

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-501820
(P2006-501820A)

(43) 公表日 平成18年1月19日(2006.1.19)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 61 K 31/455 (2006.01)	A 61 K 31/455	4 B O 6 4
A 61 K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 B O 6 5
A 61 K 47/34 (2006.01)	A 61 K 47/34	4 C O 7 6
A 61 K 47/48 (2006.01)	A 61 K 47/48	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-534751 (P2004-534751)	(71) 出願人	503211596 バイエル・ファーマシューチカルズ・コーポレーション アメリカ合衆国コネチカット州O 6 5 1 6 ウエストヘブン・モーガンレーン4 0 0
(86) (22) 出願日	平成15年9月4日 (2003.9.4)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月1日 (2005.3.1)	(72) 発明者	パン, クラーク アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 2カストロバリー・プリンストンプレイス 2 2 3 6 2
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/028093	(72) 発明者	ウエラン, ジエイムズ・ピー アメリカ合衆国コネチカット州O 6 4 4 3 マディソン・サマーヒルロード2 1 0
(87) 國際公開番号	W02004/022004		
(87) 國際公開日	平成16年3月18日 (2004.3.18)		
(31) 優先権主張番号	60/408,696		
(32) 優先日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/439,369		
(32) 優先日	平成15年1月9日 (2003.1.9)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】修飾G L P - 1 受容体アゴニストおよびそれらの薬理学的使用法

(57) 【要約】

本発明は3 0 k Dよりも大きな分子量を有するポリエチングリコールポリマーに連結されたG L P - 1 受容体アゴニストを含んでなる修飾G L P - 1 受容体アゴニストに関し、そして関連する製剤および調剤および治療目的のそれらの投与法が提供される。より詳細には、これら修飾G L P - 1 受容体アゴニスト、組成物および方法は、胃腸管の運動を減少させずにグルコース依存的なインスリン分泌を誘導することにより、糖尿病のような代謝性障害および耐糖能障害および空腹時血糖障害のような前糖尿病状態に罹患した個体に治療的選択を提供するために有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1、2、4～10、13、14 および 16～31 からなる群から選択されるポリペプチドおよびそれらの機能的に均等なフラグメント、誘導体およびバリエント。

【請求項 2】

上記ポリペプチドがポリエチレングリコールポリマーに連結されている、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

上記ポリエチレングリコールが少なくとも 30 kD の分子量を有する、請求項 2 に記載のポリペプチド。 10

【請求項 4】

上記ポリエチレングリコールが分岐している請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド、またはその縮重バリエント。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 8】

a) 請求項 7 に記載の宿主細胞を、上記ポリペプチドの発現に適する条件下で培養し；そして

b) 宿主細胞カルチャからポリペプチドを回収する、ことを含んでなるポリペプチドの生産法。 20

【請求項 9】

ポリエチレングリコールポリマーを GLP-1 受容体アゴニストに連結する工程を含んでなる、該 GLP-1 受容体アゴニストの胃腸管副作用を減少または抑制する方法。

【請求項 10】

上記ポリエチレングリコールが少なくとも 30 kD の分子量を有する、請求項 9 に記載の方法。 30

【請求項 11】

上記ポリエチレングリコールが分岐している請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

上記 GLP-1 受容体アゴニストが配列番号 1、2、4～10、13、14 および 16～31 およびそれらの機能的に均等なフラグメント、誘導体およびバリエントからなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

治療に有効量の請求項 1～4 のいずれか 1 つのポリペプチドまたはそれらの機能的に均等なフラグメント、誘導体およびバリエントを、製薬学的に許容される得る担体と組み合わせて含んでなる製薬学的組成物。 40

【請求項 14】

治療に有効量の請求項 1～4 のいずれか 1 つのポリペプチドまたはそれらの機能的に均等なフラグメント、誘導体およびバリエントを、製薬学的に許容される得る担体および 1 以上の薬剤と組み合わせて含んでなる製薬学的組成物。

【請求項 15】

上記薬剤が、PPAR アゴニスト、スルホニルウレア薬、非スルホニルウレア分泌促進薬、- グルコシダーゼインヒビター、インスリン感作物質、インスリン分泌促進薬、肝グルコース排出低下化合物、インスリン、抗肥満薬、HMG CoA レダクターゼインヒビター、ニコチン酸、胆汁酸抑制薬、フィブリシン酸誘導体および抗高血圧薬からなる群から選択される、請求項 14 に記載の製薬学的組成物。 50

【請求項 16】

有効量の請求項1～4のいずれか1つのポリペプチドまたはそれらの機能的に均等なフラグメント、誘導体およびバリエントを、不活性担体と組み合わせて含んでなる組成物。

【請求項 17】

治療に有効量の請求項1ないし4のいずれか1つのポリペプチドを、処置が必要な個体に投与する工程を含んでなる、個体の糖尿病を処置する方法。

【請求項 18】

上記糖尿病が1型糖尿病、2型糖尿病、若年者の成人発生型糖尿病、成人の潜在的自己免疫糖尿病、妊娠糖尿病、症候群Xからなる群から選択される、請求項17に記載の方法。
10

【請求項 19】

上記ポリペプチドが1以上の薬剤と組み合わせて投与される、請求項17に記載の方法。
。

【請求項 20】

上記薬剤が、PPARアゴニスト、スルホニルウレア薬、非スルホニルウレア分泌促進薬、-グルコシダーゼインヒビター、インスリン感作物質、インスリン分泌促進薬、肝グルコース排出低下化合物、インスリンおよび抗肥満薬からなる群から選択される、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

上記ポリペプチドが、HMG-CoAレダクターゼインヒビター、ニコチン酸、胆汁酸抑制剤、フィブリン酸誘導体および抗高血圧薬からなる群から選択される、1以上の薬剤と組み合わせて投与される請求項17に記載の方法。
20

【請求項 22】

ポリペプチドおよび1以上の薬剤が単一の製薬学的製剤として投与される、請求項19ないし21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】

糖尿病の処置および/または予防のための請求項1ないし4のいずれか1項に記載のポリペプチド。
。

【請求項 24】

請求項1ないし4のいずれか1項に記載の少なくとも1つのポリペプチドを、少なくとも1つの製薬学的に許容され得る、製薬学的に安全な担体または賦形剤と組み合わせて含む薬剤。
30

【請求項 25】

糖尿病の処置および/または予防用の薬剤を製造するための、請求項1に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 26】

糖尿病の処置および/または予防用の請求項24に記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、2002年9月6日に出願された特許文献1および2003年1月9日に出願された特許文献2の利益を主張し、これらの内容は引用により全部、本明細書に編入する。
40

発明の分野

本発明は、30kDよりも大きな分子量を有するポリエチレングリコールポリマーに連結されたGLP-1受容体アゴニストを含んでなる修飾GLP-1受容体アゴニスト、ならびに治療を目的とするこれらの関連製剤、調剤および投与法に関する。より詳細にはこれら修飾GLP-1受容体アゴニスト、組成物および方法は、治療を制限する胃腸管運動の減少または阻害の副作用無しにグルコース依存的なインスリン分泌を誘導することにより、糖尿病、耐糖能障害のような代謝性障害、または代謝性症候群、前糖尿病状態に罹患
50

している個体に治療の選択肢を提供するために有用である。

【背景技術】

【0002】

関連技術の背景

糖尿病は、とりわけ糖尿病患者における上昇したグルコースレベルにより現れる不十分なインスリンの分泌を特徴とする。際立った欠損により糖尿病は2つの主な群に分類される：1型糖尿病、すなわちインスリン依存性糖尿病（I D D M）（これは患者の膵臓に-細胞が生産するインスリンが無い時に生じる）、および2型糖尿病、すなわち非インスリン依存性糖尿病（N I D D M）（これは不十分な-細胞のインスリン分泌およびインスリン作用に変化がある患者に生じる）。 10

【0003】

1型糖尿病の患者は現在インスリンで処置されているが、2型糖尿病患者は-細胞機能を刺激する薬剤を用いて、もしくはインスリンに向かう患者の組織感度を強化する薬剤を用いて処置することができる。時間経過に伴い、2型糖尿病患者のほぼ半分がこれらの薬剤に対する応答を失い、次いでインスリン治療を施さなければならない。2型糖尿病を処置するために現在使用されている薬剤を以下に記載する。

【0004】

アルファ-グルコシダーゼインヒビター（例えばP R E C O S E（商標）、V O G L I B O S E（商標）およびM I G L I T O L（商標））は、腸からグルコースの吸収を遅らせることにより食後のグルコースの移動（e x c u r s i o n）を減らす。これらの薬剤は安全であり、そして軽度から中度に罹患した糖尿病患者に対する処置を提供する。しかし文献では胃腸管での副作用が報告され、そしてそれらの効力を限定する。 20

【0005】

インスリン感作物質は、インスリンに対する身体の応答を強化する薬剤である。A v a n d i a（商標）（ロシグリタゾン：r o s i g l i t a z o n e）およびA c t o s（商標）のようなチオゾリジンジオン（t h i o z o l i d i n e d i o n e）は、ペルオキソソーム増殖因子活性化受容体（P e r o x i s o m e p r o l i f e r a t o r -a c t i v a t e d r e c e p t o r : P P A R）ガンマを活性化し、そして十分に説明されてこなかった一群の遺伝子の活性を調節（m o d u l a t e）する。R e z u l i n（商標）（トログリタゾン：t r o g l i t a z o n e）（このクラスでの最初の薬剤）は、上昇した肝酵素レベルおよび薬剤が誘導する肝臓毒性により撤収された。これらの肝臓効果は、A v a n d i a（商標）およびA c t o s（商標）を使用している患者には重要な問題にならないようである。たとえそうであっても、肝臓酵素試験が治療の初年度では2カ月毎に、そしてその後、周期的に薦められる。A v a n d i a（商標）およびA c t o s（商標）処置は流体滞留、水腫および体重増加が伴う。A v a n d i a（商標）はうつ血性心不全の懸念からインスリンと一緒に使用することは示されていない。 30

【0006】

スルホニルウレア（S F U）および非スルホニルウレア（例えばN a t e g l i n i d eおよびP e p a g l i n i d e）のようなインスリン分泌促進薬は、A T P 依存性K+チャネルを介して作用し、グルコース依存性のインスリン分泌を引き起こす。これらの薬剤は、軽度から中程度の空腹時血糖を有する2型糖尿病の標準的治療である。S F Uは、低血糖、体重増加および高い1次的および2次失敗率を誘導する可能性を含む限界を有する。初期に処置した患者の10～20%が、有意な治療効果を示すことに失敗した（1次的失敗）。2次的失敗は、S F Uで6カ月後の治療効果がさらに20～30%損失することにより示される。インスリン処置は治療の5～7年後に、S F U応答者の50%で必要とされる（非特許文献1）。N a t e g l i n i d eおよびP e p a g l i n i d eは、1日3回の摂取を要する短期作用薬である。それらは食後グルコースの制御にのみ使用され、空腹時グルコースの制御には使用されない。 40

【0007】

G L U C O P H A G E（商標）（メトホルミン（m e t f o r m i n）H C l）は、肝

臓のグルコース排出を減少させ、そして末梢のグルコース取り込みおよび利用を増加させることにより血中グルコースを低下させるビグアニドである。この薬剤は軽度および中程度に罹患した個体の血中グルコースを下げるのに効果的であり、体重増加の副作用または低血糖を誘導する可能性はない。しかし G L U C O P H A G E (商標) には胃腸管障害および乳酸アシドーシスを含む多数の副作用がある。G L U C O P H A G E (商標) は 70 歳以上の糖尿病患者および腎臓または肝臓機能が十分ではない個体には禁忌である。最後に G L U C O P H A G E (商標) は S F U と同じ 1 次的および 2 字的失敗率を有する。

【 0 0 0 8 】

インスリン処置は食事、運動および経口薬物療法が十分に血中グルコースを制御できなかった後に始められる。注入可能であり、低血糖を生じることができ、そして体重増加を引き起こすこの処置は欠点を有する。インスリンで低血糖を誘導する可能性は、高血糖を制御できる程度を限定する。

10

【 0 0 0 9 】

現行の処置に付随する問題から、2型糖尿病を処置するための新規な療法が必要である。特に、正常(グルコース依存性)インスリン分泌を維持するための新規処置が必要である。そのような新規薬剤は以下の特徴を有すべきである：インスリン分泌を促進するためのグルコース依存性(すなわち、血中グルコースの上昇が存在する時のみ、インスリン分泌を生じる)；低い1次的および2次的失敗率；および島細胞機能の保存。本明細書に開示する新規治療を開発する方法は、サイクリックアデノシンモノホスフェート(cAMP)シグナリングメカニズムおよびそのインスリン分泌に及ぼす効果に基づく。

20

【 0 0 1 0 】

グルコースはインスリン分泌プロセスの主要なレギュレーターである。この糖の上昇は、ATP の上昇後に K⁺チャネルの閉鎖を促進する。K⁺チャネルの閉鎖は細胞の脱分極、続いて Ca⁺⁺チャネルの開放を生じ、これが次にインスリン粒子のエキソサイトーシスを導く。あるとしてもわずかなインスリン分泌に及ぼす効果は、低グルコース濃度の不存在下で起こる(非特許文献 2)。分泌促進薬様の GLP-1 は、このグルコース依存性のメカニズムを介してインスリン分泌を調節するために cAMP 系を利用する(非特許文献 3；非特許文献 4；非特許文献 5)。cAMP の上昇を介するインスリン分泌促進薬も、インスリンの放出に加えてインスリンの合成を強化することができる(非特許文献 6；非特許文献 7)。

