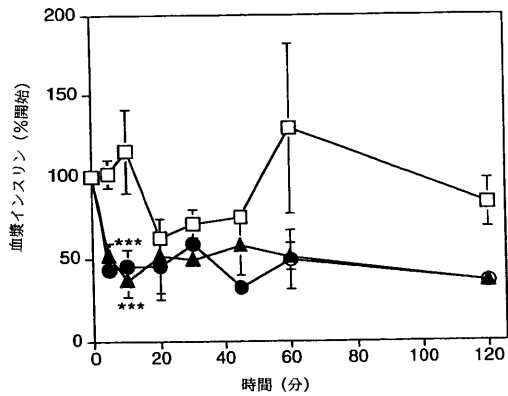


—□— コントロール —●— IGF-変異体

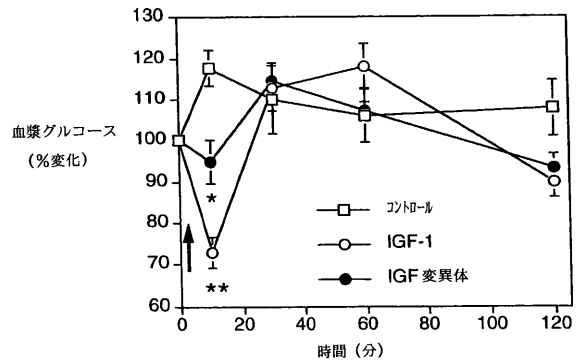
【図 9 A】



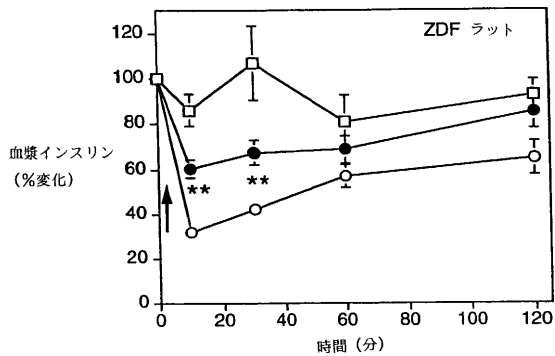
【図 9 B】



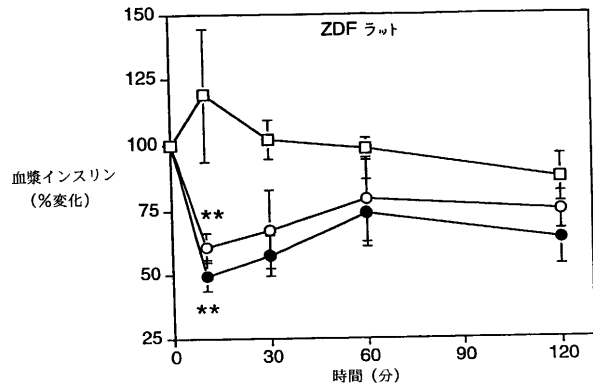
【図 10 B】



【図 10 A】



【図 11 A】



【図 1 1 B】

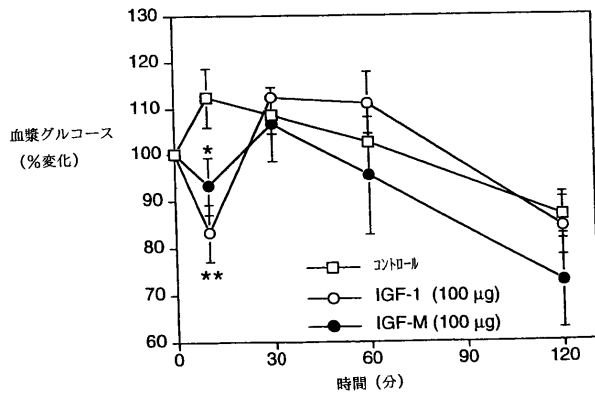


FIG. 11B

【図 1 2】

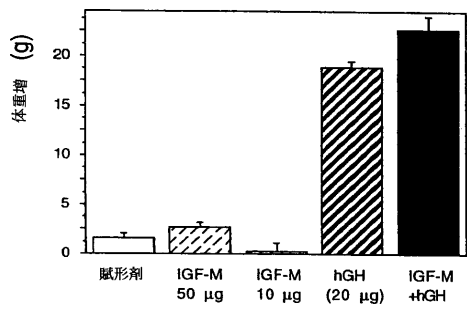


FIG. 12

【図 1 3 A】

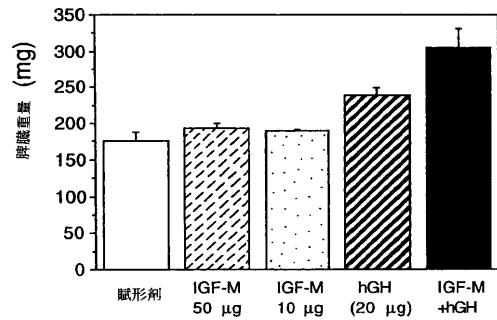


FIG. 13A

【図 1 3 B】

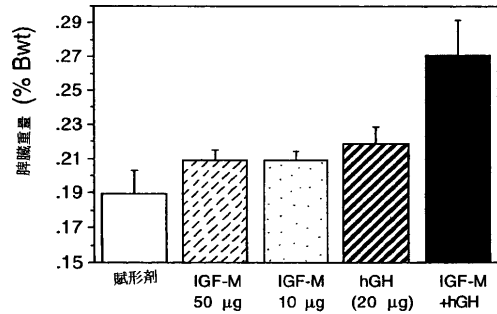


FIG. 13B

【図 1 4 A】

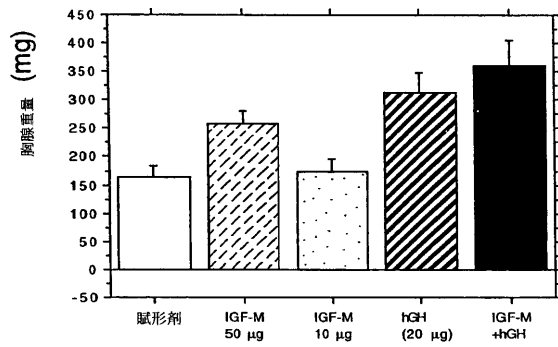


FIG. 14A

【図 1 5 A】

