

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3877530号
(P3877530)

(45) 発行日 平成19年2月7日(2007.2.7)

(24) 登録日 平成18年11月10日(2006.11.10)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 7 K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415	
A 6 1 K 36/42 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	S
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
C O 7 K 1/14 (2006.01)	C O 7 K 1/14	

請求項の数 1 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2000-611560 (P2000-611560)	(73) 特許権者	501401571
(86) (22) 出願日	平成11年9月28日 (1999.9.28)		カハンナ, プシュパ
(65) 公表番号	特表2002-543047 (P2002-543047A)		KHANNA, Pushpa
(43) 公表日	平成14年12月17日 (2002.12.17)		インド, ニュー デリー, 110 0
(86) 国際出願番号	PCT/IN1999/000052		57, バサント ヴィーハー, 1階
(87) 国際公開番号	W02000/061619		イー14/7
(87) 国際公開日	平成12年10月19日 (2000.10.19)	(74) 代理人	100085453
審査請求日	平成15年5月12日 (2003.5.12)		弁理士 野▲崎▼ 照夫
(31) 優先権主張番号	560/DEL/99	(72) 発明者	カハンナ, プシュパ
(32) 優先日	平成11年4月13日 (1999.4.13)		インド, ニュー デリー, 110 0
(33) 優先権主張国	インド (IN)		57, バサント ヴィーハー, 1階
(31) 優先権主張番号	561/DEL/99		イー14/7
(32) 優先日	平成11年4月13日 (1999.4.13)		
(33) 優先権主張国	インド (IN)	審査官	斎藤 真由美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ツルレイシ (ニガウリ、Momordica charantia) から取得された蛋白質／ポリペプチド-k

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ツルレイシ (Momordica charantia) から抽出されるポリペプチド-kからなるタンパク質であり、

前記ポリペプチドは160のアミノ酸残基で構成されており、

前記アミノ酸残基は、アスパラギン酸、トレオニン、セリン、グルタミン、プロリン、システイン、グリシン、アラニン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジン、トリプトファン、アルギニンで構成されており、

前記ポリペプチド-kには、以下に示すアミノ酸が以下に示すモルパーセント (mol %) で存在しており、

アスパラギン酸	9.4%
トレオニン	3.0%
セリン	5.3%
グルタミン	17.1%
プロリン及びシステイン	5.5%
グリシン	8.9%
アラニン	7.3%
バリン	6.8%
メチオニン	1.5%

10

20

イソロイシン	4. 8 %
ロイシン	8. 2 %
チロシン	2. 7 %
フェニルアラニン	4. 2 %
ヒスチジン	3. 1 %
アルギニン	9. 2 %

i. 水に不溶性であるが、pH 9. 5では部分的に可溶性であり、10%蟻酸には完全に可溶性であり、

ii. 遊離N末端を有し、

iii. 安定で、

iv. 18ヶ月の品質保持期間を有し、

v. 234℃の燃焼点を有し、かつ

vi. ウシのインスリンで検査した場合、交差反応を示さない、特性を有する前記ポリペプチド-k。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ツルレイシから抽出されたポリペプチド-kと称される非常に有効な血糖降下蛋白質に関する。本発明はまた、前記ポリペプチド-kのツルレイシからの抽出法を提供する。さらに本発明は、前記抽出物を用いて、糖尿病の治療に有用な新規な血糖降下組成物を提供する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

インスリンは従来、動物の膵臓から、またヒトのインスリンは大腸菌から商業的に合成されてきた（米国イーライリリー社）。これまでのところ、植物性の供給源からのポリペプチドのようなインスリンの商業的な抽出の報告はない。

【0003】

動物の膵臓からのインスリンの単離は、以下の理由のため反対を受けやすい：

1. 10,000匹の動物を殺すことによって、わずか1ポンドの純粋なインスリンが得られるにすぎない。

2. それは舌下に投与されていない。

3. もし膵臓が何らかの病気に感染しているとしたら、インスリンと一緒にそれが運ばれる（もしそれがウイルスであれば）可能性が常に存在する。

4. ヒトのインスリンは大腸菌から合成されるが、それは高価である。

【0004】

通常のインスリン抽出法におけるこれらのおよび他の不利益を除去するべく、科学者達は植物を基材とする製品に焦点を合わせた。

【0005】

ツルレイシは、アジアにおいて広く栽培されているウリ科の多年生草本である。この草は、インド、南アフリカ、フィリピン、中国、およびビルマのような熱帯地方の特産である。西洋において見られるモルディカ属の種は、熱帯の種と異なっており、形態学および感覚器官を刺激する性質が異なる。この植物の様々な部分特に果実は、血糖降下性の薬理学的組成物の調製に広く用いられてきた。

【0006】

インド特許第136565号において、出願人はツルレイシからの「ポリペプチド-p」と称される蛋白質の抽出法を開示している。乾燥されかつ粉碎されたツルレイシの果実および組織培養物は、エタノール中で別々に抽出され、冷却されたエタノールおよびジエチルエーテルと混合された。その後、微量の亜鉛の添加より18時間後に、針状の結晶が形成される。果実および培養物は別々に圧搾され、水中でホモジナイズされ、エタノールおよび濃硫酸がpHを0.3に調整するために添加されて綿状沈殿物が得られる。

10

20

30

40

50

【0007】

この方法は以下の欠点を有する：

1. 抽出の工程におけるアルコールの使用は、それが大量に入手できないこと、およびその中に存在する不純物のため、実用的ではない。
2. 果実および組織培養物などの生の材料の使用は、取扱に問題を生じ、経済的に実行不能であり、かつ収率が非常に低い。

【0008】

この特許の欠点は、もう一つのインド特許第176040号において除去された。この特許は、ジエチルエーテルと一緒にヘキサンを用いることにより、非常に有効なポリペプチド-pの抽出のための工程を開示している。しかしながら、前文において参照された特許明細書において開発および開示されたこの方法は、この薬剤の良好な収率、改良された純度、および高度の有効性を、油およびサポゲニンならびに他の不純物をそこから除去することにより、結果的に生じることとなったにも関わらず、しかしそれにはまだ、以下にそのいくつかが示されている欠点があった：

1. ポリペプチド-pの精製は、油およびサポゲニンのような干渉性のラジカルの存在のため厄介な方法であった。
2. 抽出の工程におけるジエチルエーテルの使用は、それが高度に炎症性でありかつ高いコストを伴うことから、実用的ではなかった。
3. 農薬／殺虫剤／尿素および他の不純物の存在が、ポリペプチド-pの純度に影響した。
4. 収率は最善ではなかった。

【0009】

この「ポリペプチド-p」と称せられる蛋白質は、ツルレイシの果実および組織培養物から抽出されたものである。この蛋白質は以下の表2に表されるアミノ酸を含む。

【0010】

【表2】

アミノ酸	μモル/mg	分子数
アスパラギン酸	0.273	17
トレオニン	0.138	8.7
セリン	0.195	12
グルタミン酸	0.305	19
プロリン	0.159	10
グリシン	0.225	19
アラニン	0.240	15
バリン	0.174	11
1/2システイン	0.058	3.6
メチオニン	0.031	2
イソロイシン	0.116	7
ロイシン	0.207	13
チロシン	0.016	1
フェニルアラニン	0.082	5
ヒスチジン	0.066	4
リジン	0.209	13
アルギニン	0.161	10
NH ₃	0.431	(27) 166の残滓を省略
合計 およそその分子量11,000		