30

【 0 0 1 1 】

GLP-1(グルカゴン様ペプチド 1)は食後に腸の L-細胞から放出され、そしてインクレチンホルモンとして機能する(すなわちこれは膵臓 - 細胞からグルコースが誘導するインスリンの放出を増強する)。これは組織型に依存してグルカゴン遺伝子により異なって発現される 37 アミノ酸のペプチドである。- 細胞中の cAMP レベルを上げる有益な効果を支持する臨床的データが、GLP-1 で集められた。うまく制御されない 2 型糖尿病への GLP-1 の注入は、それらの空腹時血中グルコースレベルを正常化し(非特許文献 8)、そしてより長期の注入はこれら正常な個体に対して - 細胞機能を改善した(非特許文献 9)。最近の報告では、GLP-1 が、耐糖能障害の個体においてグルコースに応答する - 細胞の能力を改善することが示された(非特許文献 10)。しかしこれらの効果はすべてペプチドの短い半減期により短期である。

40

【 0 0 1 2 】

GLP-1 ペプチドの短い半減期に加え、GLP-1 は腸の運動を低下させ(例えば非特許文献 11 および非特許文献 12 を参照にされたい)、これは次いで恶心および吐き気のような有意な胃腸管副作用をもたらす。そのような胃腸管副作用は NN-2211(非特許文献 13) および Exendin-4(非特許文献 14) のような GLP-1 アゴニストでも示された。胃腸管の副作用を引き起こす腸の運動減少は、齶歯類のモデルでも研究された(非特許文献 15)。胃腸管の運動および分泌に及ぼす GLP-1 の阻害効果は、少なくとも部分的には中枢神経系により媒介されることが示された(非特許文献 16)。全身的に注入された GLP-1 は、単なる拡散により末梢から脳への接近を獲得する(

50

非特許文献 17)。

【 0 0 1 3 】

したがって、G L P - 1 のグルコース依存的インスリン分泌促進活性を有するが、G L P - 1 に基づく処置を制限する副作用が無い、改善されたペプチドの必要性が存在する。

【特許文献 1】米国特許仮出願第 6 0 / 4 0 8 , 6 9 6 号明細書

【特許文献 2】米国特許仮出願第 6 0 / 4 3 9 , 3 6 9 号明細書

【非特許文献 1】S c h e e n , et al . , D i a b e t e s R e s . C l i n . P r a c t . 6 : 5 3 3 - 5 4 3 , 1 9 8 9

【非特許文献 2】W e i n h a u s , et al . , D i a b e t e s 4 7 : 1 4 2 6 - 1 4 3 5 , 1 9 9 8

10

【非特許文献 3】K o m a t s u , et al . , D i a b e t e s 4 6 : 1 9 2 8 - 1 9 3 8 , 1 9 9 7

【非特許文献 4】F i l i p s s o n et al . , D i a b e t e s 5 0 : 1 9 5 9 - 1 9 6 9 , 2 0 0 1

【非特許文献 5】D r u c k e r , E n d o c r i n o l o g y 1 4 2 : 5 2 1 - 5 2 7 , 2 0 0 1

【非特許文献 6】S k o g l u n d , et al . , D i a b e t e s 4 9 : 1 1 5 6 - 1 1 6 4 , 2 0 0 0

【非特許文献 7】B o r b o n l , et al . , E n d o c r i n o l o g y 1 4 0 : 5 5 3 0 - 5 5 3 7 , 1 9 9 9

20

【非特許文献 8】G u t r i a k , et al . , N e w E n g . J . M e d . 3 2 6 : 1 3 1 6 - 1 3 2 2 , 1 9 9 2

【非特許文献 9】R a c h m a n , et al . , D i a b e t e s 4 5 : 1 5 2 4 - 1 5 3 0 , 1 9 9 6

【非特許文献 10】B y r n e , et al . , D i a b e t e s 4 7 : 1 2 5 9 - 1 2 6 5 , 1 9 9 8

【非特許文献 11】K i e f f e r and H a b e n e r , E n d o c r i n e R e v i e w s 2 0 : 8 7 6 - 9 1 3 , 1 9 9 9

【非特許文献 12】D r u c k e r , G a s t r o e n t e r o l o g y 1 2 2 : 5 3 1 - 5 4 4 , 2 0 0 2

30

【非特許文献 13】A g e r s o , et al . , D i a b e t o l o g i a 4 5 : 1 9 5 - 2 0 2 , 2 0 0 2

【非特許文献 14】A m y l i n a b s t r a c t , A m e r i c a n D i a b e t e s A s s o c i a t i o n m e e t i n , 2 0 0 1

【非特許文献 15】L o t t i , et al . , L i f e S c i . 3 9 : 1 6 3 1 - 1 6 3 8 , 1 9 8 6

【非特許文献 16】I m e r y u z , et al . , A m . J . P h y s i o l 2 7 3 : G 9 2 0 - G 9 2 7 , 1 9 9 7

【非特許文献 17】K a s t i n , et al . , J . M o l . N e u r o s c i . 1 8 : 7 - 1 4 , 2 0 0 2

40

【発明の開示】

【 0 0 1 4 】

発明の要約

本発明は、3 0 k D よりも大きい分子量を有するポリエチレングリコールポリマーに連結され、そしてG L P - 1 受容体をアゴナイズする能力を保持するG L P - 1 受容体アゴニストを含んでなる修飾G L P - 1 受容体アゴニストに関する。これら修飾G L P - 1 アゴニストは、糖尿病または耐糖能障害のような代謝障害、前糖尿病の処置に効果的である。さらに本発明の修飾G L P - 1 アゴニストは胃腸管の運動を阻害せずに代謝性障害を処置することができ、これにより悪心および吐き気のような胃腸管の副作用がより少くなり、そしてより高い効果的な用量を投与できるようにする。

50

【0015】

特に本発明の1つの観点は、GLP-1受容体アゴニストとして機能するポリペプチドである。GLP-1受容体アゴニストの例には、限定するわけではないが図1に示すポリペプチドを含み、そして配列番号1～10からなる群から選択されるそれらポリペプチド、および配列番号1～10に列挙するポリペプチドと実質的に同じレベルでGLP-1受容体のアゴニストとして機能するポリペプチドのフラグメントおよびバリエントを含む（集合的に本発明のポリペプチド）。

【0016】

本発明の別の態様は、GLP-1受容体アゴニストポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および本発明のポリペプチドを組換え的に発現させるために必要な随伴ベクターおよび宿主細胞である。

【0017】

本発明の別の観点は、30kDよりも大きな分子量を有するポリエチレングリコールポリマーに連結することにより修飾された、本発明のポリペプチドと実質的に同じレベルでGLP-1受容体のアゴニストとして機能する本発明のポリペプチドの1つ、またはそのフラグメントもしくはバリエントを含んでなる修飾GLP-1受容体アゴニストである（集合的に「本発明の修飾ポリペプチド」）。修飾GLP-1受容体アゴニストの例には、限定するわけではないが図2に示す修飾ポリペプチドを含み、そして配列番号13～14および16～31からなる群から選択されるそれらポリペプチドを含む。

【0018】

また本発明は、本発明のGLP-1アゴニストポリペプチドの作成法（組み換えおよび合成の両方）、および本発明の修飾GLP-1アゴニストポリペプチドの作成法を対象とする。

【0019】

また、治療的に有効量の本発明の修飾ポリペプチドを哺乳動物に投与することを含んでなる、胃腸管の副作用を引き起こさずに該哺乳動物における糖尿病および／または他の疾患または状態を処置する方法を開示する。

発明の説明

本発明は、30kDよりも大きい分子量を有するポリエチレングリコール（PEG）ポリマーに連結されたGLP-1受容体アゴニストを含んでなる修飾GLP-1受容体アゴニストに関し、そして治療目的でのその投与法が提供される。より詳細にはこれら修飾GLP-1受容体アゴニストおよび組成物は、胃腸管の運動を減少させることなくグルコース依存性インスリン分泌を誘導することにより、糖尿病、高血糖、耐糖能障害、空腹時血糖障害、および肥満のような疾患または状態を防止および／または処置するためにインビボでGLP-1受容体アゴニストとして機能する。

【0020】

GLP-1受容体アゴニスト活性を有するペプチドは同定され、そして例えばGLP-1(7-36)、GLP-1(7-37)、Exendin-4および他のGLP-1アゴニスト（例えば国際公開第98/43658号、同第00/15224号、同第00/16797号、同第01/98331号パンフレット、米国特許第5,545,618号；同第5,118,666号明細書；および米国特許出願第60/395,738号明細書を参照にされたい；これらは引用により全部、本明細書に編入する）を含む。

【0021】

以下に重ねた配列は、幾つかの既知のGLP-1アゴニストペプチド間の1次構造関係を示す：

【0022】

【表1】

		配列番号
GLP-1 (7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂	1
GLP-1 (7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	2
Exendin-4 (G27)	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH ₂ HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂	3 4

【0023】

10

本明細書で使用する特定のアミノ酸に関する1文字略号、その対応するアミノ酸および3文字略号は、以下の通りである：A、アラニン（a l a）；C、システイン（c y s）；D、アスパラギン酸（a s p）；E、グルタミン酸（g l u）；F、フェニルアラニン（p h e）；G、グリシン（g l y）；H、ヒスチジン（h i s）；I、イソロイシン（i l e）；K、リシン（l y s）；L、ロイシン（l e u）；M、メチオニン（m e t）；N、アスパラギン（a s n）；P、プロリン（p r o）；Q、グルタミン（g l n）；R、アルギニン（a r g）；S、セリン（s e r）；T、トレオニン（t h r）；V、バリン（v a l）；W、トリプトファン（t r p）；およびY、チロシン（t y r）。

【0024】

20

これらのポリペプチドはグルコースのホメオスタシスに役割を果たし、そして特にこれらのポリペプチドは血漿グルコース濃度を下げるによりGLP-1受容体アゴニストとして機能する。膵臓のグルコースが調節するインスリン分泌の促進におけるGLP-1の役割を仮定すれば、GLP-1受容体アゴニストは、代謝性障害および他の疾患の処置に潜在的に価値がある。しかし今まで、GLP-1受容体アゴニストには重大な副作用があった：すなわち胃腸管の運動の減少、これは次いで恶心および吐き気を導き得る。

【0025】

30

当該技術分野では、低分子、ペプチドまたはタンパク質のような薬剤のペグ化（P E G y l a t i o n）が血漿半減期、物理的溶解性および安定性、およびプロテアーゼ分解に対する耐性を改善し、そして免疫原性を下げることができるということは周知である。さらに当該技術分野では、ペグ化が持続的な血漿濃度から生じる薬剤の谷対ピークレベルを下げることにより悪い副作用の程度を減らすことができる事が知られている。しかし当該技術分野ではペグ化が薬剤の特定組織への接近を限定し得ることは知られていなかった。

【0026】

30

驚くべきことには、ペプチドまたはタンパク質をP E Gのような特定サイズまたは構造のポリマーで修飾することにより、投与された修飾ペプチドまたはタンパク質の組織分布に選択的に影響を及ぼすことができる。例えばGLP-1アゴニストの直鎖22kD P E Gを用いた修飾は、非修飾GLP-1アゴニストおよびC16-脂肪酸修飾アゴニストと比べた時、治療指數（グルコース低下 対 腸運動）を上昇させない。直鎖30kD P E Gによる修飾は治療指數をわずかに改善したが、分岐した43kD P E Gによる修飾はC N Sが媒介する腸の運動を大きく減少させた。興味深いことには、脳に直接注射した時、43kD-ペグ化GLP-1アゴニストは、腸の運動を誘導することができた。すなわちP E Gのサイズおよび構造がそのような選択的プロセスの主要な決定因子である。

【0027】

40

ペグ化に起因する多くの利点にもかかわらず、1つの重要な欠点は、機能的活性の減少をもたらすペプチドとその受容体との間の相互作用における嵩高なP E Gの妨害である。モデルとしてGLP-1およびグルカゴンを利用して、「ねじれたヘリックス」モデルを開発し、そしてこのモデルに基づきペプチドのC末端内に配置された位置をペグ化に選択した。これらの位置はペプチド-受容体相互作用の反対側になると予想された。

【0028】

50

ここで本発明者は、30kDよりも大きい分子量を有するポリエチレングリコールポリマーをGLP-1受容体アゴニストに連結することにより、GLP-1受容体アゴニストを修飾することが、GLP-1受容体アゴニストに典型的に付随する胃腸管運動の低下を抑制することを見いたした。理論に拘束されることなく、ここで本発明者はペグ化の技術を使用してGLP-1受容体アゴニストのサイズを上げることが、GLP-1受容体アゴニストの血液脳関門への通過、そしてすなわち中枢神経系への接近を妨ぐと考える。結果として、GLP-1アゴニストが胃腸管の副作用を引き起こす能力（これは中枢神経系により媒介されるようである）は減少する。しかしペグ化GLP-1受容体アゴニストは臍臓へ接近し、すなわち血中グルコースを下げる2型糖尿病を処置するための望ましい活性を有する。

10

GLP-1受容体アゴニスト：

本発明のポリペプチドはGLP-1受容体アゴニストであり、そしてそれらがGLP-1受容体を活性化する能力として決定される。GLP-1受容体アゴニストは、GLP-1受容体活性化に関する1以上のインビトロまたはインビボアッセイで、GLP-1受容体を活性化する。そのようなアッセイの例には限定するわけではないが、以下の具体的実施例で記載するようなRINm5F細胞におけるcAMPの誘導に関するインビトロアッセイ、臍臓-細胞からのインスリン分泌の誘導に関するインビトロアッセイ、血漿グルコースレベルの低下に関するインビボアッセイ、および血漿インスリンレベルにおける上昇に関するインビボアッセイを含む。

