

(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2013-533217

(P2013-533217A)

(43) 公表日 平成25年8月22日 (2013.8.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 14/62 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/62	4 C O 7 6
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 38/28 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/26	4 H O 4 5
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10	
<b>A 6 1 K 47/48 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/48	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 139 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-511302 (P2013-511302)	(71) 出願人	512288639
(86) (22) 出願日	平成23年5月17日 (2011.5.17)		セビックス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月7日 (2013.1.7)		C E B I X I N C .
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/036858		アメリカ合衆国92037カリフォルニア
(87) 国際公開番号	W02011/146518		州ラホーヤ、プロスペクト・ストリート1
(87) 国際公開日	平成23年11月24日 (2011.11.24)		298番、スウィート2エイ
(31) 優先権主張番号	61/345,293	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成22年5月17日 (2010.5.17)		弁理士 青山 稔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	61/448,402		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成23年3月2日 (2011.3.2)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PEG化C-ペプチド

## (57) 【要約】

本発明は修飾型Cペプチドとその利用方法に関する。1つの態様において、修飾型Cペプチドは、N末端に結合した少なくとも1つのPEG基を含み、インピボで優れた薬物動態と生物学的活性を示すPEG化Cペプチド誘導体を含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C - ペプチドの N 末端に共有結合する PEG 部分を含む PEG 化 C - ペプチド。

## 【請求項 2】

前記 PEG 部分が約 10 kDa と約 80 kDa の間の分子量を持つ請求項 1 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

## 【請求項 3】

前記 PEG 部分が約 20 kDa と約 60 kDa の間の分子量を持つ請求項 1 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

## 【請求項 4】

前記 PEG 部分が約 30 kDa と約 50 kDa の間の分子量を持つ請求項 1 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

## 【請求項 5】

前記 PEG 部分が線状ポリマーである請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチド。

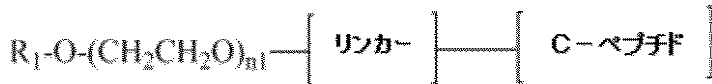
## 【請求項 6】

前記 PEG 部分が分枝状ポリマーである請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチド。

## 【請求項 7】

次の構造：

## 【化 1】



を有する PEG 化 C - ペプチドであって、

式中、 $R_1$  はアルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、リンカーは

- X - 、 - CO - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - 、  
 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - 、 - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - 、  
 - CO - X - CO - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - 、  
 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - 、 - X - CO - X - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - 、 - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - 、  
 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - 、 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> X - 、  
 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - CO - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X - および  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - CO - から選択され、

式中、X はそれぞれ独立して - O - 、 - S - または - NH - から選択されるか存在せず、

$m_1$  はそれぞれ独立して 0 ~ 5 であり、 $m_2$  はそれぞれ独立して 1 ~ 5 であり、そして、

式中、前記リンカーが C - ペプチドの N 末端アミノ基に結合する

請求項 5 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

## 【請求項 8】

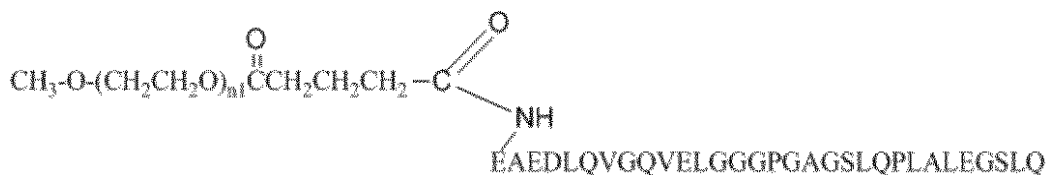
- X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO - 、  
 - X<sub>1</sub> - CO - 、  
 - X<sub>1</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO - 、  
 - X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>3</sub></sub> - CO - および  
 - X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X<sub>2</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO -

から選択されるリンカーを含む PEG 化 C - ペプチドであって、  
 式中、 $X_1$  は - O - であるか存在せず、 $X_2$  は - NH - であり、 $m_2$  は 1 ~ 5 であり、 $m_3$  は 2 であり、 $m_4$  は 2 ~ 5 である  
 請求項 5 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 9】

構造：

【化 2】



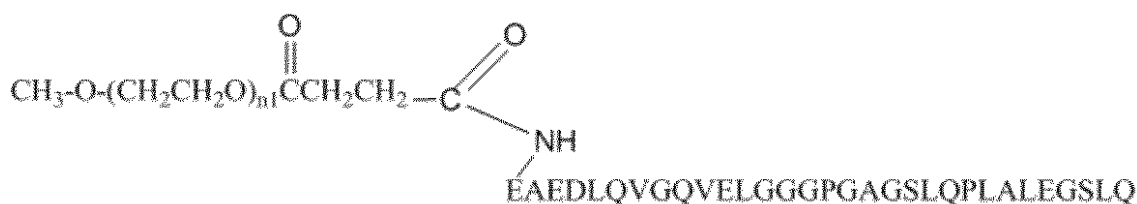
10

を有する請求項 5 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 10】

構造：

【化 3】



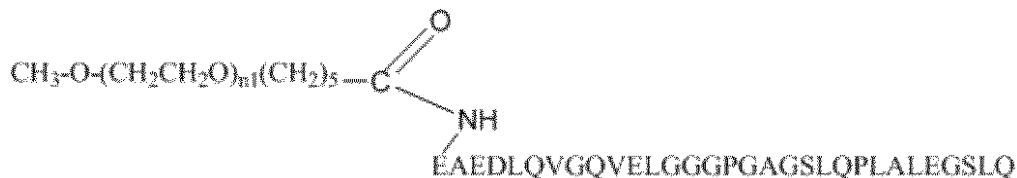
20

を有する請求項 5 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 11】

構造：

【化 4】



30

を有する PEG 化 C - ペプチドであって、式中、 $n_1$  が 20 ~ 800 である請求項 5 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 12】

構造：

【化 5】



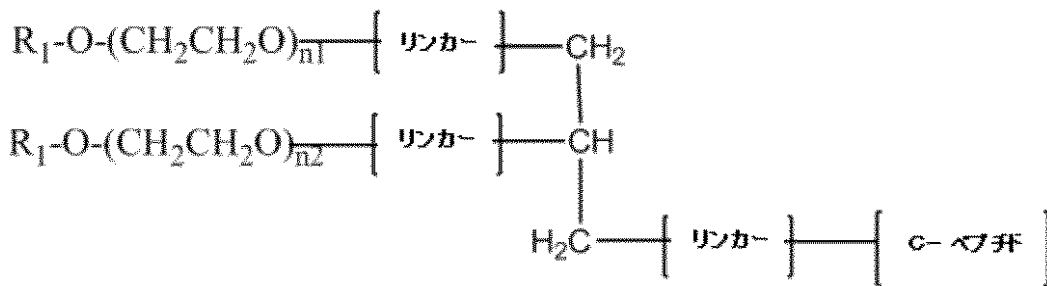
40

を有する PEG 化 C - ペプチドであって、式中、 $n$  が 20 ~ 800 である請求項 5 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 13】

次の構造：

## 【化 6】



10

を有する PEG 化 C - ペプチドであって、  
 式中、リンカーはそれぞれ独立して

- X - 、 - CO - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、
- (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - 、 - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、
- CO - X - CO - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、
- (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、 - X - CO - X - 、 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - 、
- CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - 、 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - 、
- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - 、 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - 、
- X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - 、
- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、
- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、
- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - X - 、
- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - CO - 、
- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - X - および
- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - CO - から選択され、

20

式中、X はそれぞれ独立して - O - 、 - S - または - NH - から選択されるか存在せず、  
 m<sub>1</sub> はそれぞれ独立して 0 ~ 5 であり、m<sub>2</sub> はそれぞれ独立して 1 ~ 5 であり、

式中、前記リンカーが C - ペプチドの N 末端アミノ基に結合し、そして、

30

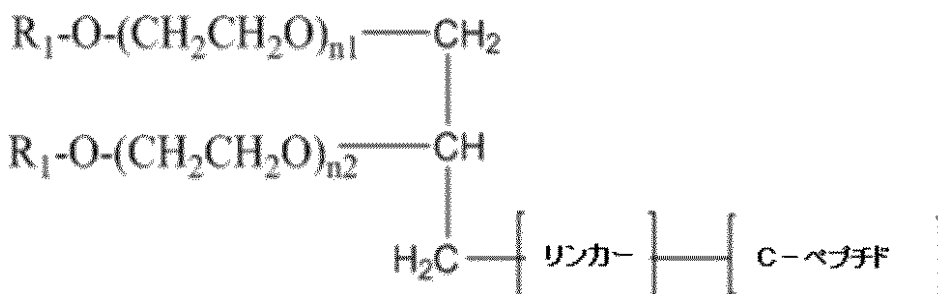
式中、R<sub>1</sub> はアルキル基または低級アルキル基であり、n<sub>1</sub> は 20 ~ 800 であり、n<sub>2</sub> は 20 ~ 800 である

請求項 6 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

## 【請求項 14】

次の構造：

## 【化 7】



40

を有する PEG 化 C - ペプチドであって、

式中、R<sub>1</sub> はアルキル基または低級アルキル基であり、n<sub>1</sub> は 20 ~ 800 であり、n<sub>2</sub> は 20 ~ 800 であり、リンカーは

- X - 、 - CO - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、
- (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - 、 - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、 - CO - X - CO - 、
- (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> -

50

、  
 $-X-CO-X-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-X-$ 、 $-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-$ 、  
 $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-$ 、 $-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ 、  
 $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ 、 $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-X-$ 、  
 $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-$ 、  
 $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-$ 、  
 $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-$ 、  
 $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-X-$ 、  
 $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-CO-$ 、  
 $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-X-$  および  
 $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-CO-$  から選択され、

式中、 $X$  はそれぞれ独立して  $-O-$ 、 $-S-$  または  $-NH-$  から選択されるか存在せず、  
 $m_1$  はそれぞれ独立して  $0 \sim 5$  であり、 $m_2$  はそれぞれ独立して  $1 \sim 5$  であり、そして、  
 式中、前記リンカーが  $C$ -ペプチドの  $N$  末端アミノ基に結合する  
 請求項 6 に記載の PEG 化  $C$ -ペプチド。

【請求項 15】

$-X_1-(CH_2)_{m_4}-CO-$ 、  
 $-X_1-CO-$ 、  
 $-X_1-CO-(CH_2)_{m_4}-CO-$ 、  
 $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_3}-CO-$  および  
 $-X_1-(CH_2)_{m_2}-X_2-CO-(CH_2)_{m_4}-CO-$

から選択されるリンカーを含む PEG 化  $C$ -ペプチドであって、

式中、 $X_1$  は  $-O-$  であるか存在せず、 $X_2$  は  $-NH-$  であり、 $m_2$  は  $1 \sim 5$  であり、 $m_3$  は  $2$  であり、 $m_4$  は  $1 \sim 5$  である

請求項 14 に記載の PEG 化  $C$ -ペプチド。

【請求項 16】

$-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-X-$ 、  
 $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-(CH_2)_{m_5}-CO-$ 、  
 $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-CO-$  およ  
 び  
 $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-CO-(CH_2)_{m_5}-CO-$

から選択されるリンカーを含む PEG 化  $C$ -ペプチドであって、

式中、 $X$  は独立して  $-O-$ 、 $-S-$  または  $-NH-$  から選択されるか存在せず、 $X_1$  は  $-O-$  であるか存在せず、 $X_2$  は  $-NH-$  であり、 $m_5$  はそれぞれ独立して  $1 \sim 5$  から選択され、そして、 $n_3$  はそれぞれ独立して  $1 \sim 400$  から選択される

請求項 14 に記載の PEG 化  $C$ -ペプチド。

【請求項 17】

$-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-(CH_2)_{m_6}-CO-$ 、  
 $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-CO-$  およ  
 び  
 $-X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-CO-(CH_2)_{m_7}-CO-$

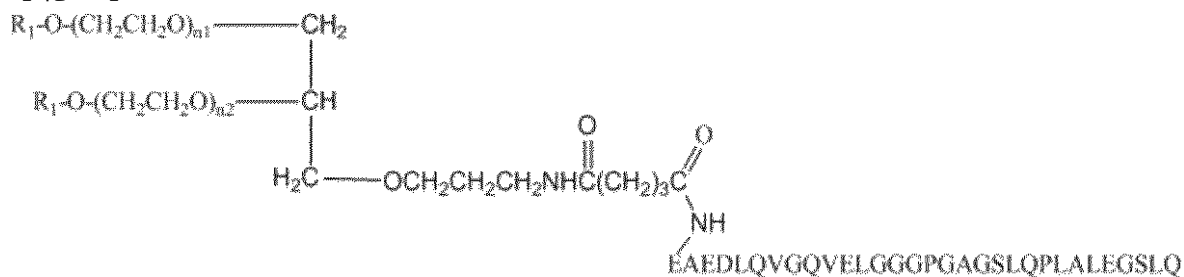
から選択されるリンカーを含む PEG 化  $C$ -ペプチドであって、

式中、 $X_1$  は  $-O-$  であるか存在せず、 $X_2$  は  $-NH-$  であり、 $m_5$  は  $3$  であり、 $m_6$  は独立して  $2$  または  $5$  であり、 $m_7$  は  $3$  であり、そして、 $n_3$  は  $1 \sim 400$  である

請求項 14 に記載の PEG 化  $C$ -ペプチド。

【請求項 18】

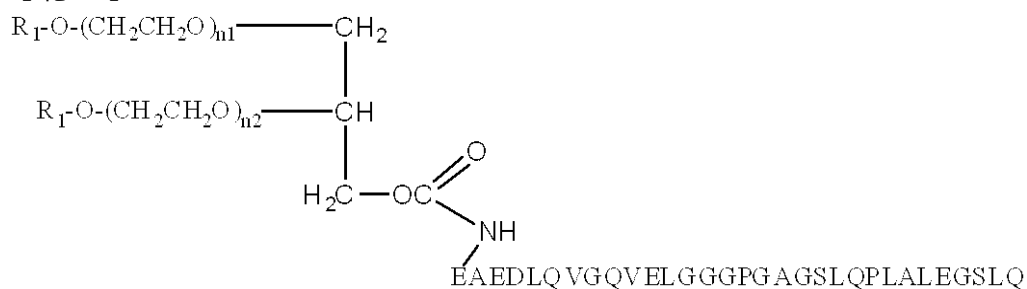
【化 8】



を有する PEG 化 C - ペプチドであって、

【請求項 19】

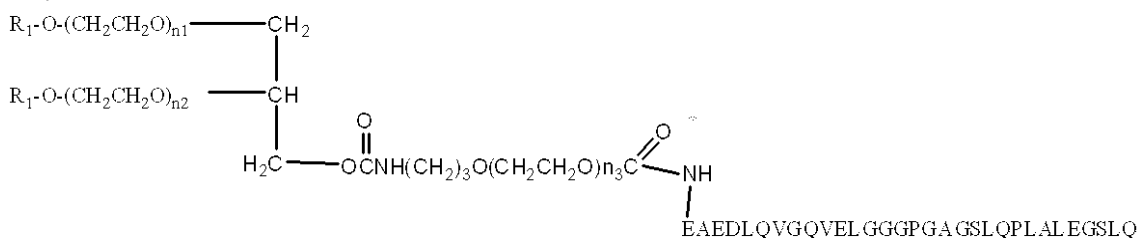
【化 9】



を有する PEG 化 C - ペプチドであって、

【請求項 20】

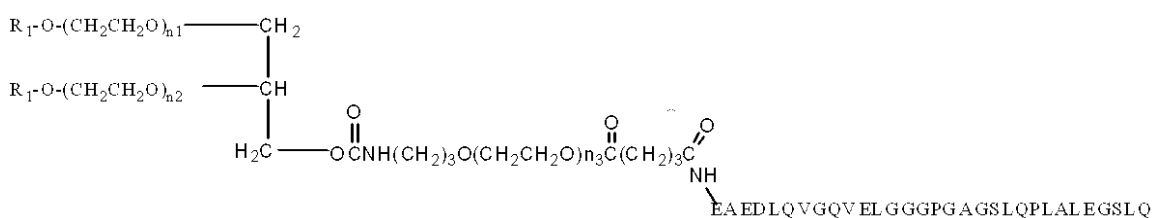
【化 1 0】



を有する PEG 化 C - ペプチドであって、

【請求項 2 1】

【化 1 1】

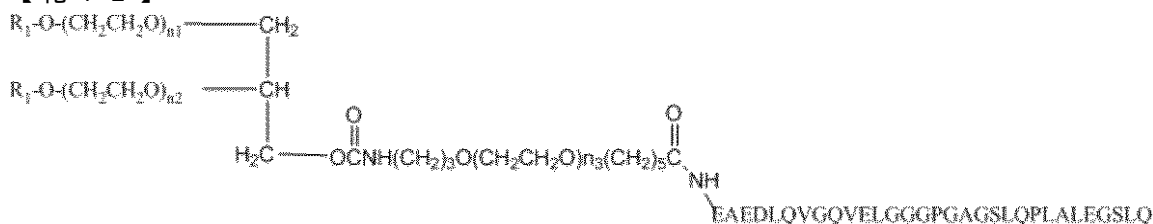


を有する PEG 化 C - ペプチドであって、

50

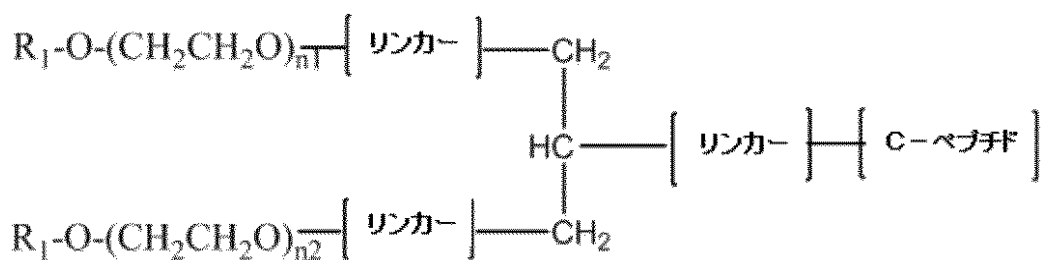
【請求項 22】

【化 1 2】



【請求項 23】

【化 1 3】



請求項 6 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 24】

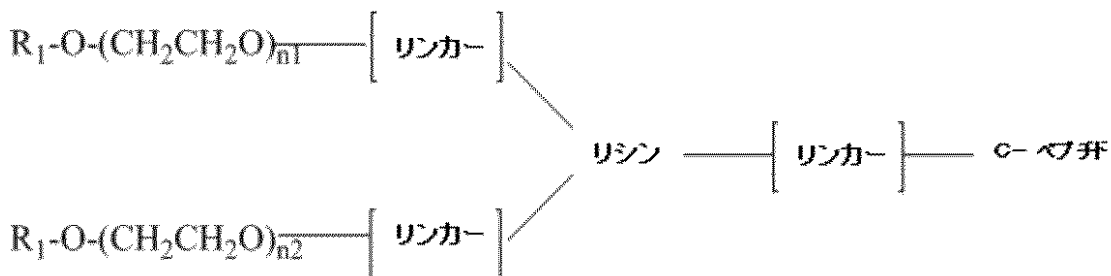
次の構造：

$$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{n1}\text{-CH}_2 \\ | \\ \text{HC} \text{---} \left[ \text{リンカー} \right] \text{---} \left[ \text{C-ペプチド} \right] \\ | \\ \text{R}_1\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{n2}\text{-CH}_2 \end{array}$$

式中、リンカーは

式中、 $R_1$  はアルキル基または低級アルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、 $n_2$  は 20 ~ 800 である

【化 1 5】



式中、リンカーはそれぞれ独立して

$$\begin{aligned} & -X-、-CO-、-(CH_2)_{m_2}-、 \\ & -(CH_2)_{m_1}-CO-、-CO-(CH_2)_{m_1}-、 \\ & -CO-X-CO-、-(CH_2)_{m_1}-X-(CH_2)_{m_1}-、 \\ & -(CH_2)_{m_1}-CO-(CH_2)_{m_1}-、 \\ & -X-CO-X-、-X-(CH_2)_{m_1}-X-、-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-、 \\ & -X-CO-(CH_2)_{m_1}-、-(CH_2)_{m_1}-CO-X-、 \\ & -X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-、-X-CO-(CH_2)_{m_1}-X-、 \end{aligned}$$



- X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - X - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - CO - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - X - および  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - CO - から選択され、

式中、Xはそれぞれ独立して - O -、 - S - または - NH - から選択されるか存在せず、

$m_1$  はそれぞれ独立して  $0 \sim 5$  であり、 $m_2$  はそれぞれ独立して  $1 \sim 5$  であり、

式中、前記リンカーが C - ペプチドの N 末端アミノ基に結合し、そして、

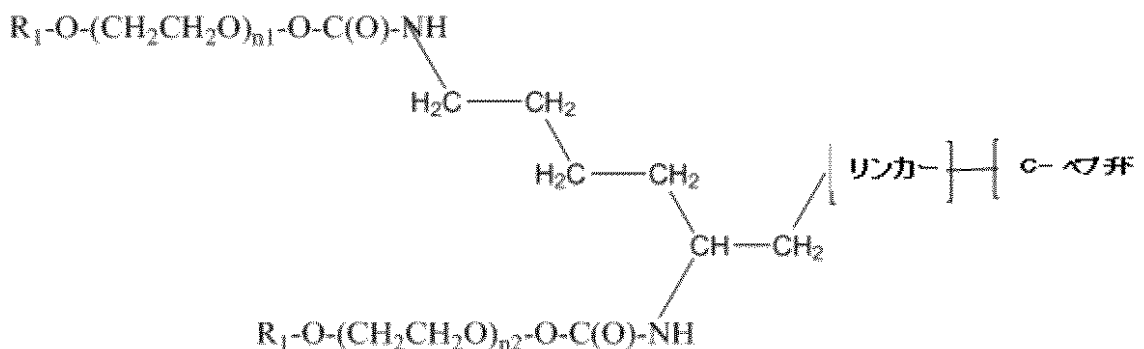
式中、 $R_1$  はアルキル基または低級アルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、 $n_2$  は 20 ~ 800 である

請求項 6 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 26】

次の構造：

【化 1 6】



を有する P E G 化 C - ペプチドであって、

式中、リンカーは

- X - 、 - CO - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、  
 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - 、 - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、  
 - CO - X - CO - 、 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、  
 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、  
 - X - CO - X - 、 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - 、  
 - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - 、 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - 、  
 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - 、 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - 、  
 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> X - 、  
 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X  
 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - X - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - CO - 、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - X - および  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m1</sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m2</sub> - CO - から選択され、

式中、Xはそれぞれ独立して - O -、 - S - または - NH - から選択されるか存在せず、

$m_1$  はそれぞれ独立して  $0 \sim 5$  であり、 $m_2$  はそれぞれ独立して  $1 \sim 5$  であり、そして、

式中、前記リンカーがC - ペプチドのN末端アミノ基に結合する

請求項 6 に記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 27】



速度が少なくとも 10 % 改善することになる請求項 36 または 37 に記載の方法。

【請求項 39】

糖尿病の患者を治療する方法であって、インスリンと併用して請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチドの治療用量を前記患者に投与することを含む方法。

【請求項 40】

ヒトのインスリン依存性患者を治療する方法であって、

a) 神経障害を有する前記患者にインスリンを投与する段階、

b) 前記患者のインスリン投与に用いられた部位とは異なる部位に請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチドの治療用量を前記患者に皮下投与する段階、

c) 前記治療用量の PEG 化 C - ペプチドの結果により生じた前記患者のインスリンの必要量の変化をモニターすることに基づいて投与されるインスリンの投薬量、投薬タイプまたは投薬頻度を調節する段階であって、前記調節された用量のインスリンが低血糖症のリスク、発生または重症度を低減し、前記調節された用量のインスリンが PEG 化 C - ペプチド治療の開始前の前記患者のインスリン用量よりも少なくとも 10 % 少ない段階を含む方法。