【0011】

米国特許第5484889号は、腫瘍およびHIV感染の治療に対して有用な植物蛋白質を記述している。この蛋白質はツルレイシの種子から得られている。単離および精製されたこの蛋白質がリボソーム不活性化蛋白質であり、したがって腫瘍の治療において有用であることに注目することは適切である。この蛋白質の抽出のために記述された方法は、溶

媒の使用と、クロマトグラフィー、透析、その他の長くて退屈な工程を含む。この特許ならびにインド特許第176040号に記述された方法では、収率および純度は低く、かついくつかの不純物を有していた。したがって、これらのおよび他の欠点を除去するべく、本出願人は血糖降下特性を有する新規な「ポリペプチドー k」と呼ばれる蛋白質をツルレイシから単離し、また同じ材料からの当該蛋白質の抽出のための新規な工程を発明した。文字「k」は、インド語で「ニガウリ」またはツルレイシを表す語、「カレラ」にちなんでいる。

【0012】

本発明の主要な目的は、「ポリペプチドー k」と呼ばれる新規な蛋白質を提供することである。

10

【0018】

【課題を解決するための手段】

上記の目的に従って、本発明はツルレイシから抽出された新規な蛋白質「ポリペプチドー k」を提供する。

【0019】

本発明では、

- i) 適当な粉碎器において乾燥種子を粉碎し、
- ii) 粉碎された種子をヘキサン-アセトンの混合物を用いて処理し、
- iii) 残渣塊を約80%のアセトン水に溶解し、
- iv) 水酸化アンモニウムのような適当な有機緩衝剤を添加することによりpHを9.5に調整し、
- v) 上澄み層を硫酸で処理し、
- vi) ポリペプチドー kの綿状の沈殿物を集めて、選択的な結晶化により当該蛋白質を単離する、

工程によって、ツルレイシの乾燥種子から蛋白質が抽出される。その後当該蛋白質は、クロマトグラフィーにより分析される。

【0020】

本発明において単離された蛋白質、すなわち「ポリペプチドー k」は、従来技術の蛋白質とは異なったものである。詳細に説明すれば、本発明において単離された蛋白質は18のアミノ酸を有する蛋白質であり、「ポリペプチドー k」と称される。この蛋白質の抽出工程は、3：1の割合のヘキサンと少量のアセトンを用いた、洗浄されたツルレイシ種子の脱油からなる。乾燥種子が用いられるのは、ポリペプチドー kが貯蔵蛋白質であって種子が乾燥されたときに大量に集積されるためである。脱油後、種子は乾燥され、粉碎されて3：1の水とアセトンに溶解される。混合物が形成された後、水酸化アンモニウムを添加することでpHが9.5に調整される。上澄みが分けられ、硫酸の添加によりpHが3に調整される。綿状の沈殿物が集められ、乾燥される。乾燥物が粉碎され、油、塩、その他の望ましくない成分を取り除くために、TLCおよびHPLCで単一のスポットを示すまで水とアセトンで洗浄される。

30

【0021】

一つの態様においては、ツルレイシの乾燥種子は割られ、水で2～3回充分に洗浄されて実質的に不純物が含まれないようにされ、さらに蛋白質の抽出に先立ち真空下で乾燥される。

40

【0022】

他の態様においては、種子からの脱油に用いられた溶媒は3：1のヘキサンとアセトンとを含んでいる。

【0023】

一つの態様においては、シリカゲルGを用いてコートされた（厚さ0.4mm～0.5mm）薄いガラスプレート（20×20）が100℃において活性化される。インスリン溶液が塗布され、当該プレートはn-ブタノール、酢酸、水（12：5：2）中にて展開され、乾燥され、アセトン中のニンヒドリン（0.25%）をスプレーすることにより可視

50

化された標準のインスリンにほぼ相当する単一のスポットが、スプレイされていないプレートからシリカゲルGとともに単離され、水酸化アンモニウムまたは10%の蟻酸により緩衝化された50%エタノール中で抽出され、濾過され、濾液は乾燥され、純粋な白色の針状結晶が形成される。

【0024】

さらに別の態様においては、分析が行なわれる場合、単離された物質は標準のインスリンとともに加水分解され、別々に濾紙クロマトグラムにかけられ、展開され、グルタミンを含む18のアミノ酸を生じる。この単離された物質が「ポリペプチド-k」と呼ばれる蛋白質である。

【0025】

もう一つの特徴においては、単離された物質および標準のインスリンは、6規定の塩酸によって20時間にわたり別々に加水分解され、乾燥され、50%エタノール中で戻され、ワットマンNo. 1濾紙片に塗布され、n-ブタノール、酢酸、水(60:20:20)中において展開され、展開された片はアセトン中の0.25%ニンヒドリンを用いてスプレイされる。標準の加水分解物は、グルタミンを含む18のアミノ酸の存在を示す。

【0026】

分析が行なわれる際に、種子はヘキサンアセトン中において抽出され、融点(234℃)、添付図面のゲル電気泳動パターン、およびポリペプチド-kにおける余分のアミノ酸であるグルタミン以外は標準のインスリンのアミノ酸数を有する生成物を生じる。

【0027】

モルディカ属の植物体のほとんどの部分が、本発明によって開示された蛋白質を異なる割合で含むことに注目されたし。上記のように蛋白質ポリペプチド-kは乾燥種子から抽出することができる。

【0028】

乾燥された種子は先の特許第176040号において記述された工程において用いられたように、アセトンとともにヘキサン(食品等級)をエーテルの代わりに用いて処置された。この工程は、望ましくない油、フラボノイド、およびサポゲニンの除去により、高い収率と、改善された純度、およびポリペプチド-kの高い有効性を生じる結果となった。

【0029】

出願人はツルレイシから単離されたペプチドを分析し、この蛋白質が18のアミノ酸を有することを見出した。18番目のアミノ酸はグルタミンである。紫外線スペクトルは275nmで吸収ピークを示し、一方ポリペプチド-p、すなわちツルレイシに見出される他の蛋白質のピークは250nmで検知される。蛋白質のHPLC分析では、ポリペプチド-kは単一のピークを示す。よって、ポリペプチド-kについての質量スペクトル分析は、ポリペプチド-pに存在する単一のチェーンに対して、ポリペプチド-kは2つのペプチドチェーンからなることを示す。

【0030】

他の留意すべき特徴としては、ポリペプチド-pはツルレイシの果実、新鮮な種子及び組織から単離可能であるのに対して、ポリペプチド-kは貯蔵蛋白質としてツルレイシの乾燥種子から得られるということである。

【0031】

より重要なことには、先に単離されたポリペプチド-pが11,000kdのおおよその分子量を有するのに対し、本発明のポリペプチド-kは18,000kdのおおよその分子量を有する。

【0032】

このようにポリペプチド-kは、以下の点でポリペプチド-pとは異なっている。

1. ポリペプチド-kは18のアミノ酸を有するのに対して、ポリペプチド-pは17のアミノ酸しか有しない。ポリペプチド-kに存在する余分なアミノ酸はグルタミンである。