20

【0029】

GLP-1受容体アゴニストの例には限定するわけではないが、配列番号1～10からなる群から選択されるポリペプチド、および配列番号1～10に列挙するポリペプチドと実質的に同じレベルのGLP-1受容体のアゴニストとして機能するそのフラグメント、誘導体、バリエントおよび類似体を含む。

20

【0030】

GLP-1受容体アゴニストである本発明のポリペプチドは、自然に存在するポリペプチド、組換えポリペプチドまたは合成ペプチドでよい。

GLP-1受容体アゴニストのフラグメント、誘導体、バリエントおよび類似体

フラグメント、誘導体、バリエントおよび類似体ポリペプチドは、例えば配列番号1～10に示すポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持する。「実質的に同じ生物学的機能または活性」はそれぞれ、各ポリペプチドの生物学的活性が同じ手順により測定される時、比較されるポリペプチドにより示される約30%～約100%（すなわち30、40、50、60、70、80、90または100%）内の生物学的活性、またはそれ以上の生物学的活性の程度を意味する。

30

【0031】

フラグメントは、本明細書に開示するインビトロおよびインビボモデルで示すように、実質的に類似する機能的活性を保持する配列番号1～10に示すポリペプチドのような完全長のポリペプチドよりも短い。

30

【0032】

誘導体には、付加的な構造および/または機能を提供するために化学的に修飾されたポリペプチドを含む。例えば脂肪酸がポリペプチドに付加されて半減期を改善させることができる。標的とする特異性またはさらなる活性を付与する融合ポリペプチドも、以下にさらに詳細に記載するように構築することができる。

40

【0033】

誘導体は翻訳後プロセッシングのような自然なプロセスにより、または化学的な修飾技術のいずれかにより修飾することができ、その両方とも当該技術分野では周知である。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含むポリペプチドの任意の場所で起こることができる。同じ型の修飾が所定のポリペプチドの幾つかの部位で同じか、または変動する程度で存在してよい。またバリエントは1以上の異なる型の修飾を含むことができる。ポリペプチドは例えばユビキチン化の結果として分岐しても

50

よく、そしてそれらは分岐を含むか、または含まない環状でもよい。

【0034】

他の化学的修飾にはアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋結合の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、フォーミュレーション (formulation)、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫黄化、アルギニレーションのようなトランスファー-RNAが媒介するアミノ酸のタンパク質への付加およびユビキチン化を含む(例えばT.E.Creighton, タンパク質、構造および分子的性質 (PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PROPERTIES)、第2版、W.H.フリーマン アンド カンパニー、ニューヨーク(1993); タンパク質の翻訳後共有的修飾 (POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS)、B.C.Johnson編集、アカデミック出版、ニューヨーク、第1~14頁(1983); Seifter, et al., Meth. Enzymol 182: 626-46, 1990; Rattan, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992を参照にされたい)。

10

20

30

40

50

【0035】

また誘導体には、それらの薬物動態学的プロフィールを改善するために、別のポリペプチド、例えばヒト血清アルブミンと融合させた成熟ポリペプチドを含む。2つのポリペプチドの融合は、当業者に知られている手段により行うことができる。例えばヒト血清アルブミンをコードするDNAおよび本発明のポリペプチドをコードするDNA配列を、当業者に知られている哺乳動物の発現ベクターにクローン化することができる。遊離のN-末端ヒスチジンがGLP-1受容体活性には必要らしいので、本発明のポリペプチドはもう1つのポリペプチドに対してN-末端に配置することが好ましい(Kawa, Endocrinology 124(49): 1768-73, 1989)。次いで生成した組換え融合タンパク質は、HKBまたはCHOのような適切な細胞株をベクターで形質転換させ、そして融合タンパク質を発現させることにより発現させることができる。

【0036】

本発明のポリペプチドのバリエントには、配列番号1~10に示すアミノ酸配列に関して1以上のアミノ酸配列に変化を有するポリペプチドを含む。バリエントは修飾されたペプチド結合により互いに連結されたアミノ酸(すなわちペプチドイソステレ(isostere))を有することができ、そして20種の自然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。

【0037】

好ましくは、バリエントは1以上の保存的アミノ酸置換(すなわち1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の置換)を、好ましくは非必須アミノ酸残基に含む。「非必須」アミノ酸残基は、その生物学的活性を改变せずにタンパク質の野生型配列から変えることができる残基であり、一方、「必須」アミノ酸は生物学的活性に必要である。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似のアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野で定められている。これらのファミリーには塩基性側鎖(例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ-分岐側鎖(例えばトレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン)

、ヒスチジン)を持つアミノ酸を含む。非保存的置換は保存されたアミノ酸残基または保存されたタンパク質ドメイン内にあるアミノ酸残基には作成されない。

【0038】

またバリアントには突然変異誘発によりアミノ酸配列が異なるポリペプチドも含む。G L P - 1受容体アゴニストとして機能するバリアントは変異体の組み合わせライブラリーをスクリーニングすることにより同定することができ、例えば1以上の位置(すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の位置)に保存的置換を持つポリペプチド変異体を、当該技術分野で周知の、そして実施例3、4、5および6に記載する方法を使用してG L P - 1受容体アゴニスト活性についてスクリーニングすることができる。

【0039】

類似体には、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を含むプロポリペプチドを含む。本発明の活性なポリペプチドは、天然のインビオプロセスにより、または酵素もしくは化学的開裂によるような当該技術分野で周知の手順により、プロポリペプチド分子中の付加的なアミノ酸から開裂させることができる。

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの製造法

本発明のポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチド配列を、ポリペプチドを発現させるために使用することができる。ポリヌクレオチドはポリペプチドのコード配列のみからなることができ、またはさらなるコード配列および/または非コード配列を含むことができる。

【0040】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、全体をまたは一部を当該技術分野で周知の化学的方法を使用して合成することができる(例えばCaruthers, et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-23, 1980; Horn, et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-32, 1980を参照にされたい)。次いでポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、発現ベクターにクローン化されてポリペプチドを発現することができ、あるいはクローニングベータ-にクローン化されてポリヌクレオチドを増殖させることができる。

【0041】

当業者には理解されているように、自然には存在しないコドンを有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を生産することが有利となり得る。例えば特定の原核もしくは真核宿主に好適なコドンを選択して、ポリペプチド発現の割合を増加させるか、または自然に存在する配列から生成される転写産物の半減期よりも長い半減期のような、所望の特性を有するRNA転写産物を生産させることができる。

【0042】

本明細書に開示するヌクレオチド配列は、当該技術分野で一般的に知られている方法を使用して操作して、限定するわけではないがポリペプチドもしくはmRNA産物のクローニング、プロセッシングおよび/または発現を修飾する改変を含む種々の理由のために、ポリペプチドをコードする配列を改変することができる。ランダムフラグメンテーションによるDNAシャフリングおよび遺伝子断片のPCRリアッセンブリーおよび合成オリゴヌクレオチドを使用して、ヌクレオチド配列を操作することができる。例えば位置指定突然変異誘発法を使用して新規な制限部位を挿入し、グリコシリ化パターンを改変し、コドンの優先性を変え、スプライスバリアントを生成し、突然変異を導入する等を行うことができる。

【0043】

また本発明は、本発明のポリペプチドをコードする1以上のヌクレオチド配列を含んでなるクローニングおよび発現ベクターも含む。ヌクレオチド配列はフォワードまたはリバース方向に挿入することができる。DNA配列は種々の手順によりベクターに挿入することができる。一般にDNA配列は、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に当該技術分野で知られ、そしてSambrook et al., モレキュラークローニング: アラボラ

10

20

30

40

50

トリーマニュアル (MOL E C U L A R C L O N I N G : A LABORATORY MANUAL)、第2版、(コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、1989)に記載されている手順により挿入される。そのような手順およびその他は、当業者の技術の範囲内にあると見なす。

【0044】

クローニングベクターの例には限定するわけではないが、pBR322、pUC18、pUC19、pSportおよびpCRIIを含む。

【0045】

発現ベクターはさらに、例えばコード配列に操作可能に連結されたプロモーターを含む調節配列を含んでなることができる。多数の適切な発現ベータ-およびプロモーターが当業者に知られ、そして市販されている。以下の発現ベクターを例として提供する。細菌の発現ベクターには限定するわけではないが、pQE70、pQE60、pQE-9 (キアゲン: Qiagen); pBS、phagescript、psiX174、pBlue script SK、pBSKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (ストラタジーン: stratagene); およびpTRC99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、PRIT5 (ファルマシア: Pharmacia) を含む。真核発現ベクターには限定するわけではないが、pWLneo、pSV2cat、pOG44、pXT1、pSG (ストラタジーン); およびpSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (ファルマシア) を含む。しかし任意の他のクローニングまたは発現ベクターも、それが所望する宿主中で複製可能および生存可能である限り使用することができる。プロモーター領域は、CAT (クロラムフェニコールトランスフェラーゼ) 発現ベクターまたは選択可能なマーカーを含む他のベクターを使用して、任意の所望する遺伝子から選択することができる。2つの適切なベクターは、pKK232-8 およびpCM7 である。特に挙げられる細菌プロモーターには、lacI、lacZ、T3、T7、gtt、ラムダP_R、P_L およびtrpを含む。真核プロモーターにはCMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスのメタロチオネイン-Iを含む。適切なベクターおよびプロモーターの選択は十分に当業者のレベル内である。

【0046】

また発現ベクターは翻訳開始、翻訳終結用のリボゾーム結合部位および発現を増幅するための適切な配列も含むことができる。発現ベクターは、真核細胞培養用のジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性のような、あるいは大腸菌 (E. coli)での培養用にテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性のような形質転換した宿主細胞の選択用の表現型形質を提供するための遺伝子を含むことができる。

【0047】

1つの態様では、バリエントのライブラリーは核酸レベルで組み合わせ突然変異誘発法 (combinatorial mutagenesis) により作成し、そして変化を与えた遺伝子ライブラリーによりコードされる。バリエントのライブラリーは、例えば潜在的なバリエントのアミノ酸配列の縮重組が個々のポリペプチドとして、あるいは中に配列の組を含む1組のより長い融合タンパク質 (例えばファージディスプレイに) として発現されるように、遺伝子配列に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に連結することにより生成することができる。

【0048】

縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なバリエントのライブラリーを生成するために、使用することができる様々な方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動的DNA合成器で行い、そして次いで合成遺伝子を適切な発現ベクターに連結することができる。遺伝子の縮重組を使用することにより、1つの混合物中に潜在的な類似配列の望ましい組をコードするすべての配列が準備できるようになる。縮重オリゴヌクレオチドの合成法は、当該技術分野では知られている (例えば Narang, Tetrahedron 39: 3, 1983; Itakura, et al., Annu. Rev. Biochem. 50

10

20

30

40

50

3 : 323, 1984; Itakura, et al., Science 1984: 1056, 1984; Ike, et al., Nucleic Acids Res. 11: 477, 1983を参照にされたい)。

【0049】

幾つかの技法が、点突然変異または短縮により作成された組み合わせライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするために、および選択した特性を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするために当該技術分野では知られている。そのような技法は本発明のポリペプチドの組み合わせ突然変異誘発法により生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための高処理量分析に利用できる最も広く使用されている技法は、典型的には遺伝子のライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングし、適切な細胞を、生成したベクターのライブラリーで形質転換させ、そして組み合わせ遺伝子を所望の活性の損失が、検出されるべき産物の遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で発現させることを含む。ライブラリー中の機能的突然変異の頻度を強化する技法であるリクルーシブアンサンブル突然変異誘発法 (recursive ensemble mutagenesis: REM) を、スクリーニングアッセイと組み合わせて使用して所望のバリエントを同定することができる。

【0050】

また本発明は上記ベクターを含む宿主細胞も提供する。宿主細胞は哺乳動物細胞のようなより高等な真核細胞、または酵母細胞のようなより下等な真核細胞であることができる。あるいは宿主細胞は細菌細胞のような原核細胞であることができる。

【0051】

宿主細胞は、本発明のクローニングまたは発現ベクターで遺伝的に操作することができる(形質導入、形質転換またはトランスフェクション)。ベクターは例えばプラスミド、ウイルス粒子またはファージの状態でよい。操作された宿主細胞は、プロモーターを活性化し、または形質転換体を選択するために適当に修飾した通例の栄養培地で培養することができる。温度およびpHのような適切な培養条件の選択は、当業者の技術の範囲内である。

【0052】

適切な宿主の代表例には、限定するわけではないが大腸菌 (E. coli)、ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) またはストレプトミセス属 (Streptomyces) のような細菌細胞；酵母のような真菌細胞；ショウジョウバエ (Drosophila) S2 およびスポットテラ (Spodoptera) Sf9 のような昆虫細胞；またはCHO、COS、またはボウズ (Bowes) メラノーマのような哺乳動物細胞を含む。適切な宿主の選択は、本明細書の技法から当業者の範囲内であるとみなす。

【0053】

構築物の宿主細胞への導入は、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクションまたは電気穿孔 (Davis, et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) により行うことができる。宿主細胞中での構築物を通例の様式で使用して、組換え配列によりコードされた遺伝子産物を生産することができる。

【0054】

成熟タンパク質は適切なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌または他の細胞中で発現させることができる。無細胞翻訳系を使用して、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用してそのようなタンパク質を生産することもできる。真核および原核宿主で使用するために適切なクローニングおよび発現ベクターは上に、そして Sambrook et al., モレキュラークローニング：アラボラトリーマニュアル (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL)、第2版、(コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、1989) に記載されている。