10

【請求項 41】

前記 PEG 化 C - ペプチドのために直近で用いられたデポ部位と比較して異なるデポ部位に前記インスリンを皮下投与する請求項 39 または 40 に記載の方法。

【請求項 42】

約 3 日以上の上の投与間隔で前記 PEG 化 C - ペプチドを投与する請求項 33 ~ 41 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 43】

約 5 日以上の上の投与間隔で前記 PEG 化 C - ペプチドを投与する請求項 33 ~ 41 のいずれかに記載の方法。

【請求項 44】

約 7 日以上の上の投与間隔で前記 PEG 化 C - ペプチドを投与する請求項 33 ~ 41 のいずれかに記載の方法。

【請求項 45】

前記治療用量の PEG 化 C - ペプチドが約 1 mg ~ 約 4.0 mg である請求項 32 ~ 44 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 46】

前記治療用量の PEG 化 C - ペプチドが約 1 mg である請求項 32 ~ 45 のいずれかに記載の方法。

【請求項 47】

前記治療用量の PEG 化 C - ペプチドが約 3.5 mg である請求項 32 ~ 45 のいずれかに記載の方法。

【請求項 48】

前記の PEG 化 C - ペプチドの血漿中濃度が約 0.2 nM よりも高く維持される請求項 33 ~ 47 のいずれかに記載の方法。

【請求項 49】

前記治療用量の PEG 化 C - ペプチドが皮下投与される請求項 32 ~ 47 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 50】

C - ペプチド置換治療法としてそれを必要とする患者に用いるための請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチド。

【請求項 51】

ヒトのインスリン依存性糖尿病の患者において低血糖症のリスクを低減するための請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチドの使用であって、処方計画ではインスリンの投与をさらに含み、

a) インスリンを前記患者に投与すること、

50

b) 前記患者のインスリン投与に用いられた部位とは異なる部位に前記 PEG 化 C - ペプチドの治療用量を投与すること、

c) 前記治療用量の前記 PEG 化 C - ペプチドの結果により生じる前記患者のインスリンの必要量の変化に基づいて投与されるインスリンの投薬量、投薬タイプまたは投薬頻度を調節することを含む使用。

【請求項 52】

前記患者が少なくとも 1 つの糖尿病の長期合併症を有する請求項 51 に記載の使用。

【請求項 53】

治療を必要とする患者において 1 つ以上の糖尿病の長期合併症を治療するための請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチドの使用。 10

【請求項 54】

前記の糖尿病の長期合併症が、網膜症、末梢神経障害、自律神経障害および腎症からなる群より選択される請求項 52 または 53 に記載の使用。

【請求項 55】

前記の糖尿病の長期合併症が末梢神経障害である請求項 54 に記載の使用。

【請求項 56】

前記末梢神経障害が既成の末梢神経障害である請求項 55 に記載の使用。

【請求項 57】

PEG 化 C - ペプチド治療法の開始前の神経伝達速度と比較して、治療により神経伝達速度が少なくとも 10 % 改善される請求項 55 または 56 に記載の使用。 20

【請求項 58】

請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチドと薬剤的に許容可能な担体または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 59】

前記の薬剤的に許容可能な担体または賦形剤がソルビトールである請求項 58 に記載の医薬組成物。

【請求項 60】

前記ソルビトールが約 2 (重量 / 重量) % ~ 約 8 (重量 / 重量) % の濃度で存在する請求項 59 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 61】

前記ソルビトールが約 4 . 7 % の濃度で存在する請求項 60 に記載の医薬組成物。

【請求項 62】

約 pH 5 . 5 ~ 約 pH 6 . 5 の範囲内の pH に緩衝される請求項 58 ~ 61 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 63】

約 6 . 0 の pH に緩衝される請求項 62 に記載の医薬組成物。

【請求項 64】

約 5 mM ~ 約 25 mM の濃度のリン酸緩衝液で緩衝される請求項 58 ~ 63 のいずれかに記載の医薬組成物。 40

【請求項 65】

約 10 mM の濃度のリン酸緩衝液で緩衝される請求項 64 に記載の医薬組成物。

【請求項 66】

既定の時間の 40 での保温の後に測定される請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチドの安定性が、pH 7 . 0 の 0 . 9 % 生理食塩水中に貯蔵される同じ PEG 化 C - ペプチドを含む医薬組成物と比較して改善されていることを特徴とする請求項 58 ~ 65 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 67】

請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチドとインスリンを含む医薬組成物。

## 【請求項 68】

ヒトのインスリン依存性患者でのインスリン利用を低減させる方法であって、

a) 前記患者にインスリンを投与する段階、

b) 前記患者のインスリン投与に用いられた部位とは異なる部位に請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の PEG 化 C - ペプチドの治療用量を前記患者に皮下投与する段階、

c) 前記治療用量の PEG 化 C - ペプチドの結果により生じた前記患者のインスリンの必要量の変化をモニターすることに基づいて投与されるインスリンの投薬量、投薬タイプまたは投薬頻度を調節する段階であって、調節された用量のインスリンが低血糖症を誘導せず、調節された用量のインスリンが PEG 化 C - ペプチド治療の開始前の前記患者のインスリン用量よりも少なくとも 10% 少ない段階

10

を含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本願は 2010 年 5 月 17 日に出願された米国特許仮出願第 61/345,293 号および 2011 年 3 月 2 日に提出された米国特許仮出願第 61/448,402 号の優先権の利益を主張し、それらの開示の内容全体は参照により本明細書に記述されたかのように組み込まれたものとする。

## 【背景技術】

20

## 【0002】

(発明の背景)

発明の分野

本発明は、修飾型 C - ペプチドの修飾型とその利用方法に関する。1つの態様において、C - ペプチドの修飾型は N 末端に結合する少なくとも 1 つの PEG 基を含み、インビボで優れた薬物動態および生物学的活性を示す PEG 化 C - ペプチド誘導体を含む。

## 【0003】

C - ペプチドはプロインスリン分子中の A 鎖と B 鎖の間にある連結ペプチドである。膵島細胞の小胞体での切断とプロセッシングの後、インスリンと C - ペプチドが作製される。C - ペプチドはインスリンと共に等モル濃度で膵島細胞から門脈循環へ共分泌される。その発見の後、C - ペプチドが二本鎖インスリン構造の折り畳みに寄与していることの他に、そのさらなる生物学的活性が長年の間の疑問であった。

30

## 【0004】

1 型糖尿病すなわちインスリン依存性糖尿病は一般に膵島細胞の自己免疫性破壊に起因するインスリンと C - ペプチドの欠乏という特徴を有する。したがって、その患者は生命の維持のために外来性インスリンに依存する。その疾病の発病には遺伝的背景、環境要因および一時的な感染症の後の攻撃的自己免疫反応などのいくつかの因子が重要である可能性がある (Akerblom HK et al.: Annual Medicine 29(5): 383-385, (1997 年))。現時点ではインスリン依存性糖尿病患者には C - ペプチドが分離した外来性インスリンが提供され、したがって、外来性 C - ペプチド治療法を受けていない。対照的に、大半の 2 型糖尿病患者は初期においてなおインスリンと C - ペプチドの両方を内在的に産生するが、骨格筋と脂肪組織におけるインスリン耐性という特徴を一般に有する。

40

## 【0005】

1 型糖尿病患者は 1 群の長期にわたる糖尿病の合併症を患い、それらは多くの場合 2 型糖尿病の場合よりも重症であり、広い範囲にわたる。具体的には、例えば、網膜、腎臓および神経に関する微小血管性合併症が 1 型糖尿病患者の罹病率と死亡率の主要な原因である。

## 【0006】

インスリン依存性糖尿病患者の長期にわたる合併症の発生に C - ペプチド欠乏がある役割を果たす可能性があるという考えへの裏付けが増加しつつある。さらに、糖尿病モデル

50

動物および1型糖尿病患者におけるインビボ研究ならびにインビトロ研究により、C-ペプチドはホルモン活性を有することが実証されている (Wahren J et al.: American Journal of Physiology 278: E759-E768, (2000年); Wahren J et al.: In International textbook of diabetes mellitus Ferranninni E, Zimmet P, De Fronzo RA, Keen H, Eds. Chichester, John Wiley & Sons, (2004年), p. 165-182)。したがって、通常のインスリン治療法を相補するものとしてのC-ペプチド利用は1型糖尿病の長期合併症の管理に対して有効な方法を提供する可能性がある。

#### 【0007】

C-ペプチドの治療活性にはC-ペプチドのGタンパク質共役膜レセプターへの結合、 $Ca^{2+}$ 依存性細胞内シグナル伝達経路の活性化およびMAPキナーゼシステムのリン酸化が関係し、ナトリウム/カリウムATPaseおよび内皮的酸化窒素合成酵素(eNOS)の活性の増大を引き起こすことが今日までの研究により示唆されている。インスリン依存性糖尿病の長期合併症の治療と予防にC-ペプチドが有望であるにも関わらず、短い生物学的半減期とC-ペプチドの皮下注射または静脈内(I.V.)投与による1日当たり複数回の投与の必要性が商業上の開発を妨げてきている。

10

#### 【0008】

本発明は、天然C-ペプチドの生物学的活性を保持し、そして、優れた薬物動態的特性を示すPEG化型C-ペプチドの開発に焦点を当てている。これらの改良された治療形態のC-ペプチドは、糖尿病の長期合併症の治療のためのより効果的な最適投薬方式の開発を可能にし、投与の頻度をかなり少なくする。

20

#### 【0009】

1つの態様において、これらの治療法は糖尿病の患者を対象とし、さらなる態様においてはインスリン依存性の患者を対象とする。1つの態様において、インスリン依存性の患者は1つ以上の糖尿病の長期合併症を患っている。

#### 【0010】

これらの改良された方法は、動物実験に基づいており、驚くべきことに、C-ペプチド分子のN末端における修飾により生じたPEG化型C-ペプチドが天然分子の生物学的活性を保持しつつ非常に優れた薬物動態性質を示すことを実証する。

#### 【発明の概要】

#### 【0011】

1つの実施形態において、本発明はC-ペプチドのN末端に共有結合で結合したPEG部分を含むPEG化C-ペプチドを包含する。1つの態様において、本発明のPEG化C-ペプチドは線状多量体PEGポリマーを含む。別の態様において、本発明のPEG化C-ペプチドは分枝鎖状PEGポリマーを含む。

30

#### 【0012】

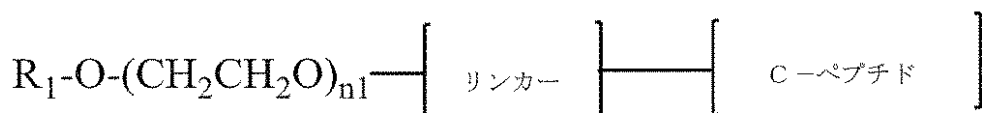
これらのPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG部分は約10kDaと約80kDaの間の分子量を有する。別の態様において、PEG部分は約20kDaと約60kDaの間の分子量を有する。別の態様において、PEG部分は約30kDaと約50kDaの間の分子量を有する。

#### 【0013】

これらの線状PEG化Cペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは一般式(I)：

40

#### 【化1】



式(I)

を有する。

50

## 【 0 0 1 4 】

式中、 $R_1$  はアルキル基、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、リンカーは -X-、-CO-、  
 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> -、- (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO -、- CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> -、- CO -  
 X - CO -、- (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> -、- (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> -、  
 - X - CO - X -、- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X -、- CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO -、  
 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> -、- (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X -、- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X -、  
 - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> X -、- X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO -、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> -、- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> -、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X -、- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - CO -、  
 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X - および - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - CO - から選択される。

10

## 【 0 0 1 5 】

式中、X はそれぞれ独立して -O-、-S- または -NH- から選択されるか存在せず、  
 $m_1$  はそれぞれ独立して 0 ~ 5 であり、 $m_2$  はそれぞれ独立して 1 ~ 5 であり、式中、  
 リンカーは C - ペプチドの N 末端アミノ基に結合する。

## 【 0 0 1 6 】

これらの線状 PEG 化 C - ペプチドのどれかの別の態様において、PEG 化 C - ペプチドは以下より選択される C - ペプチドに PEG 部分を連結するリンカーを含む；

- X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO -、
- X<sub>1</sub> - CO -、
- X<sub>1</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO -、
- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>3</sub></sub> - CO -、および
- X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X<sub>2</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO -。

20

## 【 0 0 1 7 】

式中、

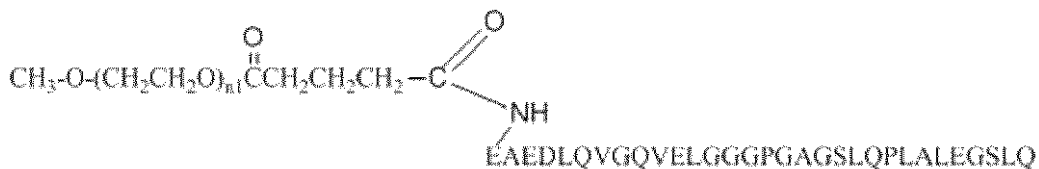
- X<sub>1</sub> は -O- または存在せず、
- X<sub>2</sub> は -NH- であり、
- $m_2$  は 1 ~ 5 であり、
- $m_3$  は 2 であり、そして、
- $m_4$  は 2 ~ 5 である。

30

## 【 0 0 1 8 】

別の実施形態において、本発明は次の構造を有する PEG 化 C - ペプチドを含む。

## 【 化 2 】



## 【 0 0 1 9 】

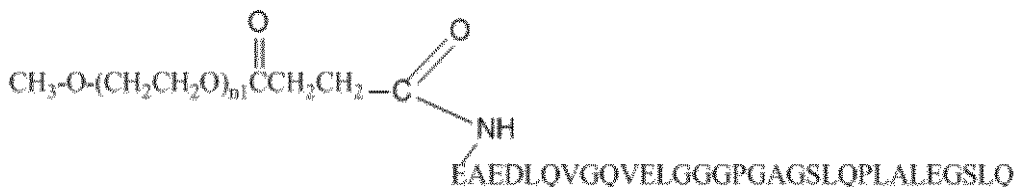
式中  $n_1$  は約 400 ~ 約 1000 である。

40

## 【 0 0 2 0 】

別の実施形態において、本発明は次の構造を有する PEG 化 C - ペプチドを含む。

## 【 化 3 】



## 【 0 0 2 1 】

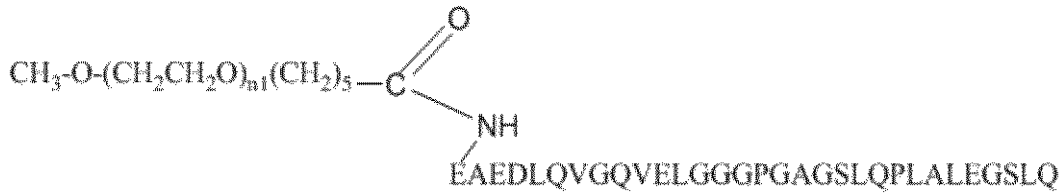
50

式中  $n_1$  は約 400 ~ 約 1000 である。

【 0 0 2 2 】

別の実施形態において、本発明は次の構造を有するPEG化C-ペプチドを含む。

【化 4】

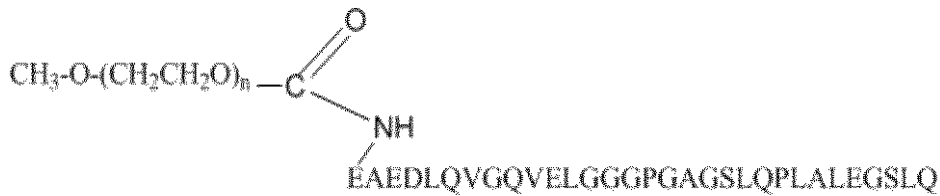


10

**【 0 0 2 3 】**

別の実施形態において、本発明は次の構造を有するPEG化C-ペプチドを含む。

【化 5】



【 0 0 2 4 】

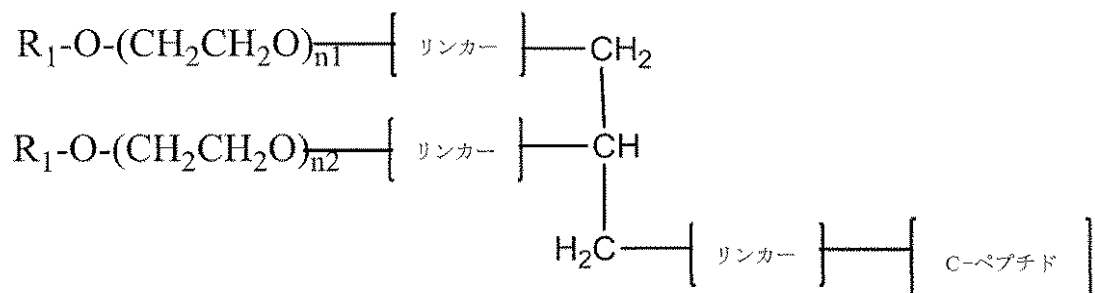
20

式中、 $n$  は約 400 ~ 約 1000 である。

【 0 0 2 5 】

別の態様において、PEG化C-ペプチドは一般式(II)の分枝鎖状PEGを含む。

【化 6】



30

式 ( I I )

【 0 0 2 6 】

式中、 $R_1$  はアルキル基、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、 $n_2$  は 20 ~ 800 であり、リンカーはそれぞれ独立して下記のように定義され、そして、式中、C - ペプチドに連結するリンカーは C - ペプチドの N 末端アミノ基に結合する。

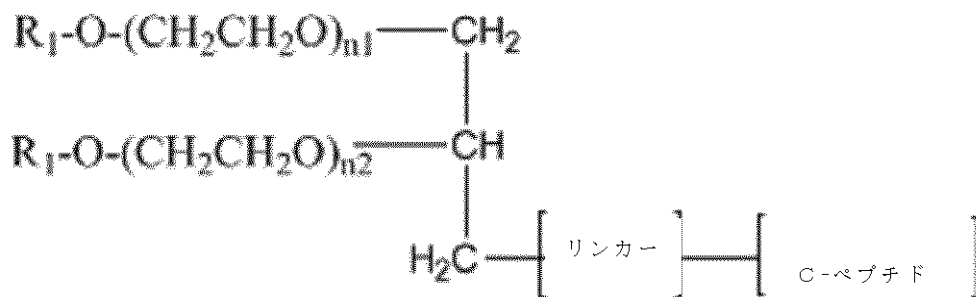
【 0 0 2 7 】

40

別の実施形態において、本発明は一般式 ( I I A ) の構造を有する P E G 化 C-ペプチドを包含する。



## 【化 7】



10

## 【0028】

式中、 $R_1$  はアルキル基、 $n_1$  は20～800であり、 $n_2$  は20～800であり、リンカーは -X-、-CO-、 $-(CH_2)_{m_2}-$ 、 $-(CH_2)_{m_1}-CO-$ 、 $CO-(CH_2)_{m_1}-$ 、 $CO-X-CO-$ 、 $-(CH_2)_{m_1}-X-(CH_2)_{m_1}-$ 、 $-(CH_2)_{m_1}-CO-(CH_2)_{m_1}-$ 、 $-X-CO-X-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-X-$ 、 $CO-(CH_2)_{m_1}-CO-$ 、 $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-$ 、 $-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-$ 、 $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-X$ 、 $-X-CO-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-X-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-X-CO-(CH_2)_{m_2}-CO-$ 、 $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-X-$  および  $-X-(CH_2)_{m_1}-CO-X-(CH_2)_{m_2}-CO-$  から選択される。

20

## 【0029】

式中、X はそれぞれ独立して -O-、-S- または -NH- から選択されるか存在せず、 $m_1$  はそれぞれ独立して0～5であり、 $m_2$  はそれぞれ独立して1～5であり、式中、リンカーはC-ペプチドのN末端アミノ基に結合する。

## 【0030】

これらの分枝鎖状PEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは以下より選択されるC-ペプチドにPEG部分を連結するリンカーを含む；

30

- $X_1-(CH_2)_{m_4}-CO-$
- $X_1-CO-$ 、
- $X_1-CO-(CH_2)_{m_4}-CO-$ 、
- $X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_3}-CO-$ 、および
- $X_1-(CH_2)_{m_2}-X_2-CO-(CH_2)_{m_4}-CO-$ 。

## 【0031】

式中、

- $X_1$  は -O- または存在せず、
- $X_2$  は -NH- であり、
- $m_2$  は1～5であり、
- $m_3$  は2であり、そして、
- $m_4$  は1～5である。

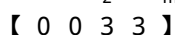
40

## 【0032】

これらの分枝鎖状PEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは以下より選択されるC-ペプチドにPEG部分を連結するリンカーを含む；

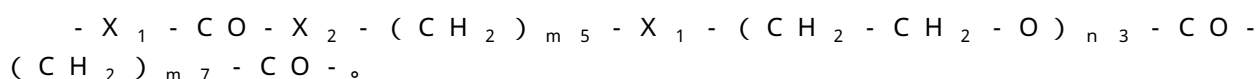
- $X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-X-$ 、
- $X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-(CH_2)_{m_5}-CO-$ 、
- $X_1-CO-X_2-(CH_2)_{m_5}-X_1-(CH_2-CH_2-O)_{n_3}-CO-$ 、
- および