2. ポリペプチド-kのおおよその分子量が18,000であるのに対し、ポリペプチ

10

20

30

40

50

ド-pのそれは11, 000である。

3. ポリペプチド-kは遊離N末端を有する。

4. ポリペプチド-kは非水溶性であるが、ポリペプチド-pは部分的に水溶性である。

5. ポリペプチド-kは患者に注射できず舌下経路による経口投与のみが可能であるのに対して、ポリペプチド-pは既に述べたように注射可能である。言い換えれば、ポリペプチド-pは（筋肉内）注射されるもので、これは患者には不便であるのに対し、ポリペプチド-kは舌上面から舌下服用されるもので、その投与と吸収は容易且つ容認可能であり、患者には便利である。

6. ポリペプチド-kは安定しており、その寿命は（常温常圧で保存の場合）約18ヶ月である。他方、ポリペプチド-pは不安定で、常温常圧で保存しても2～3ヶ月ともたない。

10

7. ポリペプチド-kが234℃の燃焼点（m. p）を有するのに対し、ポリペプチド-pは228～232℃で始まる早めの燃焼点を有する。

【0033】

糖尿病は、グルコースが体内のエネルギー源として利用されず、そのようなグルコースが血中に高レベルに残存し、最終的には尿を通して排泄される病気である。ある状況においては、膵臓のβ細胞から分泌されたインスリンは不十分であるか、またはその機能を十分に果たさない。

【0034】

20

糖尿病は一般に、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）に分類される。I型糖尿病は、遺伝性¹の原因、ウイルス感染²、肥満³、薬物作用⁴、事故等⁵の結果として、膵臓のβ細胞の機能低下の状態にあり、インスリンが効果的に分泌されず、主として20代～30代において急激に襲う。しかしながら、40代においての、あるいは家族の糖尿病歴、肥満、またはストレス等がある場合におけるII型の糖尿病の発病については確かではない。II型の糖尿病の場合には、インスリンは膵臓から十分に分泌されているが、インスリン抵抗性および糖利用が正常なヒトのそれらとは異なっており、高インスリン血症にもかかわらず血糖は正常レベルに戻らない。

【0035】

糖尿病は多くの症状に伴われる。かかる症状の典型的な例は多尿、過飲、および多食である。すなわち糖尿病患者は、高い血中グルコースレベルに起因する浸透圧的作用による、尿を通してのグルコースと過剰な水との排泄によって引き起こされる多尿を示し、それゆえ脱水によって引き起こされる口渴を訴え、それが過飲を誘導し、かつ空腹感を感じさせて過剰な食物摂取を引き起こす。糖尿病患者はエネルギー源としてグルコースを有効に利用することができず、その代わりに、体内に保存されたものとして蛋白質および脂肪を利用しており、この現象が体重の減少の原因となる悪循環に捕えられる。

30

【0036】

しかしながら、かかる現象は糖尿病の初期に観察される急性の症状に過ぎない。もし治療の遅れにより糖尿病が慢性化すれば、合併症として慢性的な血管疾患が追加される。したがって、糖尿病性網膜症（視力障害、失明、網膜出血）、糖尿病性腎障害、糖尿病性抹消神経障害等の糖尿病の合併症は、人体の全般的な代謝および感覚機能を低下させる。

40

【0037】

インスリン非依存性の糖尿病患者の血糖を低下させるべく、数多くの医薬品が製造および検査されてきた。しかしながらこれらの医薬品の大半は、一つまたはそれより多い望ましくない特徴を有しており、それらのあるものは集団の大部分にとって有意な副作用をもつか、または多くの用量を必要とする。また、それらのあるものは血糖レベルを下げ過ぎるため、散発性に使用されることのみが可能であるか、さもなければそれらは健康に対し脅威となる可能性があり、また他のものは潜在的な毒性を有する。現在では、血糖を低下することにおいて高度に有効な、しかもそれを危険なレベルまで低下させず、また顕著な副作用をもたない天然の抗糖尿病薬はない。

50

【0038】

本発明によれば、薬理学的に活性のある血糖降下薬が、本発明の蛋白質のみを用いた単純かつ簡単な方法で製造される。これは非常に効果的であるため、血糖値を下げるのに比較的少量の同種療法薬を摂取するだけでよい。

【0039】

本発明の蛋白質を用いた薬草組成物：

ツルレイシから抽出された蛋白質は血糖降下特性を示しており、したがって当該蛋白質を含んでいる組成物は、哺乳類における血糖降下療法の治療用に使用され得る。モモルディカ属から得られた蛋白質は無定形の粉末の形状である。当該蛋白質は不活性なインスリンを活性化し、したがって個体の病理学的状態の慢性度に依存して、膵臓の元気を回復させることが可能である。実際、時間がたつにつれ、それは糖尿病の治療薬として作用し得る。本出願人は500より多い実験を行ない、一度に約12mg～70mgの蛋白質の服用が非常に有効であることを確認した。したがって、当該蛋白質を1回分含んで成る組成物は、約12mgまたはそれ以上の当該蛋白質を含むようにすることが賢明である。

10

【0040】

本発明の蛋白質を用いた血糖降下組成物は、錠剤、食用の製品といった種々の物理的な形状に製剤されることが可能である。錠剤の調製には、約12mg～70mgの当該蛋白質が、使用に適した薬理学的に許容される担体と混合される。当該薬理学的に許容される担体は、十分な純度および低毒性のものでなければならず、ポリペプチド-kの活性／効果に干渉するものであってはならない。ビスケット、チューインガム、ロゼンズ (lozenges) 等の即座に嚥下されない食用の製品が、調製されることが可能である。かかる調剤のすべてにおいて、当該蛋白質の含有量は約12mg～70mgである。本発明の蛋白質を用いて調製された低塩ビスケットは、糖尿病患者には非常に評判がよいことが判っている。

20

【0041】

本発明の低血糖組成物は、少なくとも1日に4回、食事の10分前に消費されるべきであることに注目することが適切である。最も重要な点は、錠剤または低血糖組成物が咀嚼のみされるべきであって、直ちに嚥下されるべきではないことである。

【0042】

本発明の一つの特徴においては、本文に記述された血糖降下組成物は何ら副作用をもたない。それは、他の療法の使用を制限することなく消費されることが可能である。それはインスリンに対して交差反応を有さない。

30

【0043】

【発明の実施の形態】

本発明は、以下の図面を参照して詳細に記述される。

本発明は、同様に以下の実施例により説明される。当業者には自明であるいくつかの変更は、本発明の範囲内に含まれるとみなされる。

【0044】

実施例1（蛋白質調製例）

ツルレイシLからの蛋白質の抽出：ツルレイシの熟果から100gの乾燥種子が取得された。種子は手作業により割られた。割られた種子は、次いで水により3～4回十分に洗浄され、すべての不純物を実質的に含まないようにされた。割られた種子は次に真空下に乾燥され、粉碎装置を用いて微細粉末に粉碎された。他のどのような通常の装置も使用されてよい。