【0055】

本発明のポリペプチドをコードするDNAの高等真核生物による転写は、発現ベクターにエンハンサー配列を挿入することにより上昇させることができる。エンハンサーはDNAのシスに作用する要素であり、通常は約10～300bpであり、プロモーターに転写を上昇させるように作用する。例には、複製起点(100～270bp)の後期側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーを含む。一般に組み換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能とする複製起点および選択可能なマーカー(例えば大腸菌(E. coli)のアンピシリン耐性遺伝子および酵母(S. cerevisiae)TRP1遺伝子)、および下流の構造配列の転写を支配するために高度に発現する遺伝子に由来するプロモーターを含む。そのようなプロモーターは、中でも3-ホスホグリセレートキナーゼ(PGK)のような解糖酵素、因子、酸性ホスファターゼまたは熱ショックタンパク質をコードするオペロンに由来することができる。ヘテロロガスな構造配列は適当なフェイズで翻訳、開始および終結配列、および好ましくは翻訳されたタンパク質の細胞周辺腔または細胞外膜質への分泌を支配することができるリーダー配列と集成される。場合によりヘテロロガスな配列は、所望の特性(例えば安定化または発現された組換え産物の簡略化された精製)を付与するN-末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。

【0056】

適当な宿主株を形質転換させ、そして宿主株を適当な細胞密度まで成長させた後、選択したプロモーターは適切な手段(例えば温度シフトまたは化学誘導)により抑制解除し、そして細胞をさらなる期間、培養する。細胞は典型的には遠心により回収され、そして物理的または化学的手段により破壊される。生成した粗抽出物は、さらに精製するために保持される。タンパク質の発現に使用した微生物細胞は、凍結・解凍サイクル、超音波処理、機械的破壊または細胞溶解酵素の使用を含む任意の常法により破壊することができる。

【0057】

種々の哺乳動物細胞培養系も、組換えタンパク質を発現させるために使用することができる。哺乳動物発現系の例には、サルの腎臓纖維芽細胞のCOS-7株を含み(Gluzman, Celle 23:175, 1981)、そしてコンバチブルベクターを発現することができる他の細胞株には、例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびHBK細胞株を含む。

【0058】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ハイドロキシアバタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む当該技術分野で周知な方法により、組換え細胞カルチャーから回収および精製することができる。高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)を最終精製工程として使用することができる。

【0059】

本発明のポリペプチドは、都合よく単離することができる。精製されたポリペプチドは少なくとも70%純粋であり、すなわち単離されたポリペプチドは細胞性物質を実質的に含まず、そして約30%未満(乾燥重量による)の非ポリペプチド物質を有する。好ましくは調製物は85%～99%(すなわち85、87、89、91、93、95、96、97、98および99%)純粋である。調製物の純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、質量分析および液体クロマトグラフィーのような当該技術分野で既知の手段により評価することができる。

【0060】

組換え生産法に使用した宿主に依存して、本発明のポリペプチドは哺乳動物または他の真核生物の炭水化物でグリコシル化することができ、あるいは非グリコシル化でもよい。本発明のポリペプチドは開始メチオニンアミノ酸残基を含むこともできる。

【0061】

あるいは本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸配列を合成するために固相技法を使用した直接的なペプチド合成のような化学合成法を使用して生産することができる（例えば Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2154, 1963; Roberge, et al., Science 269: 202 - 204, 1995 を参照にされたい）。ポリペプチド合成は手動の技法を使用して、または自動化により行うことができる。自動化合成は、例えばアプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）431Aペプチド合成器（パーキン エルマー：Perkin Elmer）を使用して達成され得る。場合によりポリペプチドのフラグメントを別々に合成し、そして化学的方法を使用して合わせ、完全長の分子を生成することができる。
10。

【0062】

新しく合成されたポリペプチドは、調製用の高性能液体クロマトグラフィーにより実質的に精製することができる（例えば Creighton、タンパク質：構造および分子的原理（Proteins: Structures and Molecular Principles）、WHフリーマンアンドカンパニー、ニューヨーク、ニューヨーク州、1983を参照にされたい）。本発明の合成ポリペプチドの組成物はアミノ酸分析により、または例えばエドマン分解法によるシーケンシングにより確認することができる（Creighton、同上を参照にされたい）。さらにポリペプチドのアミノ酸配列の任意の部分は直接合成中に、および／または化学的方法を使用して他のタンパク質に由来する配列と合わせて改変して、バリアントポリペプチドまたは融合ポリペプチドを生成することができる。
20

修飾GLP-1受容体アゴニストおよび生産法

本発明の修飾GLP-1受容体アゴニストは、GLP-1受容体アゴニスト、またはそのフラグメント、誘導体、バリアントもしくは類似体を含んでなり、これは30kDよりも大きい分子量を有するポリエチレングリコール（PEG）ポリマーに連結される。

【0063】

適当なPEGポリマーは多くは市販されているか、または当業者に周知な技法により作成してもよい。PEGポリマーは30kDよりも大きい分子量を有し、好ましくは30kDよりも大きな分子量、より好ましくは40kDよりも大きな分子量、そしてさらにより好ましくは例えば43kDの分岐PEG-ペプチドのような分岐構造を有する（シェアウォーター（Shearwater）2001カタログ#2D3X0T01、mPEG2-MA-L）。

【0064】

完全なペプチド上へのPEGの結合は、受容体と相互作用するペプチド表面の反対側にPEGを結合させることにより達成することができる。好ましくはPEGの結合はGLP-1アゴニスト上の、GLP-1(7-37)に従って番号付けられた22～28および30～31位、ならびにC末端を越えた位置；すなわち32～37位で起こる。より好ましくはPEGの結合はGLP-1アゴニスト上の、GLP-1(7-37)に従って番号付けられた24、28、30および31位、ならびにC末端を越えた位置；すなわち32、34、36および37位で起こる。さらに一層好ましくは、PEGの結合はGLP-1アゴニスト上の、GLP-1(7-37)に従って番号付けられたC末端；すなわち31位で起こる。
30
40

【0065】

PEGをペプチドにカップリングするために幾つかの方法があり（例えばVeronesi, Biomaterials 22: 405 - 417, 2001を参照にされたい）、そのすべてを全部、引用により本明細書に編入する。したがって当業者は、本明細書に記載するPEGポリマーのGLP-1受容体アゴニストへの連結に、そのような周知技法を利用することができる。

【0066】

簡単に説明すると、システインのペグ化は部位特異的ペグ化の1法であり、そしてペプチドがシステイン残基をほとんど持たないか、または全く持たない場合にしばしば利用される。例えば天然のG L P - 1 (7 - 37)の場合、システイン残基は無い。したがって天然G L P - 1 (7 - 37)またはシステイン残基を持たないG L P - 1アゴニストのペグ化は、天然G L P - 1 (7 - 37)または上で確認されるG L P - 1アゴニスト上の特定部位の1つに唯一のシステインの突然変異を導入し、そして次いで生成した誘導体をシステインに特異的なペグ化試薬、例えばPEG - マレイミドと反応させることにより成すことができる。

【0067】

しかし部位特異的ペグ化を可能とするために、本発明のG L P - 1アゴニストを変異させる必要があるかもしれない。例えばG L P - 1アゴニストがシステイン残基を含む場合、これらは部位特異的ペグ化を確実にするために保存的アミノ酸で置換される必要がある。加えて限定するわけではないが“G G S”(配列番号32)、“G G S G G S”(配列番号33)、および“P P P S”(配列番号34)を含む硬いリンカーをG L P - 1アゴニストのC末端、しかしPEG付加部位の前に加えることができる(すなわち唯一のシステイン残基)。

【0068】

本発明の修飾G L P - 1受容体アゴニストの例には、限定するわけではないが配列番号13～14および16～31からなる群から選択されるポリペプチドを含む。本発明の最も好適な修飾G L P - 1受容体アゴニストは、配列番号26である。

【0069】

本発明のポリペプチドは、1型および2型糖尿病(非インスリン依存性糖尿病)の両方を含む糖尿病の処置に使用することができる。そのような処置は糖尿病および糖尿病の合併症の発症を遅らせることもできる。ポリペプチドは耐糖能障害の個体が2型糖尿病へ進行することを防止するために使用できる。本発明の方法において、本発明の化合物を使用して処置または防止することができる他の疾患および状態は；若年者の成人発症型糖尿病(MODY)(Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994)；成人の潜在的自己免疫糖尿病(LADA)(Zimmet et al., Diabetes Med, 11:299, 1994)；耐糖能障害(IGT)(糖尿病の分類に関する専門委員会(Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus)、Diabetes Care 22(Supp. 1):S5, 1999)；空腹時血糖障害(IFG)(Charles, et al., Diabetes 40:796, 1991)；妊娠糖尿病(Metzger, Diabetes 40:197, 1991)；および代謝性症候群Xを含む。

【0070】

本発明のポリペプチドは肥満のような障害、およびアテローム硬化症、高脂血症、高コレステロール血症、低HDLレベル、高血圧症、心血管疾患(アテローム硬化症、冠心臓疾患、冠動脈疾患、および高血圧症を含む)、脳血管性疾患および末梢血管疾患にも効果的となり得る。

【0071】

本発明の化合物は、例えば脂質を蓄積する細胞を生産するための細胞分化、インスリン感受性の調節および血中グルコースレベルに関連する生理学的障害を処置するために有用となることができ、これは例えば異常な膵臓-細胞機能、インスリン分泌腫瘍および/またはインスリンに対する自己抗体、インスリン受容体に対する自己抗体、または膵臓-細胞に対する刺激物である自己抗体による自己免疫低血糖、アテローム硬化症斑の形成を導くマクロファージ分化、炎症性応答、発癌、過形成、脂肪細胞遺伝子発現、脂肪細胞分化、膵臓-細胞質量の減少、インスリン分泌、インスリンに対する組織感度、脂肪肉腫細胞増殖、多囊胞性卵巣疾患、慢性無排卵、高アンドロゲン過剰症、プロゲステロン生産、ステロイド形成、細胞の酸化還元電位および酸化的ストレス、一酸化窒素シンターゼ(NOS)生産、上昇したガンマグルタミルトランスペプチダーゼ、カタラーゼ、血漿

10

20

30

40

50

トリグリセリド、HDL、LDLコレステロールレベル等に関与している。

【0072】

本発明のポリペプチドは、糖尿病の2次的原因を処置するために本発明の方法に使用することができる（糖尿病の分類に関する専門委員会、Diabetes Care 22（Supp. 1）：S5, 1999）。そのような2次的原因には、グルココルチコイド過剰、成長ホルモン過剰、褐色細胞腫および薬剤が誘導する糖尿病を含む。糖尿病を誘導し得る薬剤には限定するわけではないがピリミニル（pyriminil）、ニコチン酸、グルココルチコイド、フェニトイン、甲状腺ホルモン、-アドレナリン作用薬、-インターフェロンおよびHIV感染を処置するために使用する薬剤を含む。

【0073】

本発明のポリペプチドは単独で、またはさらなる治療薬および/または糖尿病および関連障害の処置において当業者に知られている化合物と組み合わせて使用することができる。あるいは本明細書に記載する方法および化合物は、部分的または完全に併用療法で使用することができる。

【0074】

本発明のポリペプチドは、PPARアゴニスト、スルホニルウレア薬、非スルホニルウレア分泌促進薬、-グルコシダーゼインヒビター、インスリン感作薬、インスリン分泌促進薬、肝臓グルコース排出低下化合物、インスリンおよび抗肥満薬を含む糖尿病を処置するために知られている他の治療薬と組み合わせて投与することができる。そのような治療薬は本発明のポリペプチドの投与前、同時または後に投与することができる。インスリンには長期および短期作用形の両方およびインスリンの製剤を含む。PPARアゴニストは、任意のPPARサブユニットのアゴニストまたはそれらの組み合わせを含むことができる。例えばPPARアゴニストは、PPAR-、PPAR-、PPAR-のアゴニスト、またはPPARのサブユニットの2もしくは3個の組み合わせを含むことができる。PPARアゴニストには、例えばロシグリタゾンおよびピオグリタゾンを含む。スルホニルウレア薬には、例えばグリブリド、グリメビリド（glimepiride）、クロルプロパミドおよびグリビジドを含む。本発明のポリペプチドと一緒に投与する時、糖尿病を処置するために有用となり得る-グルコシダーゼインヒビターには、アカルボース、ミグリトール（miglitol）およびボグリボース（voglibose）を含む。糖尿病の処置に有用となり得るインスリン感作薬には、チアゾリジンジオンおよび非チアゾリジンジオンを含む。本発明のポリペプチドと投与する時、糖尿病を処置するために有用となり得る肝臓グルコース排出低下化合物には、GlucophageおよびGlucophage XRのようなメトホルミンを含む。本発明のポリペプチドと投与する時、糖尿病を処置するために有用となり得るインスリン分泌促進薬には、スルホニルウレア薬および非スルホニルウレア薬；GIP、セクレチン、ナテグリニド（nateglinide）、メグリチニド、レパグリニド（repaglinide）、グリベンクラミド（glibenclamide）、グリメビリド、クロルプロパミド、グリビジドを含む。本発明の1つの態様では、インスリン分泌促進薬に対する臍臓-細胞の感度を上げるために、本発明のポリペプチドをインスリン分泌促進薬と組み合わせて使用する。

【0075】

本発明のポリペプチドは、抗肥満薬と組み合わせて本発明の方法に使用することもできる。抗肥満薬には-3アゴニスト、CB-1アンタゴニスト、例えばシブトラミン（sibutramine）（Meridia）のような食欲抑制薬、および例えばオルリスト（orlistat）（Xenical）のようなリバーゼインヒビターを含む。

