(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2008-546816
(P2008-546816A)
(43)公表日　平成20年12月25日(2008.12.25)

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| C07K 14/47 | (2006.01) | C07K 14/47 | ZNA | 4C084 |
| A61K 38/00 | (2006.01) | A61K 37/02 | | 4H045 |
| A61P 3/10 | (2006.01) | A61P 3/10 | | |
| C07K 14/605 | (2006.01) | C07K 14/605 | | |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 32 頁）

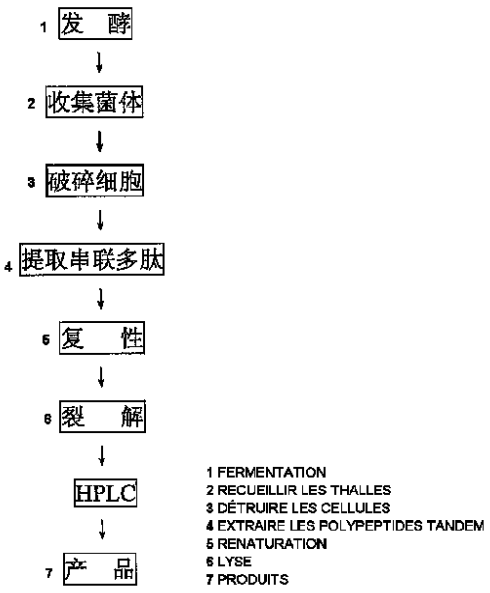
(21)出願番号　特願2008-518600 (P2008-518600)
(86)(22)出願日　平成18年6月29日 (2006.6.29)
(85)翻訳文提出日　平成20年2月14日 (2008.2.14)
(86)国際出願番号　PCT/CN2006/001495
(87)国際公開番号　WO2007/000118
(87)国際公開日　平成19年1月4日 (2007.1.4)
(31)優先権主張番号　200510040823.8
(32)優先日　平成17年6月29日 (2005.6.29)
(33)優先権主張国　中国 (CN)

(71)出願人　507422194
チャンツオ　ファーマシューティカル　ファクトリー　シーオー．，エルティーディー．
中国　２１３０１８，ジィアンスー，チャンツオ，ケイリング　ロード　ナンバー２
(74)代理人　110000659
特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
(72)発明者　マ，シャオペン
中国　２１３０１８，ジィアンスー，チャンツオ，ケイリング　ロード　ナンバー２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】エキセンディン４ポリペプチドフラグメントおよびその使用

(57)【要約】
【解決課題】本発明は、低血糖活性を有し、ＩＩ型真性糖尿病の治療に使用することができるエキセンディン４ポリペプチドフラグメントに関する。
【解決手段】本明細書中に記載のポリペプチド配列は、ＨＧＥＧＴＸ$_1$ＴＳＤＬＳＫＱＸ$_2$ＥＥＥＡＶＸ$_3$ＬＦＩＥＷＬＫＮＧＸ$_4$ＰＸ$_5$（式中、Ｘ$_1$は、ＰｈｅまたはＴｙｒを示し、Ｘ$_2$は、Ｍｅｔ、Ｉｌｅ、またはＬｅｕを示し、Ｘ$_3$は、Ｌｙｓを示し、Ｘ$_4$は、Ｇｌｙを示すか欠失し、Ｘ$_5$は、Ａｒｇを示すか欠失する）である。さらに、エキセンディン４ポリペプチドフラグメントの調製方法に関する。
【選択図】１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）：
ＨＧＥＧＴＸ$_1$ＴＳＤＬＳＫＱＸ$_2$ＥＥＥＡＶＸ$_3$ＬＦＩＥＷＬＫＮＧＸ$_4$ＰＸ$_5$（Ｉ）
（式中、
Ｘ$_1$は、ＰｈｅまたはＴｙｒを示し、
Ｘ$_2$は、Ｍｅｔ、Ｉｌｅ、またはＬｅｕを示し、
Ｘ$_3$は、Ｌｙｓを示し、
Ｘ$_4$は、Ｇｌｙを示すか欠失し、
Ｘ$_5$は、Ａｒｇを示すか欠失する）によって示される配列を含む、ポリペプチドおよびその薬学的に許容可能な塩またはエステル。
【請求項２】
Ｘ$_1$がＴｙｒである、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
Ｘ$_2$がＭｅｔである、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４】
Ｘ$_4$が欠失している、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５】
Ｘ$_1$がＴｙｒであり、Ｘ$_2$がＭｅｔであり、Ｘ$_3$がＬｙｓであり、Ｘ$_4$が欠失しており、Ｘ$_5$がＡｒｇであるか欠失している、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項６】
１種または数種の請求項１～請求項５に記載のポリペプチドを含む、薬学的組成物。
【請求項７】
薬学的に許容可能な希釈剤、賦形剤、またはキャリアをさらに含む、請求項６に記載の薬学的組成物。
【請求項８】
前記キャリアが、エタノール、グリセロール、および水から１つまたは複数選択される、請求項７に記載の薬学的組成物。
【請求項９】
前記ポリペプチドを使用して真性糖尿病を処置した、請求項１～請求項５に記載のポリペプチドの使用。
【請求項１０】
前記真性糖尿病はＩＩ型真性糖尿病をいう、請求項９に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、低血糖活性を有し、ＩＩ型真性糖尿病の治療に使用することができる短縮エキセンディン４ポリペプチドフラグメントに関する。
【背景技術】
【０００２】
現代の食生活および生活様式のために、世界中の多くの国々で糖尿病患者が年々増加している。今日では、それぞれ、中国で５０００万人、インドで６０００万人、米国で１８００万人、および日本で６００万人の患者が存在する。
【０００３】
糖尿病には以下の２つの型が存在する：インスリン依存性糖尿病（Ｉ型糖尿病）および非インスリン依存性糖尿病（ＩＩ型糖尿病）。ＩＩ型糖尿病の症例は、この疾患の９０％超を占める。ＩＩ型糖尿病患者は、種々の症状（食後の不十分なインスリン分泌、インスリン分泌時間の遅延、高血糖値、その他多くの症状など）を示す。肥満ＩＩ型糖尿病患者の末梢インスリン受容体のインスリン感受性が減少し、それにより、血糖値が上昇し、それに伴って血中インスリンレベルおよびヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）レベルが８％を超え

て上昇する（非糖尿病範囲は４～６％）。結果として、心疾患および腎不全などの糖尿病合併症が起こる。したがって、ＩＩ型糖尿病の有効な治療の手掛かりは、血糖値を減少させることである。

【０００４】

現在、糖尿病治療に使用される薬物は、大きく分けて以下の６つのカテゴリーに分類される：インスリン分泌促進薬（スルホニル尿素およびメグリチニドなど）、インスリン非分泌促進薬（インスリン、α－グルコシダーゼインヒビター、ビグアニド、およびチアゾリンジオンなど）。しかし、非特許文献１による６年間の何千ものＩＩ型糖尿病患者についての追跡研究報告の１つに示すように、上記の６つの薬物クラスはＩＩ型糖尿病患者に有効ではない。これらの薬物は全て膵臓のβ細胞の絶え間ない悪化を防止することができず、ＨｂＡ１ｃレベルを減少させて、心疾患および腎不全などの糖尿病性合併症を防止することができなかった。したがって、ＩＩ型糖尿病療法のための新規の薬物を開発する必要がある。

【０００５】

１９９５年に、エキセンディン４についての特許文献１が付与された。エキセンディン４は、アメリカ南西部に生息するアメリカドクトカゲ（Ｈｅｌｏｄｅ　Ｓｕｓｐｅｃｔｕｍ）の唾液から単離された。この３９アミノ酸ポリペプチドは、グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）とアミノ酸配列レベルが４０％同一である。

【０００６】

エキセンディン４（ＧＬＰ－１のアナログ）はＧＬＰ－１受容体に結合すると報告されている。エキセンディン４は、プロインスリン合成およびインスリン分泌を刺激し、それにより、血糖値が低下する。エキセンディン４は、血糖が正常レベルに回復するまで作用し続ける。エキセンディン４は、低血糖による意識障害およびショックを回避するので、安全且つ有効である。エキセンディン４は、ＨｂＡ１ｃレベルを減少させ、β細胞量を増加させ、ＩＩ型糖尿病患者中のインスリン受容体の感受性を増強し、グルカゴンなどの分泌を阻害する。Ｂｙｅｔｔａと呼ばれる市販のエキセンディン４は、２００５年４月にＦＤＡによって市販が承認された（非特許文献２；非特許文献３；非特許文献４；非特許文献５；非特許文献６；非特許文献７；非特許文献８；非特許文献９；非特許文献１０；非特許文献１１；非特許文献１２；非特許文献１３を参照のこと）。

【０００７】

多くの研究者によって、より有効且つ調製に都合がよく、より多くのエキセンディン４の代替物が得られるより多くの変異型（ｖａｒｉａｎｔ）を得る目的でエキセンディン４ポリペプチドを修飾する努力がなされている。短縮エキセンディン４ポリペプチドは、特許文献２として公表されており、これは、Ｃ末端にＡｒｇまたはＴｙｒを有する３０個のアミノ酸残基から構成される。米国のＬｉｌｌｙ　Ｃｏｍｐａｎｙは、糖尿病を長期にわたって安全に治療することができる一連のＧＬＰ－１アナログを開発した（特許文献３を参照のこと）。しかし、上記のこれらの例は、ＧＬＰ－１受容体の結合能力、島細胞腫瘍のインスリン分泌量、およびサイクリックＡＭＰ（ｃＡＭＰ）の産生量によってｉｎ　ｖｉｔｒｏでのみ評価されていると言う点で非常に制限される（非特許文献１４；非特許文献１５；非特許文献１６；特許文献４を参照のこと）。