40

【0045】

微細粉末は次に、粉末を脱油するために1：2の割合で混合されたアセトン・ヘキサン溶媒を用いて処理され、残渣塊は20%アセトンに溶解された。水酸化アンモニウムを添加することによりpHは9.5に合わせられ、このようにして得られた上澄みは、綿状の沈殿を得るために硫酸でpHを3に調整して緩衝化され、それらは集められ、さらに微量の酢酸亜鉛を用いて結晶化された。

【0046】

50

シリカゲル G (キーゼルゲル (Kieselgel) G ナックスタール (nach Stahl) ; Eメルク) で塗布された (厚さ 0.4 mm ~ 0.5 mm) 薄いガラスプレート (20 × 20 cm) が、100 °C にて半時間活性化された。単離された物質を含んでいる溶液がプレートの端から 1 cm 上に塗布され、n-ブタノール、酢酸および水の有機溶媒混合物 中にて流された。これは n-ブタノール、酢酸および水 (12 : 5 : 2) である。展開されたプレートは室温において乾燥され、アセトン中の 0.25 % ニンヒドリンをスプレーされた。インスリンにはほぼ相当する単離物のニンヒドリン陽性スポット (R = 0.19) が、約 200 のスプレーされていないプレートからシリカゲル G とともに集められ、水酸化アンモニウム / 10 % 蟻酸 により緩衝化された 50 % エタノールを用いて抽出された。抽出物は濾過され、さらに真空内で乾燥された。このようにして取得された純粋な無色の結晶は秤量された (3 g / 種子の乾燥重量 100 グラム)。

10

【0047】

精製された化合物の融点 (232 °C ~ 235 °C) ならびに mmp (234 °C) が決定された。標準のインスリンの融点は 233 °C と記録された。

【0048】

インスリンの標準試料ならびに単離物は、6 規定の塩酸を用いた還流下において 20 時間にわたり、別々に加水分解された。加水分解物は濾過され、乾燥され、50 % エタノールあるいは 10 % 蟻酸中にて別々に再構成され、ワットマン No. 1 濾紙片に塗布された。当該濾紙片は、n-ブタノール、酢酸、および水 (3 : 1 : 1) の有機溶媒混合物 中において流された。単離物、および標準のインスリンの双方の加水分解物はまた、既知のアミノ酸 (ヒドロキシリジン、メチオニン、ヒドロキシプロリン、およびトリプトファン) とともに別々に塗布された。種々の展開されたクロマトグラムは、アセトン中の 0.25 % ニンヒドリンを用いてスプレーされた。標準の加水分解物のアミノ酸は、単離されたポリペプチド k における余分なアミノ酸であるグルタミンを除けば、単離化合物の加水分解物のそれと正確に一致した。ヒドロキシリジン、ヒドロキシプロリン、およびトリプトファンは、単離されたポリペプチド k ならびに標準の加水分解物では欠如していることが見い出され、そのことは単離された蛋白質がグルタミンの存在により区分されることを示す。ポリペプチド k で特定されたアミノ酸のいくつかは、図 1 に示されている。

20

【0049】

ディスク電気泳動が行なわれた (10 % SDS バイオフォアゲル、トリス緩衝液中で泳動、操作 pH 6.1、下部電極槽には 3 % 酢酸 ; 90 V、管あたり 2.5 mA ; トラッキング色素ブロモフェノールブルー)。ジチオスレイトールおよび EDTA を含んでいる結晶化された単離体およびジチオスレイトールおよび EDTA を含んでいるウシの試料が注入され、7 時間泳動された。管から集められたゲルは染色され (7 % 酢酸水溶液中の 0.05 % クマシーブリリアントブルー R-250)、さらに 10 % 酢酸を用いて洗浄された。単離体およびウシのインスリンの双方の電気泳動パターンは、添付図面の図 1 に示されているように、ほとんど同じであった。ポリペプチド k の免疫学的検定は、ウシのインスリンを用いて検査した場合、いかなる交差反応も示さなかった。

30

【0050】

単離体の舌下投与は、ポジティブかつ高度に有効な血糖降下活性を示した。500 人の糖尿病患者が治療された (表 4) ときに、この薬剤の副作用は何ら観察されなかった。これらの患者にこの薬品が 2 ~ 4 年の間投与された場合でも、神経障害、嗜眠状態、低血糖症は報告されなかった。同時に、血中の糖レベルは 1 ヶ月の期間で明らかに低下していった。このデータは表 4 に示されている。

40

【0051】

実施例 2 (ツルレイシ L からの蛋白質の抽出)

ツルレイシ L の熟果から 200 g の乾燥種子が取得された。種子は手作業により割られた。割られた種子は、次いで水により 3 ~ 4 回充分に洗浄され、すべての不純物を実質的に含まないようにされた。これらの種子は真空下に乾燥され、粉碎装置を用いて微細粉末に粉碎された。他のどのような通常の装置も使用されてよい。

50

【0052】

微細粉末は次に、1：2の割合で混合されたアセトン・ヘキサン溶媒を用いて処理された。シリカゲルG（キーゼルゲルGナックスター；Eメルク）で塗布された（厚さ0.4 mm～0.5 mm）薄いガラスプレート（20×20 cm）が100℃で半時間活性化された。単離された物質を含んでいる溶液がプレートの端から1 cm上に塗布され、n-ブタノール、酢酸、および水（12：5：2）の有機溶媒混合物中にて流された。展開されたプレートは室温において乾燥され、アセトン中の0.25%ニンヒドリンでスプレーされた。単離物の、インスリン相当するニンヒドリン陽性スポット（R=0.19）が、約200のスプレーされていないプレートからシリカゲルGとともに集められ、水酸化アンモニウムあるいは10%蟻酸により緩衝化された50%エタノールを用いて抽出された。抽出物は濾過され、さらに真空内で乾燥された。このようにして取得された純粋な無色の結晶は秤量された（3 g／種子の乾燥重量100グラム）。 10

【0053】

精製された化合物の融点（232℃～235℃）ならびにmmp（234℃）が測定された。標準のインスリンの融点は、233℃と記録された。

【0054】

インスリンの標準試料ならびに単離されたポリペプチド-kは、6規定の塩酸を用いた還流下において20時間にわたり、別々に加水分解された。加水分解物は濾過され、乾燥され、50%エタノール中にて別々に再構成され、ワットマンNo. 1濾紙片に塗布された。当該濾紙片は、n-ブタノール、酢酸、および水（5：1：1）の有機溶媒混合物中において流された。単離物、および標準のインスリンの双方の加水分解物はまた、既知のアミノ酸（ヒドロキシリジン、メチオニン、ヒドロキシプロリン、およびトリプトファンを含む）とともに別々に塗布された。種々の展開されたクロマトグラムは、アセトン中の0.25%ニンヒドリンを用いてスプレーされた。標準の加水分解物のアミノ酸は、単離されたポリペプチド-kにおける余分のアミノ酸であるグルタミン以外は、単離された化合物の加水分解物のそれとほぼ正確に一致した。ヒドロキシリジン、ヒドロキシプロリン、およびトリプトファンは、単離されたポリペプチド-kならびに標準の加水分解物では欠如していることが見い出され、そのことは単離されたポリペプチド-kがインスリンのそれとほぼ同じであることを指摘した。ポリペプチド-kは、18のアミノ酸を示した。ポリペプチド-kをジアオニルと共に継続することが最良であることが判った。18のアミノ酸からなるポリペプチド-kは以下の表3に示されている。 20 30