【0076】

本発明のポリペプチドは、糖尿病患者における脂質障害を処置するために通常使用される薬剤と組み合わせて、本発明の方法に使用することもできる。そのような薬剤には限定するわけではないが、HMG-CoAレダクターゼインヒビター、ニコチン酸、胆汁酸分泌抑制薬、およびフィブリン酸誘導体を含む。本発明のポリペプチドは、例えば-遮断薬およびACEインヒビターのような抗高血圧症薬と組み合わせて使用することもできる

10

20

30

40

50

。

【0077】

そのような同時療法 (co-therapy) は、2以上の薬剤（例えばインスリン感作薬および抗肥満薬と組み合わせた本発明の化合物）を任意に組み合わせて投与することができる。そのような同時療法は上記のような製薬学的組成物の形態で投与してもよい。

【0078】

本明細書で使用するような種々の用語を、以下に定義する。

【0079】

本発明の要素またはその好適な態様（1つまたは複数）を紹介する時、冠詞“a”、“an”、“the”および“said”は、1以上の要素があることを示す。用語「含んでなる」、「含む」および「有する」は、包括的であることを意図し、そして列挙した要素以外にさらなる要素があってもよいことを意味する。

10

【0080】

本明細書で使用する用語「個体」は、哺乳動物（例えばヒトおよび動物）を含む。

【0081】

本明細書で使用する用語「処置」には、任意のプロセス、作用、適用、治療等を含み、ここでヒトを含む個体には、個体の状態を改善する目的で、直接的または間接的に、あるいは個体の状態または障害の進行を遅らせる医学的援助が提供される。

20

【0082】

用語「併用療法（combination therapy）」または「同時療法」は、2以上の治療薬を投与して糖尿病の状態および/または障害を処置することを意味する。そのような投与には、有効成分を固定比率で有する単一のカプセルまたは各インヒビター薬用の多数の個別のカプセルのような2以上の治療薬を実質的に同時様式で同時投与することを包含する。さらにそのような投与には順次様式で各種の治療薬を使用することを包含する。

20

【0083】

「治療に有効な」という句は、糖尿病の状態または障害の重症の改善目標を達成するが、同時に上記治療的処置に伴う悪い副作用を回避または最小にする、投与される各薬剤の量を意味する。

30

【0084】

用語「製薬学的に許容され得る」とは、個々の品目が製薬に使用するために適していることを意味する。

【0085】

哺乳動物において上に同定される状態の処置に関する効力を決定するために使用する周知のアッセイに基づき、そしてこれらの結果をこれらの状態を処置するために使用される既知の薬物療法の結果と比較することにより、本発明のポリペプチドの有効な投薬用量は、各々の望ましい徴候の処置に容易に決定することができる。これら状態の1つの処置に投与される有効成分（例えばポリペプチド）の量は、特定の化合物および使用する単位用量、投与様式、処置の期間、処置する患者の年齢および性別、および処置する状態の性質および程度のような考査に従い、広く変動することができる。

40

【0086】

投与すべき有効成分の総量は、一般に1日あたり約0.0001mg/kg～約200mg/kg、そして好ましくは約0.01mg/kg～約200mg/kg体重の範囲である。単位用量は約0.05mg～約1500mgの有効成分を含むことができ、そして1日に1回以上投与することができる。静脈内、筋肉内、皮下を含む注射、および非経口注射、および注入技術の使用により投与するための毎日の投薬用量は、約0.01～約200mg/kgであり得る。毎日の直腸投薬法は、0.01～200mg/kg総体重となり得る。経皮的濃度は、0.01～200mg/kgの毎日の用量を維持するために必要となる濃度であり得る。

【0087】

50

もちろん各患者について特別な初期および持続的投薬法は、担当医師により決定されるような状態の性質および重症度、使用する具体的なポリペプチドの活性、患者の年齢、患者の食事、投与時期、投与経路、薬剤の排出速度、薬剤の併用等に従い変動するだろう。本発明の望ましい処置様式およびポリペプチドの投与回数は、通常の処置試験を使用して当業者により確認され得る。

【0088】

本発明のポリペプチドを使用して、投与が必要な患者に適切に配合された製薬学的組成物を投与することにより、望ましい薬理学的效果を達成することができる。本発明の目的に関して、患者は特定の状態または疾患の処置が必要なヒトを含む哺乳動物である。したがって本発明は、製薬学的に許容され得る担体および治療に有効量のポリペプチドを含んでなる製薬学的組成物を含む。製薬学的に許容され得る担体は、比較的非毒性であり、そして有効成分の効果的活性に一致した濃度で患者に無害な担体であるので、担体に起因する副作用が有効成分の有益な効果を損なうことはない。治療に有効量のポリペプチドは、処置する特定の状態に結果を生じるか、または影響を発揮する量である。本明細書に記載するポリペプチドは、例えば即時および時限放出型の調製物、経口、非経口、局所等を含む効果的な通例の単位剤形を使用して、製薬学的に許容され得る担体と投与することができる。

【0089】

経口投与には、ポリペプチドは例えばカプセル、ピル、錠剤、トローチ、ロゼンジ、マルト、粉末、溶液、懸濁液または乳液のような固体または液体調製物に配合することができ、そして製薬学的組成物の製造に当該技術分野で知られている方法に従い調製することができる。固体の単位剤形は、例えば表面活性剤、潤滑剤、およびラクトース、シュクロース、リン酸カルシウムおよびトウモロコシ澱粉のような不活性充填剤を含有する通例の硬質または軟質殻ゼラチン型であることができるカプセルでよい。

【0090】

別の態様では、本発明のポリペプチドはラクトース、シュクロース、およびコーンスターの通例の錠剤基材を、アラビアガム、コーンスターまたはゼラチンのような結合剤；ジャガイモ澱粉、アルギン酸、コーンスターおよびグアガムのような投与後に錠剤の破壊および溶解を補助することを意図する崩壊剤；錠剤造粒の流動を改善し、そして錠剤材料が錠剤ダイおよびパンチの表面に接着することを防ぐ、例えばタルク、ステアリン酸またはステアリン酸マグネシウム、カルシウムもしくは亜鉛のような潤滑剤；染料；着色剤；および錠剤の美的品質を強化し、そしてそれらを患者に受け入れ易くすることを意図する風味剤と組み合わせて製剤することができる。経口液体剤形での使用に適する賦形剤は、水およびアルコール、例えばエタノール、ベンジルアルコールおよびポリエチレンアルコールのような希釈剤を、製薬学的に許容され得る表面活性剤、沈殿防止剤または乳化剤を添加して、または添加せずに含む。種々の他の材料がコーティングとして、または単位用量の物理的形態を修飾するために存在してよい。例えば錠剤、ピルまたはカプセルは、シェラック、糖または両方でコーティングすることができる。

【0091】

分散性粉末および粒子は、水性懸濁液の調製に適している。それらは分散もしくは湿潤剤、沈殿防止剤および1以上の保存剤との混合物中に有効成分を提供する。適当な分散もしくは湿潤剤および沈殿防止剤は上にすでに挙げたものにより例示される。さらなる賦形剤、例えば上記の甘味剤、風味剤および着色剤も存在してよい。

【0092】

本発明の製薬学的組成物は、水中油型の乳液状態でもよい。油相は液体パラフィンのような植物油または植物油の混合物でよい。適当な乳化剤は(1)アラビアガムおよびトラガカントガムのような自然に存在するガム、(2)ダイズおよびレシチンのような自然に存在するホスファチド、(3)脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来するエステルまたは部分エステル、例えばソルビタンモノオレート、および(4)該部分エステルとエチレンオキシドとの縮合産物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレートであること

ができる。乳液は甘味剤および風味剤を含んでもよい。

【0093】

油性懸濁液は、有効成分を例えば落花生油、オリーブ油、ゴマ油、またはココヤシ油のような植物油中に；あるいは液体パラフィンのような鉱物油中に懸濁することにより配合され得る。油性懸濁液は、例えば蜜蝋、硬質パラフィンまたはセチルアルコールのような増粘剤を含んでもよい。懸濁液は1以上の保存剤、例えばエチルもしくはn-プロピルp-ヒドロキシベンゾエート；1以上の着色剤；1以上の風味剤；およびシュクロースもしくはサッカリンのような1以上の甘味剤を含んでもよい。

【0094】

シロップおよびエリキシルは、例えばグリセロール、プロピレンジコール、ソルビトールまたはシュクロースのような甘味剤を用いて配合することができる。そのような製剤は、粘滑剤および保存剤、風味剤および着色剤を含んでもよい。

【0095】

本発明のポリペプチドは、非経口的に投与することもでき、すなわち皮下に、静脈内に、筋肉内に、または腹腔内に、滅菌性液体または水、塩水、水性デキストロースおよび関連する糖の溶液のような液体の混合物；エタノール、イソプロパノール、またはヘキサデシルアルコールのようなアルコール；プロピレンジコールまたはポリエチレンジコールのようなグリコール；2,2-ジメチル-1,1-ジオキソラン-4-メタノールのようなグリセロールケタール、ポリ(エチレンジコール)400のようなエーテル；油；脂肪酸；脂肪酸エステルまたはグリセリド；またはさらにセッケンもしくは界面活性剤のような製薬学的に許容され得る表面活性剤、ペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースのような沈殿防止剤、あるいは乳化剤および他の製薬学的補助剤を含むか、または含まないアセチル化脂肪酸グリセリドでよい製薬学的担体を含む生理学的に許容され得る希釈剤中の化合物の注射可能用量として投与され得る。

【0096】

本発明の非経口製剤に使用することができる油の例は、石油、動物、植物または合成起源の油、例えばピーナッツ油、ダイズ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油、オリーブ油、石油および鉱物油である。適当な脂肪酸にはオレイン酸、ステアリン酸およびイソステアリン酸を含む。適当な脂肪酸エステルは、例えばオレイン酸エチルおよびミリスチン酸イソプロピルを含む。適当なセッケンには脂肪アルカリ金属、アンモニウムおよびトリエタノールアミン塩を含み、そして適当な界面活性剤にはカチオン性界面活性剤、例えばジメチルジアルキルアンモニウムハライド、アルキルピリジニウムハライドおよびアルキルアミンアセテート；アニオン性界面活性剤、例えばアルキル、アリールおよびオレフィンスルホネート、アルキル、オレフィン、エーテルおよびモノグリセリドスルフェートおよびスルホスクシネート；非イオン性界面活性剤、例えば脂肪アミンオキシド、脂肪酸アルカノールアミド、およびポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー；および両イオン性界面活性剤、例えばアルキル-ベータ-アミノプロピオネートおよび2-アルキルイミダゾリン四級アンモニウム塩ならびに混合物を含む。

【0097】

本発明の非経口組成物は、典型的には溶液中に約0.5%～約25重量%の有効成分を含むことができる。保存剤およびバッファーも有利に使用することができる。注射部位での炎症を最小に、または排除するために、そのような組成物は約12～約17の親水親油バランス(HLB)を有する非イオン性表面活性剤を含んでもよい。そのような製剤中の表面活性剤の量は、約5%～約15重量%の範囲である。表面活性剤は上記HLBを有する単一成分であることができ、または所望のHLBを有する2以上の成分の混合物であることができる。

【0098】

非経口製剤に使用する表面活性剤の例は、ポリエチレンソルビタン脂肪酸エステルの種類、例えばソルビタンモノオレートおよびプロピレンオキシドとプロピレンジコールと

10

20

30

40

50

の縮合により形成される疎水性基材を含むエチレンオキシドの高分子量付加物である。

【0099】

製薬学的組成物は、滅菌性の注射可能な水性懸濁液状態でよい。そのような懸濁液は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガムおよびアラビアガムのような適当な分散または湿潤剤および沈殿防止剤を使用して既知の方法に従い製剤することができ；分散または湿潤剤は、レシチンのような自然に存在するホスファチド、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えばポリオキシエチレンステアレート、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレートのようなエチレンオキシドと、脂肪酸およびヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物、またはエチレンオキシドと、脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来する部分エステルとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレートでよい。

【0100】

滅菌性の注射可能な調製物は、非毒性の非経口的に許容され得る希釈剤または溶媒中の滅菌性の注射可能な溶液または懸濁液でもよい。使用できる希釈剤および溶媒は、例えば水、リングル溶液および等張性塩化ナトリウム溶液である。加えて、滅菌性の固定油も通常、溶媒または沈殿防止媒質として使用できる。このために、合成モノもしくはジグリセリドを含む任意のブレンド、固定油を使用することができる。さらにオレイン酸のような脂肪酸を注射可能物の調製に使用することができる。

【0101】

また本発明の組成物は、薬剤の直腸投与用に座薬の状態で投与してもよい。これらの組成物は、薬剤（例えばポリペプチド）と適当な非炎症性賦形剤（これは常温では固体であるが、直腸温度では液体であり、したがって直腸で融解して薬剤を放出する）とを混合することにより調製することができる。そのような材料は、例えばカカオ脂およびポリエチレングリコールである。

【0102】

本発明の方法に採用される別の製剤は、経皮的送達デバイス（「パッチ」）を使用する。そのような経皮的パッチは、制御された量で本発明の化合物の持続的または断続的注入を提供することのために使用することができる。薬剤送達用の経皮的パッチの構造および使用は、当該技術分野では周知である（例えば引用により本明細書に編入する米国特許第5,023,252号明細書を参照にされたい）。そのようなパッチは薬剤を連続的、拍動的に、または要求があり次第送達するように構築することができる。