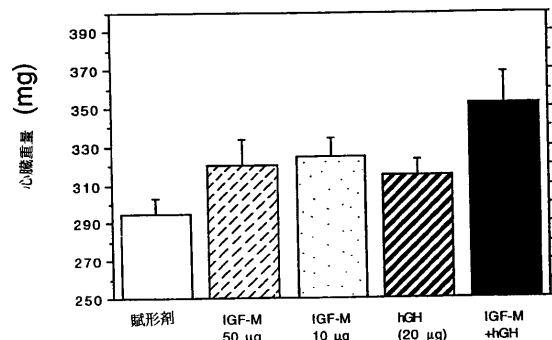


FIG. 15A

【図 1 4 B】

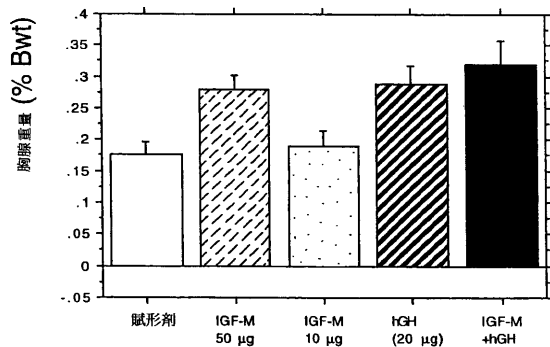


FIG. 14B

【図 1 5 B】

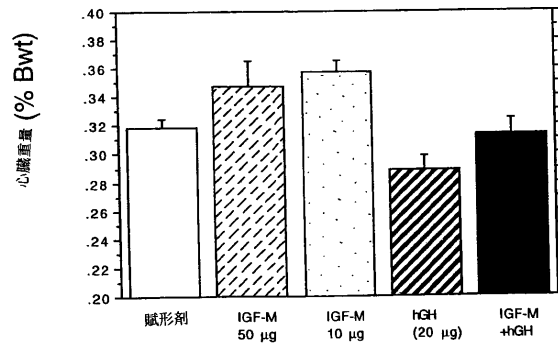


FIG. 15B

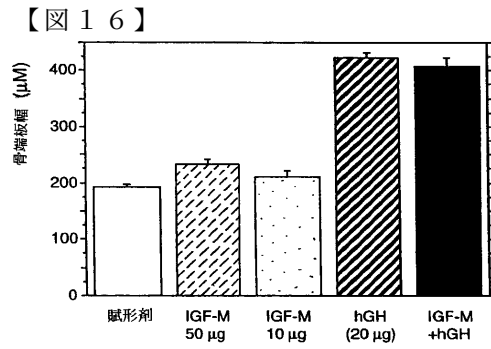


FIG. 16

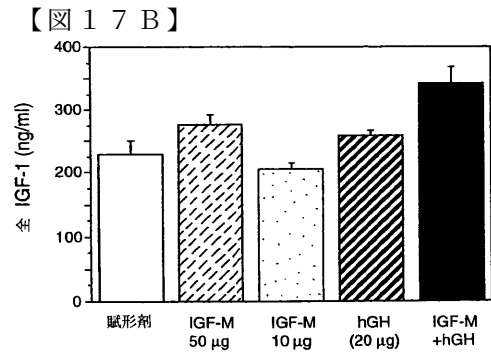


FIG. 17B

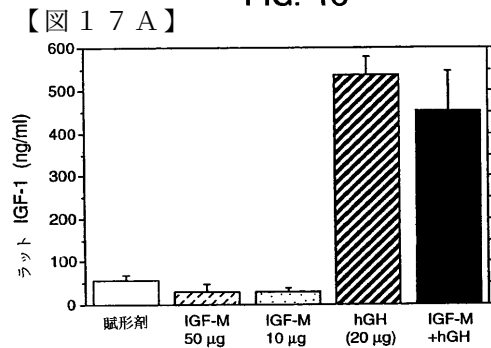


FIG. 17A

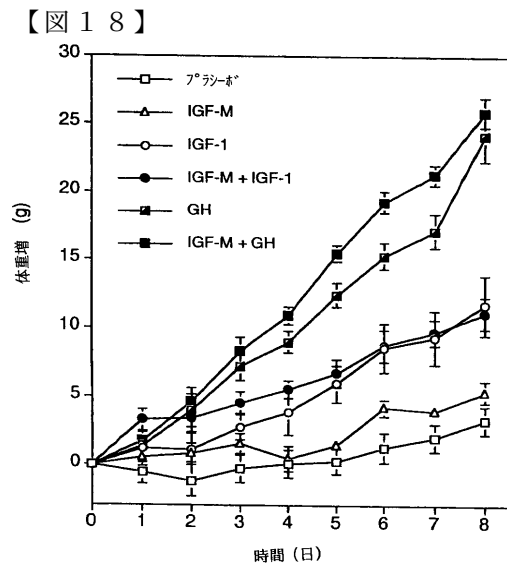


FIG. 18

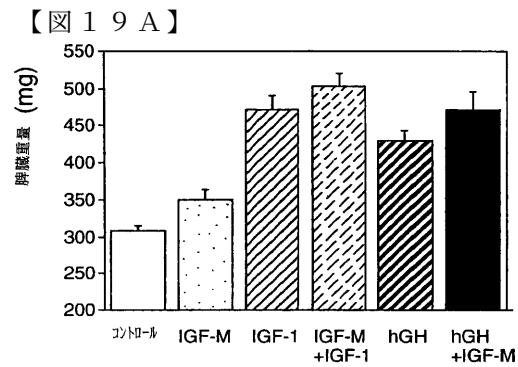


FIG. 19A

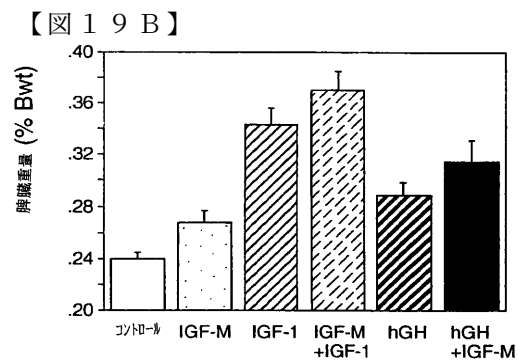


FIG. 19B

【図 20 A】

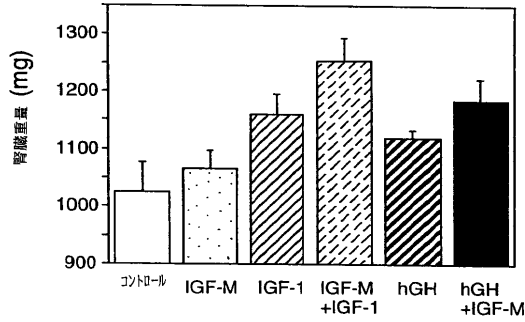


FIG. 20A

【図 21 A】