【0055】

【表3】

アミノ酸	aaa 936	平均nモル	μグラム	モルパーセント	#残基
Cysac Cmcys					
アスパラギン酸	3.6346	3.635	0.418	9.4%	15.0
トレオニン	1.1549	1.155	0.117	3.0%	4.8
セリン	2.0456	2.046	0.178	5.3%	8.5
グルタミン酸	6.6195	6.619	0.848	17.1%	27.4
プロリン、システ イン	(2.1133)	(2.113)	(0.205)	5.5%	(8.7)
グリシン	3.4509	3.451	0.197	8.9%	14.3
アラニン	2.8168	2.817	0.200	7.3%	11.6
バリン	2.6160	2.616	0.259	6.8%	10.8
メチオニン	0.5625	0.563	0.074	1.5%	2.3
イソロイシン	1.8404	1.840	0.208	4.8%	7.6
ロイシン	3.1701	3.170	0.359	8.2%	13.1
チロシン	1.0645	1.064	0.174	2.7%	4.4
フェニルアラニン	1.6115	1.612	0.237	4.2%	6.7
ヒスチジン	(1.2110)	(1.211)	(0.166)	3.1%	(5.0)
リジン					
トリプトファン	(測定せず)				
アルギニン	3.5602	3.560	0.566	9.2%	14.7

注入量% 100%

総残基: 160

【0056】

ディスク電気泳動が行なわれた（10% SDS バイオフォアゲル、トリス緩衝液中で泳動、操作pH6.1、下部電極槽には3%酢酸；90V、管あたり2.5mA；トラッキング色素ブロモフェノールブルー）。結晶化された単離体およびジチオスレイトールおよびEDTAを含んでいるウシの試料が注入され、7時間泳動された。管から集められたゲルは染色され（7%酢酸水溶液中の0.05%クマシーブリリアントブルーR-250）、さらに10%酢酸を用いて洗浄された。単離体およびウシのインスリンの双方の電気泳動パターンは、添付図面の図2に示されているように、ほとんど同じであった。図3（a）-（d）は、該蛋白質が単一の主ピークとして移動することを示す、ディスク電気泳動の結果を示す。ポリペプチド-kのアミノ酸のシーケンスは、図4に示されている。ポリペプチド-kの免疫学的検定は、ウシのインスリンを用いて検査した場合、いかなる交差反応も示さなかった。

【0057】

以下は代表的な症例研究の実例であり、これにおいて患者は本発明の血糖降下組成物を投与されている。これらの患者は、慢性度は症例ごとに異なっていたが、すべて糖尿病に苦しめられていた。患者は実質的にデンプンを含まず、少なくとも一つの果物を含んでいる良質の食物を摂取するよう忠告された。患者はまた、本発明の組成物の使用の他に、運動を勧められた。ほとんどの患者は、この処置が始まる前に、ジアオニル（Diaonil）／グリシフェーズ（Glyciphase）／グリナーゼ（Glynase）／DBI／ユーグルコン（Euglucon）／ジミクロン（Dimicron）、またはグリシファージ（glyciphage）とグリナーゼとの組合せといった薬剤を服用していた。

【0058】

患者の血糖レベルの緩やかな低下が、1週間～40日後に観察され、その後正常値になった。本発明の組成物の継続した摂取は、4用量を、各々の食事の10～15分前に舌下に行うようにして、6ヵ月から3年まで異なっていた。血糖レベルが355またはそれより多い患者においては、2（1+1）または1（1/2+1/2）用量のジアオニル（diaonil）が、当該組成物の用量（朝、晩）に補われた。ジアオニルは15日後には完全に除かれた。

【0059】

10

20

30

40

50

症例研究

1. ヴィーヴェク・ムカージ氏18才は、下肢の痛み、過剰な口渴、頻尿および視力障害を訴えていた。検査にあたり、彼の血糖レベルはppで425mg/dlであり、空腹時で209mg/dlであることが分かった。いかなる経口薬も、効果的に作用しなかった。この患者は、本発明の血糖降下組成物（12mg/dl/用量、および1日あたり4用量。各々の用量は各食事の10分前に何らの液体または固体なしに服用された）を、ジアオニル（1+1+1）とともに服用するべく忠告された。これが、血糖レベルをかなり低下させた。ジアオニルは1ヵ月後には半減され、その後は完全に除かれ、驚いたことに血糖レベルは2ヵ月後に114mg/dl（pp）まで低下した。この患者は現在は完全に本発明の組成物に依存して、何ら副作用なしに正常な血糖レベルを維持している。

10

【0060】

2. 他の患者、K. P. ミシュラ教授71才は、血糖レベル305mg/dlの慢性糖尿病患者であった。彼はインスリンを常用していた（18単位/日）。この患者は、本発明の組成物を4回服用するよう忠告された。彼はここ2年間、正常な血糖を維持している。

【0061】

3. D. P. ガウア氏60才は、過去10年間ずっと慢性糖尿病であった。彼は60単位のインスリンを服用している時でも、身体に神経障害および嗜眠を発症した。高血圧および高トリグリセリドレベルの症状があった。この患者は、減じられたインスリンに加えて、本発明の製剤の1日4回の服用から出発した。血糖レベルは低下した。インスリンの用量は徐々に減じられ、最終的には除去され、現在この患者は正常な血糖レベルを維持しており、本発明の組成の4用量との適合を保っている。

20

【0062】

4. ラシュミ・ギハ夫人46才は、症状を発症しており、それは血液プロフィール検査（ヘモグロビン糖鎖付加試験）において糖尿病と確認された（320mg/dl）。彼女は本発明の粉末の服用から出発し、正常な血糖レベルを維持している。彼女は、他の経口薬は服用していない。

【0063】

5. バナージー氏70才は、慢性の患者（15～20年間）であり、高血圧、高トリグリセリドおよびコレステロールレベルをもつ。彼は本発明の組成を、粉末を3年間、1日4用量で服用した。これが、正常な血糖レベルと、血圧およびコレステロールレベルの制御されたレベルを維持した。

30

【0064】

【表4】

糖尿病患者における血糖レベルに対するゴアジン（ポリペプチド-k）の効果

被検者数	糖尿病持続期間 (年)	*血糖レベルの範囲 mg/dl (prantl 後)	*ポリペプチド-k 効果 血糖レベルにおける低下の平均 mg/dl (207日後)
250	2~5	160~200	120~110
250	6~10	210~350	150~190
100	11~15	355~450	250~270
5	15~20	460~500	282

40

【0065】

ポリペプチド-pと比較して、本願の新規なポリペプチド-kがその安定性故に非常に効果的であることを出願人は見出した。それはジアオニルと共に用いられたときに奇跡的な働きを示し、250mg/dlを超える血糖値を2、3日中に正常なものとする。これは高い血糖値を低下させるだけではなく、全コレステロール、DHL、LDL、VLDLおよびトリグリセリドの制御により高血圧も制御する。これはまた神経障害も治療し、患者を通常感覚に戻す。ポリペプチド-kにより糖尿病における副次的作用が治療される。