【0103】

製薬学的組成物は患者に機械的な送達デバイスを介して導入することが望ましいか、または必要となるかもしれない。製剤を送達するための機械的送達デバイスの構造および使用は、当該技術分野では周知である。例えば薬剤を脳に直接投与するための直接的技法は通常、血液脳関門をバイパスするために薬剤送達カテーテルを患者の血管系に配置することが関与する。身体の特別な解剖学的領域に薬剤を輸送するために使用される1つのそのような移植可能な送達系は、引用により本明細書に編入する米国特許第5,011,472号明細書に記載されている。

【0104】

本発明の組成物は、一般に担体または希釈剤と呼ばれる他の通例の製薬学的に許容され得る混合材料も必要または所望により含むことができる。本発明の任意の組成物は、アスコルビン酸のような酸化防止剤を加えることにより、または他の適当な保存剤により保存され得る。そのような組成物を適切な剤形に調製するための通例の手順を使用することができる。

【0105】

意図する投与経路用に組成物を配合するために適切であるとして使用することができる、通常使用される製薬学的材料には：酸性化剤、例えば限定するわけではないが、酢酸、

10

20

30

40

50

クエン酸、フマル酸、塩酸、硝酸；および限定するわけではないが、アンモニア溶液、炭酸アンモニウム、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン、水酸化カリウム、ホウ酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、トリエタノールアミン、トロラミンのようなアルカリ化剤を含む。

【0106】

他の製薬学的材料には、例えば限定するわけではないが吸着剤（例えば粉末化セルロースおよび活性炭）；エーロゾル推進薬（例えば二酸化炭素、 CCl_2F_2 、 $\text{F}_2\text{ClC}-\text{CClF}_2$ および CClF_3 ）；空気置換剤（air displacement agent）（例えば窒素およびアルゴン）；抗菌・カビ保存剤（例えば安息香酸、ブチルパラベン、エチルパラベン、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム）；抗微生物保存剤（例えば塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、塩化セチルピリジニウム、クロロブタノール、フェノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀およびチメロサール）；酸化防止剤（例えばアスコルビン酸、アスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、次亜リン酸、モノチオグリセロール、プロピル没食子酸塩、アスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ナトリウムホルムアルデヒドスルホキシレート、異性重亜硫酸ナトリウム）；結合材料（例えば、ブロックポリマー、天然および合成ゴム、ポリアクリレート、ポリウレタン、シリコーンおよびスチレン-ブタジエンコポリマー）；緩衝剤（例えばメタリン酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、酢酸ナトリウム、無水クエン酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム2水和物）；運搬剤（carrying agent）（例えばアカシアシロップ、芳香性シロップ、芳香性エリキシル、チェリーシロップ、カカオシロップ、オレンジシロップ、シロップ、トウモロコシ油、鉱物油、ピーナッツ油、ゴマ油、静菌性塩化ナトリウム注射および注射用の静菌性水）；錯化剤（例えばエデト酸二ナトリウムおよびエデト酸）；着色剤（例えばFD&C レッド No. 3、FD&C レッド No. 20、FD&C イエロー No. 6、FD&C ブルー No. 2、D&C グリーン No. 5、D&C オレンジ No. 5、D&C レッド No. 8、カラメルおよび酸化鉄赤）；浄化剤（clarifying agent）（例えばベントナイト）；乳化剤（限定するわけではないがアカシア、セトマクロゴール、セチルアルコール、モノステアリン酸グリセリル、レシチン、モノオレイン酸ソルビタン、ポリエチレン50ステアレート）；カプセル化剤（例えばゼラチンおよび酢酸フタル酸セルロース）；風味剤（例えば、アニス油、シナモン油、カカオ、メントール、オレンジ油、ペパーミント油およびバニリン）；保湿剤（例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよびソルビトール）；磨碎剤（levigating agent）（例えば鉱物油およびグリセリン）；油（例えば、落花生油、鉱物油、オリーブ油、ピーナッツ油、ゴマ油および植物油）；軟膏基材（例えば、ラノリン、親水性軟膏、ポリエチレングリコール軟膏、ペトロラタム、親水性ペトロラタム、ホワイト軟膏、イエロー軟膏およびバラ水軟膏）；浸透強化剤（経皮送達）（例えば、モノヒドロキシまたはポリヒドロキシアルコール、飽和もしくは不飽和脂肪アルコール、飽和もしくは不飽和脂肪エステル、飽和もしくは不飽和ジカルボン酸、精油、ホスファチジル誘導体、ケファリン、テルペン、アミド、エーテル、ケトンおよびウレア）；可塑剤（例えば、ジエチルフタレートおよびグリセリン）；溶媒（例えば、アルコール、トウモロコシ油、綿実油、グリセリン、イソプロピルアルコール、鉱物油、オレイン酸、ピーナッツ油、精製水、注射用水、注射用滅菌水および灌注用滅菌水）；剛化剤（例えば、セチルアルコール、セチルエステルワックス、微結晶ワックス、パラフィン、ステアリルアルコール、白蝶、黄蝶（yellow wax）；座薬基材（例えばカカオ脂およびポリエチレングリコール（混合物））；表面活性剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、ノンオキシノール10、オクストキシノール（oxtoxy no 1）9、ポリソルベート80、ラウリル硫酸ナトリウムおよびソルビタンモノパルミテート）；沈殿防止剤（例えば、寒天、ベントナイト、カルボマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カオリン、メチルセルロース、トラガカントおよび50

ビーガム) ; 甘味剤、例えばアスパルテーム、デキストロース、グリセリン、マンニトール、プロピレングリコール、サッカリンナトリウム、ソルビトールおよびシュクロース) ; 錠剤の抗接着剤(例えば、ステアリン酸マグネシウムおよびタルク) ; 錠剤の結合剤(例えば、アラビアガム、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースナトリウム、圧縮性糖、エチルセルロース、ゼラチン、液体グルコース、メチルセルロース、ポビドンおよび糊化澱粉) ; 錠剤およびカプセルの希釈剤(例えば、二塩基性リン酸カルシウム、カオリン、ラクトース、マンニトール、微結晶セルロース、粉末化セルロース、沈殿した炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、ソルビトールおよび澱粉) ; 錠剤コーティング剤(例えば、液体グルコース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、酢酸フタル酸セルロースおよびシェラック) ; 錠剤の直接圧縮賦形剤(例えば、二塩基性リン酸カルシウム) ; 錠剤の崩壊剤(例えば、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースカルシウム、微結晶セルロース、ポラクリリン(polaracrilin)カリウム、アルギン酸ナトリウム、グリコール酸澱粉ナトリウムおよび澱粉) ; 錠剤のグライダント(例えば、コロイドシリカ、トウモロコシ澱粉およびタルク) ; 錠剤潤滑剤(例えば、ステアリン酸カリウム、ステアリン酸マグネシウム、鉛物油、ステアリン酸およびステアリン酸亜鉛) ; 錠剤 / カプセル不透明化剤(例えば二酸化チタン) ; 錠剤の研磨剤(例えば、カルナバ蠟、および白蠟) ; 濃化剤(例えば蜜蠟、セチルアルコールおよびパラフィン) ; 張性調節剤(例えば、デキストロースおよび塩化ナトリウム) ; 粘性増加剤(例えば、アルギン酸、ベントナイト、カルボマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ポビドン、アルギン酸ナトリウムおよびトラガカントガム) ; および湿润剤(例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、レシチン、ポリエチレンソルビトールモノオレート、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレートおよびポリオキシエチレンステアレート)を含む。
10

【0107】

本明細書に記載するポリペプチドは、単一の製剤として、または組み合わせが望ましくない副作用を引き起こさない1以上の他の製剤と組み合せて投与することができる。例えば本発明のポリペプチドは、既知の抗肥満薬と、または既知の抗糖尿病薬と、または他の徴候薬等と、ならびにそれらの混合物および組み合わせ物と合わせることができる。

【0108】

本明細書に記載するポリペプチドは、遊離の塩基形で、または組成物で、研究および診断に、あるいは分析用の参考標準等としても利用することができる。したがって本発明は不活性担体および本明細書に記載する方法により同定される有効量の化合物またはその塩もしくはエステルを含んでなる組成物を含む。不活性担体は、運搬される化合物と作用せず、そして支持体、運搬の手段、嵩、追跡可能な材料等を運搬される化合物に添える任意の材料である。有効量の化合物は結果を生じるか、または行う特定の手順で影響を發揮する量である。

【0109】

ポリペプチドは水性および非水性の環境下で、加水分解、脱アミド化、酸化、ラセミ化および異性化を受けることが知られている。加水分解のような分解、脱アミド化または酸化は、キャピラリー電気泳動により容易に検出することができる。酵素的分解にもかかわらず、長期の血漿半減期、または生物学的滞留時間を持つポリペプチドは、水溶液中で少なくとも安定でなければならない。ポリペプチドは体温で1日に10%未満の分解しか表さないことが必須である。さらにポリペプチドは、体温で1日に5%未満の分解しか表さないことが好ましい。慢性の糖尿病患者では処置が一生であることから、これらの治療薬は非経口経路による場合は好都合にはさらに低い頻度で投与することが一層好ましい。体温で数週間にわたる安定性(すなわち数パーセント未満の分解)により、より低い投与頻度が可能となる。冷蔵温度で数年間の規模での安定性は、製造者に液体製剤の提示を可能とし、すなわち再構成の不便を回避する。さらに有機溶媒中の安定性は、ポリペプチドにインプラントのような新規剤形への配合を提供するだろう。

20

20

30

30

40

50

【0110】

皮下、静脈内、筋肉内等に適する製剤；適切な製薬学的担体；および配合および投与に関する技術は、当該技術分野で周知な任意の方法により調製することができる（例えばレミングトンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Science）、マック出版社、イーストン、ペンシルバニア州、第20版、2000を参照にされたい）。

【0111】

以下の例は本明細書に記載する本発明を具体的に説明するために提示するが、本発明の範囲をどのようにも限定するとは解釈すべきではない。

カプセルの調剤

10

カプセル調剤は：

本発明のポリペプチド	10 mg
澱粉	109 mg
ステアリン酸マグネシウム	1 mg

から調製する。

【0112】

成分をブレンドし、適当なメッシュのふるいにかけ、そして硬質ゼラチンカプセルに充填する。

錠剤の調剤

20

錠剤は

本発明のポリペプチド	25 mg
セルロース、微結晶	200 mg
コロイド状二酸化ケイ素	10 mg
ステアリン酸	5.0 mg

から調製する。

【0113】

材料を混合し、そして錠剤に圧縮する。適切な水性および非水性コーティングを施して嗜好性を上げ、質および安定性を改善し、または吸収を遅らせることができる。

滅菌IV溶液

本発明の所望する化合物のmg / mL溶液は、滅菌の注射可能水を使用して作成し、そしてpHを必要に応じて調整する。溶液は投与のために滅菌5%デキストロースで希釈され、そしてIV注入として投与される。

30

筋肉内懸濁液

以下の筋肉内懸濁液を調製する：

本発明のポリペプチド	50 μg / mL
カルボキシメチルセルロースナトリウム	5 mg / mL
TWEEN 80	4 mg / mL
塩化ナトリウム	9 mg / mL
ベンジルアルコール	9 mg / mL

懸濁液は筋肉内に投与する。

40

硬質殻カプセル

多数の単位カプセルは、標準的な2片硬質ゼラチンカプセルを充填することにより調製され、各カプセルは粉末化された有効成分、150 mgのラクトース、50 mgのセルロースおよび6 mgのステアリン酸マグネシウムを含む。

軟質ゼラチンカプセル

ダイズ油、綿実油またはオリーブ油のような消化性油中に有効成分の混合物を調製し、そして容量形ポンプにより溶融ゼラチンに注入して有効成分を含有する軟質ゼラチンカプセルを形成する。カプセルは洗浄し、そして乾燥させる。有効成分はポリエチレングリコール、グリセリンおよびソルビトールの混合物に溶解して、水混和性薬剤ミックスを調製することができる。

50

即時放出型錠剤 / カプセル

これらは通例および新規方法により作成される固体経口剤形である。これらの単位は薬剤の即時溶解および送達のために水無しで経口的に摂取される。有効成分は、糖、ゼラチン、ペクチンおよび甘味剤のような材料を含有する液体と混合する。これらの液体は凍結乾燥および固体状態抽出技法により固体錠剤またはカプセルに固化される。薬剤化合物は粘弾および熱弾性糖およびポリマーまたは発泡性成分を用いて圧縮して、水を必要とせずに即時放出を意図する多孔性マトリックスを生成することができる。

【0114】

当業者には、本明細書に説明するような本発明の精神または範囲から逸脱することなく、本発明に対して変更および修飾が行えることは明白である。

10

【実施例】

本発明がより良く理解されるために、以下の実施例を説明する。これらの実施例は具体的説明を目的とするだけであり、そして本発明の範囲をどのようにも限定するとは解釈されない。本明細書に挙げたすべての刊行物は全部、引用により編入する。