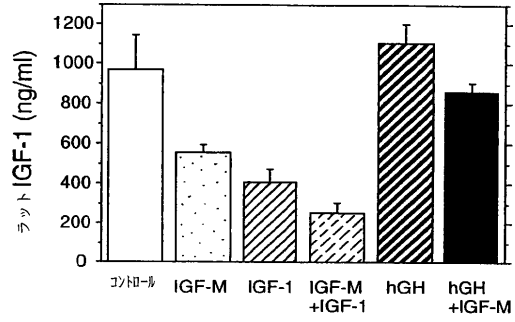


FIG. 21A

【図 20 B】

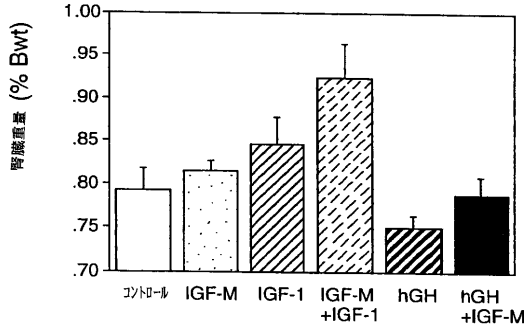


FIG. 20B

【図 21 B】

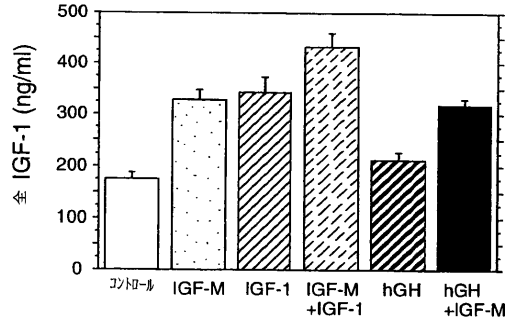


FIG. 21B

【図 22 A】

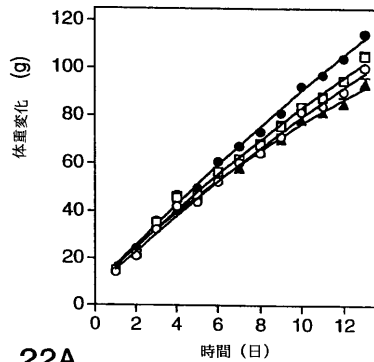


FIG. 22A

【図 23 A】

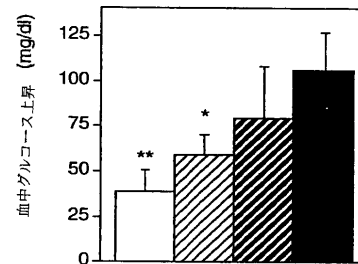


FIG. 23A

【図 22 B】

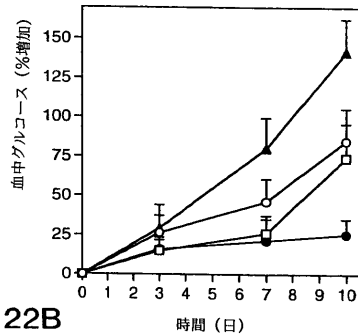


FIG. 22B

【図 23 B】

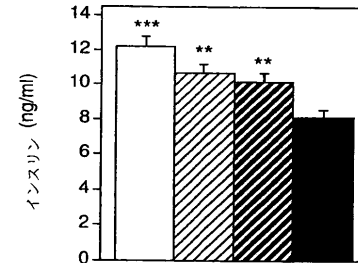


FIG. 23B

● IGF-1 (150 µg, tid) □ IGF 変異体 (150 µg, tid)
 ○ IGF 変異体 (50 µg, tid) ▲ 賦形剤コントロール

□ IGF-1 (150 µg, tid) ▨ IGF-1 変異体 (150 µg, tid)
 ▩ IGF-1 変異体 (50 µg, tid) ■ コントロール