50



【 0 0 3 4 】

10



【 0 0 3 5 】

$n_3$  は 1 ~ 4 0 0 である。

20

【 0 0 3 6 】

【化 8】



【 0 0 3 7 】

○

【 0 0 3 8 】

【化 9】



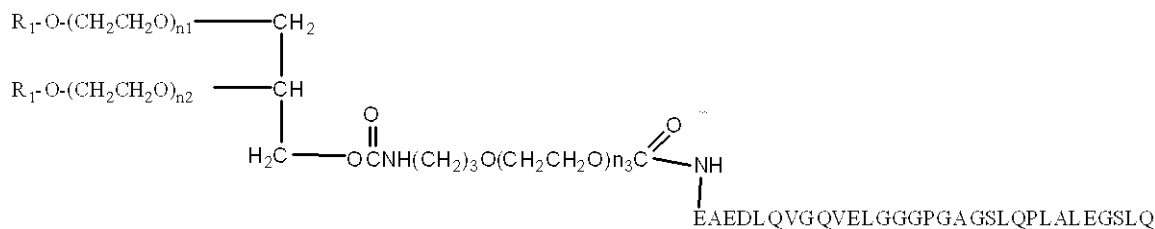
【 0 0 3 9 】

Q

## 【 0 0 4 0 】

別の実施形態において、本発明は次の構造を有するPEG化C-ペプチドを含む。

## 【 化 1 0 】



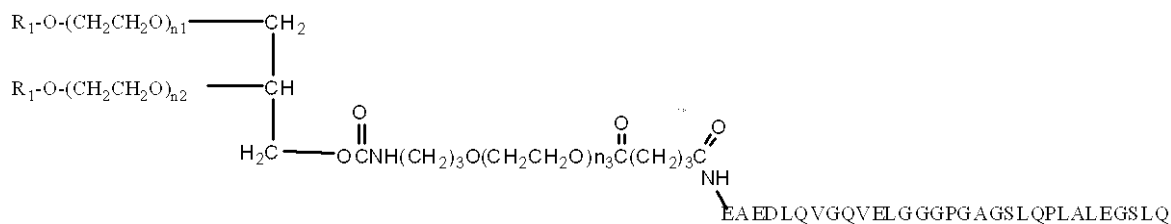
## 【 0 0 4 1 】

式中、 $R_1$  はアルキル基、 $n_1$  は200～800であり、 $n_2$  は200～800であり、 $n_3$  は1～400である。

## 【 0 0 4 2 】

別の実施形態において、本発明は次の構造を有するPEG化C-ペプチドを含む。

## 【 化 1 1 】



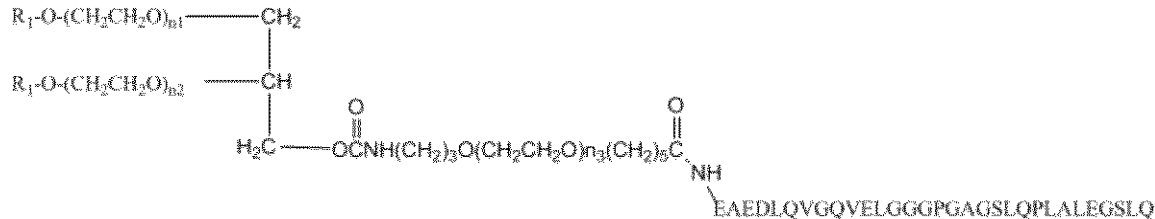
## 【 0 0 4 3 】

式中、 $R_1$  はアルキル基、 $n_1$  は200～800であり、 $n_2$  は200～800であり、 $n_3$  は1～400である。

## 【 0 0 4 4 】

別の実施形態において、本発明は次の構造を有するPEG化C-ペプチドを含む。

## 【 化 1 2 】



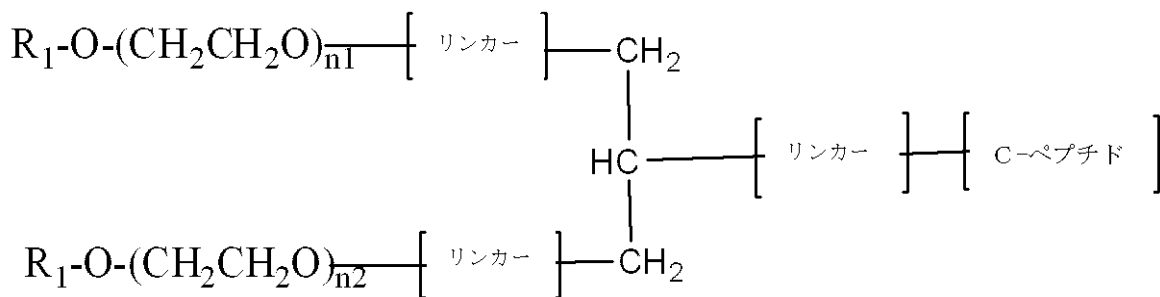
## 【 0 0 4 5 】

式中、 $R_1$  はアルキル基、 $n_1$  は200～800であり、 $n_2$  は200～800であり、 $n_3$  は1～400である。

## 【 0 0 4 6 】

別の態様において、PEG化C-ペプチドは一般式(III)の分枝鎖状PEGを含む。

## 【 化 1 3 】



式(III)

10

20

30

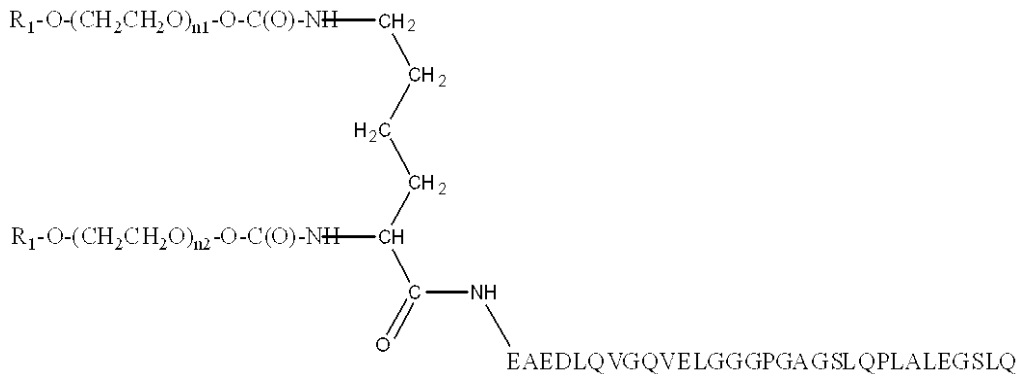
40

50



別の実施形態において、本発明は次の構造を有するPEG化C-ペプチドを含む。

【化17】



10

【0052】

式中、 $R_1$  はアルキル基、 $n_1$  は200～800であり、 $n_2$  は200～800である。

【0053】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約5倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを有する。

【0054】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約6倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを有する。

20

【0055】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約7倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを有する。

【0056】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約8倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを有する。

30

【0057】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約10倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを有する。

【0058】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約15倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを有する。

【0059】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約20倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを有する。

40

【0060】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約25倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを有する。

【0061】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかのある態様において、そのPEG化C-ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約50倍大

50

きい血漿中または血清中薬物動態 AUC プロファイルを有する。

【0062】

本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型 C - ペプチドよりも少なくとも約 75 倍大きい血漿中または血清中薬物動態 AUC プロファイルを有する。

【0063】

本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドはイヌに皮下投与されるとき、非修飾型 C - ペプチドよりも少なくとも約 100 倍大きい血漿中または血清中薬物動態 AUC プロファイルを有する。

【0064】

本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドと等効力の生物学的活性を有する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 95% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 90% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 80% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 70% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 60% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 50% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 40% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 30% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 20% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 10% の生物学的活性を保持する。本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかのある態様において、その PEG 化 C - ペプチドは非修飾型 C - ペプチドの少なくとも約 5% の生物学的活性を保持する。

10

20

30

【0065】

別の実施形態において、本発明は、本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかの PEG 化 C - ペプチドの治療用量を患者に投与することを含み、3 日以上投与間隔を用いるとき、患者の血漿中 PEG 化 C - ペプチドの平均定常状態濃度を約 0.2 nM と約 6 nM の間に維持する投与計画を包含する。

【0066】

別の実施形態において、本発明は、本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかの PEG 化 C - ペプチドの治療用量を患者に投与することを含み、3 日以上投与間隔を用いるとき、患者の血漿中 PEG 化 C - ペプチドの平均定常状態濃度を約 0.4 nM と約 6 nM の間に維持する投与計画を包含する。

40

【0067】

別の実施形態において、本発明は、本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかの PEG 化 C - ペプチドの治療用量を患者に投与することを含み、3 日以上投与間隔を用いるとき、患者の血漿中 PEG 化 C - ペプチドの平均定常状態濃度を約 0.6 nM と約 8 nM の間に維持する投与計画を包含する。

【0068】

別の実施形態において、本発明は、本特許請求の PEG 化 C - ペプチドのどれかの PEG

50

G 化 C - ペプチドの治療用量を患者に投与することを含み、3 日以上の投与間隔を用いるとき、患者の血漿中 P E G 化 C - ペプチドの平均定常状態濃度を約 0 . 8 n M と約 1 0 n M の間に維持する投与計画を包含する。

【 0 0 6 9 】

別の実施形態において、本発明は、本特許請求の P E G 化 C - ペプチドのどれかの治療用量を患者に投与することを含み、治療を必要とする患者における最小有効治療レベルを超えるレベルに C - ペプチドを維持する方法を包含する。

【 0 0 7 0 】

本特許請求の P E G 化 C - ペプチドのどれかの別の態様において、哺乳類動物に有効治療用量を皮下投与するとき、P E G 化 C - ペプチドは悪性の副作用が実質的に無い。

10

【 0 0 7 1 】

別の実施形態において、本発明は、本特許請求の P E G 化 C - ペプチドのどれかの治療用量を患者に投与することを含み、治療を必要とする患者において 1 つ以上の糖尿病の長期合併症を治療する方法を包含する。

【 0 0 7 2 】

別の実施形態において、本発明は、インスリンと併用して本特許請求の P E G 化 C - ペプチドのどれかの治療用量の P E G 化 C - ペプチドを患者に投与することを含む糖尿病の患者を治療する方法を包含する。

【 0 0 7 3 】

これらの方法のどれかの 1 つの態様において、P E G 化 C - ペプチドは、約 3 日以上の投与間隔で投与される。これらの方法のどれかの 1 つの態様において、P E G 化 C - ペプチドは、約 4 日以上の投与間隔で投与される。これらの方法のどれかの 1 つの態様において、P E G 化 C - ペプチドは、約 5 日以上の投与間隔で投与される。これらの方法のどれかの 1 つの態様において、P E G 化 C - ペプチドは、約 6 日以上の投与間隔で投与される。これらの方法のどれかの 1 つの態様において、P E G 化 C - ペプチドは、約 7 日以上の投与間隔で投与される。

20

【 0 0 7 4 】

ある実施形態において、P E G 化 C - ペプチド治療法の開始前の神経伝達速度と比較して、神経伝達速度が治療によって少なくとも 1 0 % 改善することになる。

【 0 0 7 5 】

30

これらの方法のどれかの別の態様において、P E G 化 C - ペプチドの血漿中濃度は約 0 . 1 n M 以上に維持される。これらの方法のどれかの別の態様において、P E G 化 C - ペプチドの血漿中濃度は約 0 . 2 n M 以上に維持される。これらの方法のどれかの別の態様において、P E G 化 C - ペプチドの血漿中濃度は約 0 . 3 以上に維持される。これらの方法のどれかの別の態様において、P E G 化 C - ペプチドの血漿中濃度は約 0 . 4 n M 以上に維持される。

【 0 0 7 6 】

これらの方法のどれかの別の態様において、治療用量の P E G 化 C - ペプチドが皮下投与される。これらの方法のどれかの別の態様において、治療用量の P E G 化 C - ペプチドが経口投与される。

40

【 0 0 7 7 】

別の実施形態において、本発明は、C - ペプチド置換治療法として治療を必要とする患者に本特許請求の P E G 化 C - ペプチドのどれかを利用することを包含する。

【 0 0 7 8 】

別の実施形態において、本発明は、治療を必要とする患者において 1 つ以上の糖尿病の長期合併症を治療するために本特許請求の P E G 化 C - ペプチドのどれかを利用することを包含する。ある実施形態において、糖尿病の長期合併症は、網膜症、末梢神経障害、自律神経障害および腎障害からなる群より選択される。ある実施形態において、糖尿病の長期合併症は末梢神経障害である。ある実施形態において、末梢神経障害は既成の末梢神経障害である。ある実施形態において、P E G 化 C - ペプチド治療法の開始前の神経伝達速

50

度と比較して、神経伝達速度が治療によって少なくとも10%改善することになる。

【0079】

別の実施形態において、本発明は薬剤的に許容可能な担体または賦形剤と本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかを含む医薬組成物を包含する。ある実施形態において、薬剤的に許容可能な担体または賦形剤はソルビトールである。ある実施形態において、ソルビトールは約2%から約8%(重量/重量)の濃度である。ある実施形態において、ソルビトールは約4.7%の濃度である。ある実施形態において、医薬組成物は約pH5.5から約pH6.5の範囲のpHに緩衝される。ある実施形態において、医薬組成物は約6.0のpHに緩衝される。ある実施形態において、医薬組成物は約5mMから約25mMの濃度のリン酸緩衝液で緩衝される。ある実施形態において、医薬組成物は約10mMの濃度のリン酸緩衝液で緩衝される。これらの実施形態のどれかの1つの態様において、前記医薬組成物は、本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかを40で既定時間保温した後に測定されるその安定性がpH7.0で同じPEG化C-ペプチドと0.9%生理食塩水を含む医薬組成物と比較して向上したことを特徴とする。異なる実施形態において、前記既定時間は約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間または約6週間である。

10

【0080】

別の実施形態において、本発明はインスリンと本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかを含む医薬組成物を包含する。

【0081】

ある実施形態は、ヒトのインスリン依存性糖尿病の患者における低血糖症のリスクを低減するために、開示されるPEG化C-ペプチドのどれかをインスリンの投与をさらに含む計画において使用することを包含する。その計画は、a)インスリンを患者に投与すること、b)治療用量のPEG化C-ペプチドを患者のインスリン投与に用いられたのとは別の部位に投与すること、c)治療用量のPEG化C-ペプチドの結果変化した患者のインスリン要求性に基づいて投与されるインスリンの投薬量、投薬タイプまたは投薬頻度を調節することを含む。

20

【0082】

いくつかの実施形態において、前記患者は少なくとも1つの糖尿病の長期合併症を有する。

30

【0083】

ある実施形態はヒトのインスリン依存性の患者を治療する方法を包含し、その方法は以下の段階を含む；a)神経障害を有する患者にインスリンを投与する段階、b)開示されるPEG化C-ペプチドのどれかの治療用量を患者のインスリン投与に用いられたのとは別の部位に皮下投与する段階、c)治療用量のPEG化C-ペプチドの結果変化した患者のインスリン要求性のモニターに基づき投与されるインスリンの投薬量、投薬タイプまたは投薬頻度を調節する段階。その段階において、調節されたインスリン用量により低血糖症のリスク、発生または重症度が低減し、調節されたインスリン用量はPEG化C-ペプチド治療の開始前の患者のインスリン用量よりも少なくとも10%少ない。

【0084】

ある実施形態はヒトのインスリン依存性の患者におけるインスリン利用を低減させる方法を包含し、その方法は以下の段階を含む；a)インスリンを患者に投与する段階、b)開示されるPEG化C-ペプチドのどれかの治療用量を患者のインスリン投与に用いられたのとは別の部位に皮下投与する段階、c)治療用量のPEG化C-ペプチドの結果変化した患者のインスリン要求性のモニターに基づき投与されるインスリンの投薬量、投薬タイプまたは投薬頻度を調節する段階。その段階において、調節されたインスリン用量では低血糖症は誘起されず、調節されたインスリン用量はPEG化C-ペプチド治療の開始前の患者のインスリン用量よりも少なくとも10%少ない。

40

【0085】

本発明の原理を利用する例示的な実施形態を述べる以下の詳細な説明とそれに付随する

50



図面を参照することにより、本発明の特徴と利点をよりよく理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】図1は、40 kDaの本発明の分枝鎖状PEG化C-ペプチドの逆相クロマトグラムを示す。

【図2】図2は、40 kDaの本発明の分枝鎖状PEG化C-ペプチドのサイズ排除クロマトグラムを示す。

【図3】図3は、20 kDaの本発明の直鎖状PEG化C-ペプチドの逆相クロマトグラムを示す。

【図4】図4は、20 kDaの本発明の直鎖状PEG化C-ペプチドのサイズ排除クロマトグラムを示す。

【図5A】図5は、単回皮下投与後のイヌでの非修飾型C-ペプチドの血漿中濃度時間プロファイルを示す。図5Aは1日の時間尺度でのプロファイルを示す。図5Bは12日の時間尺度でのプロファイルを示す。

【図5B】図5は、単回皮下投与後のイヌでの非修飾型C-ペプチドの血漿中濃度時間プロファイルを示す。図5Aは1日の時間尺度でのプロファイルを示す。図5Bは12日の時間尺度でのプロファイルを示す。

【図6】図6は、20 kDaの直鎖状PEG化C-ペプチド（菱形）と40 kDaの分枝鎖状PEG化C-ペプチド（正方形）の単回皮下投与後のイヌでのC-ペプチドの線形目盛を用いる血漿中濃度時間プロファイルを示す。

【図7】図7は、20 kDaの直鎖状PEG化C-ペプチド（菱形）と40 kDaの分枝鎖状PEG化C-ペプチド（正方形）の単回皮下投与後のイヌでのC-ペプチドの片対数目盛を用いる血漿中濃度時間プロファイルを示す。

【図8A】図8は、PEG化C-ペプチドの単回皮下投与後のイヌでのC-ペプチドの血漿中濃度時間プロファイルを示す。図8Aは線形目盛を用いて表されたデータを示す。図8Bは片対数形式で表されたデータを示す。

【図8B】図8は、PEG化C-ペプチドの単回皮下投与後のイヌでのC-ペプチドの血漿中濃度時間プロファイルを示す。図8Aは線形目盛を用いて表されたデータを示す。図8Bは片対数形式で表されたデータを示す。

【図9A】図9は、PEG化C-ペプチドの単回皮下投与後のイヌでの $C_{max}$ とAUC(0-t)を示す。図9Aは $C_{max}$ を示し、そして、図9BはAUC(0-t)を示す。

【図9B】図9は、PEG化C-ペプチドの単回皮下投与後のイヌでの $C_{max}$ とAUC(0-t)を示す。図9Aは $C_{max}$ を示し、そして、図9BはAUC(0-t)を示す。

【図10A】図10は、PEG化C-ペプチドの単回皮下投与後のSprague Dawleyラットでの平均(±SD)C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA, 線形目盛; パネルB, 片対数目盛。

【図10B】図10は、PEG化C-ペプチドの単回皮下投与後のSprague Dawleyラットでの平均(±SD)C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA, 線形目盛; パネルB, 片対数目盛。

【図11A】図11は、PEG化C-ペプチドの単回皮下投与後のカニクイザルでの平均(±SD)C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA, 線形目盛; パネルB, 片対数目盛。

【図11B】図11は、PEG化C-ペプチドの単回皮下投与後のカニクイザルでの平均(±SD)C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA, 線形目盛; パネルB, 片対数目盛。

【図12A】図12は、PEG化C-ペプチドの複数回皮下投与後のSprague Dawleyラットでの平均C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA, オス、線形目盛; パネルB, メス、線形目盛; パネルC, オス、片対数目盛; パネルD,

10

20

30

40

50

メス、片対数目盛。

【図12B】図12は、PEG化C-ペプチドの複数回皮下投与後のSprague Dawleyラットでの平均C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA，オス、線形目盛；パネルB，メス、線形目盛；パネルC，オス、片対数目盛；パネルD，メス、片対数目盛。

【図12C】図12は、PEG化C-ペプチドの複数回皮下投与後のSprague Dawleyラットでの平均C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA，オス、線形目盛；パネルB，メス、線形目盛；パネルC，オス、片対数目盛；パネルD，メス、片対数目盛。

【図12D】図12は、PEG化C-ペプチドの複数回皮下投与後のSprague Dawleyラットでの平均C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA，オス、線形目盛；パネルB，メス、線形目盛；パネルC，オス、片対数目盛；パネルD，メス、片対数目盛。

【図13A】図13は、Sprague Dawleyラットでの $C_{max}$ と $AUC_{(0-t)}$ の間の関係を用量の関数として示す。パネルA， $C_{max}$ 、最初の投与；パネルB， $AUC_{(0-inf)}$ 、最初の投与；パネルC， $C_{max}$ 、最後の投与；パネルD， $AUC_{(0-inf)}$ 、最後の投与。

【図13B】図13は、Sprague Dawleyラットでの $C_{max}$ と $AUC_{(0-t)}$ の間の関係を用量の関数として示す。パネルA， $C_{max}$ 、最初の投与；パネルB， $AUC_{(0-inf)}$ 、最初の投与；パネルC， $C_{max}$ 、最後の投与；パネルD， $AUC_{(0-inf)}$ 、最後の投与。

【図13C】図13は、Sprague Dawleyラットでの $C_{max}$ と $AUC_{(0-t)}$ の間の関係を用量の関数として示す。パネルA， $C_{max}$ 、最初の投与；パネルB， $AUC_{(0-inf)}$ 、最初の投与；パネルC， $C_{max}$ 、最後の投与；パネルD， $AUC_{(0-inf)}$ 、最後の投与。

【図13D】図13は、Sprague Dawleyラットでの $C_{max}$ と $AUC_{(0-t)}$ の間の関係を用量の関数として示す。パネルA， $C_{max}$ 、最初の投与；パネルB， $AUC_{(0-inf)}$ 、最初の投与；パネルC， $C_{max}$ 、最後の投与；パネルD， $AUC_{(0-inf)}$ 、最後の投与。

【図14A】図14は、複数回皮下投与でのカニクイザルでの平均C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA，オス、線形目盛；パネルB，メス、線形目盛；パネルC，オス、片対数目盛；パネルD，メス、片対数目盛。

【図14B】図14は、複数回皮下投与でのカニクイザルでの平均C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA，オス、線形目盛；パネルB，メス、線形目盛；パネルC，オス、片対数目盛；パネルD，メス、片対数目盛。

【図14C】図14は、複数回皮下投与でのカニクイザルでの平均C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA，オス、線形目盛；パネルB，メス、線形目盛；パネルC，オス、片対数目盛；パネルD，メス、片対数目盛。

【図14D】図14は、複数回皮下投与でのカニクイザルでの平均C-ペプチド血漿中濃度時間プロファイルを示す。パネルA，オス、線形目盛；パネルB，メス、線形目盛；パネルC，オス、片対数目盛；パネルD，メス、片対数目盛。

【図15A】図15は、カニクイザルでの $C_{max}$ と $AUC_{(0-t)}$ の間の関係を用量の関数として示す。パネルA， $C_{max}$ 、最初の投与；パネルB， $AUC_{(0-inf)}$ 、最初の投与；パネルC， $C_{max}$ 、最後の投与；パネルD， $AUC_{(0-inf)}$ 、最後の投与。

【図15B】図15は、カニクイザルでの $C_{max}$ と $AUC_{(0-t)}$ の間の関係を用量の関数として示す。パネルA， $C_{max}$ 、最初の投与；パネルB， $AUC_{(0-inf)}$ 、最初の投与；パネルC， $C_{max}$ 、最後の投与；パネルD， $AUC_{(0-inf)}$ 、最後の投与。

【図15C】図15は、カニクイザルでの $C_{max}$ と $AUC_{(0-t)}$ の間の関係を用量

10

20

30

40

50

の関数として示す。パネル A,  $C_{max}$ 、最初の投与；パネル B,  $AUC_{(0-inf)}$ 、最初の投与；パネル C,  $C_{max}$ 、最後の投与；パネル D,  $AUC_{(0-inf)}$ 、最後の投与。

【図 15 D】図 15 は、カニクイザルでの  $C_{max}$  と  $AUC_{(0-t)}$  の間の関係を用量の関数として示す。パネル A,  $C_{max}$ 、最初の投与；パネル B,  $AUC_{(0-inf)}$ 、最初の投与；パネル C,  $C_{max}$ 、最後の投与；パネル D,  $AUC_{(0-inf)}$ 、最後の投与。

【図 16】図 16 は、8 週までの間、処理した 4 群のラットのそれぞれの群での尾部神経伝達速度 (NCV) を示す (実施例 6 を参照のこと。)。この図および次の 3 つの図では、グループ 1 は賦形剤対照を表し (ストレプトゾトシン [STZ] 無し)、グループ 2 は賦形剤と STZ で処理されたグループを表し、グループ 3 は STZ と  $1.0 \text{ mg/kg/週}$  ( $1.0 \text{ mg/ml}$ ) のヒト PEG 化 C - ペプチドを表し (実施例 12)、そして、グループ 4 は STZ と  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  ( $1.0 \text{ mg/ml}$ ) のヒト PEG 化 C - ペプチド (実施例 12) を表す。図 16 において、パネル A は基線 NCV 測定値を表し、そして、パネル B は賦形剤のみの投与または  $1.0$  か  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  のどちらかでの PEG 化 C - ペプチドの投与のどちらかの (基線から) 4 週間の期間の後の尾部 NCV を示す。図 16 パネル C は賦形剤のみの投与または  $1.0$  か  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  のどちらかでの PEG 化 C - ペプチドの投与のどちらかの (基線から) 8 週間の期間の後の尾部 NCV を示す。

【図 17 A】図 17 は、図 16 に記載されるものと同じ 4 群の動物の各々における指 NCV を示す。図 17 においてパネル A は基線測定値を示し、そして、パネル B は、賦形剤のみの投与または  $1.0$  か  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  のどちらかでの PEG 化 C - ペプチドの投与のどちらかの (基線から) 4 週間の期間の後での指 NCV を示す。図 17 パネル C は、賦形剤のみの投与または  $1.0$  か  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  のどちらかでの PEG 化 C - ペプチドの投与のどちらかの (基線から) 8 週間の期間の後での指 NCV を示す。