【実施例1】

【0115】

ペプチド合成法

本発明のポリペプチドの幾つかを合成するために、以下の一般手順に従った。ペプチド合成は F M O C / t - ブチル法 (ペプチド合成プロトコール (Peptide Synthesis Protocols)、35巻、Michael W. Pennington & Ben M. Dunn, 1994) により、Rapp - Polymere PE G - ポリスチレン樹脂 (ラップ - ポリマー (Rapp - Polymere)、チュービング、ドイツ) を使用した連続流の条件下で行った。合成の完了時、ペプチドを樹脂から開裂し、そして TFA / DTT / H₂O / トリイソプロピルシラン (88 / 5 / 5 / 2) を使用して脱保護した。ペプチドは開裂カクテルから冷ジエチルエーテルを使用して沈殿させた。沈殿物は冷エーテルを用いて3回洗浄し、そして次に5%酢酸に溶解した後、凍結乾燥した。ペプチドの同一性は逆相クロマトグラフィーにより、YMC - Pack ODS - AQ カラム (YMC社、ウィルミントン、ノースカロライナ州) でウォーターズ (Waters) の A L L I A N C E (商標) システム (ウォーターズ社、ミルフォード、マサチューセッツ州) で、3%のTFAを含む水 / アセトニトリルを、0% ~ 100%アセトニトリルの勾配で使用して、および M A L D I 質量分析により V O Y A G E R D E (商標) M A L D I 質量分析機 (モデル 5 - 2386 - 00、(パーセプティブバイオシステムズ (PerSeptive BioSystems)、フラミンガム、マサチューセッツ州) で確認した。マトリックスバッファー (3%のTFAを含む 50 / 50 d H₂O / アセトニトリル) ペプチドサンプルを、マトリックスバッファー 1 / 1 に加えた。> 95%の純度基準を満たさなかったそれらのペプチドは、ウォーターズの D e l t a Prep 4000 HPLC システムで逆相クロマトグラフィーにより精製した (ウォーターズ社、ミルフォード、マサチューセッツ州)。

20

30

30

【0116】

表1は、上で検討したペプチド合成プロトコールに従い作成した幾つかの選択したポリペプチドを含む。

40

【0117】

【表2】

表1

ペプチド	ペプチド配列	配列番号
GLP-1(7-36) アミド	HAE GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂	1
GLP-1(7-37)	HAE GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	2
Exendin 4	HGE GTFTSDL SKQMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH ₂	3
G27	HSQ GTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂	4
G51	HSQ GTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG	5
G1	HSQ GTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLVKGR-NH ₂	7
G5	HSQ GTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂	8
G55	HSQ GTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂	9
G56	HSQ GTFTSDYAA YLDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂	10

10

20

30

40

【実施例2】

【0118】

ペプチドのペグ化

ペグ化は当業者に知られている任意の方法により行うことができる。しかしこの場合、ペグ化はペプチドまたはペプチドのC末端に唯一のシステイン突然変異を導入するために2つの異なる方法を使用し、続いてペプチドのスルフィドリルとメトシキ - P E G - マレイミド試薬（インハーレ（i n h a l e）/シェアウォーター）のマレイミド基との間に安定なチオエーテル連結を介してシステインをペグ化することにより行った。唯一のシステインをペプチドのC末端に導入することが好ましい。

【0119】

第1の方法では、2倍モル過剰のm P E G - m a 1 (M W 2 2 k D、30 k Dおよび43 k D)試薬を1mgのペプチドに加え、そしてp H 6で反応バッファー(0.1 M N aホスフェート/0.1 M N a C l /0.1 M E D T A)に溶解した。室温で0.5時間後、反応はm P E G - m a 1に対して2倍モル過剰のD T Tを用いて止めた。ペプチド - P E G - m a 1反応混合物をカチオン交換カラムに添加して残存P E G試薬を除去し、続いてゲルfiltrationカラムにより残存する遊離ペプチドを除去した。純度、質量およびペグ化部位の数は、S D S - P A G EおよびM A L D I - T O F質量分析法により決定した。

【0120】

第2の方法は、10倍モル過剰のm P E G - m a 1 (M W ~ 2 2 k Dまたは43 k D)試薬を、p H 6の試薬バッファー(0.1 M N aホスフェート/0.1 M N a C l /0.1 M E D T A)に溶解した50 μMのペプチドに加えた。室温で0.5時間後、反応はm P E G - m a 1に対して2倍モル過剰のシステインを用いて止めた。粗ペプチド - P E G - m a 1反応混合物は、さらに精製せずにインビトロでアッセイした。

【0121】

表2は本明細書で検討したペグ化技法に従い作成した幾つかの選択したポリペプチドを含む。下線を付したアミノ酸はP E Gポリマーがペプチドに結合した位置を表すことに注目されたい。

【0122】

【表3】

表2

ペプチド	ペプチド配列	配列番号
G71	HSQGTFTSDYAKYLDARRACEFIAWLVKGRG	11
G72	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKCFIAWLVKGRG	12
G73	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFICWLVKGRG	13
G74	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVCGRG	14
G75	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKCRG	15
G76	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKCGC	16
G77	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG	17
G78	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRGC	18
G79	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRGGSC	19
G80	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRGPPPC	20
G81	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRGGSGGSC	21
G82	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVRGRG	22
G83	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVRGRG	23
G84	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVKGRC	24
G85	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIawlVRGRGK	25
G185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVRGRGC	26

10

20

【実施例3】

【0123】

サイクリックAMPシンチレーション近位(SPA)アッセイを使用したGLP-1受容体を介するペプチドシグナリングの測定

本発明の修飾GLP-1受容体アゴニストについて、cAMPシンチレーション近位アッセイにおけるGLP-1受容体の「活性化」は、天然のGLP-1(7-36)-アミドにより誘導される最大活性の少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、そしてさらに一層好ましくは少なくとも90%である最大活性の誘導である。本発明の修飾GLP-1受容体アゴニストのEC50値は、0.1から1000nMの間である。“EC50”は本明細書では、最大活性の50%が達成される本発明のポリペプチド濃度と定義する。

30

【0124】

RINm5F細胞は、 1.5×10^5 細胞/ウェルで96-ウェルプレート(コスター:Costar)にまき、そして37℃で24時間、RPMI1640、5%FBS、抗生物質/抗菌・カビ剤(Gibco(BRL))中で成長させた。培地を除去し、そして細胞をPBSで2回洗浄した。細胞は $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-5}$ Mの濃度範囲のペプチドと、1%BSAおよび $100 \mu M$ のIBMXを含有するHEPES-PBS中で37℃で15分間インキュベーションした。インキュベーションバッファーを除去し、そして細胞は、cAMPシンチレーション近位アッセイ(SPA)直接スクリーニングアッセイ系(アマーシャムファルマシアバイオテック(Amersham Pharmacia Biotech)社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州)により提供された溶解試薬中で溶解した。ライセート中に存在するcAMPの量(ピコモルで)は、このキットに提供されている使用説明にしたがって決定した。各ペプチド濃度で生成されたcAMPの量(ピコモルで)をプロットし、そして Prismソフトウェアを使用した非線形回帰により分析して、各ペプチドのEC50を決定した。

40

【0125】

対照(アスタリスクにより示す)および本発明の代表的ポリペプチドを含むこのアッセイの結果を以下の表に示す。

【0126】

【表4】

表3

ペプチド	22 kD PEG			43 kDa PEG		
	EC50		倍数-シフト	EC50		倍数-シフト
	非修飾	PEG		非修飾	PEG	
G71 *	27.3	346.1	14.3	33.6	358.6	10.7
G72 *	88.0	476.0	5.2	83.6	411.3	4.9
G73	40.4	144.5	4.2	36.0	294.7	8.2
G74	36.0	114.7	3.7	53.8	337.4	7.2
G75 *	48.3	275.8	7.6	53.7	388.4	8.0
G76	20.4	106.6	5.5	26.0	383.0	14.8
G77	26.1	49.7	2.0	22.4	236.1	11.0
G78	15.7	69.5	3.3	20.1	91.6	4.9
G79	19.6	60.2	3.0	16.6	66.9	4.0
G80	14.9	53.2	4.1			
G81	20.5	77.6	4.2	16.9	49.6	3.0

10

20

30

40

50

【実施例4】

【0127】

分散したラットの小島細胞からのインスリン分泌

このアッセイで、分散したラットの小島細胞からのインスリン分泌の上昇は、少なくとも1.5倍の増加である。本発明の修飾G L P - 1アゴニストは、分散した小島細胞からのインスリン分泌を、少なくとも約1.5倍～約10倍(すなわち1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0または10倍)まで増加する。

【0128】

ランゲルハンス島はS D ラット(200～250 g)から、コラゲナーゼを使用した消化手順を介して単離した。分散した小島細胞は、トリプシンを用いた処理を介して調製し、96 V底プレートにまき、そしてペレットとした。細胞は一晩、本発明のペプチドを含むか、または含まない培地内で培養した。培地を吸引し、そして細胞は3 mM グルコースを含むクレブス・リングル・H E P E S バッファーと37℃で30分間、プレインキュベーションした。プレインキュベーションバッファーを除去し、そして細胞はペプチドを含むか、または含まない適当濃度のグルコース(例えば8 mM)を含有するクレブス・リングル・H E P E S バッファーで37℃にて適当な時間、刺激した。幾つかの実験では、適当濃度のG L P - 1も含めた。上清の一部を取り出し、そしてそのインスリン含量をS P Aにより測定した。結果は対照に対する倍数(F O C)として表した。50 nM 濃度で、C末端に連結された43 kDのPEGを含む配列番号26に示すアミノ酸配列を有する修飾G L P - 1アゴニストは、分散した小島細胞からインスリンの分泌をおよそ3倍上昇させた。

【実施例5】

【0129】

絶食ウイスター ラットを対象としたI V G T T 中の血漿インスリンレベル上昇の測定

このアッセイにおける血漿インスリンレベルの上昇は、少なくとも約2倍である。好ましくは本発明の修飾G L P - 1受容体アゴニストは、絶食ウイスター(W i s t a r)ラットを対照としたインビボでの耐糖能試験中に、血漿インスリンレベルの上昇により測定されるラットのインスリン分泌を、約2倍～約5倍まで、より好ましくは約2倍～約10倍まで、そしてさらに一層好ましくは約2倍～約20倍上昇させる(すなわち2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20倍)。

【0130】

オスのウイスター ラットを一晩絶食させ、そして次いでイソフルランガスで麻酔をかける。ラットには0.4 g / kg のグルコースに賦形剤(0.9% 塩水 + 1% アルブミン)

または1ナノモル／kgのGLP-1(陽性対照)または1ナノモル／kgの本発明のペプチドを加えた尾の静脈注射を与える。次いでラットは1分後に目から採血し、そして血漿をインスリンについてELISAキットを使用してアッセイする(アルプコダイアグノスティックス(Alpco Diagnostics)、ウインドハム、ニューハンプシャー州)。

【実施例6】

【0131】

マウスを対象とした腹腔内の耐糖能に及ぼす本発明のペグ化ペプチドの効果

このアッセイにより測定される血中グルコースレベルの減少は、少なくとも約10%の減少である。好ましくは本発明の修飾GLP-1受容体アゴニストは、ラットまたはマウスを対照とした腹腔内の耐糖能試験により測定した時、マウスの血中グルコースレベルを、約10%～約60%まで、より好ましくは約10%～約80%まで、さらに一層好ましくは約10%～約100%まで減少させる(すなわち10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%)。

【0132】

皮下に投与した時の本発明の修飾ペプチド(ペグ化)のインビボ活性をマウスで調査した。一晩絶食させたマウスに、対照または修飾ペプチド(100μg/kg)を皮下注射した。3時間後、基本血中グルコースを測定し、そしてラットには2g/kgのグルコースを腹腔内に与えた。血中グルコースは、30および60分間後に再度測定した。

【0133】

本発明の代表的な修飾ペプチドは、IPGTT後に賦形剤に比べて血中グルコースレベルを有意に減少させた(グルコースAUC「曲線下面積」に36%～54%の減少)。これは修飾ペプチドが長期化したグルコース低下活性をインビボで有することを示す。本発明の修飾ペプチドはグルコース低下活性に加えて、インビボで長期化したペプチド半減期も示す。非修飾GLP-1はインビボで大変短い半減期を有する(<10分UTES)。本発明の修飾ペプチドがペプチドの投与から3時間後の血中グルコースを下げる能力は、ペプチドがこの時点で循環に存在し、したがって非修飾GLP-1に比べて長期の半減期を有することを明らかに示す。

【実施例7】

【0134】

皮下注射によるマウスの胃腸管運動の測定

本発明の修飾GLP-1受容体アゴニストは、少なくとも5倍の治療指數を有する。好ましくは本発明の修飾GLP-1受容体アゴニストは約5倍～10倍、より好ましくは約5～約20倍、さらにより好ましくは約5倍～約50倍、さらにより一層好ましくは5倍～100倍、そして最も好ましくは約5倍～200倍の治療指數を有する。治療指數は、少なくとも20%まで腸運動を減少させるために必要なペプチド(すなわちアゴニスト)の最小濃度を、少なくとも20%まで血中グルコースAUCを減少させるために必要な最小グルコース濃度で割ったものである(図6を参照にされたい)。

【0135】

マウスにおける胃腸管運動は、本発明の代表的な修飾GLP-1アゴニストを使用して試験した(43KDのPEGに連結されたGLP-1アゴニスト、30KDのPEGに連結されたGLP-1アゴニスト、22KDのPEGに連結されたGLP-1アゴニストペプチドおよび脂肪酸に連結されたGLP-1アゴニスト)。胃腸管の運動は以下のように測定した:オスのBalb/cマウスは、投与と運動測定の間の時間間隔に依存して、最初に一晩絶食させ、そしてペプチド(3～100μg/kg)または賦形剤を皮下注射により与えるか、あるいはそれらには最初ペプチドまたは賦形剤を与え、次いで一晩絶食させるかのいずれかであった。投与後の適当な時期に、マウスに経口栄養により木炭食を与え、そして5分後、頸部転位により屠殺した。小腸を切り出し、そして腸の長さ、ならびに幽門括約筋を越えて活性炭が移動した距離を測定した。%移動は、移動した活性炭の距離を小腸の全長で割り、そして100倍することにより算出した。