【特許文献１】米国特許第５，４２４，２８６号
【特許文献２】ＣＮ　１２２７５６７Ａ
【特許文献３】ＷＯ　０２０４７７１６Ａ
【特許文献４】ＷＯ　０３０１１８９２Ａ
【非特許文献１】ＵＫ　Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ　Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｓｔｕｄｙ（ＵＫＰＤＳ）
【非特許文献２】Ｄｉａｂｅｔｅｓ（１９９７）４６　４３３－４３９
【非特許文献３】ｉｂｉｄ（１９９５）４４　１２４９－１２５８
【非特許文献４】Ｉｂｉｄ（２００２）５１　２７９６－２８０３
【非特許文献５】Ｉｂｉｄ（１９９４）５３　２３９７－２４０３

【非特許文献６】Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｃａｒｅ（２００２）２５ ３３０－３３６
【非特許文献７】Ｉｂｉｄ（２０００）２３ ６４－６９
【非特許文献８】ｉｂｉｄ（２００４）２ ２６２３－２６３５
【非特許文献９】ＪＡＭＡ（２００２）２８７ ３７３－３７９
【非特許文献１０】Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．（２００２）３４６ ３９３－４３６
【非特許文献１１】Ｌａｎｃｅｄ（１９９８）３５２ ８３７－８５３
【非特許文献１２】Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ（２００５）１４６（４）２０６９－２０７０
【非特許文献１３】Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ Ｍｅｔａｂ（２００４）８９ ３４６９－３４７３
【非特許文献１４】Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ（１９９７）２７２ ２１２０１－２１２０６
【非特許文献１５】Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ（２００３）１１４ １５３－１５８
【非特許文献１６】Ｔｒｅｎｄ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉ．（２００３）２４ ３７７－３８３

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
既存のテクノロジーの不利点を克服するために、本発明者らは、そのＣ末端にＰｒｏを有する新規のＣ末端短縮エキセンディン４ポリペプチドフラグメントを追求した。この構造を有するポリペプチドは、ペプチド鎖の約１／４が短縮されて産生を促進するが、糖尿病治療のための新規の代替物を提供することに注目すべきである。さらに、短縮エキセンディン４は有効にカルボキシペプチダーゼ耐性を示し、その低血糖活性を長期間維持することができる。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
１つの態様では、本開示は、式（Ｉ）：
$HGEGTX_1TSDLSKQX_2EEEAVX_3LFIEWLKNGX_4PX_5$（Ｉ）
（式中、
$X_1$は、ＰｈｅまたはＴｙｒを示し、
$X_2$は、Ｍｅｔ、Ｉｌｅ、またはＬｅｕを示し、
$X_3$は、Ｌｙｓを示し、
$X_4$は、Ｇｌｙを示すか欠失し、
$X_5$は、Ａｒｇを示すか欠失する）によって示される配列を有する、エキセンディン４ポリペプチドフラグメントおよびその薬学的に許容可能な塩またはエステルを提供する。
【００１０】
式（Ｉ）のエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの６番目のアミノ酸残基（$X_1$）は、Ｔｙｒであることが好ましい。薬物動態学研究に関して、分子内のＰｈｅは、$^{125}$Ｉ標識を容易にするＴｙｒに置換される。
【００１１】
式（Ｉ）のエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの１４番目のアミノ酸残基（$X_2$）は、Ｍｅｔ、Ｉｌｅ、またはＬｅｕに代わり、Ｍｅｔが好ましい。
【００１２】
式（Ｉ）のエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの３０番目のアミノ酸残基（$X_4$）は、欠失していることが好ましい。
【００１３】
好ましくは、ポリペプチドフラグメントは、以下である：$X_1$がＴｙｒであり、$X_2$がＭｅｔであり、$X_3$がＬｙｓであり、$X_4$が欠失しており、$X_5$がＡｒｇであるか欠失している。

【００１４】
本発明では、用語「本発明のエキセンディン４ポリペプチドフラグメント」は、その配列を式（Ｉ）に示す短縮エキセンディン４ポリペプチドをいう。本発明では、このポリペプチドを、簡潔に、「Ｅ４（ｆ）」、「ポリペプチドフラグメント」、または「本発明のポリペプチド」と呼んだ。
【００１５】
式（Ｉ）によって示されるポリペプチドフラグメントは、Ｎ末端アミノ基、Ｃ末端カルボキシル基、アミノ酸側鎖基のいずれかが未修飾であるか、基本的に本発明のポリペプチドの活性（「薬学的に許容可能なエステル」の形成など）に影響を与えることなく修飾される。アミノ酸側鎖基の修飾には、リジンのε－アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジン、またはリジンのＮ－アルキルの脱アシル化が含まれるが、これら限定されない。Ｎ末端アミノ基の修飾には、Ｎ短鎖アルキル、Ｎ短鎖ジアルキル、およびＮ－アシルの脱アミノ化および修飾が含まれるが、これらに限定されない。Ｃ末端カルボキシル基の修飾には、アミド、短鎖アルキルアミド、ジアルキルアミド、および短鎖アルキルエステルが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、末端基は、当業者に公知の保護基（アセチル、トリフルオロアセチル、Ｎ－（９－フルオレニル）メトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）、アリルオキシカルボニル（Ａｌｌｏｃ）、$Ｃ_{1\sim6}$アルキル、$Ｃ_{2\sim8}$アルケニル、$Ｃ_{7\sim9}$アラルキルなど）によって保護される。好ましくは、本発明の式（Ｉ）によって示されるポリペプチドフラグメントは、Ｎ末端アミノ基、Ｃ末端カルボキシル基、およびアミノ酸側鎖基が修飾されていない（すなわち、Ｎ末端基が依然としてＮ末端のＨｉｓのα－アミド（$－ＮＨ_2$）であり、Ｃ末端基が依然としてＣ末端のＰｒｏのカルボキシル（－ＣＯＯＨ）である）。ＰｒｏのＣ末端カルボキシル基がアミド化される（すなわち、$－ＣＯＮＨ_2$）ことも好ましい。
【００１６】
本発明では、ポリペプチド、アミノ酸、および化学基の表示は、当該分野で十分に認識されている。アミノ酸の略語を表１に示す。本発明では、他で特に示さない限り、一般に、アミノ酸はＬ－アミノ酸をいう。
【００１７】
【表１】

アミノ酸およびその略語

| アミノ酸 | 三文字表記 | 一文字表記 | アミノ酸 | 三文字表記 | 一文字表記 |
|---|---|---|---|---|---|
| アラニン | Ala | A | ロイシン | Leu | L |
| アルギニン | Arg | R | ロイシン | Leu | L |
| アスパラギン | Asn | N | リジン | Lys | K |
| アスパラギン酸 | acid | Asp | メチオニン | Met | M |
| システイン | Cys | C | フェニルアラニン | Phe | F |
| グルタミン | Gln | Q | プロリン | Pro | P |
| グルタミン酸 | acid | Glu | セリン | Ser | S |
| グリシン | Gly | G | トレオニン | Thr | T |
| ヒスチジン | His | H | トリプトファン | Trp | W |
| イソロイシン | Ile | I | チロシン | Tyr | Y |

【００１８】
用語「薬学的に許容可能な塩」は、ポリペプチドと組み合わせた酸性または塩基性小化合物の塩をいう。形成された塩は、一般に、ポリペプチドの溶解性を増強し、基本的に、ポリペプチドの活性に影響を及ぼさない。例えば、酸には、一般に、本発明のポリペプチドと塩を形成することができる塩酸、リン酸、硫酸、酢酸、コハク酸、マレイン酸、クエン酸などが含まれる。塩基には、一般に、本発明のポリペプチドと塩を形成することができるアルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム、炭酸塩などの水酸化物が含まれる。

【００１９】
本発明のポリペプチドの低血糖値に及ぼす影響を、当該分野の日常的方法（細胞生物学、動物実験など）を使用して立証する。本発明の実施形態では、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験の制約を克服するために、好ましくは、糖尿病動物モデル（ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウス、Ｇｏｔｏ－Ｋｏｋｉｚａｋｉ（ＧＫ）ＩＩ型ラット、糖尿病ＫＫマウス、アロキサン誘導性糖尿病マウス）を使用して、低血糖値の影響をアッセイする。これらの動物実験は、本発明で式（Ｉ）によって示されるエキセンディン４ポリペプチドフラグメントがｉｎ　ｖｉｖｏで低血糖活性を維持する連続的効果を有し、糖尿病治療のために使用されることを示す。