【図 17 B】図 17 は、図 16 に記載されるものと同じ 4 群の動物の各々における指 NCV を示す。図 17 においてパネル A は基線測定値を示し、そして、パネル B は、賦形剤のみの投与または  $1.0$  か  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  のどちらかでの PEG 化 C - ペプチドの投与のどちらかの (基線から) 4 週間の期間の後での指 NCV を示す。図 17 パネル C は、賦形剤のみの投与または  $1.0$  か  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  のどちらかでの PEG 化 C - ペプチドの投与のどちらかの (基線から) 8 週間の期間の後での指 NCV を示す。

【図 17 C】図 17 は、図 16 に記載されるものと同じ 4 群の動物の各々における指 NCV を示す。図 17 においてパネル A は基線測定値を示し、そして、パネル B は、賦形剤のみの投与または  $1.0$  か  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  のどちらかでの PEG 化 C - ペプチドの投与のどちらかの (基線から) 4 週間の期間の後での指 NCV を示す。図 17 パネル C は、賦形剤のみの投与または  $1.0$  か  $3.0 \text{ mg/kg/週}$  のどちらかでの PEG 化 C - ペプチドの投与のどちらかの (基線から) 8 週間の期間の後での指 NCV を示す。

【図 18】図 18 は、実験の全経過時間にわたる図 17 に記載されるものと同じ 4 処理群における指 NCV の相対変化を示す。

【図 19】図 19 は、図 16 および図 17 に記載されるものと同じ 4 処理群における尾部および指 NCV の処置から 8 週間後の基線測定値に対する相対変化を示す。

【図 20】図 20 は C - ペプチド、PEG 試薬および PEG 化 C - ペプチドのフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) を示す。

【図 21】図 21 は、C - ペプチド、PEG 試薬および PEG 化 C - ペプチドのフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) の拡大領域を示す。

【図 22】図 22 は、重水中で収集された C - ペプチド、PEG 試薬および PEG 化 C - ペプチドのフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) を示す。

【図 23】図 23 は、重水中で収集された C - ペプチド、PEG 試薬および PEG 化 C - ペプチドのフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) を示す。

【図 24】図 24 は、キモトリブシンとの保温後の C - ペプチド ( $1 \text{ mg/mL}$ ) と PEG

10

20

30

40

50

G 化 C - ペプチド ( 1 0 m g / m L ) のペプチドマップを示す。

【図 2 5】図 2 5 は、P B S 緩衝液中の ( 約 0 . 6 m g / m L の ) P E G 化 C - ペプチドの正規化された沈降係数分布を示す。

【図 2 6】図 2 6 は、C - ペプチドと P E G 化 C - ペプチドの円偏光二色性分析を示す。

【図 2 7】図 2 7 は、実施例 1 2 の P E G 化 C - ペプチドの試料のサイズ排除クロマトグラフィー ( S E C ) の結果を示す。

【図 2 8】図 2 8 は、実施例 1 2 の 2 0 k D a の P E G 化 C - ペプチドと 4 0 k D a の P E G 化 C - ペプチドの重ね合わせたクロマトグラムを示す。

【図 2 9】図 2 9 は、実施例 1 2 の P E G 化 C - ペプチドのゲル電気泳動であるドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) の結果を示す。

【図 3 0】図 3 0 は、天然 C - ペプチドと比較した P E G 化 C - ペプチドの生物学的活性の E R K リン酸化アッセイでの評価の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 8 7 】

発明の詳細な説明  
定義

用語「活性がある」または「活性化された」がある特定の官能基と合わせて使用される  
とき、それらは、別の分子上で求電子試薬または求核試薬と容易に反応する反応性官能基  
を意味する。これは、反応するために強力な触媒または非常に非実用的な反応条件を必要  
とする官能基 ( すなわち、「非反応」基または「不活性」基 ) と対照的である。本明細書  
において使用されるように、用語「官能基」またはその任意の同義語はその保護化形態な  
らびに非保護化形態を包含するとされている。

【 0 0 8 8 】

用語「アルコキシ基」は - O - R 基を意味し、式中、R はアルキル基または置換アルキ  
ル基、好ましくは C 1 ~ 6 アルコキシ基 ( 例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロピルオ  
キシ基など ) である。

【 0 0 8 9 】

用語「アルキル基」は炭化水素を、典型的には 1 から 1 2 原子までの長さの炭化水素を  
意味する。炭化水素は分枝状または線状であることができ、そして、飽和型であることが  
好ましいが必須ではない。アルキル基の例にはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル  
基、ペンチル基、2-メチルブチル基、2-エチルプロピル基などが含まれる。本明細書にお  
いて使用されるように、「アルキル基」にはシクロアルキルならびにシクロアルキレンア  
ルキル類が含まれる。用語「低級アルキル基」は 1 個から 6 個までの炭素原子を含むアルキ  
ル基を意味し、そして、直鎖状または分枝状であることができる。

【 0 0 9 0 】

本明細書において使用される用語「 $C_{max}$ 」は、モニターされた放出期間中に生じる  
薬剤の最大血清中濃度または最大血漿中濃度である。

【 0 0 9 1 】

本明細書において使用される用語「 $C_{min}$ 」は治療期間の放出期間中に生じる薬剤の  
最小血清中濃度または最小血漿中濃度である。

【 0 0 9 2 】

本明細書において使用される用語「 $C_{ave}$ 」は、放出プロファイル曲線 ( A U C ) の  
下の面積を放出経過時間で除算することにより得られる薬剤の平均血清中濃度または平均  
血漿中濃度である。

【 0 0 9 3 】

本明細書において使用される用語「 $C_{ss-ave}$ 」は、少なくとも 5 回の消失半減期  
の間に投薬した後の複数回投与計画の間に得られる薬剤の平均定常状態濃度である。一度  
でも薬剤の平均定常状態濃度が得られると、投薬間隔の間では薬剤の濃度が変動するとい  
うことが認識されるであろう。

【 0 0 9 4 】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される用語「 $t_{max}$ 」は $C_{max}$ が観察される投薬後の時間である。

【0095】

本明細書において使用される用語「AUC」は血清中または血漿中濃度時間曲線の曲線下面積を意味し、試料収集間隔の全体に関して台形公式により計算される。

【0096】

用語「生物学的利用能」は投与された薬剤うちの循環系に達した薬剤の量を意味し、パーセントで表される。生物学的に利用可能な物質の量は、投与後に始まり既定の時点で終わる期間の薬剤の放出プロファイルについて計算されたAUCとして定義されることができる。当技術分野において理解されているように、既定の時点（X軸）での対象（Y軸）として生物学的に活性のある薬剤の血清中レベルをグラフ化することにより放出プロファイルが作成される。生物学的利用能 はしばしば%生物学的利用能という表現で言及され、それは薬剤の持続性放出組成物の投与の後にその（C-ペプチドなどの）薬剤について達成される生物学的利用能であって、同等の用量の薬剤を静脈内投与した後にその薬剤について達成される生物学的利用能で除算し、100で乗算したものである。

【0097】

「保存的アミノ酸置換」または「保存的変異」という表現はあるアミノ酸の共通する性質を有する別のアミノ酸による置換を意味する。個々のアミノ酸の間で共通の性質を定義する機能的な方法は同属の生物の対応するタンパク質の間でのアミノ酸変化の正規化された頻度を解析することである (Schulz GE および RH Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag (1979年))。そのような解析によれば、あるグループのアミノ酸が好んで互いを交換しあう場合、アミノ酸のグループが定義され得る。したがって、それらは全体のタンパク質構造への影響についてもっともよく互いに類似している (Schulz GE and RH Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag (1979年))。

【0098】

この方法で定義されるアミノ酸のグループの例にはグルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、リシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる「荷電/極性グループ」、プロリン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる「芳香族または環状グループ」、ならびに、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、セリン、トレオニンおよびシステインからなる「脂肪族グループ」が含まれる。

【0099】

各グループ内でサブグループが特定されることもできる。例えば、リシン、アルギニンおよびヒスチジンから成る「正荷電サブグループ」、グルタミン酸およびアスパラギン酸からなる「負荷電サブグループ」、ならびに、アスパラギンおよびグルタミンからなる「極性サブグループ」からなるサブグループに荷電/極性アミノ酸のグループを細分化することができる。芳香族または環状グループを、プロリン、ヒスチジンおよびトリプトファンからなる「窒素環サブグループ」ならびにフェニルアラニンおよびチロシンからなる「フェニルサブグループ」からなるサブグループに細分化することができる。バリン、ロイシンおよびイソロイシンからなる「大脂肪族非極性サブグループ」、メチオニン、セリン、トレオニンおよびシステインからなる「脂肪族やや極性サブグループ」ならびにグリシンおよびアラニンからなる「小残基サブグループ」からなるサブグループに脂肪族グループを細分化することができる。

【0100】

保存的変異の例には上記のサブグループ内のアミノ酸のアミノ酸置換が含まれる。例えば、正電荷が維持され得るようにアルギニンのリシンとの置換、そして、その逆が含まれる。負電荷が維持され得るようにアスパラギン酸のグルタミン酸との置換、そして、その逆が含まれる。遊離-OH基が維持され得るようにトレオニンのセリンとの置換、そして、その逆が含まれる。遊離-NH<sub>2</sub>基が維持され得るようにアスパラギンのグルタミンとの置

10

20

30

40

50

換が含まれる。「半保存的変異」には上述の同じグループ内のアミノ酸だが同じサブグループを共にしないアミノ酸のアミノ酸置換が含まれる。例えば、アスパラギン酸のアスパラギンへの変異またはアスパラギンのリシンへの変異など、すべて同じグループだが異なるサブグループのアミノ酸が関係する。「非保存的変異」には異なるグループ間でのアミノ酸置換、例えばロイシンのリシンとの置換、セリンのフェニルアラニンとの置換などが含まれる。

#### 【0101】

用語「ダルトン」、「Da」または「D」は質量の任意単位を意味し、炭素12の各種の質量の12分の1は $1.657 \times 10^{-24}$  g に等しい。用語「kDa」はキロダルトン（すなわち、1000ダルトン）のことである。

10

#### 【0102】

用語「糖尿病 (diabetes)」、「糖尿病 (diabetes mellitus)」または「糖尿病性症状」は、特に指示されない限り、全ての形態の糖尿病を包含する。用語「1型糖尿病患者」または「1型糖尿病」は約7.0 mmol/L よりも高い空腹時血漿グルコース濃度と約0.2 nmol/L 以下の空腹時C-ペプチドレベルを有する患者を意味する。用語「1.5型糖尿病患者」または「1.5型糖尿病」は約7.0 mmol/L よりも高い空腹時血漿グルコース濃度と約0.4 nmol/L 以下の空腹時C-ペプチドレベルを有する患者を意味する。用語「2型糖尿病患者」または「2型糖尿病」は約7.0 mmol/L よりも高い空腹時血漿グルコース濃度とC-ペプチドレベルの正常な生理的範囲（約0.47から2.5 nmol/L）の範囲内またはそれよりも高い空腹時C-ペプチドレベルを有する患者を一般的に意味する。最初に2型糖尿病患者であると診断された患者が後にインスリン依存性糖尿病を発生する可能性があり、そして、たとえ、彼らのC-ペプチドのレベルが1.5型または1型糖尿病患者のレベル（< 0.2 nmol/L）に落ちても、2型の患者であると診断されたままである可能性があることが認識されるであろう。

20

#### 【0103】

用語「インスリン依存性患者」または「インスリン依存性糖尿病」は、明示されない限り、正常なグルコースレベルを適切に維持するためにインスリン投与を必要とするあらゆる形態の糖尿病患者/糖尿病を包含する。

#### 【0104】

糖尿病はしばしば空腹時血中グルコースレベル、インスリンレベルまたは（典型的にはヘモグロビンA<sub>1c</sub>、Hb<sub>1c</sub>、HbA<sub>1c</sub>またはA<sub>1c</sub>と称される）糖化ヘモグロビンのレベルを測定することにより診断される。正常な成人のグルコースレベルは60~126 mg/dLである。正常なインスリンレベルは30~60 pmol/Lである。正常なHbA<sub>1c</sub>レベルは一般的に6%未満である。世界保健機構は糖尿病について空腹時血漿中グルコース濃度の診断値を7.0 mmol/L（126 mg/dL）以上（全血では6.1 mmol/Lもしくは110 mg/dL）または11.1 mmol/L以上の（200 mg/dL以上の）2時間後血中グルコースレベルと定義している。糖尿病の高いリスクを示唆する、または、示すその他の値には、140/90 mmHg以上に上昇した動脈圧、血漿中トリグリセリド類の上昇（1.7 mmol/L [150 mg/dL] 以上）、および/または、低HDLコレステロール（男性については0.9 mmol/L [35 mg/dL] 未満、女性については1.0 mmol/L [39 mg/dL] 未満）、中心性肥満（30 kg/m<sup>2</sup>を超えるBMI）、尿中アルブミン排泄速度が20 µg/分以上の、または、アルブミンクレアチニン比率が30 mg/g以上である微量アルブミン尿症が含まれる。

30

40

#### 【0105】

用語「送達薬剤」は、治療薬の経口送達に有効な担体化合物または担体分子を意味し、そして、「担体」と互換的に使用することが可能である。

#### 【0106】

用語「相同性」は、類似の機能またはモチーフを有する遺伝子またはタンパク質を同定

50

するために用いられる配列類似性の数学に基づく比較を説明する。本発明の核酸配列およびタンパク質配列を、例えば、そのほかのファミリーメンバー、関連の配列またはホモログを同定するために、「問い合わせ配列」として使用して公のデータベースに対して検索を行うことができる。Altschul et al.: J. Mol. Biol. 215: 403-410, (1990年)のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いてそのような検索を行うことができる。NBLASTプログラム、スコア=100、ワードレングス=12の条件を用いてBLASTヌクレオチド検索を実行し、本発明の核酸分子に対して相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラム、スコア=50、ワードレングス=3の条件を用いてBLASTタンパク質検索を実行し、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較を目的としてギャップアライメントを得るために、Altschul et al.: Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402, (1997年)において説明されるようにGapped BLASTを利用することができる。BLASTプログラムとGapped BLASTプログラムを利用するとき、各プログラムの初期設定パラメーター(例えば、XBLASTおよびBLAST)を使用することができる(www.ncbi.nlm.nih.govを参照のこと。)

#### 【0107】

用語「相同な」は、同じ種の動物のスーパーファミリー由来のタンパク質(例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー)ならびに異なる種の動物由来の相同タンパク質(例えば、ミオシン軽鎖ポリペプチド; Reeck et al.: Cell 50: 667, (1987年)を参照のこと。)を含む「共通する進化上の起源」を有する2つのタンパク質の間の関係を意味する。そのようなタンパク質(およびそれらをコードする核酸)は、パーセント同一性という表現であろうと、特定の残基もしくはモチーフおよび保存位置の存在によろうと、それらの配列類似性によって反映される配列相同性を有する。特定の実施形態において、BLAST、FASTA、DNA Strider、CLUSTALなどの公知の配列比較アルゴリズムにより決定されるように、既定の長さの核酸配列について少なくとも約85%の、より好ましくは少なくとも約90%または少なくとも約95%のヌクレオチドが一致するとき、2つの核酸配列は「実質的に相同である」または「実質的に類似する」。そのような配列の例は本発明の具体的な遺伝子の対立異型または種異型である。実質的に相同な配列はまた、ハイブリダイゼーションによって、例えば、その特定の系について定義されるストリンジェントな条件でのサザンハイブリダイゼーションにおいて同定される可能性がある。

#### 【0108】

同様に、本発明の特定の実施形態において、80%より多くのアミノ酸残基が同一であるとき、または、約90%以上のアミノ酸残基が類似している(すなわち、機能的に同一である)とき、2つのアミノ酸配列は「実質的に相同である」または「実質的に類似する」。好ましくは、類似の、または、相同なポリペプチド配列は、例えば、GCG(Genetics Computer Group, バージョン7, Madison, ウィスコンシン州) pileupプログラムを用いる、または、上記のプログラムおよびアルゴリズムのうちのどれかを用いるアラインメントにより同定される。前記プログラムは、SmithとWatermanの局所的相同性アルゴリズムを初期設定値、ギャップクリエーションペナルティー =  $-(1 + 1/3k)$ 、kはギャップ拡張数であり、平均マッチ = 1、平均ミスマッチ = 0.333で用いることができる。

#### 【0109】

本明細書において使用されるように、2つ以上の配列を配列マッチングが最大化するように、すなわち、ギャップと挿入を考慮して整列させるとき、「同一性」はそれらの配列での対応する位置における同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを意味する。Computational Molecular Biology, Lesk AM, Ed., Oxford University Press, New York, (1988年)、Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith DW, Ed., Academic Press, New York, (1993)、Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin AM and Griffin HG, Eds., Humana Press, New Jersey, (1994年)、Sequence An

alysis in Molecular Biology, von Heinje G, Academic Press, (1987年)およびSequence Analysis Primer, Gribskov M and Devereux J, Eds., M Stockton Press, New York, (1991年)およびCarillo H and Lipman D, SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988年)に記載される方法を含むがこれらに限定されない公知の方法によって同一性を容易に計算することができる。同一性を決定する方法は試験する配列間で最大の一致をもたらすように設計されている。さらに、同一性を決定する方法は公に利用可能なコンピュータプログラムに集約化されている。2つの配列間で同一性を決定するコンピュータプログラム方法にはGCGプログラムパッケージ(Devereux J et al.: Nucleic Acids Res. 12(1): 387, (1984年))、BLASTP、BLASTNおよびFASTA(Altschul SF et al.: J. Molec. Biol. 215: 403-410, (1990年)およびAltschul SF et al.: Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, (1997年))が含まれるがこれらに限定されない。BLAST XプログラムはNCBIおよびその他の情報源から公に利用可能である(BLAST Manual, Altschul SF et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul SF et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, (1990年))。配列間の類似性を決定するために周知のSmith Watermanアルゴリズム(Smith TF, Waterman MS: J. Mol. Biol. 147(1): 195-197, (1981年))もまた使用することができる。

10

#### 【0110】

用語「インスリン」は、インスリンリスプロ(rDNA起源):ヒューマログ(1.5 mL, 10 mL, Eli Lilly and Company, インディアナポリス, インディアナ州)、beefおよびpork由来インスリン注射(レギュラーインスリン)(レギュラーイレチンI, Eli Lilly)、ヒト:rDNA:ヒューマリンR(Eli Lilly)、ノボリンR(Novo Nordisk, ニューヨーク, ニューヨーク州)、半合成品:ヴェロスリン(ヒト型)(Novo Nordisk)、rDNAヒト、緩衝化型:ヴェロスリンBR, pork:レギュラーインスリン(Novo Nordisk)、精製pork:porkレギュラーイレチンII(Eli Lilly)、レギュラー精製porkインスリン(Novo Nordisk)、およびレギュラー(濃縮型)イレチンIIU-500(500 units/mL, Eli Lilly)などの速効型、インスリン亜鉛懸濁液, beefおよびpork:レンテイレチンGI(Eli Lilly)、ヒト, rDNA:ヒューマリンL(Eli Lilly)、ノボリンL(Novo Nordisk)、精製pork:レンテイレチンII(Eli Lilly)、イソフェンインスリン懸濁液(NPH):beefおよびpork:NPHイレチンI(Eli Lilly)、ヒト, rDNA:ヒューマリンN(Eli Lilly)、ノボリンN(Novo Nordisk)、精製pork:PorkNPHイレチンII(Eli Lilly)、NPH-N(Novo Nordisk)などの中等度作用型、ならびに、インスリン亜鉛懸濁液, 持続型(ウルトラレンテ, Eli Lilly)、ヒト, rDNA:ヒューマリンU(Eli Lilly)などの長時間作用型を含むがこれらに限定されないあらゆる形態のインスリンを包含する。

20

30

#### 【0111】

用語「測定すること」または「測定」は、臨床試料中の所与の物質か患者由来試料中の所与の物質のどちらかの有無、数量もしくは量(それは有効量であり得る。)を評価することを意味し、そのような物質の定性的または定量的濃度レベルの導出を含み、または、そうでなければ、患者の臨床上のパラメーターの数値もしくはカテゴリー化を評価することを意味する。

40

#### 【0112】

本明細書において使用される用語「食事」は標準食、および/または、混合食を意味する。

#### 【0113】

用語「平均」が薬物動態値の前にあるとき(例えば、平均 $t_{max}$ )、それは、特定されない限り、薬物動態値の計算による平均値を表す。

#### 【0114】

50



本明細書において使用される用語「平均基線レベル」は、例えば、単回臨床試験または複数回臨床試験の組合せにまたがって、比較の基準として用いられるある値の測定、計算またはレベルを意味し、それは統計学的に有意な数の対象についての平均値である。

【0115】

用語「複数回投与」は、患者が少なくとも2服用量の薬剤組成物をその組成物の投与間隔にしたがって受容することを意味する。

【0116】

「神経障害を有する患者」または「神経障害を持つ」患者の文脈での用語「神経障害」は、サンアントニオ糖尿病性神経障害会議において概説された（サンアントニオ糖尿病性神経障害会議報告書および提言 Ann. Neurol. 24 99-104 (1988年)）、簡単に述べると、1) 多発性神経障害の臨床徴候、2) 神経機能不全の症状、3) 少なくとも2つの神経での神経伝達消失、または、4) 定量的感覚消失を含む4つの基準のうち少なくとも1つにその患者が合致することを意味する。用語「既成の神経障害」は、サンアントニオ糖尿病性神経障害会議において概説された4つの基準のうち少なくとも2つにその患者が合致することを意味する。用語「初発性神経障害」は、神経伝達消失のみでその他の神経障害の症状を示さない患者に関連している。

【0117】

用語「正常なグルコースレベル」は用語「正常血糖の」および「正常な」と互換的に使用され、そして、約  $6.1 \text{ mmol/L}$  ( $110 \text{ mg/dL}$ ) 未満の空腹時静脈血漿グルコース濃度に当てはまる。正常血糖よりも高い持続性グルコースレベルは前糖尿病性症状と考えられる。

【0118】

本明細書において使用されるように、本発明の文脈における用語「患者」は哺乳類動物であることが好ましい。哺乳類動物はヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであり得るがこれらの例に限定されない。好都合なことにヒト以外の哺乳類をインスリン依存性糖尿病または糖尿病性症状の動物モデルとなる患畜として用いることができる。患者はオスまたはメスであり得る。患者は、インスリン依存性糖尿病または糖尿病性症状を持つと以前に診断され、または、同定され、所望により、糖尿病への治療介入が既に行われた、または、行われているものであり得る。患者はまた糖尿病の長期合併症を患っているものであり得る。その患者はヒトであることが好ましい。

【0119】

本明細書において使用される用語「PEG」「ポリエチレングリコール」または「ポリ(エチレングリコール)」は任意の水溶性ポリ(エチレングリコール)を意味し、そして、 $n$  が2から約800までの整数である -  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$  - の構造を含む分子を包含する。一般に使用されるPEGは末端封止PEGであり、PEGの一端はアルコキシ基などの比較的不活性な基で封止され、一方、他方の末端は、さらに修飾することができるヒドロキシル基である。しばしば用いられる封止基はメトキシ基であり、対応する末端封止PEGはしばしばmPEGと表示される。non-PEGはmPEGの代わりにしばしば用いられる。本発明の具体的なPEGの形態は分枝状PEG、線状PEG、分岐状PEGなどであり、PEG基は多分散系であることが典型的であり、約1.05未満の多分散指数を有する。本発明の所与の分子量を有するPEG部分は一定範囲のエチレングリコール(またはエチレンオキシド)モノマーからなることが典型的であるであろう。例えば、分子量2000DaのPEG部分は、 $43 \pm 10$  個のモノマー、平均約43個のモノマーからなることが典型的であるであろう。用語「PEG化」はPEGのC-ペプチドなどの別の分子への共有結合を意味する。