10

20

30

40

50

【0136】

1例では、脂肪酸で修飾したG L P 1 (-L-グルタモイル(N-ヘキサデカノイル)により修飾したK 2 6を含むR^{3 4}-G L P - 1(7-37))を、木炭食の3時間前に一晩絶食したマウスに与えた。脂肪酸-G L P 1は投与依存的に胃腸管運動を減少させた(図3A)。

【0137】

第2例では、22kDのPEGに連結されたG L P - 1を木炭食の3時間前に一晩絶食したマウスに与えた。22kDのPEGに連結されたG L P 1も、投与依存的に胃腸管運動を減少させた(図3B)。

【0138】

第3例では、43kDのPEGに連結されたG L P - 1を木炭食の3時間前に一晩絶食したマウスに与えた。43kDのPEGに連結されたG L P 1は、胃腸管運動に有意な効果を示さなかった(図3B)。

【0139】

第4例では、22kDのPEGに連結されたG L P - 1アゴニストを木炭食の3時間前に一晩絶食したマウスに与えた。22kDのPEGに連結されたG L P 1アゴニストも、投与依存的に胃腸管運動を減少させた(図4)。

【0140】

第5例では、30kDのPEGに連結されたG L P - 1アゴニストを木炭食の3時間前に一晩絶食したマウスに与えた。30kDのPEGに連結されたG L P 1アゴニストも、投与依存的に胃腸管運動を減少させた(図4)。

【0141】

第6例では、本発明の代表的な修飾G L P - 1アゴニスト(43kDのPEGに連結されたG L P - 1アゴニスト)を木炭食の3時間前に一晩絶食したマウスに与えた。本発明の代表的な修飾G L P - 1アゴニストは、胃腸管運動に有意な効果を示さなかった(図4)。

【実施例8】

【0142】

I C V注射によるマウスの胃腸管運動の測定

脳の第3脳室にねらいを定めるステンレス鋼ガイドカニューレを、イソフルラン麻酔をかけたオスのウィスターラット(275~350g)に移植した。1つの21Gカニューレは、定位装置および以下の座標を使用して脳の第3脳室にねらいを定めた: プレグマから-2.2mm後方、そして硬膜から-7.5mm腹側。カニューレは宝石ネジおよび歯科用セメントで頭蓋に固定した。手術から1週間後、カニューレの配置は1μlの10ng/μl濃度のアンギオテンシン(Angiotensin)IIの注入により試験した。1時間の間に5ml以上の水を飲む動物を実験に残した。胃の運動実験日に、一晩絶食したラットは第3脳室に賦形剤(PBS)、0.5μg/ラットのG L P - 1(7-36)アミドペプチドまたは43kDaのPEGを用いてC末端で修飾した20μg/ラットの配列番号26を10μlの容量で、注入ポンプ(ハーバード装置: Harvard Apparatus)を使用して注入した。ペプチドまたは賦形剤は2分間注入し、そして注射針を注入後さらに1分、その場所に維持した。注入から5分後、ラットは0.8ml容量中に10%活性炭、5%アラビアガムおよび1%カルボキシメチルセルロースの経口投与を受けた。活性炭から5分後、ラットはCO₂吸入および断頭により屠殺された。腸を切り出し、そして幽門括約筋を越えて移動した活性炭の距離を測定した。実験後、カニューレの正しい配置をエバンスブルー(Evans Blue)の注射および脳の切開により確認した。

【0143】

20μg/ラットで、43kDaのPEGで修飾した配列番号26は、胃の運動に有意な減少を生じた。この効果は0.5μg/ラットのG L P - 1(7-36)アミドペプチドにより生成される効果に匹敵した(図5)。これらのデータは、30kDaよりも大き

10

20

30

40

50

な分子量を有する P E G ポリマーに連結された G L P - 1 受容体アゴニスト（すなわち本発明の修飾 G L P - 1 受容体アゴニスト）は、多くの G L P - 1 アゴニストとは異なり脳血管閥門を通過できないことを示す。結果として本発明の修飾 G L P - 1 受容体アゴニストは、 G L P - 1 受容体アゴニストに典型的に付随する胃腸管運動の減少を防止することができる。

【実施例 9】

【0 1 4 4】

製薬学的組成 - I V および S C 製剤

滅菌の I V 注射可能製剤は、 4 m g のペプチド含量に均等な誘導化ペプチド（例えば 4 3 k D a の P E G に連結された配列番号 2 8 ）、および 1 リットルの滅菌塩水から、当該技術分野で周知な製造法を使用して作成する。 S C 製剤にはより高濃度の誘導化ポリペプチドが必要かもしれない。

【0 1 4 5】

上記明細書中で挙げたすべての刊行物および特許は、引用により本明細書に編入する。記載した本発明の組成物および方法の様々な修飾および変更は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく当業者には明白である。本発明を具体的な好適態様に関連して記載してきたが、特許請求される本発明はそのような具体的な態様に不当に制限されるべきではないと理解すべきである。実際に、分子生物学または関連分野の当業者には明らかな本発明を行うための上記様式の様々な修飾は、特許請求の範囲に従う範囲内にあるものとする。当業者は日常的な実験だけで本明細書に記載する本発明の具体的な態様に対する多くの均等物を認識し、そして確認することができるだろう。そのような均等物は、本発明に含まれるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0 1 4 6】

【図 1】本発明のポリペプチド、 G L P - 1 受容体アゴニストの例である、配列番号 1 ~ 1 0 に確認されるポリペプチドのアミノ酸配列を表す。

【図 2】本発明の修飾ポリペプチド、修飾 G L P - 1 アゴニストの例である、配列番号 1 3 ~ 1 4 および 1 6 ~ 3 1 のポリペプチドのアミノ酸配列を表す。

【図 3】3 A は、脂肪酸で修飾した G L P - 1 が胃腸管の運動を減少させたことを示す折れ線グラフである。3 B は、 2 2 k D の P E G で修飾した G L P - 1 が胃腸管の運動を減少させたが、 4 3 k D の P E G で修飾した G L P - 1 は胃腸管の運動を減少させなかつたことを示す折れ線グラフである。

【図 4】2 2 k D または 3 0 k D の P E G で修飾した本発明の G L P - 1 アゴニスト（配列番号 2 6 ）は胃腸管の運動を減少させたが、 4 3 k D の P E G で修飾した同じ G L P - 1 アゴニストペプチドは胃腸管の運動を減少させなかつたことを示す折れ線グラフである。

【図 5】4 3 k D の P E G で修飾された本発明の G L P - 1 アゴニスト（配列番号 2 6 ）が、 I C V 注入された場合に胃腸管の運動を減少させることを示す棒グラフである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer Pharmaceuticals Corporation
Pan, Clark
Whelan, James

<120> Modified GLP-1 Receptor Agonists and Their Pharmacological Methods of Use

<130> MSB-7296

<150> US 60/408,696 10
<151> 2002-09-16

<150> US 60/439,369
<151> 2003-01-09

<160> 34

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg 20 25 30 20

<210> 2
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly 20 25 30

<210> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens 30

<400> 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

10

<210> 5
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

20

<210> 6
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

30

<210> 7
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

10

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 11
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 11
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Cys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 12
<211> 31

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Cys Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 13
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 14
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Cys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 15
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Cys Arg Gly
20 25 30

<210> 16
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

10

20

30

40

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Cys Gly
20 25 30

<210> 17
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

10

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 18
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

20

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Cys
20 25 30

<210> 19
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly
20 25 30

30

Ser Cys

<210> 20
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Pro
20 25 30

Pro Pro Cys
35

<210> 21
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 21

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly
20 25 30

Ser Gly Gly Ser Cys
35

<210> 22
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 23
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 23

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 24
<211> 31

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Lys
20 25 30

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Cys
20 25 30

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Cys
20 25 30

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

10

20

30

40

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly
20 25 30

<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Cys Gly Arg Gly Gly
20 25 30

<210> 30
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Cys Gly
20 25 30

<210> 31
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys
35 40

<210> 32
<211> 3
<212> PRT
<213> Peptide Linker
<400> 32

10

20

30

Gly Gly Ser
1

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Peptide Linker

<400> 33

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Peptide Linker

<400> 34

Pro Pro Pro Ser
1

10

【図1】

ペプチド	式別	配列番号
GLP-1(7-36)	HAEGTFTSDVSYLEGAAKEFIAWLVKGR-NH ₂	1
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSYLEGAAKEFIAWLVKGRG	2
Exendin-4	HGEGLFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPS-SOAPPPS-NH ₂	3
G27	HSQGIFTTSVDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGR-NH ₂	4
G51	HSQGIFTTSVDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGRG	5
GX	HSQGIFTTSVDYARLDRRAKEFIAWLVRORG	6
G1	HSQGIFTTSVDYSKYLDSSRRAQDFQWLVKGR-NH ₂	7
G5	HSQGIFTTSVDYSKYLEGAAKEFIAWLVKGR-NH ₂	8
G55	HSQGIFTTSVDYARLDRRAKEFIAWLVKGR-NH ₂	9
G56	HSQGIFTTSVDYAYILDARRAKEFIAWLVKGR-NH ₂	10

Figure 1

【図2】

ペプチド	式別	配列番号
G73	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGRG	13
G74	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGRG	14
G76	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGC	16
G77	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKRC	17
G78	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKRC	18
G79	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGRSC	19
G80	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGRPPSC	20
G81	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGRGSGSSC	21
G82	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVRORG	22
G83	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVRORG	23
G84	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVKGRG	24
G85	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVRORG	25
G185	HSQGIFTSDYAKYLDRRAKEFIAWLVRORG	26
GLP-1	HAEGLFTSDVSYLEGAAKEFIAWLVKGRG	27
GLP-1	HAEGLFTSDVSYLEGAAKEFIAWLVKGRGG	28
GLP-1	HAEGLFTSDVSYLEGAAKEFIAWLVKRGCG	29
GLP-1	HAEGLFTSDVSYLEGAAKEFIAWLVKGRG	30
Exendin-4	HGEGLFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSGAPPSC	31

Figure 2

*PEG10-シクレオチドを用いて、側鎖のジメチルアミノ基を導入したアミノ酸を組合せた。
下線を付したアルファは、PEG結合の位置を示す。

【図3a】

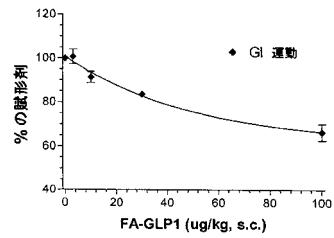


Figure 3a

【図3b】

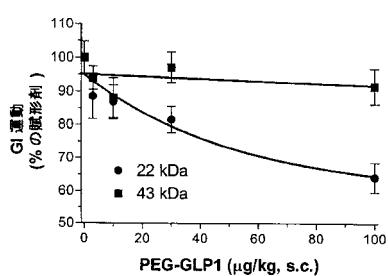


Figure 3b

【図4】

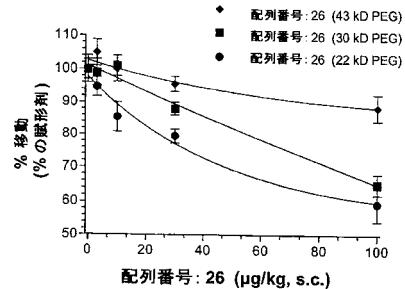


Figure 4

【図5】

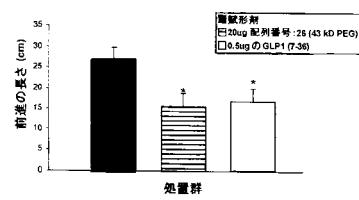
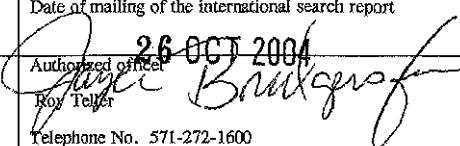


Figure 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/28093
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 38/00 US CL : 514/2, 12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2, 12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) West and STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BYRNE et al. Glucagon-like peptide 1 improves the ability of the B-cell to sense and respond to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. Diabetes. August 1998, Vol. 47, pages 1259-1265.	1-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 October 2004 (15.10.2004)	Date of mailing of the international search report <i>26 Oct 2004</i>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer  Telephone No. 571-272-1600	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 6 1 K 38/26 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/28 (2006.01)	A 6 1 K 37/28	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 K 37/26	
	C 1 2 N 5/00	A

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

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA05 DA06 EA04 GA11 HA03
 4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA26X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C076 AA22 AA36 AA56 AA58 AA95 BB01 BB15 CC21 CC29 CC30
 CC41 DD23 DD29 DD37 DD38 DD41 DD67 EE23 EE31 EE32
 EE38 EE41 EE42 EE53 EE59 FF31 FF33 FF65 FF68
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA17 AA19 BA01 BA08 BA19 CA18 CA53
 DB34 DB35 MA02 MA23 MA35 MA37 MA52 MA66 NA03 NA06
 NA10 NA12 NA13 NA14 ZA42 ZA70 ZB21 ZB22 ZC03 ZC20
 ZC35 ZC41 ZC75
 4C086 AA01 AA02 AA03 BC19 MA01 MA02 MA04 MA23 MA35 MA37
 MA52 MA66 NA03 NA06 NA10 NA12 NA13 NA14 ZA42 ZA70
 ZB21 ZB22 ZC03 ZC20 ZC35 ZC41 ZC75
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA18 BA19 BA57 EA27 EA28 FA33 FA74
 GA25