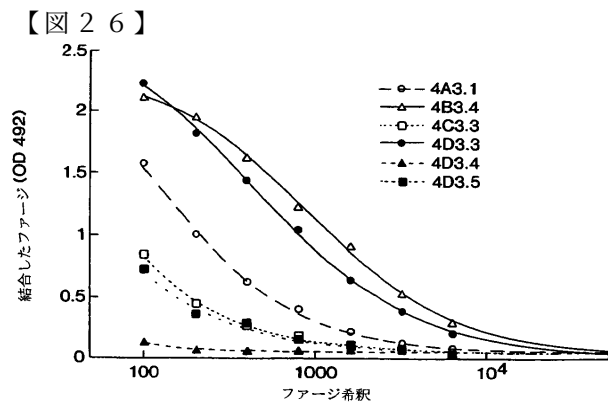


FIG. 26

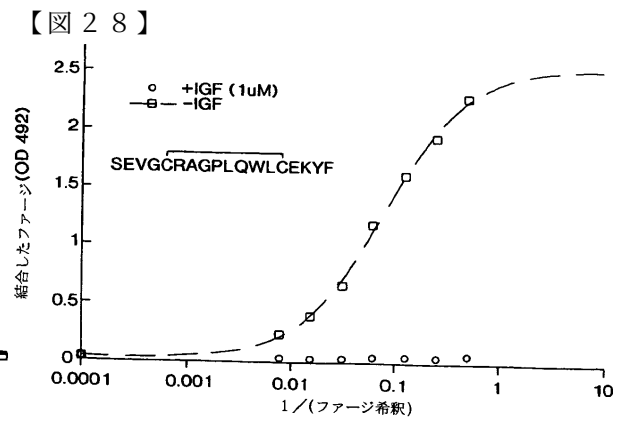


FIG. 28

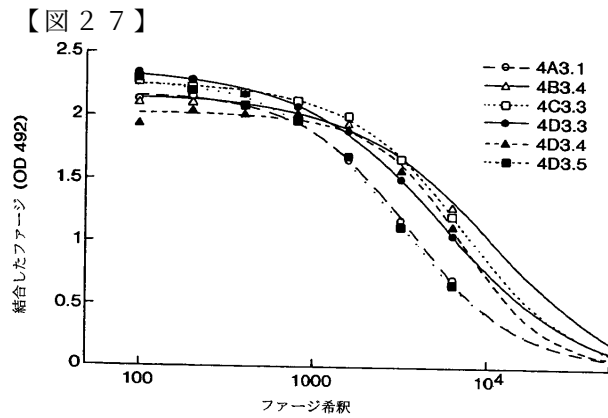


FIG. 27

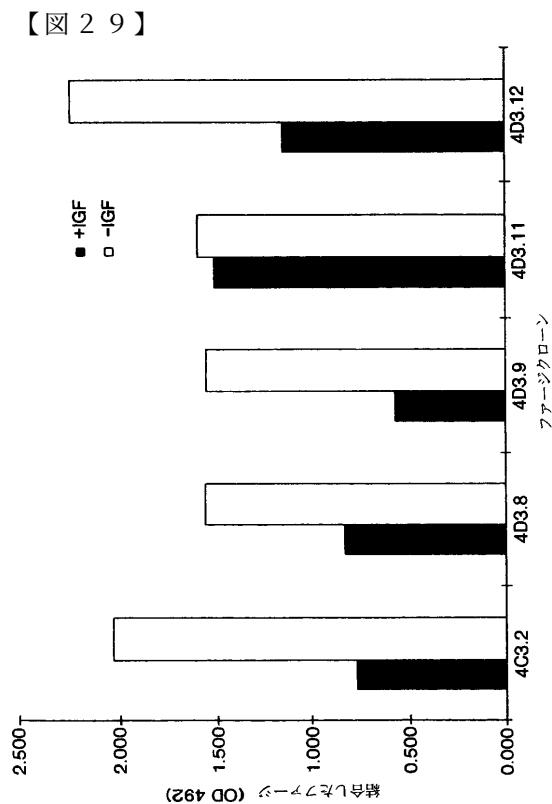


FIG. 29

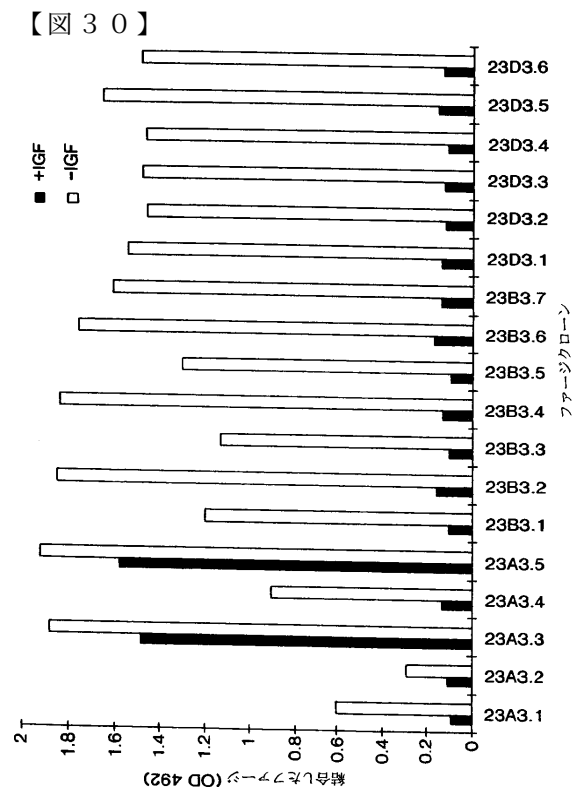