【００２０】
したがって、別の態様では、本発明は、糖尿病の治療、特に、ＩＩ型糖尿病の治療のために使用することができる式（Ｉ）によって示されるエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの薬学的組成物を提供する。薬学的組成物は、１種または数種の本発明のエキセンディン４ポリペプチドフラグメント、好ましくはたった１つのエキセンディン４ポリペプチドフラグメントを含む。この薬学的組成物は、１種または数種の薬学的に許容可能な希釈剤、賦形剤、またはキャリアを含む。好ましくは、この薬学的組成物を、錠剤、薄膜、丸薬、カプセル（徐放性形態および遅延放出形態が含まれる）、粉末、顆粒、チンキ剤、シロップ、乳濁液、滅菌注射液または懸濁液、エアゾールまたは液体スプレー、ドロップ、注射、自動注射デバイス、および座剤などの薬学的単位投薬形態として供給した。１つの実施形態では、上記の有効成分の錠剤またはカプセルとしての経口投与を、薬学的に許容可能なキャリアおよび非毒性不活性（ｉｎｅｒｔｉａ）キャリア（エタノール、グリセロール、水のみ、または組み合わせなど）と組み合わせることができる。ＷＯ２００４０３５７５４Ａ号およびＷＯ２００４０３６１８６Ａ号は、それぞれ、エキセンディン４ポリペプチドフラグメントの制御放出投薬形態に適用可能な投薬形態を公表しており、好ましくは、この投薬形態は、本発明の式（Ｉ）によって示される活性ポリペプチドに推奨される（ＷＯ２００４０３５７５４Ａ号およびＷＯ２００４０３６１８６Ａ号の両開示は、その全体が本明細書中で参考として援用される）。

【００２１】
本発明はまた、好ましくは、ＩＩ型糖尿病療法のために使用される、糖尿病療法のための薬物調製物に対する上記化合物または薬学的組成物の適用を提供する。本発明の薬学的組成物を、当業者に周知の薬物投与経路（経口送達、直腸投与、舌下投与、肺薬物送達、経皮薬物送達、イオン導入法、膣投与、および鼻腔内送達など）によって投与する。好ましくは、本発明の薬学的組成物を、非経口注射（皮下投与、筋肉内投与、および静脈内投与など）によって投与する。本発明の薬物は、インスリンを調整し、最終的に、正常な血糖値を持続的に維持することができる。投薬量は、投薬形態、予想される効果の持続時間、および治療目的によって変化し得る。臨床投薬量を、実情（例えば、患者の病状および体重など）に従って医師が都合良く決定することができる。正常な成人について、投薬量は、０．１μｇ～１００μｇ／日の範囲、好ましくは１μｇ～２０μｇ／日の範囲、好ましくは５μｇ～１０μｇ／日の範囲である。投薬量を、市販のエキセンディン４ポリペプチド薬の投薬量の参照によって決定することもできる。

【００２２】
本発明はまた、ポリペプチドの化学合成法を提供する。ポリペプチドの化学合成法は、

当業者は熟知している。詳細なスキームを、以下の文献中の方法（“Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，２ｎｄ Ｅｄ” ｂｙ Ｊ．Ｍ．Ｓｔｅｗａｒｄ ａｎｄ Ｊ．Ｄ．Ｙｏｕｎｇ，Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ（１９８４）および“Ｈｏｒｍｏｎａｌ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ” ｂｙ Ｊ．Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，Ｖｏｌｕｍｅ ＩＩ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９７３）を参照したポリペプチドの固相合成法など）にしたがって行うことができる。ペプチドの液相合成法については“Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ” ｂｙ Ｅ．Ｓｃｈｒｏｄｅｒ ａｎｄ Ｋ．Ｌｕｂｋｅ，Ｖｏｌｕｍｅ Ｉ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９５６）に記載がある．全引例の開示は、その全体が本明細書中で参考として援用される。１つの実施形態では、本発明は、好ましくは、ポリペプチドの固相合成法を使用する。

【００２３】

別の態様では、本発明は、大腸菌におけるコドン使用頻度の偏りを使用したＥ４（ｆ）ポリペプチドフラグメントの核酸配列を提供する。例えば、本発明のポリペプチドの核酸配列が大腸菌中で発現する場合、発現産物を、大腸菌のコドン使用頻度の偏りによって至適化することが好ましい。

【００２４】

本発明はまた、上記ポリペプチドを産生するための遺伝子操作方法を提供する。本方法は、ａ）本発明のポリペプチドを発現する宿主細胞の発酵、およびｂ）発現産物の抽出および精製を含む。本方法は、さらに、発現産物の切断プロセスを含む。中程度の分子量（２０～６０アミノ酸残基）のポリペプチドの発現レベルは、通常低く、容易に分解される。したがって、１つのアプローチは、標的ポリペプチド遺伝子をキャリアタンパク質遺伝子に連結することであり、標的タンパク質が融合タンパク質として発現する。その後、標的タンパク質を、化学的方法または酵素的方法を使用して、切断、抽出、および、精製によって融合タンパク質から得ることができる。本方法の欠点は、タンパク質収率が低く、手順が複雑であると言う点である。別のアプローチは、ポリペプチドのアミノ酸配列に基づく。複数の標的遺伝子コピーを縦列に連結し、適当な促進剤により駆動される。縦列に連結した標的タンパク質を、切断によって調製することができる。このアプローチは、ポリペプチド調製の多くの実際の症例（ヒトインスリン（Ｐｒｏｃ，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．１９８４ ８１ ４６２７－４６３１）、カルシトニン（ＪＰ６２－２２６９９８）、ＧＬＰ－１（ＷＯ９５／１７５１０）など）で成功している。このアプローチの利点は、発現タンパク質の収率が非常に高いと言う点である。好ましくは、本発明のポリペプチドを、上記のように複数の遺伝子縦列連結法を使用して発現する。連結ポリペプチドを、当該分野の日常的方法を使用して切断する。例えば、シトラコン酸無水物でのＬｙｓ残基の保護後、多量体ポリペプチドのＡｒｇ部位をトリプシンで切断し、その後に酸処理によってシトランコン酸基を除去する（Ｊ．Ｄ．Ｂａｘｔｅｒ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ １９８０ ２８５ ４５６－４６１；ＪＰ６２－２２６９９８を参照のこと）。１つの好ましい実施形態では、図１に示すように、上記方法は、ａ）本発明のポリペプチドを発現する細菌細胞の発酵、ｂ）細菌細胞の採取、ｃ）細胞溶解、ｄ）多量体ポリペプチドの抽出、ｅ）調製されたポリペプチドの再折り畳み、ｆ）切断、およびｇ）高速液体クロマトグラフィ（ＨＰＬＣ）を使用した最終ポリペプチドの精製を含む。

【００２５】

キャリアタンパク質に連結される場合に限り、遺伝子操作技術によって発現した標的ポリペプチド（２０～６０アミノ酸残基）を得ることができる。融合タンパク質分子が１つの標的ポリペプチド分子のみを含み、これが融合タンパク質の約１０％しか占めないので、標的タンパク質の収率は非常に低い。さらに、融合タンパク質切断後に多くの他の非標的タンパク質も得られ、このことが標的ポリペプチドの精製を非常に困難にしている。本発明では、複数のポリペプチド遺伝子を縦列に連結し、発現した融合タンパク質が標的ポリペプチドのみから構成される。切断されたポリペプチドは、単一形態のみで存在し、収

率は前者の方法の１０倍であり、このことが精製手順を非常に容易にする。本発明では、$X_3$部位は、Ｌｙｓとして存在し、融合タンパク質は分子間部位（Ａｒｇ部位）でのみ切断され、$E_4$（ｆ）の完全性が確保される。

【００２６】

$E_4$（ｆ）中のＣ末端のＰｒｏ残基は、カルボキシペプチダーゼＡおよびＢに対して耐性を示し、分子の安定性を増強する。

【００２７】

実際、$E_4$（ｆ）の中間体として、$E_4$（ｆ）Ａｒｇ中のＡｒｇ残基は血液中のカルボキシペプチダーゼＢによって迅速に除去され、$E_4$（ｆ）Ａｒｇが加水分解されて$E_4$（ｆ）を形成し、$E_4$（ｆ）および$E_4$（ｆ）Ａｒｇの両方が有効である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２８】

以下の実施例は、本発明を説明するために提供するものであって、本発明の範囲を制限すると決して解釈すべきではない。さらに、全引例の開示全体が本明細書中で参考として援用される。本発明は、添付の図面と併せて以下の実施形態を考慮してより明確に理解されるであろう。したがって、以下の実施形態を本発明を説明するために提供したものであって、本発明の範囲を制限すると決して捕らえるべきではないと理解しなければならない。本発明によれば、本明細書中に記載の発明に加えて、本発明の種々の修正形態が当業者に明らかである。さらに、全引例の開示全体が本明細書中で参考として援用される。

【実施例１】

【００２９】

エキセンディン４ポリペプチド変異型の固相合成法

複数の完全自動化ＳｙＲｏＩＩペプチド合成機を使用した固相ペプチド合成法によってポリペプチドを合成する。Ｎ－（９－フルオレニル）メトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）を使用して、アミノ酸のα－アミドを保護する。アミノ酸側鎖を保護するために、他の保護基（Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｓｅｒ、およびＴｈｒのためのｔｅｒｔ－ブチル、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、およびＨｉｓのためのトリチル（Ｔｒｔ）、ＬｙｓおよびＴｒｐのためのｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）、Ａｒｇのための２，２，５，７，８－５－ペンタメチル－クロマン－６－スルホニル（Ｐｍｃ）など）も使用される。活性化試薬としてのＮ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド／１－ヒドロキシベンゾトリアゾールの使用により、各抱合反応について４０分間保護アミン酸を１つずつ抱合する。１５％エタンジチオール／硫化ジメチル／アニソール（１：１：１／ｖ／ｖ／ｖ）の存在下で、ポリペプチドを８５％トリフルオロ酢酸と室温で１２０分間反応させ、次いで、樹脂から切断し、同時に脱保護する。無水エーテルによる沈殿後、沈殿物を無水エーテルで数回洗浄してメルカプタンを完全に除去する。次いで、ポリペプチドを、水／ｔｅｒｔ－ブチルアルコール（１：１）で沈殿させ、粗ポリペプチドに凍結乾燥させる。粗ポリペプチドを、３０分以内の３７～４２％アセトニトリル／０．９％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）勾配での逆相ＨＰＬＣによって精製する。溶離液を濃縮し、凍結乾燥させる。最終白色固体生成物の純度は、９７％超である。