50

これはまた患者の病気に対する免疫力を高めるもので、よってH I V患者にも同様に役立つ。インスリンに対する交差反応はない。多くの患者では、インスリンは徐々に減らされた。

【0066】

ポリペプチドー k で治療されると、糖尿病を患う患者の多くが、50～60歳またはそれ以上の年齢層で優れた結果を示す。上記の年齢層の患者は通常感覚に戻り、完全に健康になる。種々の症例において血糖値はポリペプチドー k 投与後に50～55%の低下効果を示したが、ポリペプチドー p で比較するとこのような効果は25～30%であることが観察され、しかも変動していた。

【0067】

実際、ポリペプチドー k で治療された患者の誰一人、副作用を訴えなかった。ポリペプチドー k とジアオニルの組み合わせは優れた結果を示した。いくつかの症例ではポリペプチドー k の用量は4-3-2と減らさなくてはならず、これは時間が経つに連れ膵臓が回復したことを示し、したがって、ポリペプチドー k が血中に存在する不活性なインスリンを活性化すると結論付けられる。つまるところ、インスリンとは酵素であり、ポリペプチドー k のいずれかの箇所の小さなペプチドの付加がインスリンを活性化させる。

【0068】

その他の血液検査を行うと、ポリペプチドー k で治療された糖尿病患者ではクレアチニン、尿酸および血液尿素のレベルが正常化したことが判った。現在、より多数の人々が国際的且つ肯定的な反応を示しつつある。

【0069】

ポリペプチドー k のもっとも重要な特性は、それが人体（血液）のpHを6とすることである。もしある人が目眩を覚え、あるいは胆汁を吐いたりしたなら、一錠で酸性、アルカリ性をそれぞれ通常レベルのpH 6へと調整し、その人はまったく平常な健康な状態に戻り、こうして同様に肝臓の機能を制御することができる。

【0070】

神経障害を制御することで、患者からは神経の問題がなくなる。植物原料からなるため、これは受け入れ易い。

【0071】

ポリペプチドー p の場合、その蛋白質の不安定性のため、このような反応は観察されなかった。

【0072】

【発明の効果】

1. ポリペプチドー k は、先の特許第176040号において請求されたプロセスにより単離されたポリペプチドー p より、有効であることが見いだされた。ポリペプチドー k の抽出プロセスは、改良されより効率的にされた。
2. ポリペプチドー k は、舌下に投与した場合に高度に有効な血糖降下薬であることが見いだされた。
3. この薬剤を抗糖尿病治療薬として用いることにより、全コレステロール、HDL、LDL、VLDL、およびトリグリセリドを含むコレステロールレベルは、正常値まで低下する。
4. 継続期間が2～4年である500人以上の患者がこの薬剤を投与されたときに、下肢の痛み、嗜眠といった症状は見られなかった。この実施例において述べられた本発明は、本質的に単なる説明に過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

【0073】

血糖降下組成物の供給源およびその効果

1. それは、「カリラ（Karela）」／ニガウリ（Bittergourd）／ツルレイシ L（Momordica charantia L）の蛋白質抽出物である。
2. ゴアジンの燃焼点／mp は、234℃であることが分かった。
3. アミノ酸分析器を用いて分析した場合、加水分解物は18のアミノ酸を示した。

10

20

30

40

50

4. 単一の電気泳動バンドが得られ、それはスキニングでは純粋なゴアジンの単一のメインピークを示した。
5. ポリペプチド-kの生化学免疫学的検定は、インスリンに対して陰性であることが分かった。
6. 薬理学的研究は、有意な血糖低下を示した。
7. ポリペプチド-kは水に不溶性であるが、pH 9.5では部分的に可溶性であり、10%蟻酸には完全に可溶性である。
8. それは、加熱すると可溶性分画の色を黄色に変え後に紫色に変える、ニンヒドリンを用いて物理的に検査されることが可能である。
9. 当該ポリペプチド分画のシーケンシングに際し、最初の末端は自由であることが見
10
い出された。
10. 本発明の血糖降下組成物は、血液中に存在する不活性なインスリンを活性化し、したがってこの病気を治癒させ、その時間的因子は当該病気の慢性度に依存する。
11. 遺伝性である場合は、正常なヒトによる1回の用量は、予防的な用量として作用する。
12. コレステロールレベルが高い場合は、その摂取は当該レベルを低下させる。
13. 高いトリグリセリドレベルも、同様に低下される。
14. 関節の痛みおよび炎症は、除去されるかまたは軽減される。
15. その摂取は、糖尿病患者にとって常態を感じさせる。
16. 他の副作用は、観察されなかった。
20
- 【図面の簡単な説明】
- 【図1】 ポリペプチド-kの紫外線分析の結果を表す。
- 【図2】 (a) - (d)は、単一の主ピークを示す高精度液体クロマトグラフィーの結果を表す。
- 【図3】 ポリペプチド-kのアミノ酸を表す。
- 【図4】 (a) - (e)は、ポリペプチド-k対して行なわれた質量スペクトル分析の結果であり、これはポリペプチド-kが2つのペプチドチェーンからなることを明瞭に示す。
- 【図5】 (a) - (c)は、ポリペプチド-k対して行なわれたHPLC分析の結果を示す。
30

【図 1】

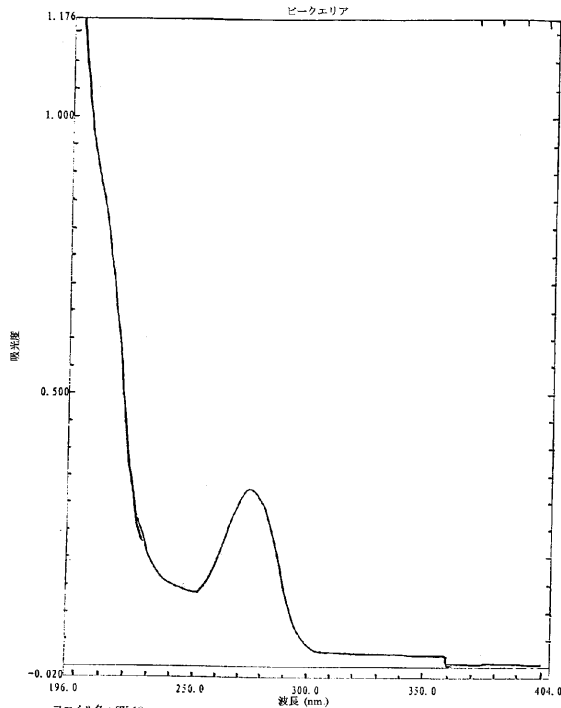


図 1

測定モード: 吸光
スキャンスピード: 早い
スリット幅: 1.0
抽出間隔: 0.2

結果 = (面積・係数) 因子係数 = 0.000
領域 開始 終了 因子 面積 結果

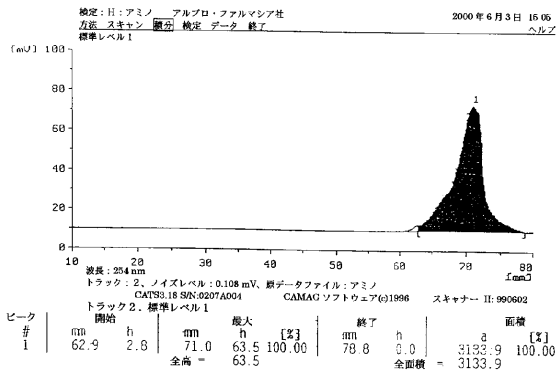


図 2 (b)