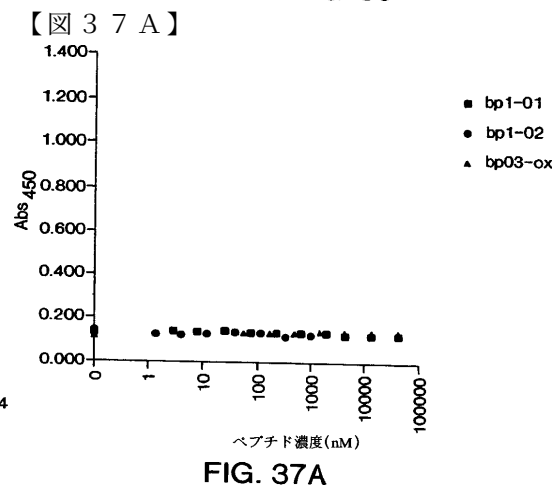
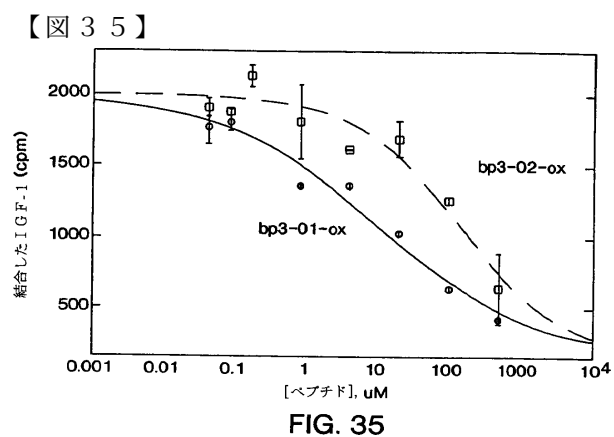
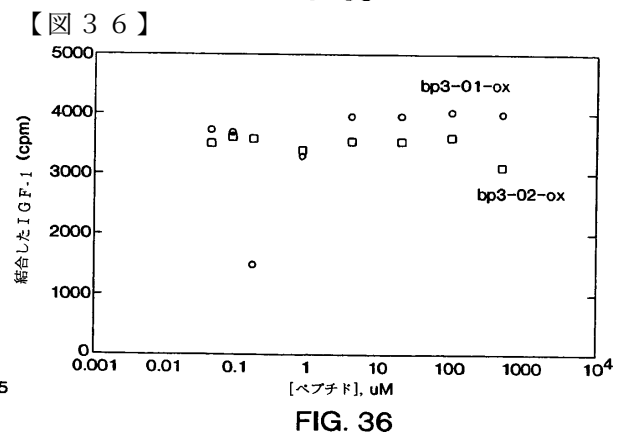
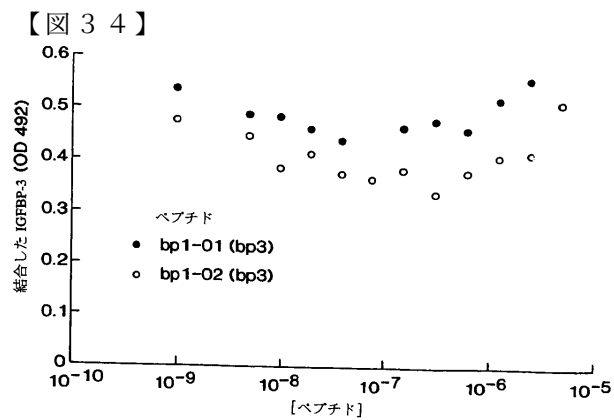
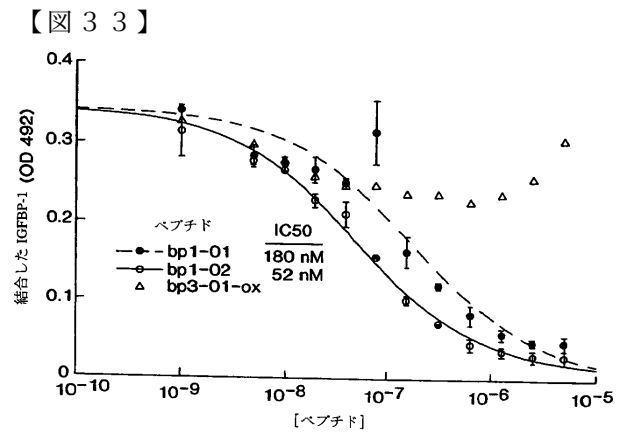
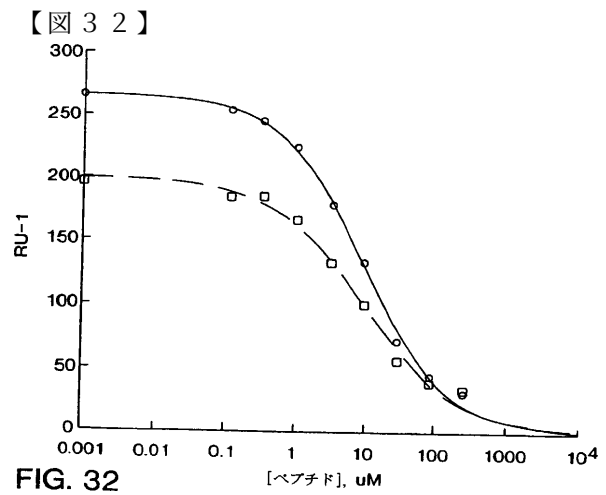
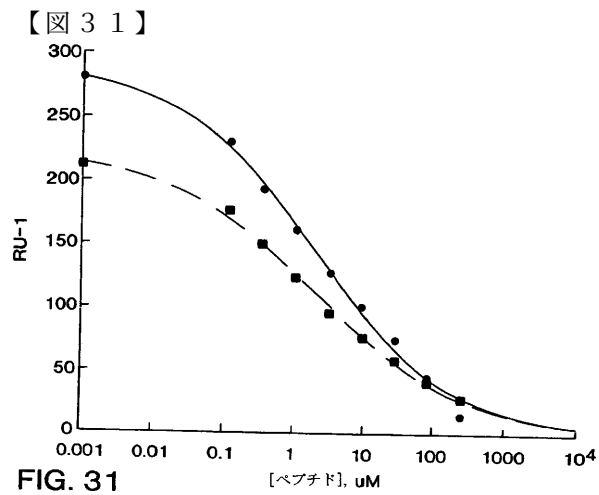