【００３０】

配列番号１、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、および配列番号１２の配列を有する固相エキセンディン４ポリペプチド変異型を、それぞれ、実施例１に記載の方法に従って調製した。

【実施例２】

【００３１】

生物光学によるエキセンディン４ポリペプチド変異型の産生手順

１）４つの遺伝子フラグメントの化学合成（Ｓｈａｎｇｈａｉ Ｂｉｏｃｏｌｏｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｃｈｉｎａ）

（１）配列番号１７；

（２）配列番号１８；
（３）配列番号１９；
（４）配列番号２０。
【００３２】
２）遺伝子フラグメントのライゲーション：
５０μｌの水を、４つの合成遺伝子に添加し（$A_{260nm}$＝２）、それぞれ（１）、（２）、（３）、および（４）とラベルし、２μｌの（１）および（４）をマイクロチューブに取り出して混合し、２μｌの（２）および（３）を別のマイクロチューブに取り出して混合する。１μｌの１０×Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液、１μｌ ＡＴＰ（０．１ｍｏｌ／Ｌ）、および１０μＬ Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを両方のマイクロチューブに添加し、３７℃で３０分間保持し、９５℃の水浴中に５分間保持し、室温に冷却し、２つのマイクロチューブ由来の成分を混合し、２μｌの１０×リガーゼ緩衝液、１μｌ ＡＴＰ（０．１ｍｏｌ／Ｌ）、および２μｌ Ｔ４リガーゼを添加し、マイクロチューブを１６℃で２時間保持し、リガンドフラグメントをＤＮＡ分画キット（Ｓｈａｎｇｈａｉ Ｂｉｏｃｏｌｏｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｃｈｉｎａ；Ｐｒｏｍｅｇａ ｃｏｍｐａｎｙ，ＵＳＡ）を使用して精製し、ＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩで消化後、フラグメントを電気泳動によって分析する。
【００３３】
３）クローニング
１μｇのｐＵＣ１８プラスミド（Ｓｈａｎｇｈａｉ Ｂｉｏｃｏｌｏｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｃｈｉｎａ）を清潔なチューブに添加する。１μｌの１０×制限酵素緩衝液を添加する。１μｌのＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩ酵素をそれぞれ添加する。３７℃で３０分間インキュベートする。フェノール：クロロホルムを使用して抽出する。マイクロチューブを遠心分離して、相を分離する。上清を清潔なチューブに取り出す。クロロホルムで再度抽出する。遠心分離によってクロロホルムを除去する。６０％イソプロパノールを使用してＤＮＡを沈殿させる。チューブを遠心分離してＤＮＡを回収し、次いで、ペレットを乾燥させ、使用するまでＤＮＡを保管する。工程（２）で調製したＥｃｏＲＩおよびＳａｌＩ消化ＤＮＡフラグメントを上記の同一酵素で消化したプラスミドと混合する。１μｌの１０×ライゲーション緩衝液、１μｌ ＡＴＰ、および２μｌ Ｔ４リガーゼを添加する。１６℃で１２時間インキュベートする。大腸菌ＪＭ１０９株コンピテント細胞調製物を、日常的方法の使用によって作製する。上記のライゲーション反応混合物を形質転換のために使用する。形質転換体の陽性クローンを選別し、プラスミドを抽出する。
【００３４】
４）連結
工程（３）由来の変異ポリペプチド遺伝子を含むベクターを、ＢｇｌＩＩおよびＳａｌＩで二重消化し、この変異ポリペプチド含有ＤＮＡフラグメントを抽出する。また、工程（３）由来のベクターを、ＢａｍＨＩおよびＳａｌＩで二重消化し、２つの変異ポリペプチド遺伝子を含むベクターを、２つの消化変異ポリペプチド含有ＤＮＡフラグメントのライゲーションによって得る。この得られたベクターを、ＢｇｌＨＩおよびＳａｌＩでさらに消化し、２つの遺伝子を含むフラグメントを得る。このフラグメントを、ＢａｍＨＩおよびＳａｌＩで予め消化した２つの遺伝子を含むベクターにライゲーションし、４つの遺伝子を含むベクターを作製する。同様に、８個、１６個、または３０個の遺伝子を含むベクターを、この方法によって得ることができる。
【００３５】
５）形質転換
変異ポリペプチドを含むプラスミドをＪＭ１０９大腸菌のコンピテント細胞と混合する。氷上で３０分間保持する。正確に４２℃の水浴中で２分間細胞に熱ショックを与える。氷上に移す。形質転換培養物を、１％アガロースおよび５０μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＬＢプレート上にプレートする。プレートを３７℃で一晩インキュベートする。１つの

形質転換体コロニーを、５０μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＬＢ培養培地を含むフラスコに取り出す。培養物を激しく震盪しながら３７℃で一晩成長させる。０．３ｍｌの５０％グリセロールを０．７ｍｌの一晩培養物に添加し、完全に混合し、使用するまで－８５℃で保存する。

【００３６】

６）発酵方法による変異ポリペプチドの産生手順（図１に示す流れ図）

最初に、１０００ｍｌのＬＢ培養培地（１０ｇ　Ｂａｃｔｏ－トリプトン、５ｇ　Ｂａｃｔｏ－酵母抽出物、５ｇ　ＮａＣｌ）を調製し、１２０℃で３０分間オートクレーブする。室温に冷却し、その後、アンピシリンを添加する（最終濃度１００μｇ／ｍｌ）。保存チューブ由来の１ｍｌ細胞培養物を、工程（５）で調製したグリセロールとインキュベートする。培養物を、激しく震盪しながら３７℃で一晩成長させる。５，０００ｒｐｍでの遠心分離によって細胞培養物を回収する。－３５℃での凍結後、細胞培養物を解凍し、６Ｍ塩酸グアニジンを添加する。サンプルを均質化し、連結ポリペプチドを抽出し、１８，０００ｒｐｍでの遠心分離によって上清を回収する。上清を新規のチューブに取り出し、透析緩衝液（１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．２）、０．１％メルカプトエタノール）を添加し、ポリペプチドを再度折り畳む。連結したポリペプチドを、遠心分離によって単離する。次いで、連結ポリペプチドを、Ｊ．Ｄ．　Ｂａｘｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ　１９８０，２８５，４５６－４６１）に記載の方法にしたがって切断する。連結したポリペプチドを水に溶解し、$Na_2CO_3$を添加してｐＨ８．５にする。シトラコン酸無水物を添加して、ｐＨ８．５で封入体を完全に溶解する。チューブを室温で２時間ボルテックスおよびインキュベートする。トリプシンおよびカルボキシペプチダーゼＢを添加する。３７℃で２時間のインキュベーション後、連結したポリペプチドを得る。３Ｎ塩酸を添加して、ｐＨ値を３に調整し、４時間ボルテックスし、シトラコン酸保護基を脱保護して、本発明の配列番号２の配列を有する最終精製エキセンディン４ポリペプチドを得る。反応の完了を、ＨＰＬＣによってモニタリングすることができる。

【００３７】

配列番号１、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、および配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントを、それぞれ、実施例２と同一の方法によって調製した。

【００３８】

ポリペプチド変異型および対応する遺伝子フラグメントの配列番号を以下に示す。

配列番号１の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号１３；（２）配列番号１４；（３）配列番号１５；（４）配列番号１６。
配列番号３の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号２１；（２）配列番号２２；（３）配列番号２３；（４）配列番号２４。
配列番号４の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号２５；（２）配列番号２６；（３）配列番号２７；（４）配列番号２８。
配列番号５の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号２９；（２）配列番号３０；（３）配列番号３１；（４）配列番号３２。
配列番号６の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号３３；（２）配列番号３４；（３）配列番号３５；（４）配列番号３６。
配列番号７の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号３７；（２）配列番号３８；（３）配列番号３９；（４）配列番号４０。
配列番号８の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号４１；（２）配列番号４２；（３）配列番号４３；（４）配列番号４４。
配列番号９の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号４５；（２）配列番号４６；（３）配列番号４７；（４）配列番号４８。
配列番号１０の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号４９；（２）配列番号５０；（３）配列番号５１；（４）配列番号５２。