【0120】

C-ペプチドの置換治療法の文脈における用語「置換用量」は、血中のC-ペプチドまたはPEG化C-ペプチドのレベルを望ましい範囲内に、特に最小有効治療レベル以上に維持するC-ペプチドまたはPEG化C-ペプチドの用量を意味する。ある態様において、置換用量は、投与間隔の間に平均定常状態濃度C-ペプチドまたはPEG化C-ペプチ

10

20

30

40

50

ドレベルを約 0.1 nM の最小レベルよりも高いレベルに維持する。ある態様において、置換用量は、投与間隔の間に平均定常状態濃度 C - ペプチドまたは PEG 化 C - ペプチドレベルを約 0.2 nM の最小レベルよりも高いレベルに維持する。ある態様において、置換用量は、投与間隔の間に平均定常状態濃度 C - ペプチドまたは PEG 化 C - ペプチドレベルを約 0.4 nM の最小レベルよりも高いレベルに維持する。

#### 【0121】

インスリンまたは PEG 化 C - ペプチドの投与モードに関して用語「皮下」または「皮下に」または「S.C.」は、ボラス注射として、または、まとめて皮膚と称される真皮および表皮の直下の皮膚の層である皮下組織の中に、または、その下に移植可能な装置を介して投与される薬剤に関連する。皮下投与、および / または、皮下移植に好ましい部位には、上腕の外側の領域、へその近くの周りの領域 (2 インチの円) を除くウエストの直ぐ上または直ぐ下が含まれる。寛骨の直ぐ後ろの臀部の上部領域。大腿の前部、外側への途中、大腿の上部から 4 インチ下、膝頭から 4 インチ上。

10

#### 【0122】

用語「単回投与」は、患者が単回用量の薬剤組成物を受容したこと、または、投与と投与の間に休薬期間を設けて単回用量を繰り返し投与したことを意味する。「単回投与」として、または、「定常状態」でと特に指示されない限り、本明細書において開示され、そして、請求される薬物動態パラメーターは単回投与条件と複数回投与条件の両方を包含する。

20

#### 【0123】

用語「配列類似性」は、共通の進化上の起源を共有する、または、共有しない可能性がある核酸配列またはアミノ酸配列間の同一性または対応の程度に関連する (前述の Reeck et al. を参照のこと。)。しかしながら、一般的な利用法および本願において、用語「相同な」は、「非常に」などの副詞で修飾されるとき、配列類似性を意味することができ、共通の進化上の起源に関連する、または、関連しない可能性がある。

30

#### 【0124】

「統計学的に有意である」とは、偶然その結果が生じた可能性はないということの意味する。当技術分野において公知の任意の方法により統計学的有意性を決定することができる。p 値が一般的に使用される有意性の尺度に含まれ、それは、帰無仮説が真であるとき、観察された事象が生じるであろう頻度または蓋然性のことである。得られた p 値が有意レベルよりも小さいとき、帰無仮説は棄却される。単純な事例では、有意レベルは 0.05 以下の p 値で定義される。

40

#### 【0125】

本明細書において定義されるように、用語「持続性放出」、「長期放出」または「デポ製剤」は、単回用量の薬剤の直接 I.V. 投与または直接 S.C. 投与の後にその薬剤が有効である期間よりも長い期間にわたって起こる持続性放出組成物または持続性放出装置からの PEG 化 C - ペプチドなどの薬剤の放出に関連する。1つの態様において、持続性放出は、少なくとも約 1 ~ 2 週間、約 2 ~ 4 週間、約 1 ~ 2 か月、約 2 ~ 3 か月または約 3 ~ 6 か月の期間にわたって起こる放出であるであろう。ある態様において、持続性放出は約 6 か月 ~ 約 1 年の期間にわたって起こる放出であるであろう。本明細書においてさらによく説明されるように、持続性放出装置 (例えば、プログラムで制御できるポンプまたは浸透圧により駆動するポンプ) または持続性放出組成物の種類、および使用する PEG 化 C - ペプチドの種類 (例えば、モノマーの比率、分子量、ブロック組成およびポリマー類のさまざまな組合せ)、ポリペプチド負荷、および / または、所望の効果を産み出すための賦形剤の選択が放出の継続と放出のレベルに影響を与えることができる。

50

#### 【0126】

様々な持続性放出プロファイルを本発明の方法のいずれにも従って提供することができる。「持続性放出プロファイル」は、移植 / 刺入またはその他の薬剤を体内に投与する方法の過程で起こる放出全体のうちの 50 % 未満の放出が投与後の最初の 24 時間の間に起こる放出プロファイルを意味する。本発明の好ましい実施形態において、長期放出プロフ

50

ファイルは、a) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 48 時間と 72 時間の間の時点に存在する 50 % 放出ポイント、b) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 72 時間と 96 時間の間の時点に存在する 50 % 放出ポイント、c) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 96 時間と 110 時間の間の時点に存在する 50 % 放出ポイント、d) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 1 週間と 2 週間の間の時点に存在する 50 % 放出ポイント、e) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 2 週間と 4 週間の間の時点に存在する 50 % 放出ポイント、f) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 4 週間と 8 週間の間の時点に存在する 50 % 放出ポイント、g) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 8 週間と 16 週間の間の時点に存在する 50 % 放出ポイント、h) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 16 週間と 52 週間 (1 年) の間の時点に存在する 50 % 放出ポイント、および、i) 移植 / 刺入またはその他の方法による投与後 52 週間と 104 週間の間の時点に存在する 50 % 放出ポイントからなる群より選択される。

10

20

30

40

50

#### 【0127】

さらに、持続性放出組成物の使用により薬剤血漿中濃度の「変動度」(「DFL」)を減少することができる。DFL は、薬剤の血漿中レベルが投与間隔の経過にわたってどれほど変化するかということの測定値である ( $C_{max} - C_{min} / C_{min}$ )。I.V. 投与などの単純な事例について、消失半減期 ( $T_{1/2}$ ) と投与間隔の関係により変動を判定することができる。投与間隔が半減期に等しいとき、トラフ濃度はまさにピーク濃度の半分であり、変動度は 100 % である。したがって、(同じ投与間隔で) 低減した DFL を有する持続性放出組成物は、ピークとトラフの血漿中レベルの差が減少したことを意味する。PEG 化 C - ペプチドの持続性放出組成物を受容する患者が、同じ投与間隔で非長期放出組成物を受容する患者での DFL のおよそ 50 %、40 % または 30 % の DFL を有することが好ましい。

#### 【0128】

用語「治療すること」または「治療」は、患者において病気の少なくとも 1 つの症状を除去する、緩和する、遅延させる、低減させる、反転させる、改善する、管理する、または、予防することを意味する。用語「治療すること」はまた発病 (すなわち、疾病の臨床状態前の期間) を停止させる、遅延させる、および / または、病気の発生もしくは悪化のリスクを低減させることを意味することもできる。

#### 【0129】

本明細書において使用されるように、用語「治療有効量」、「予防有効量」または「診断有効量」は投与後の所望の生物学的応答を引き出すために必要なインスリンまたは PEG 化 C - ペプチドなどの薬剤の量である。

#### 【0130】

用語「単位用量形態」はヒト患者および患畜に適切であり、そして、当技術分野において公知であるように個別に包装された物理的に分けられた単位を意味する。本発明の目的のため、治療有効量の薬剤を含む本発明の剤形は、治療効果を達成するために、1 以上の単位用量 (例えば、経口投与用の錠剤、カプセル剤、粉剤、半固形剤 [例えば、ゼラチンカプセル剤またはフィルム剤]、液剤、注射用のアンプルまたはバイアル、充填済みの注射筒) を含有することができると考えられる。本発明の目的のため、剤形の好ましい実施形態は皮下注射可能な剤形であることがさらに考えられる。

#### 【0131】

用語「約」または「およそ」は、当業者により決定される特定の数値の許容可能な誤差範囲内であることを意味し、それは、部分的には、その数値が測定された、または、決定された方法、すなわち、測定系の限界に依存するであろう。例えば、「約」は、当技術分野において 1 実施あたり 1 標準偏差以上の範囲内であることを意味することができる。あるいは、前記組成物に関して、「約」は 20 % までの範囲の、好ましくは 10 % までの範囲の、さらに好ましくは 5 % までの範囲のプラスマイナスを意味することができる。

#### 【0132】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形の「a」、「

a n」および「t h e」は、文脈の中で明確に示されない限り、複数の指示物を含む。したがって、例えば、「a m o l e c u l e（分子）」への言及はそのような分子の1つ以上を包含し、「a r e a g e n t（試薬）」はそのような様々な試薬の1つ以上を包含し、「a n a n t i b o d y（抗体）」への言及はそのような様々な抗体の1つ以上を包含し、そして、「t h e m e t h o d（方法）」への言及は、修飾することができるであろう、または、本明細書に記載の方法および医薬組成物に置き換えることができるであろう当業者に公知の同等の工程および方法を包含する。

【 0 1 3 3 】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は本発明が属する技術分野の当業者により共通して理解されるものと同じ意味を持つ。表 A に記載の次の略語は本開示のある部分で用いられる。

【表 1】

表 A 略語表	
A D A	抗薬剤抗体
A U C	曲線下の面積
A U C <sub>(0-7)</sub>	0 時点から 7 日目までの血漿中濃度時間曲線下の面積
A U C <sub>(0-14)</sub>	0 時点から 1 4 日目までの血漿中濃度時間曲線下の面積
A U C <sub>(0-t)</sub> / A U C <sub>tau</sub>	0 時点から最終的に定量可能な濃度を示す時点までの血漿中濃度時間曲線下の面積
A U C <sub>(0-inf)</sub> / A U C <sub>inf</sub>	0 時点から無限大時点までの血漿中濃度時間曲線下の面積
C o n c .	濃度
C <sub>ss</sub>	定常状態での濃度
C L / F	生物学的利用能 (F) について未修整の見かけのクリアランス
C L <sub>ss</sub> / F	定常状態での生物学的利用能 (F) について未修整の見かけのクリアランス
C <sub>max</sub>	最大検出濃度
E L I S A	酵素結合免疫吸着アッセイ
F	生物学的利用能またはメス
F <sub>rel</sub>	相対的生物学的利用能
G L P	優良試験所規範
H	時間
i . v .	静脈内
K g	キログラム
L	リットル
M	オス

10

20

30

40

【表 1 - 2】

Mg	ミリグラム
mL	ミリリットル
Min	分
MTD	最大耐性量
ND	未定
Ng	ナノグラム
NOEL	無影響量
nM / nmol / L	ナノモラー
Nmol	ナノモル
QC	品質管理
PEG	ポリエチレングリコール
RIA	放射免疫測定
s. c. / S . C.	皮下
SD	標準偏差
T <sub>1/2</sub>	終末相消失半減期
T <sub>max</sub>	C <sub>max</sub> に到達するまでの時間
Vd / F	生物学的利用能 (F) について未修整の皮下投与後の見かけの分布容積
Vd <sub>ss</sub> / F	定常状態での生物学的利用能 (F) について未修整の皮下投与後の見かけの分布容積
Wk	週

10

20

## 【0134】

本発明の実施または試験にあたって本明細書において記載されるものに類似の、または、同等の任意の方法、組成物、試薬、細胞を用いることができるが、本明細書に好ましい方法と材料が記載される。

30

## 【0135】

特許文献および特許申請文献を含むがこれらに限定されない、本明細書において引用される全ての出版物および参考文献は、各出版物または参考文献が完全に記載されているものとして参照により本明細書に組み込まれていると具体的に、そして、個々に示されているものとして、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本願が優先権を主張する任意の特許申請もまた、出版物と参考文献について上述した様式で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0136】

本発明の実施は、他に示されない限り、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNAおよび免疫学の従来技術を用いるであろう。そして、それらは当業者の能力の範囲内である。文献中にそのような技術は説明される。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, および T. Maniatis, 1989年, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1~3巻, Cold Spring Harbor Laboratory Press、Ausubel, F. M. et al. (1995年および定期的な増補; Current Protocols in Molecular Biology, 9章, 13章, および 16章, John Wiley & Sons, New York, N.Y.)、B. Roe, J. Crabtree, および A. Kahn, 1996年, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons、J. M. Polak および James O'D. McGee, 1990年, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press、M. J. Gait (編集者), 1984年, Oligo nucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press、D. M. J. Lilley および J. E. Dahlberg, 1992年, Met

40

50

hods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press、Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes 編集のHandbook of Drug Screening, (2001年, New York, N.Y., Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9)、Jane Roskams および Linda Rodgers編集のLab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, 2002年, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3、Harris, JM, および Zalipsky, S, 編集 Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS, Washington, 1997年、Veronese, F., および J.M. Harris, 編集, Peptide and protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews, 54(4) 453-609 (2002年)、Zalipsky, S., et al., Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications内の "Use of functionalized Poly(Ethylene Glycols) for modification of polypeptides" を参照のこと。これらの一般的な原本の各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【 0 1 3 7 】

先に議論した出版物は、本願の提出年月日以前に単に公開を目的として提供されている。本明細書内の何物も、先行発明を理由として本発明がそのような開示よりも先行するといえないことを認めるものとして解釈されるべきではない。

#### 【 0 1 3 8 】

##### 1. ポリエチレングリコール ( P E G )

P E G は多くの水性溶媒および有機性溶媒における優れた溶解性を有する良く知られたポリマーであり、低毒性、免疫原性の欠如を示し、そして、透明、無色、無臭で安定している。これらとその他の理由のため、P E G は付加に好ましいポリマーとして選択されてきた。しかし、このことは単に例示を目的として用いられたものであり限定を目的としたものではない。ポリビニルアルコール、ポリ(プロピレングリコール)などのようなその他のポリ(アルキレンオキシド)類、ポリ(オキシエチル化グリセロール)などのようなポリ(オキシエチル化ポリオール)類、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルプロリドン、ポリ-1, 3-ジオキソラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキソラン、エチレン/マレイン酸無水物およびポリアミノ酸類を含むがこれらに限定されないその他の水溶性ポリマーを用いて類似の製品を得ることができる。当業者は、所望の投薬量、循環時間、タンパク質分解に対する抵抗性およびその他の考慮事項に基づいて所望のポリマーを選択することができるであろう。

20

30

#### 【 0 1 3 9 】

そのようなポリマーを活性部分と複合体化するための代表的な高分子試薬と方法は、Harris, J.M. および Zalipsky, S., 編集, Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS, Washington, 1997年、Veronese, F., および J.M. Harris, 編集, Peptide and Protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews, 54(4); 453-609 (2002年)、Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, 編集, Plenus Press, New York (1992年)内のZalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides", Zalipsky (1995年) Advanced Drug Reviews 16:157-182、および、Roberts et al., Adv. Drug Delivery Reviews, 54, 459-476 (2002)に記載されている。

40

#### 【 0 1 4 0 】

多様な P E G 誘導体が市販されており且つ本発明の P E G 複合体の調製における使用に適している。例えば、NOF社のSUNBRIGHT(登録商標)シリーズ(www.peg-drug.com)は、様々な方法によるC-ペプチドへのカップリングのためのスクシニミジルエステル、メトキシ-P E G アミン類、マレイミド類およびカルボン酸類などのメトキシポリエチレングリコール類および活性化 P E G 誘導体を含む多数の P E G 誘導体を提供し、Nektar Therapeutics社のAdvanced P E Gylationもまた治療術の安全性と効果を改善する多様な P E G カップリング技術を提供する。本発明のC-ペプチド複合体の形成に用いられるそのほかの P E G 類にはPolypure社(ノルウェー)、QuantaBioDesign社LTD(オハイオ

50

州)およびSunbio, Inc社(韓国)から入手可能なものが含まれる。本発明の複合体の形成における使用に適切なさらなるPEG試薬と複合体形成方法はPasut. G., et al., Expert Opin. Ther. Patents (2004年),14(6) 859-893に記載される。

#### 【0141】

特許、特許出願公開および関連する出版物の検索によっても、本開示を読む当業者に重要で見込みがあるPEGカップリング技術とPEG誘導体が提供されるであろう。例えば、米国特許第7,026,440号、第6,858,736号、第6,828,401号、第6,602,498号、第6,495,659号、第6,448,369号、第6,436,386号、第5,990,237号、第5,932,462号、第5,900,461号、第5,824,784号、第5,739,208号、第5,672,662号、第5,650,234号、第5,629,384号、第5,252,714号および第4,904,584号はそのような技術および誘導体およびそれらの製造方法を記載する。これらの内容の全体が参照により組み込まれる。

#### 【0142】

本発明によるPEG化C-ペプチドは、約4,000Da~80,000Daの範囲内で変わる分子量を有するPEG部分を持つ。分子量の範囲は、典型的には、約4000Daから約10,000Daまで、約10,000Daから約20,000Daまで、約20,000Daから約30,000Daまで、約30,000Daから約40,000Daまで、約40,000Daから約50,000Daまで、約50,000Daから約60,000Daまで、約60,000Daから約70,000Daまで、および約70,000Daから約80,000Daまでである。PEG部分の平均分子量の非限定的な例は、約10,000Da、約20,000Da、約30,000Da、約40,000Da、約50,000Da、約60,000Da、約70,000Da、および約80,000Daである。

#### 【0143】

実質的には全てのPEGポリマーが多様な分子質量の混合物として存在するので、PEGの分子量(MW)は数平均(M<sub>n</sub>)分子量、重量平均(M<sub>w</sub>)分子量またはz-平均(M<sub>z</sub>)分子量として報告されることが典型的である。この3つのうちで重量平均が、おそらく、最も役に立つ。なぜなら、それが、様々なサイズのポリマー鎖のそのポリマーの全体挙動への寄与をかなり説明し、そして、目的の物理的特質の大半と最もよく相関するからである。

#### 【数1】

$$\text{数平均分子量 } (Mn) = \frac{\sum (MiNi)}{\sum Ni}$$

#### 【数2】

$$\text{重量平均分子量 } (Mw) = \frac{\sum (Mi^2Ni)}{\sum (MiNi)}$$

#### 【数3】

$$\text{Z平均分子量 } (Mz) = \frac{\sum (Mi^3Ni)}{\sum (Mi^2Ni)}$$

式中、「Ni」は、ポリマー混合物中の分子量「Mi」の分子のモル分率(または分子数の分数)である。MwのMnに対する比率は多分散指数(PDI)として知られており、そして、分布の幅をおおまかに示す。非常に狭いMW分布を有する特別なポリマーではPDIは1.0(下限)に近づく。

#### 【0144】

本発明のPEG基は、典型的には、所与の分子量ではある範囲のエチレングリコール(またはエチレンオキシド、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)モノマーからなるであろう。例えば、分子量

2000 DaのPEG基は、典型的には、 $43 \pm 10$ 個のモノマーから、平均では約43～44個のモノマーからなるであろう。

【0145】

本発明のPEG基は、典型的には、多数のサブユニットを含むであろう。例えば、本請求の化合物のいずれにおいても各 $n$ 、 $n_1$ または $n_2$ または $n_3$ はそれぞれ独立して約1から約1000まで、約1から約800まで、約1から約600まで、約1から約400まで、約1から約300まで、約1から約200までであり得る。適切なPEG基は、サブユニットの数（すなわち、 $n_1$ 、 $n_2$ および $n_3$ ）が約800から約1000まで、約800から約950まで、約600から約850まで、約400から約650まで、約200から約450まで、約180から約350まで、約100から約150まで、約35から約55まで、約42から約62まで、約12から約25サブユニットまで、約1から10サブユニットまでからなる群より独立して選択されるものである。ある実施形態において、PEG化C-ペプチドは約40 kDaの分子量を有し、したがって分枝鎖状PEG類の各PEG鎖の $n_1$ と $n_2$ は約440～約550または約450～約520の範囲内であるであろう。

10

【0146】

前述のいずれかの総分子量を有する分枝型のPEGポリマー（例えば、2つ以上の10,000 Da～20,000 DaのPEGポリマーなどを含む分枝状で40,000 DaのPEGポリマー）も使用することができる。

【0147】

本明細書に記載される代表的な分枝状ポリマーには次の一般構造、(PEG) $y$ -[コア]-[リンカー]、を有するものが含まれる。

20

【0148】

式中、「[コア]」は、2本以上のPEGアームを伸長している中心分子またはコア分子であり、変数「 $y$ 」はPEGアームの数を表し、そして、「[リンカー]」は、典型的には、[コア]をC-ペプチドに連結する（下記でさらに定義される）任意の連結部分を表す。分枝鎖状PEG類のある別の実施形態において、少なくとも1つのポリマーアームはC-ペプチドとの反応に適切な末端官能基（例えば、NHS部分）を有する。本発明の分枝鎖ポリマーがC-ペプチドのN末端アミノ基に結合することが典型的である。

【0149】

さらに別の実施形態において、リンカー部分は加水分解に安定なリンカー、または代わりに、分解可能なリンカーのどちらかであることができ、その結合が生理的条件下で加水分解され得ることを意味し、例えば、その結合はエステル、加水分解可能なカルバミン酸エステルまたは他のそのような基を含む。重合体骨格内の分解可能な結合として役立つだけでなく、本発明のある実施形態の場合においては、C-ペプチドへの水溶性ポリマーの共有結合に役立つ加水分解可能な結合には炭酸エステル、例えば、アミンとアルデヒドの反応から生ずるイミン（例えば、Ouchi et al. (1997年) Polymer Preprints 38(1):582-3を参照のこと。）、例えば、アルコールをリン酸基と反応させることにより形成されるリン酸エステル、例えば、ヒドラジドとアルデヒドの反応により形成されるヒドラゾン、例えば、アルデヒドとアルコールの反応により形成されるアセタール、例えば、ギ酸エステルとアルコールの間の反応により形成されるオルトエステル、および、あるウレタン（カルバミン酸エステル）の結合が含まれる。本発明に従う放出可能なC-ペプチド複合体の調製に使用されるPEG試薬の例は、米国特許第6,348,558号、第5,612,460号、第5,840,900号、第5,880,131号および第6,376,470号に記載される。放出可能なリンカーはC-ペプチド内の任意の残基と結合することができ、そして、N末端アミノ酸に限定されないことが典型的である。

30

40

【0150】

上記の式、(PEG) $y$ -[コア]-[リンカー]、によって一般的に表されるもののよう分枝状PEG類は約2本のポリマーアーム～約8本のポリマーアームを有することができる（すなわち、「 $y$ 」は2から約8までの範囲である。）。そのような分枝状PEG

50



G 類は、典型的には、2 から約 4 ポリマーアームを有することが好ましい。マルチアームポリマーには 2、3、4、5、6、7 または 8 本の PEG アームを有するものが含まれる。

#### 【0151】

上述の分枝状 PEG 類におけるコア分子は、その後さらに機能化されるポリオール類を含む。そのようなポリオール類には 1 から 10 個までの炭素原子を有する、および、1 から 10 個のヒドロキシル基を有する脂肪族ポリオール類が含まれ、それにはエチレングリコール、アルカンジオール類、アルキルグリコール類、アルキリデンアルキルジオール類、アルキルシクロアルカンジオール類、1, 5 - デカリンジオール、4, 8 - ビス(ヒドロキシメチル)トリシクロデカン、シクロアルキリデンジオール類、ジヒドロキシアルカン類、トリヒドロキシアルカン類などが含まれる。脂環型ポリオール類も使用することができ、それにはマンニトール、ソルビトール、イノシトール、キシリトール、ケブラキトール、トレイトール、アラビトール、エリトリトール、アドニトール、ダルシトール、ファコース(fucose)、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、ラムノース、ガラクトース、グルコース、フルクトース、ソルボース、マンノース、ピラノース、アルトロース、タロース、タジトース(tagitose)、ピラノース類、ショ糖、ラクトース、マルトースなどのような直鎖糖類または閉環型糖類および糖アルコール類が含まれる。その他の脂肪族ポリオール類にはグリセルアルデヒド、グルコース、リボース、マンノース、ガラクトースの誘導体および関連の立体異性体が含まれる。使用することができるその他のポリオール類にはクラウンエーテル、シクロデキストリン類、デキストリン類およびデンプンやアミロースなどのその他の炭水化物が含まれる。典型的なポリオール類にはグリセロール、ペンタエリスリトール、ソルビトールおよびトリメチロールプロパンが含まれる。その他の適切なコアにはリシンおよびその他のポリアミン類が含まれ、そして PEG 部分には複数の末端官能基が含まれる。