FIG. 30



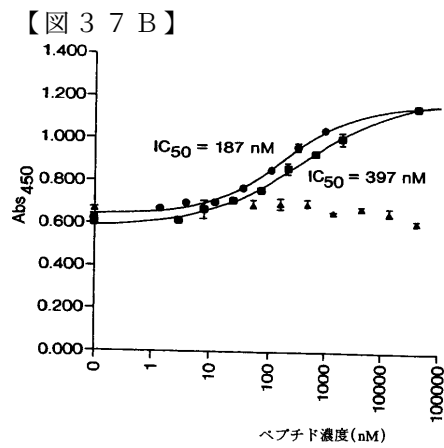


FIG. 37B

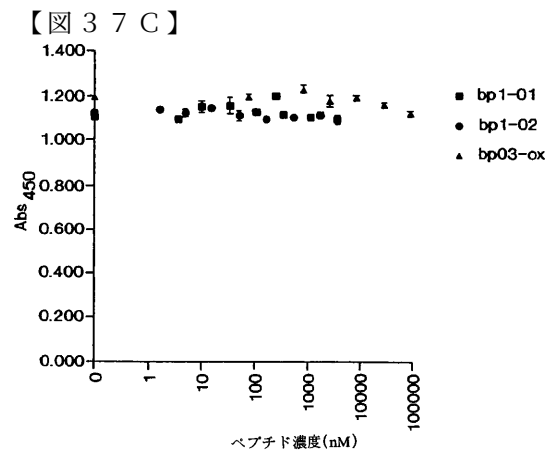


FIG. 37C

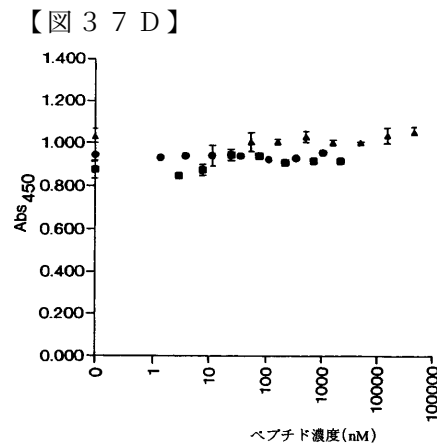


FIG. 37D

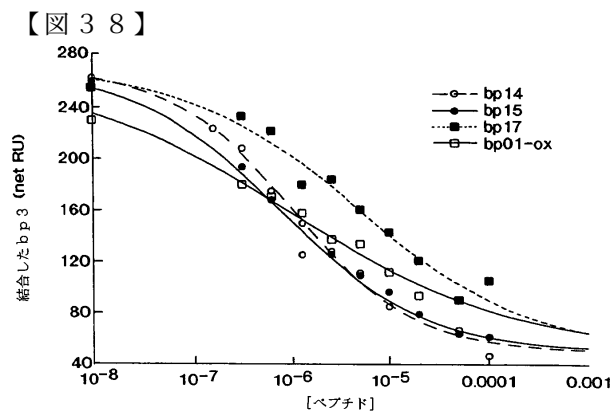


FIG. 38

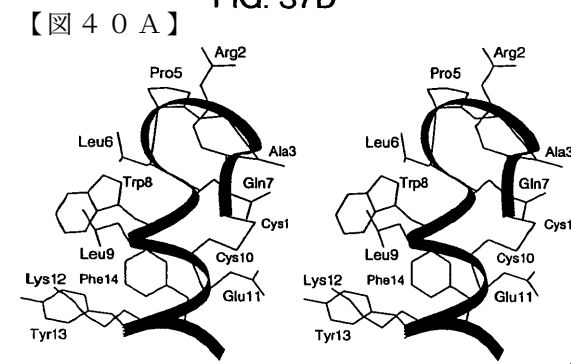


FIG. 40A

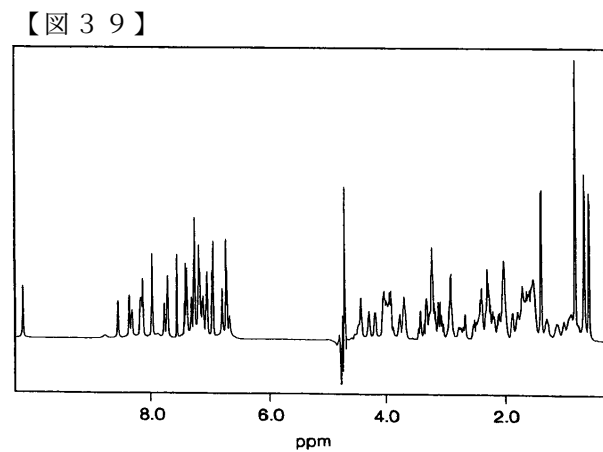


FIG. 39

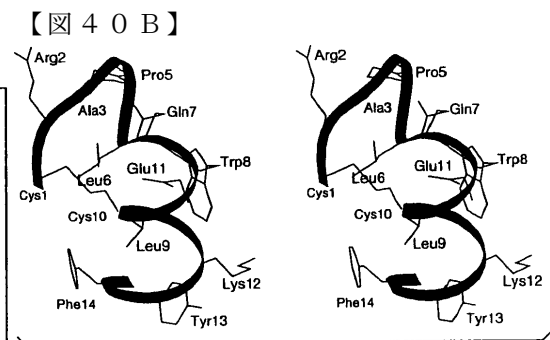
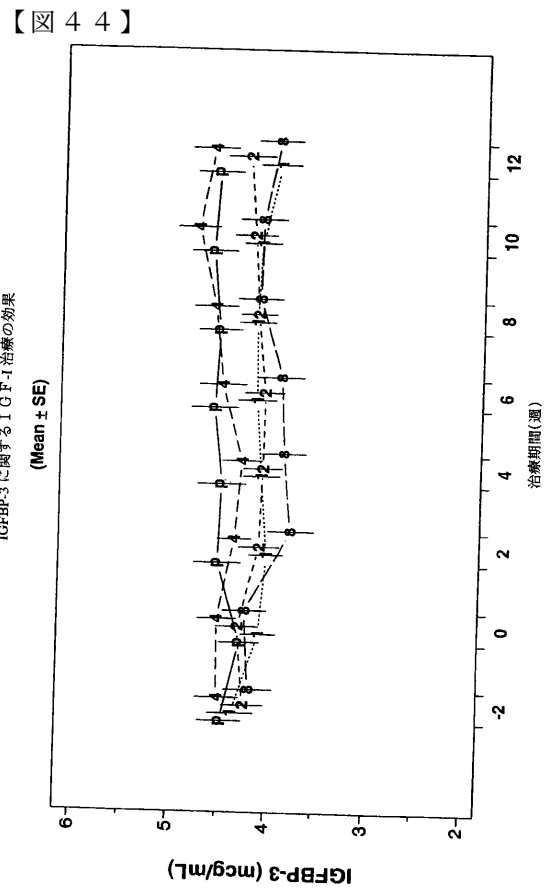
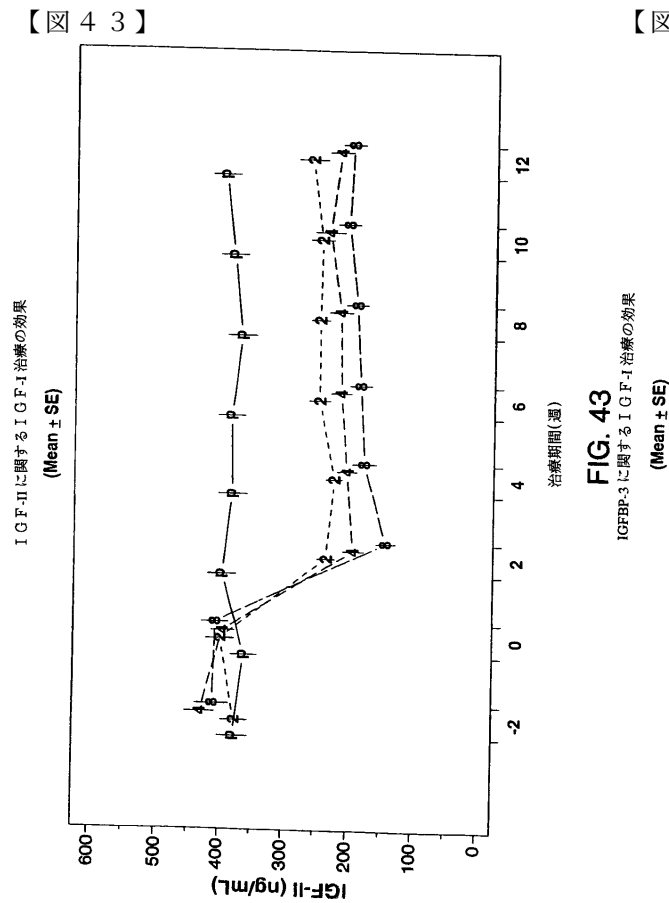