配列番号１１の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号５３；（２）配列番号５４；（３）配列番号５５；（４）配列番号５６。
配列番号１２の配列を有するポリペプチドの対応する遺伝子フラグメント：
（１）配列番号５７；（２）配列番号５８；（３）配列番号５９；（４）配列番号６０。
【実施例３】
【００３９】
エキセンディン４ポリペプチドフラグメントの維持された低血糖活性のアッセイ
体重５０ｇのＫＫ　ＩＩ型糖尿病マウス（Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｃｈｉｎａから購入）を、２時間の絶食に供し、４つの群に分ける。２群に２μｇエキセンディン４を注射し、他の２群に本発明に示した２μｇエキセンディン４ポリペプチドフラグメントを注射する。２４μｌの血液サンプルを、それぞれ、試験物質投与から０、０．５、１、２、３、４、５、および６時間後に絶食動物から得る。維持された低血糖活性を、血糖アッセイキット（Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｃｈｉｎａから購入）の使用によって分析する。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、および配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの対応する結果を、図７、図２、図１２、図１７、図２２、図２７、図３２、図３７、図４２、図４７、図５２、および図５７にそれぞれ示す。
【実施例４】
【００４０】
ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおけるエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性アッセイ
体重５０ｇのｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウス（Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｃｈｉｎａから購入）を、２時間の絶食に供し、試験動物に、２μｇの用量のエキセンディン４ポリペプチドフラグメントを皮下注射した。２０μｌの血液サンプルを、それぞれ、試験物質投与から０、０．５、および２時間後に絶食動物から得た。維持された低血糖活性を、血糖アッセイキット（Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｃｈｉｎａから購入）の使用によって分析する。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、および配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの対応する結果を、図８、図３、図１３、図１８、図２３、図２８、図３３、図３８、図４３、図４８、図５３、および図５８にそれぞれ示す。
【実施例５】
【００４１】
Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおけるエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性
５月齢（体重４７０ｇ）のＧｏｔｏ－Ｋｏｋｉｚａｋｉ糖尿病ラット（Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｃｈｉｎａから購入）を、外科的手順のために得た。２時間の絶食に供した後、試験動物に１ｍｌの用量の２０％グルコースを腹腔内注射によって投与し、５μｇの用量のエキセンディン４ポリペプチドフラグメントを皮下注射によって投与した。コントロール群に、グルコースのみを投与した。２４μｌの血液サンプルを、それぞれ、試験物質投与から０、０．５、１、および２時間後に絶食動物から得た。維持された低血糖活性を、血糖アッセイキット（Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｃｈｉｎａから購入）の使用によって決定する。結果を図４に示す。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す

。

【００４２】

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、および配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの対応する結果を、図９、図４、図１４、図１９、図２４、図２９、図３４、図３９、図４４、図４９、図５４、および図５９にそれぞれ示す。

【実施例６】

【００４３】

アロキサン誘導性マウスにおけるエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性

８週齢（体重２０ｇ）のマウスを、外科的手順のために得た。マウスの実験的糖尿病を、（１６ｍｇ／ｍｌ）０．１ｍｌアロキサンの微静脈注射によって誘導した。動物を５つの群に分ける。４８時間後、２μｇのエキセンディン４ポリペプチドフラグメントを注射した。２４μｌの血液サンプルを、それぞれ、試験物質投与から０、０．５、１、および２時間後に絶食動物から得た。低血糖活性を、血糖アッセイキット（Ｓｈａｎｇｈａｉ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｃｈｉｎａから購入）の使用によって決定する。５つの糖尿病マウス群全てで有意な低血糖活性が認められた。

【００４４】

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、および配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの対応する結果を、図１０、図５、図１５、図２０、図２５、図３０、図３５、図４０、図４５、図５０、図５５、および図６０にそれぞれ示す。

【実施例７】

【００４５】

エキセンディン４ポリペプチドフラグメントによるインスリン分泌刺激

６月齢（体重４７０ｇ）のＧｏｔｏ Ｋｏｋｉｚａｋｉ ＩＩラットを、外科的手順のために得た。試験動物に、５μｇの用量のエキセンディン４ポリペプチドを皮下注射によって投与し、コントロール動物群に生理食塩水のみを投与した。２０μｌの血液サンプルを、それぞれ、試験物質投与から０、３、５、１０、１５、３０、および４５分間後に絶食動物から得た。エキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌を、ＥＬＩＳＡキット（Ｄｉａｎｏｓｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｌａｂ Ｉｎｃ．，ＵＳＡ）の使用によって決定する。結果を、図６に示す。配列番号２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドの皮下注射によって投与された試験群動物は、第１段階インスリン分泌を回復した。

【００４６】

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、および配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの対応する結果を、図１１、図６、図１６、図２１、図２６、図３１、図３６、図４１、図４６、図５１、図５６、および図６１にそれぞれ示す。

【実施例８】

【００４７】

配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、および配列番号７２の配列を有する固相エキセンディン４ポリペプチド変異型を、それぞれ、実施例１に記載の方法にしたがって調製した。

【００４８】

実施例３、４、５、６、７に記載の方法にしたがって、ｄｂ／ｄｂ　ＩＩ糖尿病マウスにおける持続された低血糖活性のアッセイ、低血糖活性アッセイ、Ｇｏｔｏ－Ｋｏｋｉｚａｋｉ　ＩＩ型糖尿病ラットにおける食後低血糖活性アッセイ、アロキサン誘導性マウスにおける低血糖活性アッセイ、およびインスリン分泌刺激アッセイを、エキセンディン４ポリペプチドフラグメント（配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、および配列番号７２）を使用して行った。上記全ポリペプチドフラグメントにおいて有意な低血糖アッセイが認められた。

【００４９】

ＫＫ　ＩＩ型糖尿病マウス、ｄｂ／ｄｂ　ＩＩ糖尿病マウス、およびアロキサン誘導性糖尿病マウスの血糖は、エキセンディン４ポリペプチドフラグメント（配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、および配列番号７２）の使用によって、６時間以内に３５％～５０％、４時間以内に５０％～６０％、２時間以内に３０％～４０％持続して減少した。Ｇｏｔｏ－Ｋｏｋｉｚａｋｉ　ＩＩ型糖尿病ラットの絶食血糖は、エキセンディン４ポリペプチドフラグメント（配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、および配列番号７２）の使用によって、２時間以内に１０％～２０％継続的に減少した。エキセンディン４ポリペプチドフラグメント（配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、および配列番号７２）の注射によって投与した試験群のインスリン分泌は回復した。

【図面の簡単な説明】

【００５０】

【図１】遺伝子操作法を使用したエキセンディン４ポリペプチドフラグメント調製物の流れ図。

【図２】配列番号２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。

【図３】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。

【図４】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。

【図５】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。

【図６】配列番号２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。

【図７】配列番号１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。

【図８】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。

【図９】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。

【図１０】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。

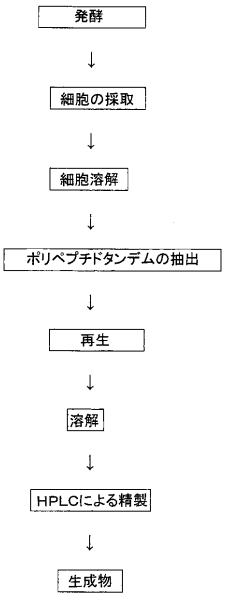
【図１１】配列番号１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール

群を示す。
【図１２】配列番号３の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図１３】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号３の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図１４】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号３の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図１５】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号３の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図１６】配列番号３の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図１７】配列番号４の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図１８】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号４の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図１９】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号４の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図２０】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号４の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図２１】配列番号４の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図２２】配列番号５の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図２３】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号５の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図２４】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号５の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図２５】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号５の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図２６】配列番号５の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図２７】配列番号６の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図２８】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号６の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図２９】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号６の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図３０】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号６の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図３１】配列番号６の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図３２】配列番号７の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続

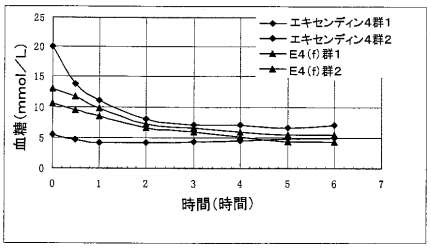
された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図３３】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号７の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図３４】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号７の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図３５】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号７の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図３６】配列番号７の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図３７】配列番号８の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図３８】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号８の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図３９】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号８の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図４０】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号８の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図４１】配列番号８の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図４２】配列番号９の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図４３】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号９の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図４４】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号９の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図４５】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号９の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図４６】配列番号９の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図４７】配列番号１０の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図４８】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号１０の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図４９】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号１０の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図５０】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号１０の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図５１】配列番号１０の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図５２】配列番号１１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図５３】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号１１の配列を有するエキセンデ

ィン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図５４】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号１１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図５５】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号１１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図５６】配列番号１１の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。
【図５７】配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの持続された低血糖活性のエキセンディン４との比較。
【図５８】ｄｂ／ｄｂＩＩ糖尿病マウスにおける配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図５９】Ｇｏｔｏ－ＫｏｋｉｚａｋｉＩＩ型糖尿病ラットにおける配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの食後低血糖活性。曲線１は、コントロール群を示す。曲線２は投与群を示す。
【図６０】アロキサン誘導性マウスにおける配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントの低血糖活性。
【図６１】配列番号１２の配列を有するエキセンディン４ポリペプチドフラグメントによって刺激されたインスリン分泌。曲線１は、投与群を示す。曲線２はブランクコントロール群を示す。