【図 2】

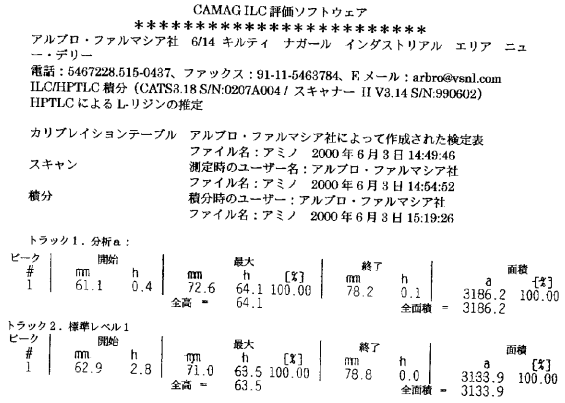


図 2 (a)

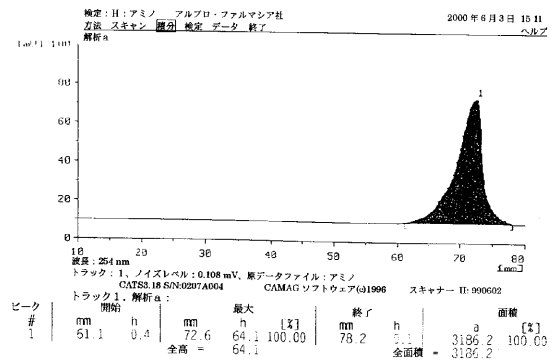
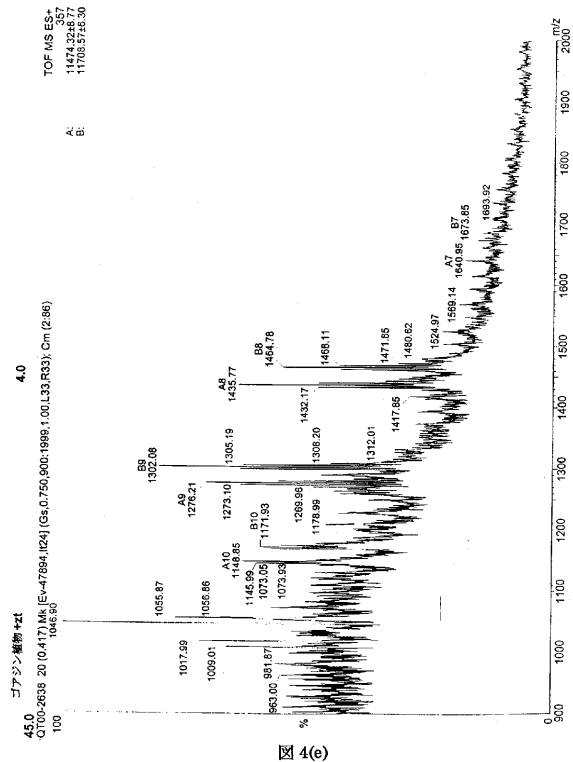
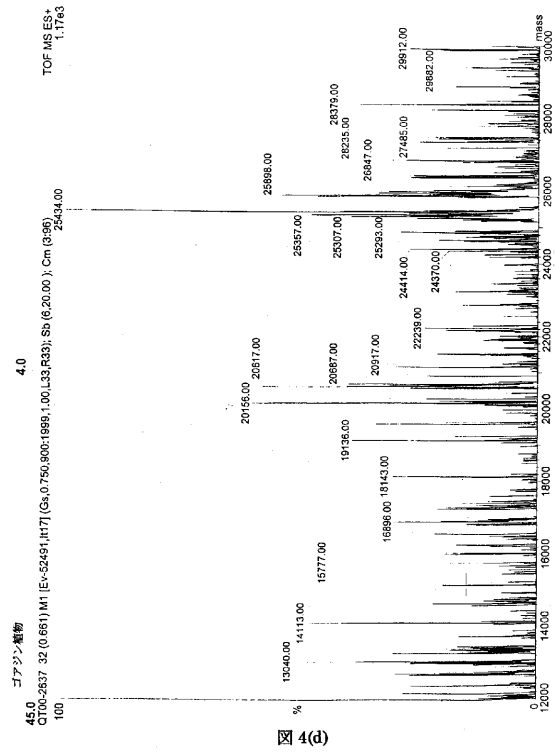
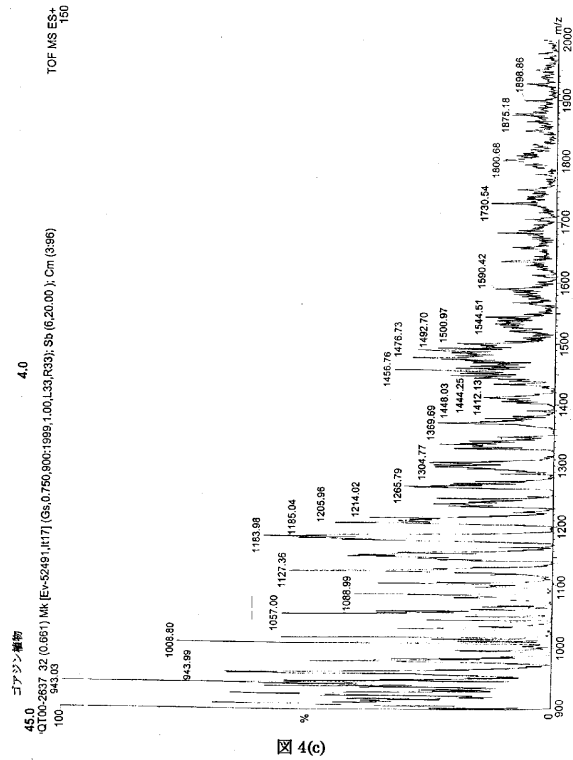
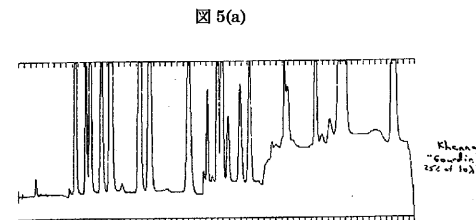


図 2 (c)



【図 5】



【インターフェース 0】 0.08 Min スケール: 16 Mv Ch.A, 15 Mv Ch.B
アミノ酸分析 処理: 2000 年 11 月 22 日 14:26:30, セグメント: 17, サイクル: 936
R データはファイル KBA098.PTS にセーブ 第 2 チャンネルは KBA098.PTS に保存
*****外観データ*****
*****2000 年 11 月 22 日 14:26:33 パージョン 4.1*****
* サンプル名: アミノ酸分析 データファイル: KBA098 *
* データ: 11-22-2000 14:26:30 方法: FRRRBECKA 11-22-2000 13:54:21 #457 *
* インターフェース: 0 サイクル#: 936 オペレータ: jme チャンネル#: 0 水素濃度: N.A. *
* 開始時ピーク: 21 しきい値: 5 閾値しきい値: 500 *
*****終了保持時間: 68.00 *
開始処理時間: 0.00 サンプル毎に 2.002 sec.
注入量: 1.00 希釈率: 1.00
サンプル重量: 1.000000