10

20

#### 【0152】

2 本のアーム、3 本のアーム、4 本のアームおよび 8 本のアームを有するマルチアーム PEG の例は当技術分野において公知であり、そして、市販されており、および/または、当業者に公知の技術に従ってそれらを調製することができる(Pasut et al., (2004年) Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic application Expert Opin. Ther. Patents 14(6) 859-894を全体として参照のこと。)。本発明の C - ペプチド複合体の形成に用いられるその他の分枝状 PEG 類には米国特許出願公開第 20050009988 号、第 20060194940 号、第 20090234070 号、第 20070031371 号、米国特許第 6,664,331 号、第 6,362,254 号、第 6,437,025 号、第 6,541,543 号、第 6,664,331 号、第 6,730,334 号、第 6,774,180 号、第 6,838,528 号、第 7,030,278 号、第 7,026,440 号、第 7,053,150 号、第 7,157,546 号、第 7,223,803 号、第 7,265,186 号、第 7,419,600 号、第 7,432,330 号、第 7,432,331 号、第 7,511,094 号、第 7,528,202 号、第 7,589,157 号および国際公開番号第 WO2005000360 号、第 WO2005108463 号、第 WO2005107815 号、第 WO2005028539 号および第 WO200605108463 号に記載されるものが含まれる。

30

40

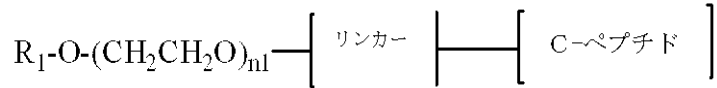
#### 【0153】

本明細書において使用される線状 PEG 類またはマルチアーム PEG 類の例には以下にさらに記載される一般式(I)、(II)、(III)または(IV)の PEG 類が含まれる。

#### 【0154】

1 つの態様において、PEG 化 C - ペプチドは一般式(I)の線状 PEG を含む。

## 【化 1 8】



式 ( I )

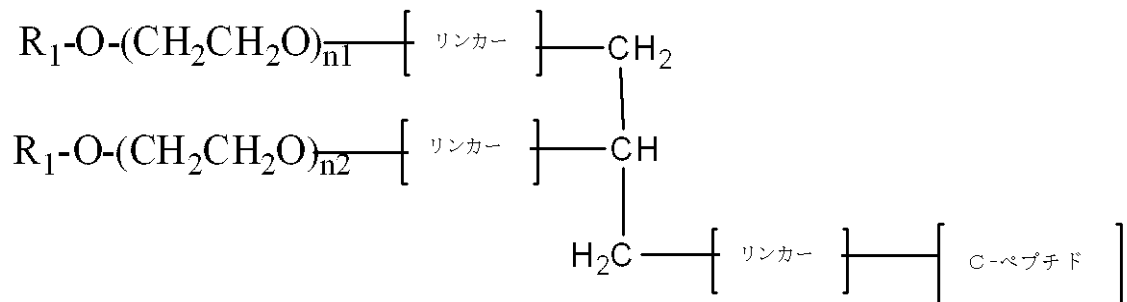
## 【 0 1 5 5】

式中、 $R_1$  はアルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、そして、式中、リンカーは下記に定義され、および、C - ペプチドの N 末端アミノ基に結合する。

## 【 0 1 5 6】

別の態様において、PEG 化 C - ペプチドは一般式 ( I I ) の分枝鎖状 PEG を含む。

## 【化 1 9】



式 ( I I )

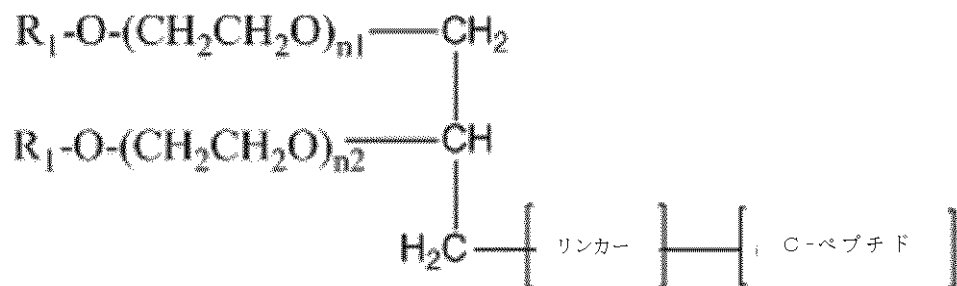
## 【 0 1 5 7】

式中、 $R_1$  はアルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、 $n_2$  は 20 ~ 800 であり、式中、各リンカーは独立して下記のように定義され、そして、式中、C - ペプチドに連結するリンカーは C - ペプチドの N 末端アミノ基に結合する。

## 【 0 1 5 8】

式 ( I I ) の PEG 化 C - ペプチドの 1 つの実施形態において、PEG 化 C - ペプチドは構造 ( I I A ) を有する。

## 【化 2 0】



式 ( I I A )

## 【 0 1 5 9】

式中、 $R_1$  はアルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、 $n_2$  は 20 ~ 800 であり、式中、リンカーは下記のように定義され、および、C - ペプチドの N 末端アミノ基に結合する。

## 【 0 1 6 0】

別の態様において、PEG 化 C - ペプチドは一般式 ( I I I ) の分枝鎖状 PEG を含む。

。

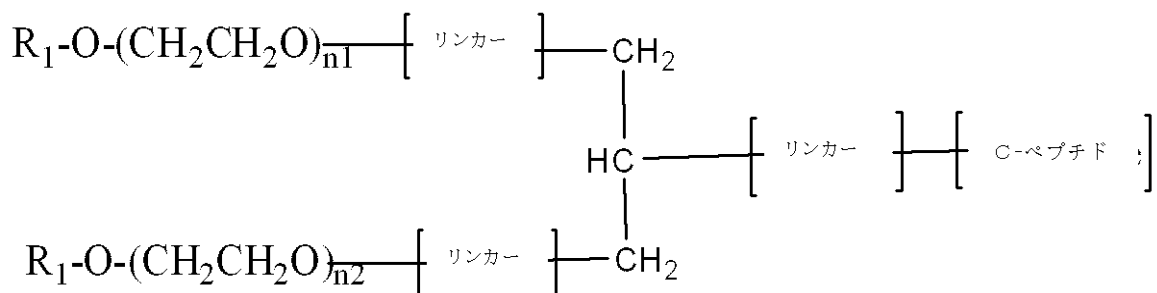
10

20

30

40

## 【化 2 1】



式 ( I I I )

10

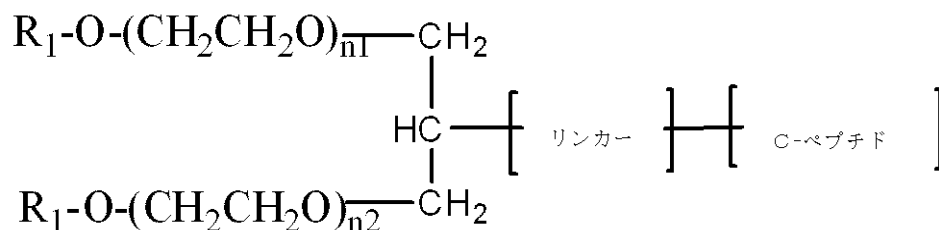
【 0 1 6 1 】

式中、 $R_1$  はアルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、 $n_2$  は 20 ~ 800 であり、式中、各リンカーは独立して下記のように定義され、そして、式中、C-ペプチドに連結するリンカーはC-ペプチドのN末端アミノ基に結合する。

【 0 1 6 2 】

式(III)のPEG化C-ペプチドの1つの実施形態において、PEG化C-ペプチドは構造(IIIA)を有する。

## 【化 2 2】



20

式 ( I I I A )

【 0 1 6 3 】

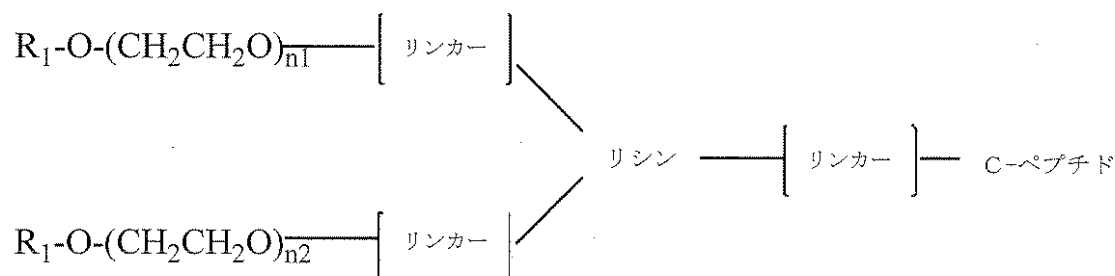
式中、 $R_1$  はアルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、 $n_2$  は 20 ~ 800 であり、そして、式中、リンカーは下記のように定義され、および、C-ペプチドの N 末端アミノ基に結合する。

30

【 0 1 6 4 】

別の態様において、PEG化C-ペプチドは一般式(IV)の分枝鎖状PEGを含む。

## 【化 2 3】



40

式 ( I V )

【 0 1 6 5 】

式中、 $R_1$  はアルキル基であり、 $n_1$  は 20 ~ 800 であり、 $n_2$  は 20 ~ 800 であり、そして、式中、各リンカーは独立して下記のように定義され、そして、式中、リシン残基を C - ペプチドに連結するリンカーは C - ペプチドの N 末端アミノ基とリシン残基の C 末端カルボキレート基に結合し、そして、式中、リシン部分を PEG 部分に連結するリンカーはリシン分子のアミノ基を介して結合する。

50

【化 2 4】



【 0 1 6 8 】

20

## 2. リンカー部分

30

## 40

## 50

X - 、

- X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - 、 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - 、 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - 、

- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X - 、 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - X - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - CO - 、 - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X - および

- X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>1</sub></sub> - CO - X - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - CO - 。

【0172】

式中、各 X は - O - 、 - S - または - NH - から独立して選択されるか存在せず、各 m<sub>1</sub> は独立して 0 ~ 5 であり、そして、各 m<sub>2</sub> は独立して 1 ~ 5 である。

【0173】

式 (I)、(II)、(III) または (IV) の PEG 化 C - ペプチドの別の実施形態において、PEG 化 C - ペプチドは以下より独立して選択される 1 つ以上のリンカーを含む；

- X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO - 、

- X<sub>1</sub> - CO - 、

- X<sub>1</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO - 、

- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>3</sub></sub> - CO - および

- X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>2</sub></sub> - X<sub>2</sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>4</sub></sub> - CO - 。

【0174】

式中、X<sub>1</sub> は - O - であるか存在せず、X<sub>2</sub> は - NH - であり、m<sub>2</sub> は独立して 1 ~ 5 であり、m<sub>3</sub> は 2 であり、そして、m<sub>4</sub> は 1 ~ 5 である。

【0175】

式 (II)、(III) または (IV) の PEG 化 C - ペプチドの別の実施形態において、PEG 化 C - ペプチドは以下より独立して選択される 1 つ以上のリンカーを含む；

- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O)<sub>n<sub>3</sub></sub> - X - 、

- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O)<sub>n<sub>3</sub></sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - CO - 、

- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O)<sub>n<sub>3</sub></sub> - CO - および

- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O)<sub>n<sub>3</sub></sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - CO - 。

【0176】

式中、X は - O - 、 - S - または - NH - から独立して選択されるか存在せず、X<sub>1</sub> は - O - であるか存在せず、X<sub>2</sub> は - NH - であり、各 m<sub>5</sub> は独立して 1 ~ 5 より選択され、そして、各 n<sub>3</sub> は独立して 1 ~ 400 より選択される。

【0177】

式 (II)、(III) または (IV) の PEG 化 C - ペプチドの別の実施形態において、PEG 化 C - ペプチドは以下より独立して選択される 1 つ以上のリンカーを含む；

- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O)<sub>n<sub>3</sub></sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>6</sub></sub> - CO - 、

- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O)<sub>n<sub>3</sub></sub> - CO - および

- X<sub>1</sub> - CO - X<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>5</sub></sub> - X<sub>1</sub> - (CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - O)<sub>n<sub>3</sub></sub> - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m<sub>7</sub></sub> - CO - 。

【0178】

式中、X<sub>1</sub> は - O - であるか存在せず、X<sub>2</sub> は - NH - であり、m<sub>5</sub> は 3 であり、m<sub>6</sub> は独立して 2 または 5 であり、m<sub>7</sub> は 3 であり、そして、n<sub>3</sub> は 1 ~ 400 である。

【0179】

10

20

30

40

50

式 ( I V ) の P E G 化 C - ペプチドの別の実施形態において、P E G 化 C - ペプチドは以下より独立して選択される 1 つのリンカーを含む；

- X - 、 - C O - 、 - ( C H <sub>2</sub> ) <sub>m<sub>2</sub></sub> - および - X<sub>1</sub> - C ( O ) - X<sub>2</sub> - 。

【 0 1 8 0 】

式中、X は - O - または - S - または - N H - であるか存在せず、X<sub>1</sub> と X<sub>2</sub> は独立して - N H - または - O - から選択されるか存在せず、m<sub>2</sub> は独立して 1 ~ 5 である。

【 0 1 8 1 】

当業者は、C - ペプチド複合体の形成に用いるリンカー部分について記載する前述の議論は決して完全無欠というわけではなく、そして、単に例示としているだけであること、および、本明細書に記載される品質を有する全てのリンカーが考慮されていることを理解するであろう。

10

【 0 1 8 2 】

さらに、本明細書に記載される教示に基づき、当業者は、通常の実験を用いてリンカーの適切なサイズと最適な構造を容易に決定することができる。例えば、様々なリンカー部分を有する多数の異なる市販の P E G 誘導体を試験し、その結果の P E G 化 C - ペプチドの生物学的活性、可溶性および安定性の特徴を調べることによって。

【 0 1 8 3 】

### 3 . 活性化官能基と反応条件

ヒト C - ペプチドの唯一の天然遊離アミノ基は N 末端アミノ基であり、したがって様々な市販の活性化 P E G 類と標準的なカップリング方法を用いて C - ペプチドの N 末端アミノ基への高分子 P E G 基の選択的複合体化を容易に達成することができる。

20

【 0 1 8 4 】

ある方法では、スクシニミジル誘導体 ( 例えば、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル ( N H S ) ) のような活性化エステルなどの活性化官能基を介して C - ペプチドを P E G 試薬と複合体化する。この方法では、反応性エステルを有する P E G が適切な p H 条件下の水性媒質中において室温または 4 で数時間から一晩で C - ペプチドと反応する。本明細書に記載されるリンカーを介して前記高分子試薬が活性化官能基に結合することが典型的である。

【 0 1 8 5 】

やや塩基性の p H 条件下の、例えば、約 7 . 5 から約 8 の範囲の p H からジメチルホルムアミド ( D M F ) またはアセトニトリルまたはそれらの組合せのような極性非プロトン性溶媒中において室温または 4 で N - ヒドロキシスクシンイミドエステル ( N H S 基 ) を有する P E G 試薬を用いる N 末端 P E G 化を行うことが典型的である。反応時間は典型的には 1 ~ 2 4 時間の範囲であるが、反応の p H と温度に依存する。

30

【 0 1 8 6 】

シアノ水素化ホウ素ナトリウム ( 1 0 等量 ) の存在下、4 、約 5 ~ 1 0 の p H という穏やかな条件で約 2 0 ~ 3 6 時間アルデヒド基を有する P E G 試薬を用いる N 末端 P E G 化を行うことが典型的である。例えば、p H 5 . 0 ~ 6 . 0 の 1 0 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液または 1 0 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液で N 末端 P E G 化を行うことができる。前記緩衝液は 2 0 m M シアノ水素化ホウ素ナトリウムをさらに含むことができる。m P E G アルデヒドに対する化合物のモル比は 1 : 5 ~ 1 : 1 0 であり得る。それから、外界温度または冷蔵温度で P E G 化物は一晩撹拌される。

40

【 0 1 8 7 】

約 8 ~ 8 . 3 の p H のホウ酸緩衝液またはリン酸緩衝液を用いて室温で一晩 p - ニトロフェニルオキシカルボニル基を有する P E G 試薬を用いる N 末端 P E G 化を行うことが典型的である。

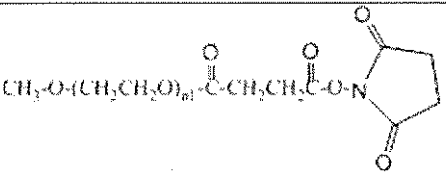
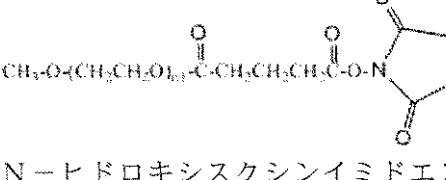
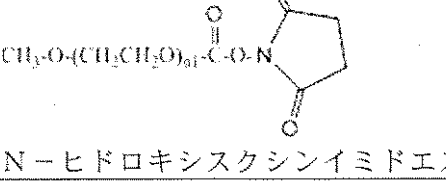
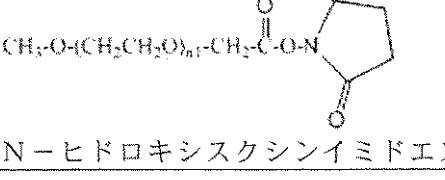
【 0 1 8 8 】

全てのカップリング反応について、C - ペプチドに対する高分子試薬の比率を変えることができる。例えば、高分子試薬が等分子数の比率から 1 0 倍分子数が過剰の比率までを用いることができる。典型的には、2 倍まで分子数が過剰の高分子試薬が十分である。活

50

性化PEG類の例には、例えば、表D1および表D2に記載されるものが含まれる。次の表では、選択したPEG化試薬が記載されている。明らかに、その他の活性基およびリンカーを用いることができ、そして、それらは当業者に公知である。

【表2 - 1】

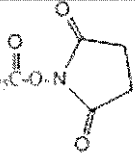
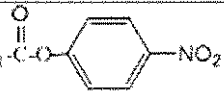
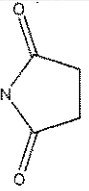
表D1 活性化線状PEGの例	
構造／機能性	略称および分子量範囲 (Da)
 <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	<p>SUNBRIGHT ME-020CS 分子量 =2,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-050CS 分子量 =5,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-100CS 分子量 =10,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-200CS 分子量 =20,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-300CS 分子量 =30,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-400CS 分子量 =40,000</p>
 <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	<p>SUNBRIGHT ME-050GS 分子量 =5,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-200GS 分子量 =20,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-300GS 分子量 =30,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-400GS 分子量 =40,000</p>
 <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	<p>SUNBRIGHT ME-050TS 分子量 =5,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-200TS 分子量 =20,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-300TS 分子量 =30,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-400TS 分子量 =40,000</p>
 <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	<p>SUNBRIGHT ME-020AS 分子量 =2,000</p> <p>SUNBRIGHT ME-050AS 分子量 =5,000</p>

10

20


30

【表 2 - 2】

$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-C(=O)-O-N}$  <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	SUNBRIGHT ME-050HS 分子量 =5,000 SUNBRIGHT ME-200HS 分子量 =20,000 SUNBRIGHT ME-300HS 分子量 =30,000 SUNBRIGHT ME-400HS 分子量 =40,000
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-C(=O)-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$  <p>p-ニトロフェニル</p>	SUNBRIGHT MENP-020H 分子量 =2,000 SUNBRIGHT MENP-050H 分子量 =5,000 SUNBRIGHT MENP-10T 分子量 =10,000 SUNBRIGHT MENP-20T 分子量 =20,000 SUNBRIGHT MENP-30T 分子量 =30,000 SUNBRIGHT MENP-40T 分子量 =40,000
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-N=C=O}$ <p>イソシアネート</p>	
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CH=O}$ <p>アルデヒド</p>	SUNBRIGHT ME-050AL 分子量 =5,000 SUNBRIGHT ME-100AL 分子量 =10,000 SUNBRIGHT ME-200AL 分子量 =20,000 SUNBRIGHT ME-300AL 分子量 =30,000 SUNBRIGHT ME-400AL 分子量 =40,000
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH=O}$ <p>アルデヒド</p>	SUNBIO P1PAL-5 分子量 =5,000 SUNBIO P1PAL-10 分子量 =10,000 SUNBIO P1PAL-20 分子量 =20,000 SUNBIO P1PAL-30 分子量 =30,000
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH=O}$ <p>アミドアルデヒド</p>	SUNBIO P1APAL-5 分子量 =5,000 SUNBIO P1APAL-10 分子量 =10,000 SUNBIO P1APAL-20 分子量 =20,000 SUNBIO P1APAL-30 分子量 =30,000
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH=O}$ <p>ウレタンアルデヒド</p>	SUNBIO P1TPAL-5 分子量 =5,000
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH=O}$ <p>アルデヒド</p>	SUNBIO P1BAL-5 分子量 =5,000 SUNBIO P1BAL-10 分子量 =10,000 SUNBIO P1BAL-20 分子量 =20,000 SUNBIO P1BAL-30 分子量 =30,000
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH=O}$ <p>アミドアルデヒド</p>	SUNBIO P1ABAL-5 分子量 =5,000 SUNBIO P1ABAL-10 分子量 =10,000 SUNBIO P1ABAL-20 分子量 =20,000 SUNBIO P1ABAL-30 分子量 =30,000
$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH=O}$ <p>ウレタンアルデヒド</p>	SUNBIO P1TBAL-5 分子量 =5,000
$\text{R}_1\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-C(=O)-(CH}_2\text{)}_y\text{-C(=O)-O-N}$  <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	X=0, y=1 SUNBRIGHT-AS X=0, y=5 SUNBRIGHT-HS X=1, y=2 SUNBRIGHT-CS X=1, y=3 SUNBRIGHT-GS

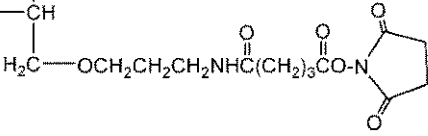
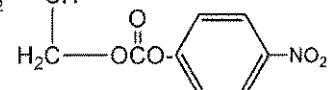
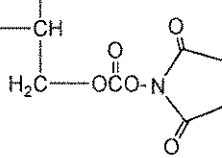
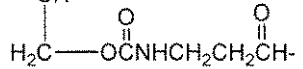


【表 2 - 3】

$R_1O(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_3NH-(CH_2)_z-N$  <p>マレイミド</p>	$z=2$ SUNBRIGHT-MA $z=5$ SUNBRIGHT-MA3
--	---

10

【表 3 - 1】

表 D 2 活性化分枝型 PEG の例	
構造／機能性	略称および分子量範囲 (Da)
$R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2$ $R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH$  <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	SUNBRIGHT GL2-200GS2 分子量 = 20,000 SUNBRIGHT GL2-400GS2 分子量 = 40,000 SUNBRIGHT GL2-400GS2 分子量 = 60,000 SUNBRIGHT GL2-800GS2 分子量 = 80,000
$R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2$ $R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH$  <p>p-ニトロフェニル</p>	SUNBRIGHT GL2-100NP 分子量 = 10,000 SUNBRIGHT GL2-200NP 分子量 = 20,000 SUNBRIGHT GL2-400NP 分子量 = 40,000 SUNBRIGHT GL2-600NP 分子量 = 60,000 SUNBRIGHT GL2-800NP 分子量 = 80,000
$R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2$ $R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH$  <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	SUNBRIGHT GL2-200TS 分子量 = 20,000 SUNBRIGHT GL2-400TS 分子量 = 40,000 SUNBRIGHT GL2-600TS 分子量 = 60,000 SUNBRIGHT GL2-800TS 分子量 = 80,000
$R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2$ $R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH$  <p>アルデヒド</p>	SUNBRIGHT GL2-200AL3 分子量 = 20,000 SUNBRIGHT GL2-400AL3 分子量 = 40,000 SUNBRIGHT GL2-600AL3 分子量 = 60,000 SUNBRIGHT GL2-800AL3 分子量 = 80,000