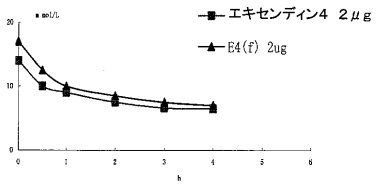
【図１】



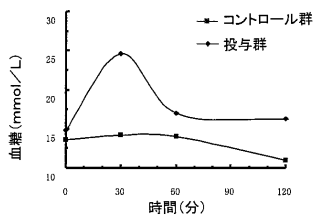

【図２】



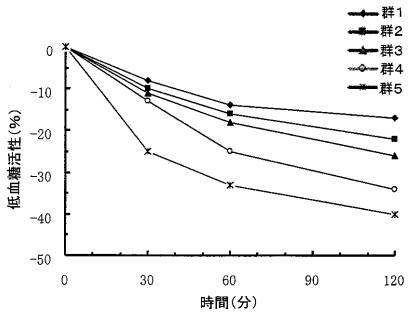

【図３】



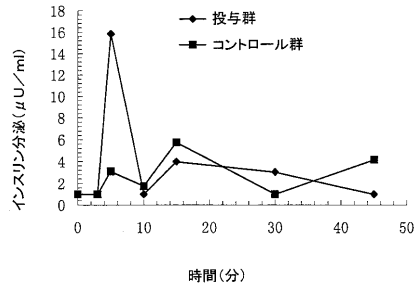

【図４】



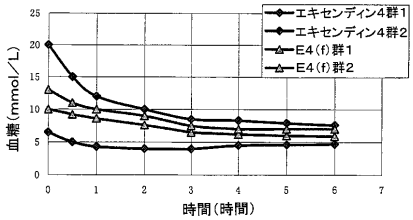
【図５】



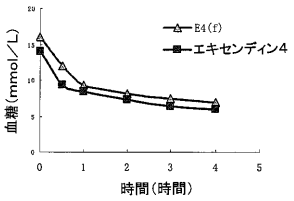

【図６】



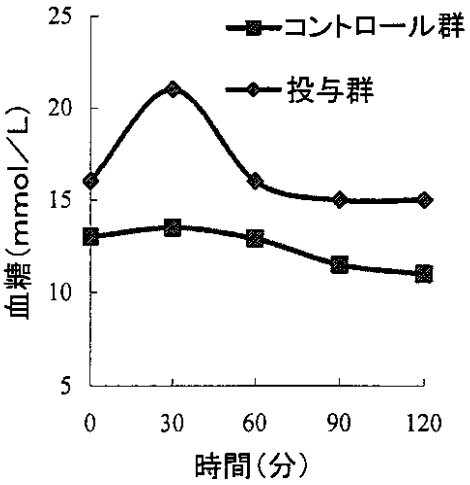

【図７】



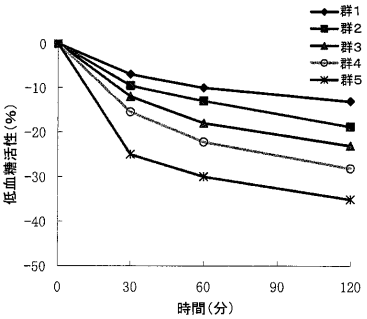

【図８】



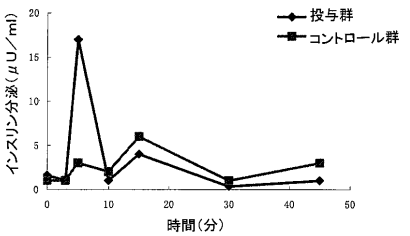

【図９】



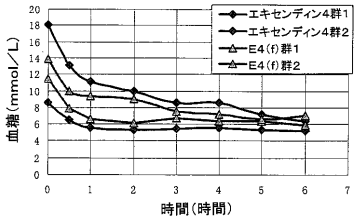

【図１０】



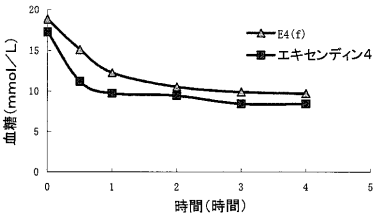

【図１１】



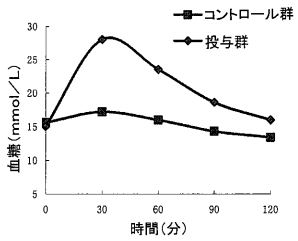
【図１２】



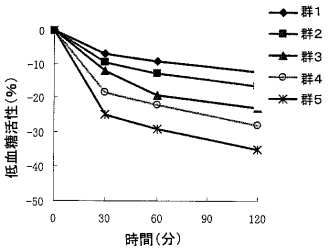

【図１３】



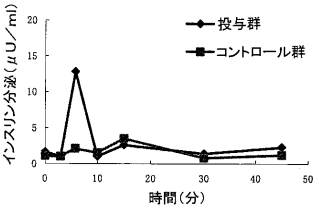

【図１４】



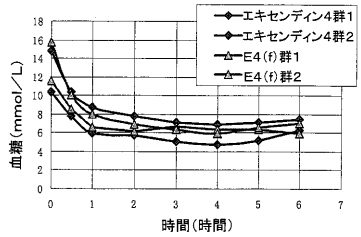

【図１５】



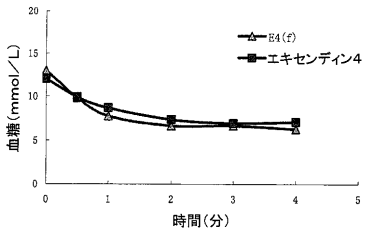

【図１６】



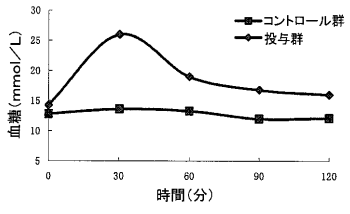

【図１７】



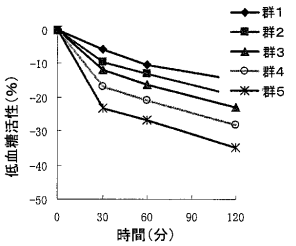

【図１８】



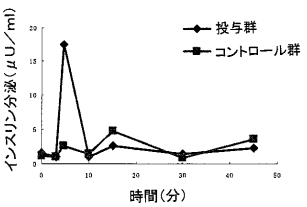

【図１９】



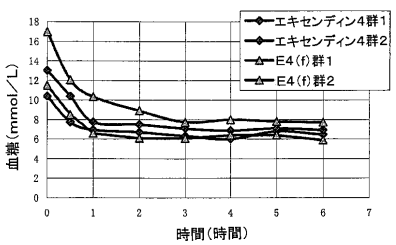

【図２０】



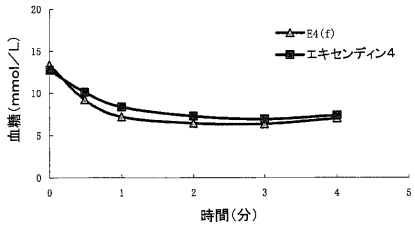

【図２１】



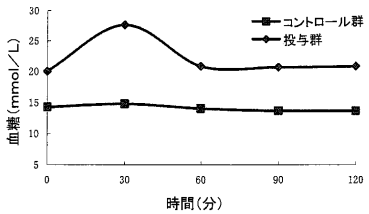

【図２２】



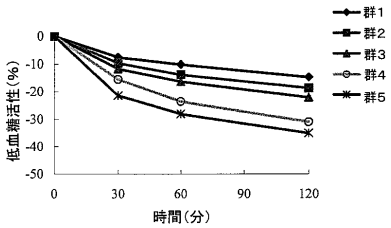
【図２３】



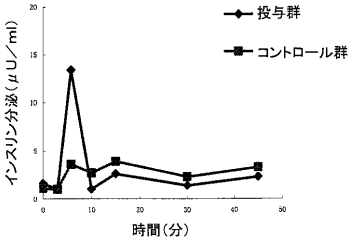

【図２４】



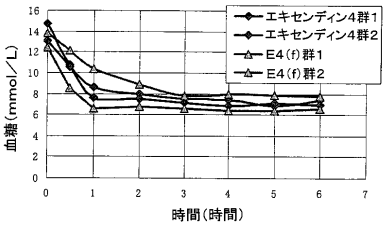

【図２５】



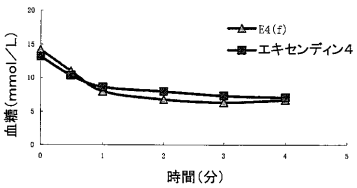

【図２６】



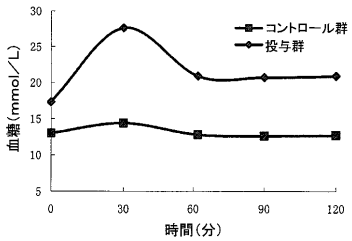

【図２７】



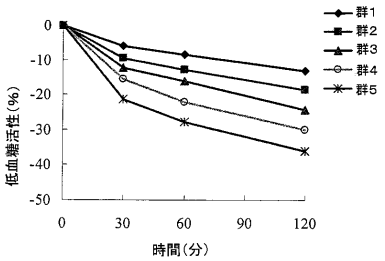

【図２８】



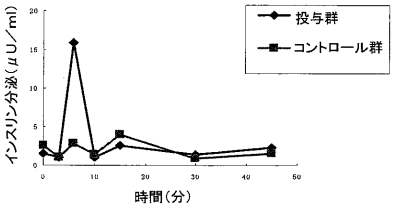

【図２９】



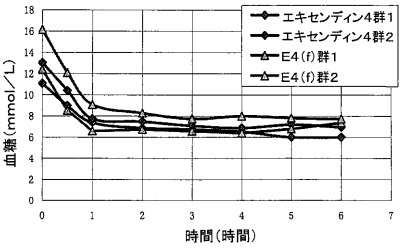

【図３０】



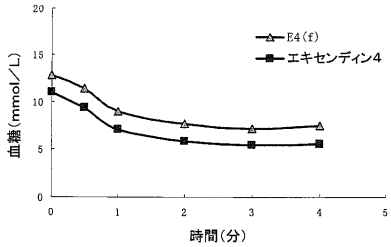

【図３１】



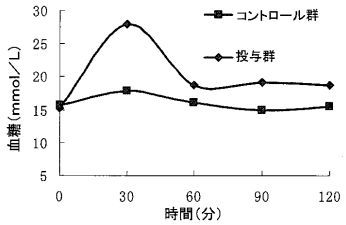