ピーク ナンバー	保持 時間	ピーク 名	n モル 濃度	正酸化 濃度	面積	高さ	面積 高さ DL	RFP ピーク	% アルカ 保持時間	濃度/ 面積
1	2.556	lys	0.0000	0.15841	28635	1558	13.4 1	6	-1.592	3.437E-06
2	8.689	asp	0.0000	0.20521	2556	435	13.7 1	5	2	4.291E-05
3	9.543	asn	3.6346	7.89331	1813984	61489	16.6 1	6	0	3.563E-06
4	11.378	thr	1.1549	2.44382	314915	15945	28.7 2	5	-1122	3.567E-05
5	12.112	ser	2.8456	4.32241	555887	27660	21.5 2	6	0	3.438E-06
6	14.881	int. std.	1.8357	2.19851	576389	23399	24.4 2	6	0	1.3841E-06
7	15.649	gln	6.6195	13.99678	1503672	71617	27.4 2	6	-1167	3.377E-06
8	17.651	pro	6.14142	28141	889	34.8 2	6	0	-2854	1.831E-04
9	20.168	gly	3.4383	7.25621	1898328	36599	38.0 2	9	0	3.148E-06
10	22.256	ala	2.8168	5.95611	881412	23276	31.7 2	9	0	3.514E-06
11	28.996	val	2.6789	5.42081	782543	16498	42.7 1	3	315 5-73	3.6541E-06
12	32.229	met	8.3625	1.18942	187141	6772	17.3 1	16	0	3.539E-06
13	39.168	ileu	0.0000	0.00001	18132	522	19.4 1	16	0	0.000E+00
14	39.967	ileu	1.8484	3.89142	525119	23328	22.9 2	16	-1.931	3.432E-06
15	34.735	leu	3.1781	6.78011	583284	38835	25.1 2	16	0	3.322E-06
16	35.982	nl std.	8.2739	8.37812	163228	6336	26.3 2	16	0	1.677E-06
17	37.871	tyr	1.8645	2.29801	298227	9412	38.8 1	16	0	2.666E-06
18	39.473	phe	1.6115	2.48751	488268	12881	31.7 1	16	0	3.947E-06
19	45.479	his	7.2693	2.67111	783562	8185	24.9 2	16	0	6.099E-06
20	46.813		0.0000	0.00001	134147	5442	26.3 2	16	0	6.099E-06
21	58.751	lys	1.2451	2.63271	385456	12357	29.1 2	16	4	3.239E-06
22	51.885	asp	0.0000	0.39291	32441	913	35.5 2	16	0	5.727E-06
23	53.287		0.0000	0.00001	182488	2246	45.6 2	16	0	0.000E+00
24	55.253	Met	6.1646	12.87311	258874	61878	37.7 2	16	0	1.727E-06
25	64.197	arg	3.5682	7.52731	1916328	22156	45.9 1	16	0	3.348E-06

総量 = 47.2934

面積、時間及び高さは K:AAA936.ATB に保存
データファイル=K:AAA936.PTS 2000 年 11 月 22 日の 14:27:06 に印刷
開始時間: 0.00 min. 停止時間 68.00 min. オフセット: 0 mv.
全範囲: 15 ミリボルト

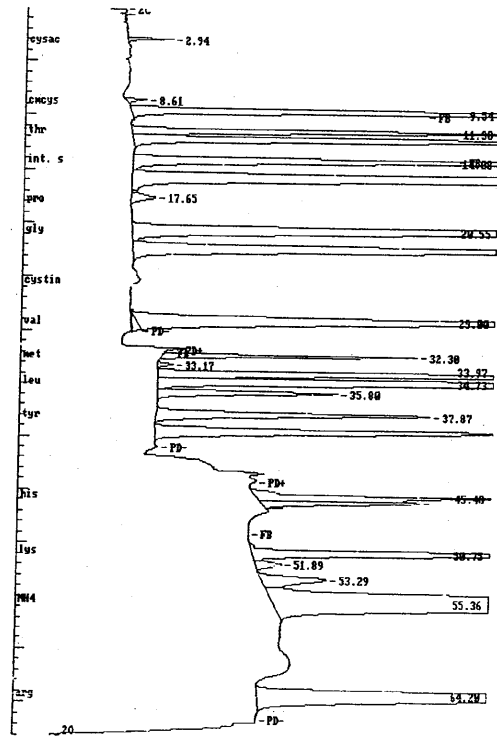


図 5(b)

*****外標準テーブル*****
*****2000 年 11 月 22 日 14:28:43 バージョン 4.1*****
サンプル名: アミノ酸分析 データファイル: K:AAA936.
*データ: 11-22-2000 14:28:30 方法: F:SEBECKA 11-22-2000 13:55:21 #257
インターフェース: 0 サイクル: 936 オペレータ: jmc チャンネル: 1 水素: N.A.
*開始時ピーク幅: 51 しきい値: 5 面積しきい値: 500

*開始時間: 0.00 終了保持時間: 68.00
*コリガリシフト: 6000 サンプル部に 2.002 sec.
*注入量: 1.00 希釈回数: 1.00
*サンプル重量: 1.000000

ピーク ナンバー	保持 時間	ピーク 名	モル 濃度	正規化 濃度	面積	高さ	面積 /高さ	REP ピーク	デジタル 保持時間	質量/ 面積
1	8.775		0.0000	0.0000	5143	286	18.0 1			0.0000E+00
2	9.518		0.0000	0.0000	129394	7747	16.8 1			0.0000E+00
3	11.345		0.0000	0.0000	24953	1171	21.3 2			0.0000E+00
4	12.879		0.0000	0.0000	35186	2285	24.7 2			0.0000E+00
5	14.847		0.0000	0.0000	47121	1978	23.8 1			0.0000E+00
6	15.615	gly	6.2317	74.6757	375516	13882	27.2 1	7	2293	1.6395E-45
7	17.651	pro+tyr	(2.1133)	25.3244	199944	6665	29.8 1	7	8	1.6376E-45
8	28.354		0.0000	0.0000	83682	2753	30.4 1			0.0000E+00
9	22.722		0.0000	0.0000	67237	2827	33.2 1			0.0000E+00

総量 = 8.3451

面積、時間及び高さは K:AAA936.ATB に保存
データファイル=K:AAA936.PTS 2000 年 11 月 22 日の 14:28:59 に印刷
開始時間: 0.00 min. 停止時間 68.00 min. オフセット: 95 mv.
全範囲: 15 ミリボルト

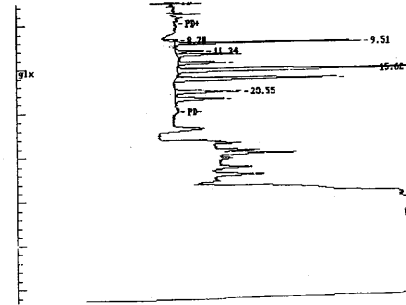


図 5(c)

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第98/043484 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

C12N 1/00-9/99

A61K 31/00-48/00

A61P 1/00-43/00

PubMed、MEDLINE(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)