20

30

40

【表 3 - 2】

$\begin{array}{c} R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\   \\ R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\   \\ H_2C-OCNH(CH_2)_3O(CH_2CH_2O)_{n3}-CH_2CH_2CHO \end{array}$ <p>アルデヒド</p>	SUNBRIGHT GL3-400AL100U 分子量 =50,000
$\begin{array}{c} R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\   \\ R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\   \\ H_2C-OCNH(CH_2)_3O(CH_2CH_2O)_{n3}-CO-C_6H_4-NO_2 \end{array}$ <p>p-ニトロフェニル</p>	SUNBRIGHT GL3-400NP100U 分子量 =50,000
$\begin{array}{c} R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\   \\ R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\   \\ H_2C-OCNH(CH_2)_3O(CH_2CH_2O)_{n3}-C(CH_2)_3CO-N \end{array}$ <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	SUNBRIGHT GL3-400GS100U 分子量 =50,000
$\begin{array}{c} R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\   \\ R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH \\   \\ H_2C-OCNH(CH_2)_3O(CH_2CH_2O)_{n3}-C(CH_2)_5CO-N \end{array}$ <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	SUNBRIGHT GL3-400HS100U 分子量 =50,000
$\begin{array}{c} R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-O-C(O)-NH \\   \\ H_2C-CH_2 \\   \\ H_2C-CH_2 \\   \\ CH-C(=O)-O-N \end{array}$ <p>N-ヒドロキシスクシンイミドエステル</p>	SUNBRIGHT LY-400NS 分子量 =40,000
$\begin{array}{c} R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n1}-CH_2 \\   \\ HC-OCH_2CH_2CH_2NHC(CH_2)_3C(=O)-O-N \\   \\ R_1-O-(CH_2CH_2O)_{n2}-CH_2 \end{array}$	分子量 = 40,000

10

20

30

## 【0189】

反応緩衝液の中和の後に任意の従来の方法、例えば、イロプロピルエーテルを用いる沈殿とその次の逆相HPLCまたはイオン交換クロマトグラフィーによりPEG化C-ペプチドを精製することができる。

40

## 【0190】

## 4. 治療形態のC-ペプチド

本明細書において使用される用語「C-ペプチド」または「プロインスリンC-ペプチド」にはC-ペプチド活性を保持する全ての天然型C-ペプチドおよび合成型C-ペプチドが含まれる。そのようなC-ペプチドにはヒトペプチドならびにその他の種および属、好ましくは、哺乳類に由来するペプチドが含まれる。好ましくは、「C-ペプチド」はアミノ酸配列E A E D L Q V G Q V E L G G G P G A G S L Q P L A L E G S L Q (表D3内の配列番号1)を有するヒトC-ペプチドを意味する。

## 【0191】

多様な種に由来するC-ペプチドの配列が決定され、そして、それらは少なくとも機能

50

的に互換的であると当技術分野において知られている。したがって、ヒト以外の種または属に由来するC - ペプチドである異型を選択することは日常的な問題であろう。C - ペプチドのいくつかのそのような異型（すなわち、その他の種由来の代表的なC - ペプチド）が表D 3に示される（配列番号1～29を参照のこと。）。

【表4 - 1】

表D 3 C - ペプチド異型			
ヒト M-プロインシュリン	ヒト (配列番号1)	EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ	<a href="#">gb AAA72531.1 </a> <a href="#">dbj BAH59081.1 </a>
チンパンジー (Pan troglodytes)	(配列番号1) アラインメント (配列番号2)	EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ 同一性 = 31/31 (100%), ポジティブ = 31/31 (100%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">NP_001008996.1 </a> <a href="#">emb CAA43403.1 </a> GENE ID: 44957 Q INS
ニシゴリラ (Gorilla gorilla)	(配列番号1) アラインメント (配列番号3)	EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ 同一性 = 31/31 (100%), ポジティブ = 31/31 (100%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb AAN06935.1 </a>
ボルネオオランウータン (Pongo pygmaeus)	(配列番号1) (配列番号4)	EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ 同一性 = 31/31 (100%), ポジティブ = 31/31 (100%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb AAN06937.1 </a>
サバンナモンキー (Chlorocebus aethiops)	(配列番号1) (配列番号5)	EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ EAED QVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ EAEDPQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ 同一性 = 30/31 (96%), ポジティブ = 30/31 (96%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">emb CAA43405.1 </a>

10

20

30

40

【表 4 - 2】

イヌ ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ (配列番号 6) E EDLQV VEL G PG G LQPLALEG+L Q EVEDLQVRDVELAGAPGEGGLQPLALEGA LQ 同一性 = 23/31 (74%), ポジティブ = 24/31 (77%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">ref NP_001123565.1 </a> <a href="#">sp P01321.1 INS_CANFA</a> <a href="#">emb CAA23475.1 </a> GENE ID: 48366 <a href="#">5_INS</a>
アナウサギ ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ E E+LQVGQ ELGGGP AG LQP ALE +LQ (配列番号 7) EVEELQVGQAELGGGPDAGGLQPSALELALQ 同一性 = 23/31 (74%), ポジティブ = 25/31 (80%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ACK44319.1 </a>
ラット ( <i>Rattus norvegicus</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ (配列番号 8) E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE + Q EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALEVAR Q 同一性 = 22/31 (70%), ポジティブ = 24/31 (77%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">ref NP_062003.1 </a> <a href="#">sp P01323.1 INS2_RAT</a> <a href="#">emb CAA24560.1 </a> GENE ID: 24506 <a href="#">Ins2</a>
タイワンモリネズミ ( <i>Apodemus semotus</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ (配列番号 9) E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE + Q EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALEVAR Q 同一性 = 22/31 (70%), ポジティブ = 24/31 (77%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB89748.1 </a>
海綿 ( <i>Geodia cydonium</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS LQ (配列番号 10) E ED QVGQVELG GPGAGS Q LALE + Q EVEDPQVGQVELGAGPGAGSEQTLALEVA RQ 同一性 = 23/31 (74%), ポジティブ = 24/31 (77%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">pir S09278</a>
マウス ( <i>Mus musculus</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE (配列番号 11) EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALE 同一性 = 21/27 (77%), ポジティブ = 22/27 (81%), ギャップ = 0/27 (0%)	<a href="#">ref NP_032413.1 </a> <a href="#">sp P01326.1 INS2_MOUSE</a> <a href="#">emb CA_A28433.1 </a> GENE ID: 16334 <a href="#">Ins2</a>

10

20

30

40

【表 4 - 3】

オキナワハツ カネズミ ( <i>Mus caroli</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQFLALE E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE (配列番号 1 2) EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALE 同一性 = 21/27 (77%), ポジティブ = 22/27 (81%), ギャップ = 0/27 (0%)	<a href="#">gb ABB89749.1 </a>
ラット ( <i>Rattus norvegicus</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (配列番号 1 3) E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE + Q EVEDPQVPQLELGGGPGAGDLQTLALEVARQ 同一性 = 22/31 (70%), ポジティブ = 24/31 (77%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">prf 720460B</a>
コキバラネズミ ( <i>Rattus losea</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (配列番号 1 4) E ED QV Q ELGGGPGAG LQ LALE + Q EVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALEVARQ 同一性 = 22/31 (70%), ポジティブ = 23/31 (74%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB89747.1 </a>
タイワントゲ ネズミ ( <i>Niviventer coxingtoni</i> )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (配列番号 1 5) E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE E + Q EVEDPQVPQLELGGGPGTGDQLQTLALEVARQ 同一性 = 21/31 (67%), ポジティブ = 23/31 (74%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB89750.1 </a>
キクチハタネズミ ( <i>Microtus kikuchii</i> )	(配列番号 1) AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE E (配列番号 1 6) ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE VEDPQVAQLELGGGPGAGDLQTLALE E 同一性 = 20/26 (76%), ポジティブ = 21/26 (80%), ギャップ = 0/26 (0%)	<a href="#">gb ABB89752.1 </a>
ラット ( <i>Rattus norvegicus</i> )  インスリン 1 前駆体	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ (配列番号 1 7) E ED QV Q+ELGGGPGAG LQ LALE E + Q EVEDPQVPQLELGGGPEAGDLQTLALEVARQ 同一性 = 21/31 (67%), ポジティブ = 23/31 (74%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">ref NP_062002.1 </a> <a href="#">gb AAA41439.1 </a> <a href="#">gb AAA41442.1 </a> <a href="#">emb CAA24559.1 </a> <a href="#">gb EDL94407.1 </a> GENE ID: 24505 <a href="#">Ins1</a>

10

20

30

40

【表 4 - 4】

ネコ (Felis catus) (飼い猫)	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLAL EGSLQ (配列番号 18) EAEDLQ ELG PGAG LQP AL E LQ EAEDLQGKDAELGEAPGAGGLQPSAL EAPLQ 同一性 = 21/31 (67%), ポジティブ = 21/31 (67%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">ref NP_001009272.1 </a> <a href="#">sp P06306.2 INS_FELCA</a> <a href="#">db BAB84110.1 </a> GENE ID: 49380 <a href="#">4 INS</a>
ゴールデンハム スター	(配列番号 1) AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLA LE (配列番号 19) ED QV Q+ELGGGPGA LQ LAL E VEDPQVAQLELGGGPGADDLQTLA LE 同一性 = 19/26 (73%), ポジティブ = 20/26 (76%), ギャップ = 0/26 (0%)	<a href="#">sp P01313.2 INS_CRILO</a> <a href="#">pir  I48166</a> <a href="#">gb AAA37089.1 </a>
タイワントゲネ ズミ (Niviventer co xingi)	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPL ALEGSLQ (配列番号 20) E ED QV Q+ELG GP AG LQ LA LE + Q EVEDPQVAQLELGGGPEAGDLQTL ALEVARQ 同一性 = 20/31 (64%), ポジティブ = 22/31 (70%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB89746.1 </a>
タイワンモリネ ズミ (Apodemus se motus)	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPL ALEGSLQ (配列番号 21) E ED QV Q+ELGG PG G L+ LA LE + Q EVEDPQVEQLELGGGAPGTGDLQTL ALEVARQ 同一性 = 19/31 (61%), ポジティブ = 22/31 (70%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB89744.1 </a>
コキバラネズミ (Rattus losea )	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLAL EGSLQ (配列番号 22) E ED QV Q+ELGG P AG LQ LALE + Q EVEDPQVPQLELGGSPGAGDLQTLAL EVARQ 同一性 = 20/31 (64%), ポジティブ = 22/31 (70%), ギャップ = 0/31 (0%)	<a href="#">gb ABB89743.1 </a>

10

20

30

40

【表 4 - 5】

スナネズミ (Meriones unguiculatus)	(配列番号 1) AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE GSLQ (配列番号 2 3) ED Q+ Q+ELGG PGAG LQ LALE + Q VEDPQMPQLELGGSPGAGDLQALALE VARQ 同一性 = 19/30 (63%), ポジティブ = 22/30 (73%), ギャップ = 0/30 (0%)	gb ABB89751.1
デブスナネズミ (Psammomys obesus)	(配列番号 1) AEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE GSLQ (配列番号 2 4) +D Q+ Q+ELGG PGAG L+ LALE + Q VDDPQMPQLELGGSPGAGDLRALALE VARQ 同一性 = 17/30 (56%), ポジティブ = 22/30 (73%), ギャップ = 0/30 (0%)	sp Q62587.1 INS_PSAOB emb CAA66897.1
ブタ (Sus scrofa)	(配列番号 1) EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE EG (配列番号 2 5) EAE+ Q G VELGG G G LQ LALE G EAENPQAGAVELGG--GLGGLQALALE EG 同一性 = 19/28 (67%), ポジティブ = 20/28 (71%), ギャップ = 2/28 (7%)	ref NP_001103242.1
キクガシラコウモリ (Rhinolophus ferrumequinum)	(配列番号 2 6) EVEDPQAGQVELGGGPGTGGLQSLALE EGPPQ	gb ACC68945.1
ブルツェワルスキーウマ (Equus przewalskii)	(配列番号 2 7) EAEDPQVGQVELGGGPGGLQPLALE AGPPQ	GENE ID: 100060077 LOC100060077 gb AAB25818.1
ウシ (Bos taurus)	(配列番号 2 8) EVEGPQVGALELAGGPGAGGLEGPQ	gb AAI42035.1
ガーネットガラゴ (Otolemur garnettii)	(配列番号 2 9) DTEDPQVGQVGLGGSPITGDLQSLALE DVPPQ	gb ACH53103.1

10

20

30

40

## 【0192】

したがって、ヒトならびにその他の種由来の C - ペプチド (配列番号 1 ~ 2 9) のすべてのそのようなホモログ、オソログおよび天然アイソフォームが、それらが検出可能な C - ペプチド活性を保持する限り、本発明の方法および医薬組成物のいずれにも含まれる。

## 【0193】

C - ペプチドはその天然型であり得る。すなわち、様々な種において自然に現れる様々

50

な異型であり得る。それらをヒトC-ペプチドと機能的に同等の異型として見る事ができる。または、それらはC-ペプチドの機能的に同等の天然型派生物である可能性がある。それらのアミノ酸配列は、例えば、(例えば、N末端またはC末端または両方からの)短縮または他のアミノ酸欠質、付加、挿入、置換または翻訳後修飾によって、異なる可能性がある。例えば、C-ペプチドのピログルタミル異型、イソアスパラチル異型、タンパク質分解異型、グリコシル化異型、酸化型異型、異性体化異型および脱アミノ化異型を含むC-ペプチドの翻訳後修飾物および分解産物を含む天然の化学的派生物もまた本発明の方法および医薬組成物のいずれにも特に含まれる。

#### 【0194】

タンパク質またはペプチドの有益な活性を保持しながらそれらの配列を合成的に修飾することは当技術分野において公知であり、当技術分野において標準的で文献に広く記載される技術、例えば、核酸の無作為突然変異導入もしくは部位特異的突然変異導入、切断および連結を用いて、または、アミノ酸もしくはポリペプチド鎖の化学合成もしくは化学修飾を介してこれを達成することがでる。同様に、C-ペプチド異型をもちいて免疫原性が生じる場合、例えば、免疫原性の弱い形態を同定するために潜在的なT細胞エпитープを特定する自動化コンピュータ認識プログラムおよび指向性進化方法を用いることで免疫原性に関する事項を処理する、および/または、収めることは当技術分野の範囲内である。

#### 【0195】

活性が保持される限り、本発明の方法および医薬組成物のいずれにおいても任意のそのような修飾物も、または、それらの組合せも作成することができ、用いることができる。前記分子のC末端が活性に重要であることが知られている。それ故、任意のそのようなC-ペプチド異型または派生物において、好ましくは、C-ペプチドのC末端が保存されているべきであり、より好ましくは、C-ペプチドのC末端ペンタペプチド(EGSLQ)(配列番号31)が保存されているべきであり、または、十分であるべきである(Henriksson M et al.: Cell Mol. Life Sci. 62: 1772-1778, (2005年)を参照のこと。)。先に述べたように、アミノ酸配列の修飾はアミノ酸置換によるものである可能性があり、例えば、あるアミノ酸がペプチドの物理化学的特徴を保存する別のアミノ酸に置換される可能性がある(例えば、AはGによって、置換されることができ、逆もまた成り立ち、VはAまたはLによって置換されることができ、EはDによって置換されることができ、逆もまた成り立ち、QはNによって置換されることができ)。一般的に、置き換わるアミノ酸は置き換えられるアミノ酸と類似の特質、例えば、疎水性、親水性、電気陰性度、かさ高い側鎖などを有する。

#### 【0196】

C-ペプチド配列の中央部(例えば、ヒトC-ペプチドの残基13~25)への修飾により、C-ペプチドの機能的な派生物または異型を作成することができ。したがって、本発明の方法または医薬組成物のいずれにおいても使用することができるC-ペプチドは天然のC-ペプチドのアミノ酸配列、例えば、配列番号1のヒトC-ペプチド配列または表D3に示されるその他の天然C-ペプチド配列のいずれとも実質的に相同である、または、実質的に類似のアミノ酸配列を有する可能性がある。あるいは、C-ペプチドは表D3に示される配列番号1~29のいずれか1つのアミノ酸配列と、好ましくは、配列番号1の天然ヒト配列と少なくとも30%、好ましくは、少なくとも40、50、60、70、75、80、85、90、95、98または99%の同一性を持つアミノ酸配列を有する可能性がある。好ましい実施形態において、本発明の方法または医薬組成物のいずれにおいても使用されるC-ペプチドは表D3より選択される配列と少なくとも80%同一である。別の態様において、本発明の方法または医薬組成物のいずれにおいても使用されるC-ペプチドはヒトC-ペプチド(配列番号1)と少なくとも80%同一である。上述したようにC-ペプチドの任意のアミノ酸を変えることができるけれども、ヒトC-ペプチド(配列番号1)の位置3、11および27またはその他の種のC-ペプチドにおいて対応する位置もしくは同等の位置にあるグルタミン酸残基が保存されていることが好ましい。配列番号1の位置3、11および27にあるグルタミン酸残基(または、対応するG1

10

20

30

40

50



u 残基)の全てが保存されていることが好ましい。あるいは、ヒトC - ペプチドのG l u 2 7 (または非ヒトC - ペプチドの対応するグルタミン酸残基)が保存されていることが好ましい。本発明の方法または医薬組成物のいずれにおいても使用することができるC - ペプチドの機能的な同等の形態の例はアミノ酸配列、

E X E X X Q X X X X E L X X X X X X X X X X X X A L B X X X Q (配列番号30)

、

G X E X X Q X X X X E L X X X X X X X X X X X X A L B X X X Q (配列番号33)

を含む。

#### 【0197】

本明細書において使用されるように、Xは任意のアミノ酸である。N末端残基はG l u かG l yのどちらかであり得る(それぞれ、配列番号30または配列番号33)。当技術分野において周知の技術に従い、天然C - ペプチド配列と機能的に同等の派生物または異型を容易に調製することができ、そして、それには天然C - ペプチドの機能活性、例えば、生物学的活性を有するペプチド配列が含まれる。

#### 【0198】

天然C - ペプチド配列または合成C - ペプチド配列の断片もまた、それらが生じたペプチドの望ましい機能上の特質を有する可能性があり、そして、本発明の方法または医薬組成物のいずれにおいても使用することができる。したがって、本明細書において使用される用語「断片」は、その断片がその分子全体の生物学的活性または治療上有益な活性を保持することを条件として、C - ペプチドの断片を含む。前記断片はまたC - ペプチドのC末端断片を含むことができる。望ましい断片には、天然C - ペプチドの残基15 ~ 31、さらにとりわけ残基20 ~ 31が含まれる。ペンタペプチドE G S L Q (配列番号31)(天然ヒトC - ペプチドの残基27 ~ 31)を含むペプチドもまた好ましい。したがって、前記断片は、例えば、4 ~ 30アミノ酸または5 ~ 20残基にサイズが変わることができる。国際公開第W O 9 8 / 1 3 3 8 4号に適切な断片が開示され、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0199】

前記断片はまたC - ペプチドのN末端断片、典型的には配列E A E D L Q V G Q V E L (配列番号32)を有する断片を含むことができ、または、2つの酸性アミノ酸残基を含み、前記の2つの酸性アミノ酸残基がそれらの炭素の間で9 ~ 14Åの距離で空間的に分けられている立体構造を適用することができるC - ペプチドの断片を含むことができる。N末端伸長部および/またはC末端伸長部または隣接配列を有する断片もまた含まれる。そのような伸長ペプチドの長さは変化することが可能であるが、典型的には50、30、25または20アミノ酸以下の長さである。代表的な適切な断片は米国特許第6,610,649号に記載され、これによりその全体が参照によって組み込まれる。

#### 【0200】

そのような場合、前記の伸長配列または隣接配列は自然の、または、天然のC - ペプチドおよび、特に、その断片が由来するC - ペプチドに本来備わっていないアミノ酸配列であるということが認識されるであろう。そのようなN末端および/またはC末端伸長配列または隣接配列は、例えば、1から10個までの、1から6個までの、1から5個までの、1から4個までの、または、1から3個までのアミノ酸を含む。

#### 【0201】

本明細書において使用される用語「派生物」は、したがって、天然配列と比較すると修飾を有するC - ペプチド配列またはその断片を意味する。そのような修飾は1つ以上のアミノ酸欠質、付加、挿入および/または置換であり得る。これらは連続的でも非連続的でもあり得る。代表的な異型は、配列番号1 ~ 33のいずれかと比較すると、1 ~ 6つの、またはより好ましくは、1 ~ 4つの、1 ~ 3つの、または、1つの、または、2つのアミノ酸置換、挿入および/または欠質を有するものを包含することができる。置換されるアミノ酸は任意のアミノ酸、特によく知られた20種の通常のアミノ酸(アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F

10

20

30

40

50

)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リシン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)のうちの1つである可能性がある。C-ペプチドの任意のそのような異型または派生物を本発明の方法または医薬組成物のいずれにおいても使用することができる。

#### 【0202】

天然L-アミノ酸の異性体、例えば、D-アミノ酸を上記の形態のC-ペプチドに組み込むことおよび本発明の方法または医薬組成物のいずれにおいても使用することができる。その他の異型が1つの、または、複数のアミノ酸のアミノ末端融合および/またはカルボキシル末端融合ならびに配列内挿入を包含する可能性がある。より長いペプチドは、配列番号1~33のいずれかのようなC-ペプチド配列のうちの1つ以上の複数のコピーを含む可能性がある。挿入アミノ酸配列異型は1つ以上のアミノ酸残基がタンパク質のある部位に導入されているものである。欠質異型は前記配列からの1つ以上のアミノ酸の除去を特徴とする。異型は、自然に現れるような、例えば、その他の種に、または、地理上の差異により現れるような、例えば、異なる対立遺伝子の異型を含むことができる。C-ペプチドの全てのそのような異型、派生物、融合タンパク質または断片を本明細書において開示される方法、請求または医薬組成物のいずれにも包含し、使用することができ、そして、用語「C-ペプチド」に包含する。

#### 【0203】

C-ペプチドのPEG化形態、C-ペプチド異型、派生物およびその断片は、それらが検出可能なC-ペプチド活性を持つという点で機能的に同等である。とりわけ、それらは少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、または、100%よりも高い天然プロインシュリンC-ペプチド、特に、ヒトC-ペプチドの活性を示す。したがって、それらはプロインシュリンC-ペプチドとして機能することができ、すなわち、C-ペプチドそれ自体に置き換えることができる。そのような活性は、インビトロ試験系またはインビトロ試験系において示される生理的反応であろうと天然C-ペプチドが介在する任意の生物学的活性または反応であろうと、例えば、酵素アッセイにおいて、または、試験組織、膜もしくは金属イオンへの結合において天然C-ペプチドにより示される任意の活性を意味する。したがって、C-ペプチドがカルシウム流入を引き起こし、そして、ERK1および2、CREB、PKC、GSK3、PI3K、NF- $\kappa$ BおよびPPARのリン酸化を含み、MAPキナーゼ経路のリン酸化などのある範囲の細胞内シグナル伝達カスケードを開始し、eNOS、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPaseおよび広範囲の転写因子の発現を上昇することになることが知られている。問題のC-ペプチド(例えば、断片または派生物)を内皮細胞、腎臓細胞、線維芽細胞および免疫細胞を含む適切な標的組織由来の細胞に添加または投与してこれらの経路のうちのいずれかの活性化または発現上昇を分析することによりC-ペプチド活性のアッセイを行うことができる。そのようなアッセイは、例えば、Ohtomo Y et al. (Diabetologia 39: 199-205, (1996年))、Kunt T et al. (Diabetologia 42(4): 465-471, (1999年))、Shafqat J et al. (Cell Mol. Life Sci. 59: 1185-1189, (2002年))、Kitamura T et al. (Biochem. J. 355: 123-129, (2001年))、Hills およびBrunskill (Exp Diab Res 2008年)に記載されており、国際公開第WO 98/13384号またはOhtomo Y et al. (前述)またはOhtomo Y et al. (Diabetologia 41: 287-291, (1998年))に記載されているもののようである。内皮性一酸化窒素合成酵素(eNOS)活性に基づくウシ大動脈細胞とレポーター細胞アッセイを用いるC-ペプチド活性のアッセイもまた Kunt T et al. (前述)に記載されている。C-ペプチド活性の評価または分析をするために、特定の細胞への結合を用いることもでき、例えば、Rigler R et al. (PNAS USA 96: 13318-13323, (1999年))、Henriksson M et al. (Cell Mol. Life Sci. 57: 337-342, (2000年))およびPramanik A et al.