【図３２】



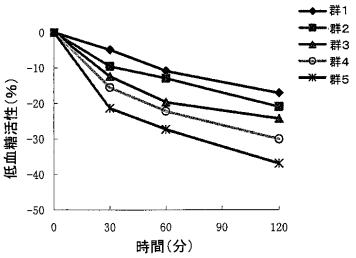
【図３３】



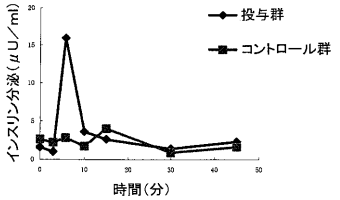

【図３４】



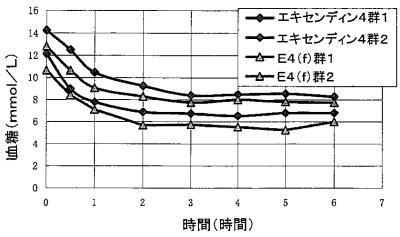

【図３５】



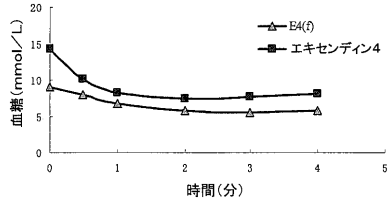

【図３６】



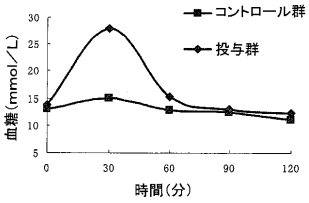

【図３７】



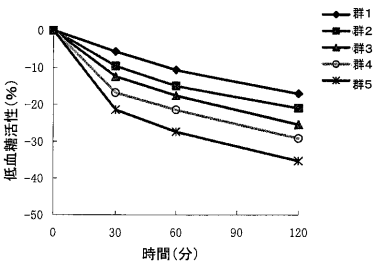

【図３８】



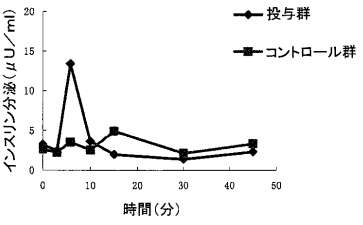

【図３９】



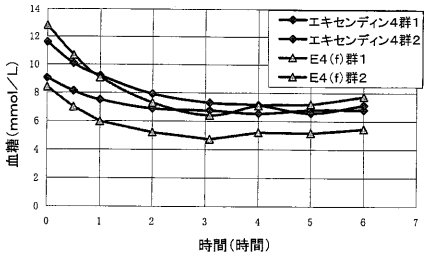

【図４０】



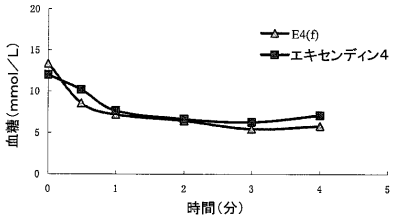

【図４１】



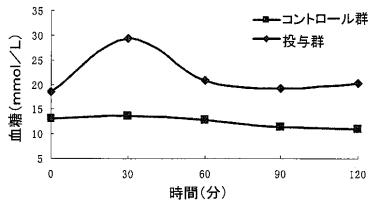
【図４２】



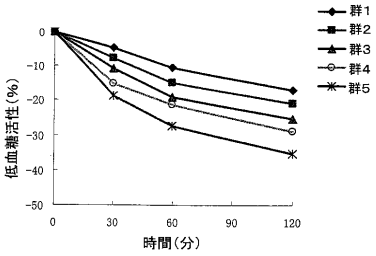

【図４３】



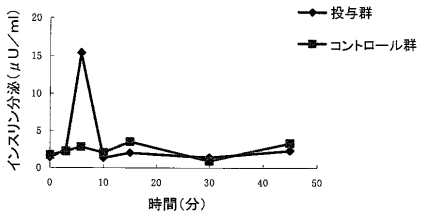

【図４４】



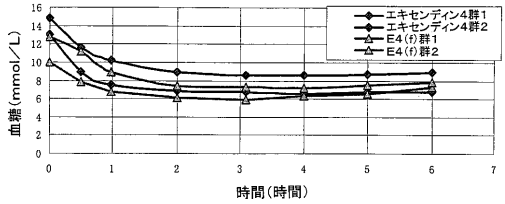

【図４５】



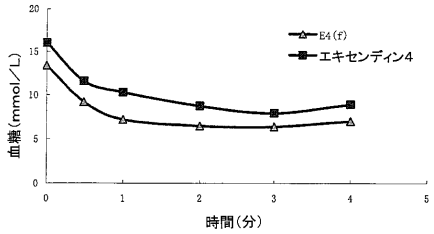

【図４６】



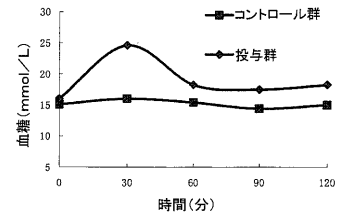

【図４７】



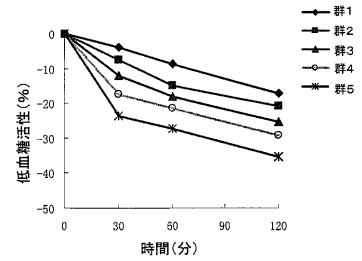

【図４８】



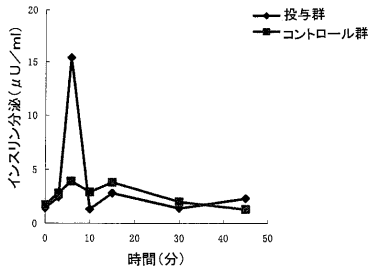

【図４９】



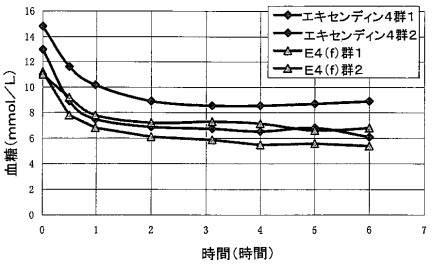

【図５０】



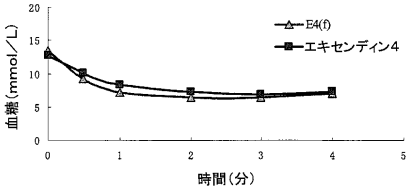

【図５１】



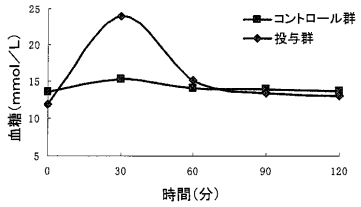

【図５２】



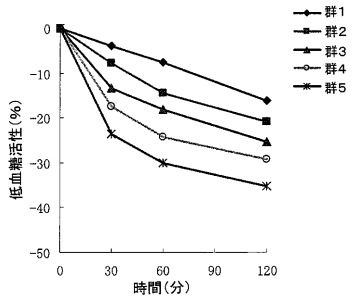

【図５３】



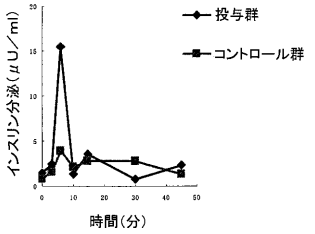
【図５４】



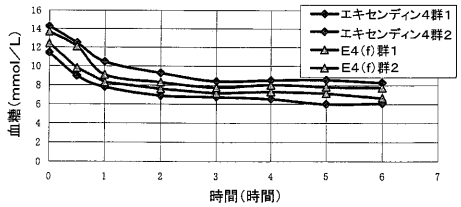

【図５５】



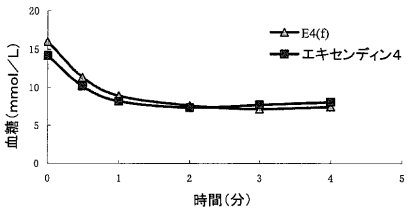

【図５６】



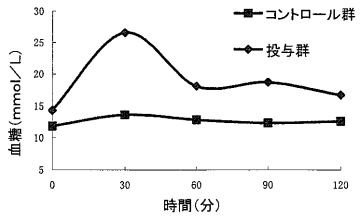

【図５７】



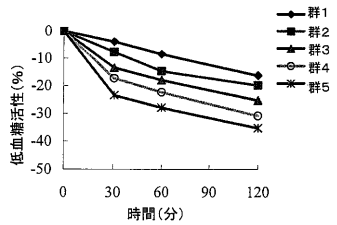

【図５８】



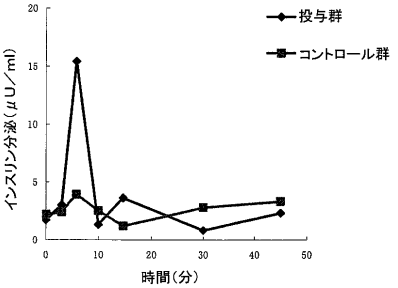

【図５９】




【図６０】




【図６１】



【配列表】
2008546816000001.app

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/001495

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet
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)