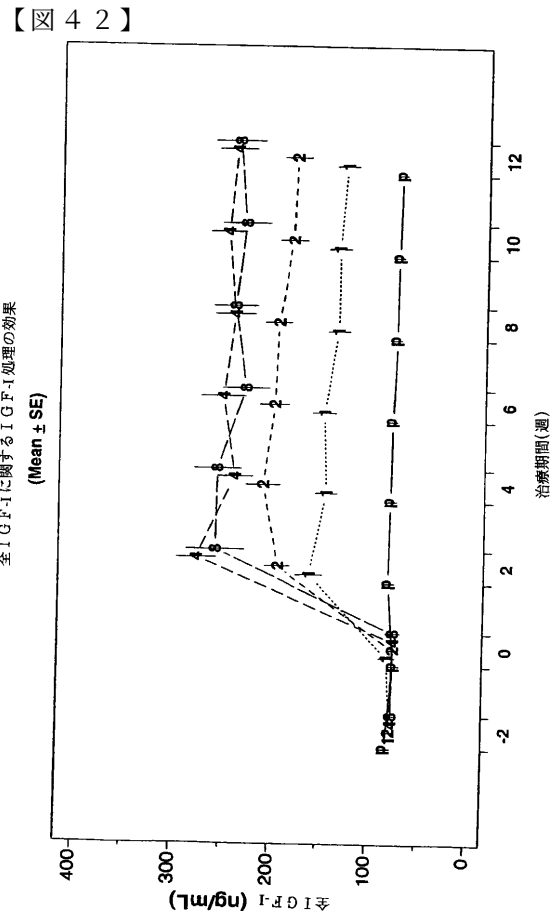
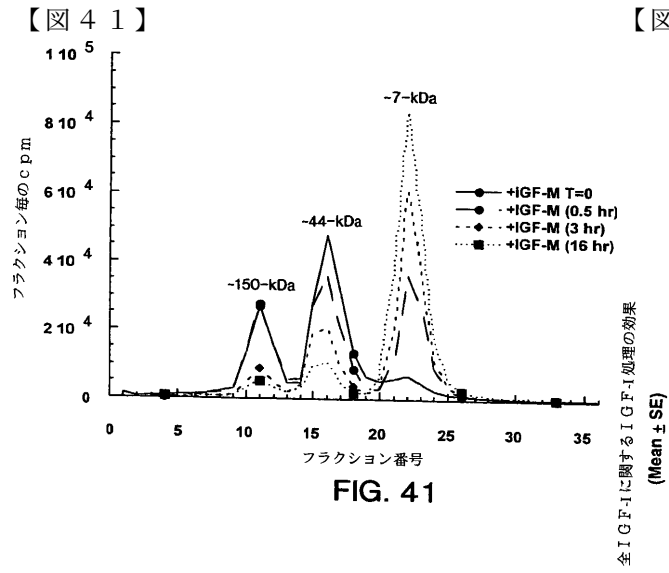


FIG. 40B



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 3/10 (2006.01) A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 9/00 (2006.01) A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 13/12 (2006.01) A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 25/00 (2006.01) A 6 1 P 25/00

(72)発明者 クラーク, ロス ジー
ニュージーランド国 オークランド 9 デヴォンポート グレン ロード 25

(72)発明者 ローマン, ヘンリー ビー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94018 エル グラナダ サン ジュアン アヴェニュー
400

(72)発明者 ロビンソン, イアン シー エー エフ
イギリス国 ハートフォードシャー AL4 0EU セント アルバンス ウッドランド ドラ
イヴ 52エー

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第94/004569 (WO, A1)
国際公開第96/040749 (WO, A1)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1990) vol.87, no.16, p.6378-6382

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C07K 7/08
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)
UniProt/GeneSeq