IPC[8]: C07K, A61K, A61P

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)

WPI, EPODOC, PAJ, WEB OF KNOWLEDGE, ELSEVIER, GENBANK, CPRS, CNKI (exendin, exenatide, GLP, glucagon like peptide, analog, analogue, derivate, derivative, SEQ ID NO:1-12, 61-72 et al)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO,A2,9925727 (AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.) 27. May 1999 (27.05.1999), see examples 38, 39 and claims 1-50 | 1-3, 6-10 |
| A | | 4-5 |
| X | WO,A2,2005000222 (AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.) 06. Jan. 2005 (06.01.2005), see SEQ ID NO.76 and 77 of table 1 | 1-3, 6-10 |
| A | | 4-5 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25.Sep. 2006 (25.09.2006)

Date of mailing of the international search report
26 · OCT 2006 (26 · 10 · 2006)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
LIN, Junkai

Telephone No. (86-10) 62085096

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/001495

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | US,B1,6858576 (AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.) 22. Feb. 2005 (22.02.2005), see the whole document | 1-10 |
| A | WO,A2,0247716 (ELILILLY AND COMPANY) 20. Jun. 2002 (20.06.2002), see the whole document | 1-10 |
| A | CN,A,1227567 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 01. Sep. 1999 (01.09.1999), see the whole document | 1-10 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/001495

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|---|---|---|
| WO,A2,9925727 | 27.05.1999 | AU,A,1404699 | 07.06.1999 |
| | | BR,A,9815670 | 17.10.2000 |
| | | EP,A1,1066314 | 10.01.2001 |
| | | NZ,A,504258 | 20.12.2002 |
| | | JP,T,2003522721T | 29.07.2003 |
| | | MX,A1,2000004670 | 01.07.2003 |
| | | AU,A1,2003200129 | 17.04.2003 |
| WO,A2,2005000222 | 06.01.2005 | US,A,2005215475 | 29.09.2005 |
| | | EP,A,1631308 | 08.03.2006 |
| | | US,A,2006172001 | 03.08.2006 |
| US,B1,6858576 | 22.02.2005 | WO,A,9805351 | 12.02.1998 |
| | | CA,A,2262647 | 12.02.1998 |
| | | AU,A,4063697 | 25.02.1998 |
| | | EP,A,0966297 | 29.12.1999 |
| | | JP,T,2001501593T | 06.02.2001 |
| | | US,A,2004266692 | 30.12.2004 |
| | | US,A,2005043238 | 24.05.2005 |
| | | US,A,2005215469 | 29.09.2005 |
| WO,A2,0247716 | 20.06.2002 | MX,A1,2003005135 | 01.01.2004 |
| | | AU,A,200239384 | 24.06.2002 |
| | | EP,A2,1390061 | 25.02.2004 |
| | | US,A1,2004053819 | 18.03.2004 |
| | | JP,T,2004521093T | 15.07.2004 |
| | | CN,A,1501809 | 02.06.2004 |
| CN,A,1227567 | 01.09.1999 | US,B1,6767887 | 27.07.2004 |
| | | WO,A1,9746584 | 11.12.1997 |
| | | DE,A1,19622502 | 02.01.1998 |
| | | DE,A1,19637230 | 19.03.1998 |
| | | AU,A,3173297 | 05.01.1998 |
| | | EP,A1,0915910 | 19.05.1999 |
| | | BR,A,9710452 | 17.08.1999 |
| | | AU,B,723694 | 31.08.2000 |
| | | MX,A1,9810361 | 01.07.1999 |
| | | JP,T,2000516912T | 19.12.2000 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/001495

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/575 (2006.01) i
A61K 38/22 (2006.01) i
A61P 3/10 (2006.01) i
A61P 3/00 (2006.01) i

# 国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2006/001495

**A. 主题的分类**

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

**B. 检索领域**

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC[8]：C07K, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

WPI, EPODOC, PAJ, WEB OF KNOWLEDGE, ELSEVIER, GENBANK, CPRS, CNKI (exendin、exenatide、GLP、glucagon like peptide、analog、analogue、derivate、derivative、胰高血糖素类似肽、衍生物、类似物、SEQ ID NO：1-12，61-72 等)

**C. 相关文件**

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| X | WO,A2,9925727 (AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.) 27. 5 月 1999（27.05.1999），见实施例 38 和 39、权利要求 1-50 | 1-3，6-10 |
| A | | 4-5 |
| X | WO,A2,2005000222 (AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.) 06. 1 月 2005（06.01.2005），见表 1 的 SEQ ID NO.76 和 77 | 1-3，6-10 |
| A | | 4-5 |
| A | US,B1,6858576 (AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.) 22. 2 月 2005（22.02.2005），见全文 | 1-10 |

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

| 国际检索实际完成的日期 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 25.9 月 2006 (25.09.2006) | 26·10月 2006 (26·10·2006) |
| 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088<br>传真号： (86-10)62019451 | 受权官员 林峻凯<br>电话号码：(86-10)62085096 |

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/001495

C(续). 相关文件

| 类 型 | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| A | WO,A2,0247716 (ELILILLY AND COMPANY) 20.6 月 2002 （20.06.2002），见全文 | 1-10 |
| A | CN,A,1227567 (曼海姆泊灵格股份公司) 01.9 月 1999 （01.09.1999），见全文 | 1-10 |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/001495

| 检索报告中引用的专利文件 | 公布日期 | 同族专利 | 公布日期 |
|---|---|---|---|
| WO,A2,9925727 | 27.05.1999 | AU,A,1404699 | 07.06.1999 |
| | | BR,A,9815670 | 17.10.2000 |
| | | EP,A1,1066314 | 10.01.2001 |
| | | NZ,A,504258 | 20.12.2002 |
| | | JP,T,2003522721T | 29.07.2003 |
| | | MX,A1,2000004670 | 01.07.2003 |
| | | AU,A1,2003200129 | 17.04.2003 |
| WO,A2,2005000222 | 06.01.2005 | US,A,2005215475 | 29.09.2005 |
| | | EP,A,1631308 | 08.03.2006 |
| | | US,A,2006172001 | 03.08.2006 |
| US,B1,6858576 | 22.02.2005 | WO,A,9805351 | 12.02.1998 |
| | | CA,A,2262647 | 12.02.1998 |
| | | AU,A,4063697 | 25.02.1998 |
| | | EP,A,0966297 | 29.12.1999 |
| | | JP,T,2001501593T | 06.02.2001 |
| | | US,A,2004266692 | 30.12.2004 |
| | | US,A,2005043238 | 24.05.2005 |
| | | US,A,2005215469 | 29.09.2005 |
| WO,A2,0247716 | 20.06.2002 | MX,A1,2003005135 | 01.01.2004 |
| | | AU,A,200239384 | 24.06.2002 |
| | | EP,A2,1390061 | 25.02.2004 |
| | | US,A1,2004053819 | 18.03.2004 |
| | | JP,T,2004521093T | 15.07.2004 |
| | | CN,A,1501809 | 02.06.2004 |
| CN,A,1227567 | 01.09.1999 | US,B1,6767887 | 27.07.2004 |
| | | WO,A1,9746584 | 11.12.1997 |
| | | DE,A1,19622502 | 02.01.1998 |
| | | DE,A1,19637230 | 19.03.1998 |
| | | AU,A,3173297 | 05.01.1998 |
| | | EP,A1,0915910 | 19.05.1999 |
| | | BR,A,9710452 | 17.08.1999 |
| | | AU,B,723694 | 31.08.2000 |
| | | MX,A1,9810361 | 01.07.1999 |
| | | JP,T,2000516912T | 19.12.2000 |
| | | KR,A,2000016389 | 25.03.2000 |

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/001495

主题的分类

C07K 14/575 (2006.01) i
A61K 38/22 (2006.01) i
A61P 3/10 (2006.01) i
A61P 3/00 (2006.01) i

フロントページの続き

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

(72)発明者 ウオン，ビン
中国 ２１３０１８，ジィアンスー，チャンツオ，ケイリング ロード ナンバー ２
(72)発明者 シー，シャオキィ
中国 ２１３０１８，ジィアンスー，チャンツオ，ケイリング ロード ナンバー ２

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA19 CA59 NA03 NA12 ZC352
4H045 AA10 AA30 BA18 BA19 CA53 EA27 FA34 FA58