10

20

30

40

50

(Biochem Biophys. Res. Commun. 284: 94-98, (2001年))に記載されるように、例えば、蛍光相関分光法を用いてヒト 腎尿細管細胞、皮膚線維芽細胞および伏在静脈内皮細胞由来の細胞膜への結合を用いることができる。

【0204】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約5倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

【0205】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約6倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

10

【0206】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約7倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

【0207】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約8倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

【0208】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約10倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

20

【0209】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約15倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

【0210】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約20倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

30

【0211】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約25倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

【0212】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約50倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

【0213】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約75倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

40

【0214】

本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの別の態様において、PEG化C-ペプチドは、哺乳類動物に皮下投与されると、非修飾型C-ペプチドよりも少なくとも約100倍大きい血漿中または血清中薬物動態AUCプロファイルを持つ。

【0215】

1つの態様において、前記哺乳類動物はイヌである。1つの態様において、前記哺乳類動物はラットである。1つの態様において、前記哺乳類動物はヒトである。

50

## 【 0 2 1 6 】

## 5 . C - ペプチドと P E G 化 C - ペプチドの製造

標準的な固相ペプチド合成を用いて合成的に、または、組換え技術により、例えば、ヒトプロインシュリンからのヒトインスリン製造における副産物として、または、遺伝子改変宿主を用いて C - ペプチドを製造することができる ( 国際公開第 WO 1999007735 号、Jonasson P, et al., J Biotechnol. (2000年) 76(2-3):215-26、Jonasson P, et al., Gene (1998年);210(2):203-10、Li SX, Tian et al., Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) (2003) 35(11):986-92、Nilsson J, et al., J Biotechnol. (1996) 48(3):241-50、Huang YB, et al., Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) (2006) 38(8):586-92を全般的に参照のこと)。

10

## 【 0 2 1 7 】

N 末端へのカップリングを指向する別の方法において、ペプチド合成中に P E G 試薬またはリシン残基を C - ペプチドの所望の位置に組み込むことができる。この方法において、1 つ以上の P E G の部位選択的導入を達成することができる。例えば、複合体化ペプチドの部位選択的合成について記載する国際特許公開第 WO 9 5 / 0 0 1 6 2 号を参照のこと。

## 【 0 2 1 8 】

例えば、米国特許第 6 , 5 0 0 , 6 4 5 号に記載されるようなインスリン生合成に用いられる周知の技術により問題の C - ペプチドをコードする D N A 配列を適切な宿主細胞で発現して C - ペプチドを製造することができる。C - ペプチドは直接的に発現されることができ、または、米国特許第 6 , 5 5 8 , 9 2 4 号に記載されるように産物の収量を増やすために多量体化したコンストラクトとして発現されることができる。多量体化した産物は培養ブロスから単離した後インピットロで切断される。

20

## 【 0 2 1 9 】

確立された標準的な方法、例えば、Beaucage et al. (1981年) Tetrahedron Letters 22:1859-1869により記載されるホスフォアミダイト方法またはMatthes et al. (1984年) E MBO Journal 3:801-805により記載される方法によって C - ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を合成で調製することができる。ホスフォアミダイト方法によれば、オリゴヌクレオチドが、例えば、自動化 D N A 合成機で合成され、精製され、二本鎖化され、そして、結合されて合成 D N A コンストラクトが形成される。D N A コンストラクトを調製する現在好まれる方法はポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) によるものである。

30

## 【 0 2 2 0 】

前記ポリヌクレオチド配列はその起源がゲノム D N A 、 c D N A および合成 D N A の混合である可能性もある。例えば、リーダーペプチドをコードするゲノム D N A 配列または c D N A 配列を A 鎖および B 鎖をコードするゲノム D N A 配列または c D N A 配列に結合することが可能であり、その後、周知の手順に従い相同組換えのため所望のアミノ酸配列をコードする合成オリゴヌクレオチドを挿入して、または、好ましくは適切なオリゴヌクレオチドを用いる P C R により所望の配列を作成して前記 D N A 配列をある部位で修飾することが可能である。

## 【 0 2 2 1 】

前記組換え方法は、典型的には、選択した微生物または宿主細胞で複製することが可能であり、本発明の親単鎖インスリンをコードするポリヌクレオチド配列を持つベクターを利用するであろう。前記組換えベクターは自律複製ベクター、すなわち、染色体外実体として存在し、その複製は染色体の複製とは独立しているベクター、例えば、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体または人工染色体である可能性がある。

40

## 【 0 2 2 2 】

前記ベクターは自己複製を確実にする何らかの手段を含んでいる可能性がある。あるいは、前記ベクターは、宿主細胞に導入されるとゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体と共に複製されるものである可能性がある。さらに、1 つのベクターもしくはプラスミド、または、宿主細胞のゲノムに組み込まれる D N A 全体をあわせて含む 2 つ以上の

50

ベクターもしくはプラスミド、または、トランスポゾンを用いることができる。ベクターは線状プラスミドまたは閉環型プラスミドである可能性があり、好ましくは、ベクターの宿主細胞のゲノムへの安定的な組み込みを可能にするエレメントまたは細胞中でのゲノムと独立したベクターの自律複製を可能にするエレメントを含むであろう。

#### 【0223】

前記組換え発現ベクターは酵母内で複製することができる。ベクターが酵母内で複製することを可能にする配列の例は、酵母プラスミド2 pm複製遺伝子REP1～3および複製起点である。形質転換細胞の容易な選択を可能にする1つ以上の選択マーカーをベクターが含むことができる。選択マーカーは、その産物が殺生物剤耐性またはウイルス耐性、重金属への耐性、栄養要求株に対して原栄養株などを提供する遺伝子である。細菌用選択マーカーの例はバチルス サブチリス (*Bacillus subtilis*) もしくはバチルス リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) 由来のdal遺伝子またはアンピシリン耐性、カナマイシン耐性、クロラムフェニコール耐性もしくはテトラサイクリン耐性などの抗生物質耐性を付与するマーカーである。糸状菌宿主細胞において用いられる選択マーカーには、amdS (アセトアミダーゼ)、argB (オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、pyrG (オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ) およびtrpC (アントラニル酸シンターゼ) が含まれる。酵母宿主細胞での適切なマーカーはADE2、H153、LEU2、LYS2、MET3、TRP1 およびURA3である。酵母に適切な選択マーカーはシゾサッカロマイセス ポンペ (*Schizosaccharomyces pompe*) TPI遺伝子 (Russell (1985 年) Gene 40:125-130) である。

10

20

#### 【0224】

前記ベクターにおいて、前記ポリヌクレオチド配列は適切なプロモーター配列に機能するように結合している。プロモーターは、変異型プロモーター、短縮型プロモーターおよびハイブリッドプロモーターを含み、選択した宿主細胞で転写活性を示す任意の核酸配列である可能性があり、そして、宿主細胞と同種または異種のどちらかの細胞外ポリペプチドまたは細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

#### 【0225】

細菌性宿主細胞において転写を管理するために適切なプロモーターの例は、大腸菌 (*E. coli*) lacオペロン、ストレプトマイセス セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) アガラーゼ遺伝子 (dagA)、バチルス サブチリス (*Bacillus subtilis*) レバンスクラーゼ遺伝子 (sacB)、バチルス リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) - アミラーゼ遺伝子 (amyL)、バチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) マルトース生産性アミラーゼ遺伝子 (amyM)、バチルス アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) - アミラーゼ遺伝子 (amyQ) およびバチルス リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) ペニシリナーゼ遺伝子 (penP) から得られたプロモーターである。糸状菌性宿主細胞において転写を管理するために適切なプロモーターの例は、アスペルジラス オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼ、リゾムコール ミーヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルジラス ニガー (*Aspergillus niger*) 中性 - アミラーゼおよびアスペルジラス ニガー (*Aspergillus niger*) 酸安定 - アミラーゼの遺伝子から得られたプロモーターである。酵母宿主において、有用なプロモーターは出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のMal、TPI、ADHまたはPGKのプロモーターである。典型的には、本発明のC-ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列はまた適切なターミネーターと機能するように結合されるであろう。酵母において適切なターミネーターはTPIターミネーター (Alber et al. (1982年) J. Mol. Appl. Genet. 1:419-434) である。

30

40

50

#### 【0226】

本発明の親単鎖インスリンをコードするポリヌクレオチド配列、プロモーターおよびターミネーターをそれぞれ結合し、選択した宿主での複製に必要な情報を含む適切なベクターにそれらを挿入するために用いられる手順は当業者に周知である。最初に本発明の単鎖インスリンをコードするDNA配列全体を含むDNAコンストラクトを調製し、その次にこの断片を適切な発現ベクターに挿入するか、または、個々の要素についての遺伝情報をコードするDNAを順番に挿入し、連結するかのどちらかにより、ベクターを構築することができるという理解されるであろう。

#### 【0227】

本発明のC-ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターが宿主細胞に導入され、ベクターが染色体組み込み体として、または、自己複製染色体外ベクターとして維持される。用語「宿主細胞」は、複製の間に生じる変異のため親細胞と同一ではない親細胞の任意の子孫を包含する。宿主細胞は単細胞微生物、例えば、原核生物または非単細胞微生物、例えば、真核生物である可能性がある。有用な単細胞は、バチルス属の細胞、ストレプトマイセス属の細胞を含むがこれらに限定されないグラム陽性細菌、または、大腸菌およびシュードモナス属の種などのグラム陰性細菌のような細菌細胞である。真核生物細胞は哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞または真菌細胞であり得る。1つの実施形態において、宿主細胞は酵母細胞である。酵母生物は、培養すると大量の本発明の単鎖インスリンを産生する任意の適切な酵母生物であり得る。適切な酵母生物の例は、酵母の種である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス クлуйベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、シゾサッカロマイセス ウバルム (*Saccharomyces uvarum*)、クлуйベロマイセス ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、ハンセンラ ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア クлуйベリ (*Pichia kluyveri*)、ヤロウイア イルポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、カンジダ属の種、カンジダ ユチリス (*Candida utilis*)、カンジダ カカオイ (*Candida cacaoi*)、ゲオトリクム属の種およびゲオトリクム ファーメンタンス (*Geotrichum fermentans*) より選択される株である。

#### 【0228】

酵母細胞の形質転換は、例えば、自体公知の方法での形質転換の前のプロトプラスト形成により影響を受ける可能性がある。その細胞を培養するために用いられる培地は酵母生物の培養に適切な任意の通常培地である可能性がある。そのかなりの割合が正確にプロセッシングを受けた形態で培地中に存在することになる分泌された単鎖インスリンを従来の技法により培地から回収することができ、それには遠心分離、濾過による培地からの酵母細胞の分離またはイオン交換マトリックスもしくは逆相吸着マトリックスによるインスリン前駆体の捕捉、例えば、硫酸アンモニウムなどの塩を用いた上清もしくは濾液のタンパク質性成分の沈殿、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの様々なクロマトグラフィー技法による精製が含まれる。

#### 【0229】

##### 6. 使用方法

1つの態様において、本発明は、本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの治療用量を患者に投与することを含み、治療を必要とする患者において最小有効治療レベルよりも上にC-ペプチドレベルを維持する方法を包含する。

#### 【0230】

別の態様において、本発明は、本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの治療用量を患者に投与することを含み、治療を必要とする患者において1つ以上の糖尿病の長期合併症を治療する方法を包含する。

#### 【0231】

別の態様において、本発明は、インスリンと併用して本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの治療用量を患者に投与することを含み、糖尿病の患者を治療する方法を包含する。

【0232】

別の態様において、本発明は、治療を必要とする患者においてC-ペプチド置換治療法または投薬として用いられる本特許請求のPEG化C-ペプチドのいずれをも包含する。

【0233】

広義では、糖尿病は、身体がそれ自身のインスリンに適切に反応できない、または、十分なインスリンを生産しない、または、その両方の状況を意味する。インスリン産生の障害の一次的な結果は、血中のグルコースの蓄積であり、そして、C-ペプチド欠損により様々な短期の、および長期合併症になる。糖尿病には3つの主要な形態が存在する。

【0234】

1型糖尿病： 1型糖尿病は身体がインスリンとC-ペプチドを産生することができないことの結果である。糖尿病であると診断される米国人の5～10%は1型糖尿病を有すると推定されている。現在では1型糖尿病を有するほぼすべての人物がインスリン注射を携帯しているにちがいない。用語「1型糖尿病」は、小児発症糖尿病、若年性糖尿病およびインスリン依存性糖尿病（IDDM）を含むそれ以前のいくつかの用語に取って代わっている。1型糖尿病の患者にとって、C-ペプチドの基礎レベルは典型的には約0.20 nM未満である(Ludvigsson et al.: New Engl. J. Med. 359: 1909-1920, (2008年))。

【0235】

2型糖尿病： 2型糖尿病は細胞がインスリンに適切に反応できない症状である組織インスリン耐性の結果であり、時には相対的なインスリン欠損と組み合わせられる。用語「2型糖尿病」は、成人発症糖尿病、肥満関連糖尿病および非インスリン依存性糖尿病（NIDDM）を含むそれ以前のいくつかの用語に取って代わっている。基礎状態の2型糖尿病患者にとって、約0.8 nMのC-ペプチドレベル（0.64～1.56 nMの範囲）および約5.7 nMグルコース刺激レベル（3.7～7.7 nMの範囲）が報告されている(Retnakaran R et al.: Diabetes Obes. Metab. (2009年) DOI 10.1111/j.1463-1326.2009.01129.x, Zander et al.: Lancet 359: 824-830, (2002年))。

【0236】

1型および2型の糖尿病患者に加えて、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）または成人晩発性自己免疫性糖尿病または「遅発性1型」糖尿病および時にはまた「1.5型」もしくは「1および半分型」糖尿病と称される糖尿病のサブクラスがますます認識されつつある。この疾患では、糖尿病の発症は一般には35歳以降に起こり、そして、インスリン産生細胞の成分に対する抗体が常に存在し、このことは自己免疫活性がLADAの重要な特徴であることを示している。見られるものは主としてグルタミン酸でカルボキシラーゼ（GAD）に対する抗体である。幾人かのLADA患者は肥満指数（BMI）の上昇または肥満、インスリン耐性および異常血液脂質を有する2型患者と類似する表現型を示す。LADAの遺伝的特徴は1型および2型の糖尿病の両方の特徴と類似する。糖尿病の初登場の後の最初の6～12か月間では患者はインスリン投与を必要としない可能性があり、そして、食事制限および/または経口抗糖尿病薬物療法を介して比較的正常な血糖を維持することができる。しかしながら、最終的には、全ての患者が、おそらく膵島細胞の漸進的な破壊へと至る進行性自己免疫活性の結果として、インスリン依存性となる。この段階では、LADAの患者は低レベルの内在性インスリンまたはC-ペプチドを示すがそれらが存在せず、そして、1型糖尿病患者に類似の末梢神経、腎臓または眼に関する糖尿病の長期合併症を発生しやすく、そして、したがって、C-ペプチド治療法の候補となる(Palmer et al.: Diabetes 54(suppl 2): S62-67, (2005年)、Desai et al.: Diabetic Medicine 25(suppl 2): 30-34, (2008年)、Furlanos et al.: Diabetologia 48: 2206-2212, (2005))。

【0237】

妊娠性糖尿病： 以前には決して糖尿病を有していなかったが妊娠中に高血糖（グルコ

10

20

30

40

50

ース)レベルを有している妊婦が妊娠性糖尿病を得ると言われている。妊娠性糖尿病は全ての妊婦の約4%に悪影響を与える。それは2型(または、まれに1型)糖尿病の発生に先立つ可能性がある。

【0238】

いくつかのその他の形態の糖尿病がこれらとは別に分類される。インスリン分泌の遺伝的欠損による先天性糖尿病、嚢胞性繊維症関連糖尿病、高用量のグルココルチコイド類により誘導されるステロイド糖尿病および単一遺伝性糖尿病のいくつかの形態が例に含まれる。

【0239】

したがって、これらの方法のいずれにおいても用語「患者」は糖尿病のうちのいずれかの症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。これらの方法のどれかの1つの態様において、用語「患者」はインスリン依存性糖尿病のうちのいずれかの症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。これらの方法のどれかの1つの態様において、用語「患者」は2型糖尿病のうちのいずれかの症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。これらの方法のどれかの1つの態様において、用語「患者」はLADAの症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。これらの方法のどれかの1つの態様において、用語「患者」は妊娠性糖尿病の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。したがって、これらの方法のどれかの1つの態様において、用語「患者」は約0.4 nM未満の空腹時C-ペプチドレベルを有する個人を意味する。これらの方法のどれかの別の態様において、用語「患者」は約0.2 nM未満の空腹時C-ペプチドレベルを有する個人を意味する。

10

20

【0240】

糖尿病の急性合併症には、その疾病が適切に管理されないときに生じる可能性がある低血糖症、糖尿病性ケトアシドーシスまたは非ケトン性高浸透圧性昏睡が含まれる。重症の長期合併症も発生する可能性があり、下記でそれらについてより詳しく議論する。

【0241】

別の態様において、本発明は、本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの治療用量を患者に投与することを含み、1つ以上の糖尿病の長期合併症を治療する方法を包含する。

30

【0242】

別の態様において、本発明は、インスリンと併用して本特許請求のPEG化C-ペプチドのどれかの治療用量を患者に投与することを含み、糖尿病の患者を治療する方法を包含する。

【0243】

この文脈で、「併用して」は、1)同じ一体型剤形のうちの部分、2)必ずしも同日ではないが、典型的には同日での別々だが同じ治療処置または治療計画の一部としての投与に当てはまる。1つの態様において、本特許請求のPEG化C-ペプチドのうちのいずれかについては決まった1日用量を投与することができ、インスリンについては必要に応じて摂取することができる。

【0244】

別の態様において、本発明は、治療を必要とする患者において1つ以上の糖尿病の長期合併症を治療するために用いられる本特許請求のPEG化C-ペプチドのいずれをも包含する。

40

【0245】

これらの方法のいずれにおいても用語「1型糖尿病の長期合併症」または「糖尿病の長期合併症」は血糖制御障害およびインスリン依存性糖尿病に関連するC-ペプチド欠乏の長期合併症を意味する。1型糖尿病の長期合併症は1型糖尿病患者に関連することが典型的である。しかしながら、その用語はまた膵島細胞の喪失の結果としてC-ペプチド欠乏を発生し、したがって、インスリン依存性にもなる1.5型および2型糖尿病の患者において生じる糖尿病の長期合併症も意味することができる。広義では、多くのそのような

50



合併症が血管の一次的障害（血管障害）から生じ、結果として生じるその後の問題は（細小血管の障害による）「微小血管障害」と（動脈への障害による）「巨大血管障害」の下でグループ化される。

【0246】

用語「糖尿病の長期合併症」の範囲内に含まれる具体的な疾病および疾患には、小動脈瘤を有する初期網膜症、増殖性網膜症および黄斑浮腫を含む網膜症、知覚運動性多発性神経障害、有痛性感覚性神経障害、急性運動神経障害、頭蓋限局性および多巣性多発性神経障害、胸腰部神経根障害、近位糖尿病性神経障害ならびにエントラップメント神経障害および圧迫性神経障害を含む限局性四肢神経障害を包含する末梢神経障害、心臓血管系、胃腸管、呼吸器系、泌尿生殖系、発汗運動機能および乳頭機能に関連する自律神経障害、ならびに、微量アルブミン尿症、顕性タンパク尿症および末期腎不全を有する疾患を含む腎症が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0247】

微小循環性灌流の障害が糖尿病患者における神経障害と網膜症の両方の発病に重要であるように見える。これは次に、高血糖介在性の血管内皮性機能の混乱を反映し、プロテインキナーゼCの過剰活性化、一酸化窒素（NO）の利用能の低下、スーパーオキシドとエンドセリン 1（ET-1）産生の上昇、インスリン機能の障害、プロスタサイクリン / PGE 1 の合成の減少および白血球の活性上昇と内皮接着という結果になる。これは究極的には破滅的な臨床事象群である。

【0248】

したがって、いくつかの実施形態において、用語「患者」は糖尿病の長期合併症の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。

20

【0249】

糖尿病性網膜症は微小血管障害に至る細小血管に対する全身性障害の眼における症状である。網膜症では、網膜における脆弱で低品質の新しい血管の成長ならびに黄斑浮腫（黄斑の膨張）が重篤な視力喪失または失明につながる可能性がある。増殖性糖尿病性網膜症（PDR）の一部として眼の裏で新しい血管が形成するとき、それらは流血し（出血）、視力をぼんやりとさせる可能性がある。それは、10年以上糖尿病を有している全ての患者の80%までに悪影響を与えている。

【0250】

糖尿病性網膜症の症状はしばしば進展が遅く、微妙であり、そして、視力のかすみおよび進行性の視力の喪失を含む。より急速に視力喪失の原因となる可能性がある黄斑浮腫は、しばらくは何の警戒サインを有さない可能性がある。しかしながら、一般的に黄斑浮腫を有する人物はかすんだ視力を持つ可能性があり、それが読書や運転などの事をすることが困難となる。いくつかの場合では、視力は1日の間に良くなったり悪くなったりする。

30

【0251】

したがって、いくつかの実施形態において、用語「患者」は糖尿病性網膜症の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。

【0252】

糖尿病性神経障害は、神経に必要な物を供給する細小血管（神経脈管）に関係する糖尿病性微小血管傷害に関連する神経障害性疾患である。糖尿病性神経障害に関連する可能性がある比較的共通する症状には第3脳神経麻痺、単神経障害、多発性単神経障害、糖尿病性筋萎縮、有痛性多発性神経障害、自律神経障害および胸腹部神経障害が含まれる。

40

【0253】

糖尿病性神経障害は全ての末梢神経、つまり痛覚線維、運動ニューロン、自律神経に悪影響を与える。したがって、全てが神経で管理されているので、それは必ず全ての器官と系に悪影響を与える可能性がある。影響される器官系と身体の部分に基づくいくつかの別個の症候群が存在するが、これらは決して他を排除するものではない。患者は知覚運動性自律性神経障害または任意のその他の組合せを持つ可能性がある。影響を受ける神経に応じて症状は変化し、そして、記載されたもの以外の症状を含む可能性がある。たいてい、

50

症状は何年もの間に徐々に進行する。

【0254】

糖尿病性神経障害の症状には四肢のしびれと刺痛、知覚異常（身体の部分の知覚の減少または喪失）、下痢、勃起機能不全、尿失禁（膀胱制御の喪失）、インポテンツ、顔、口および脛の弛み、視力の変化、めまい、筋力低下、嚥下困難、発話障害、線維束性収縮（筋収縮）、無オルガスム症および焼けるような痛みまたは電気の刺激のような痛みが含まれる。

【0255】

さらに、神経障害により様々な神経が様々な様式で悪影響を受ける。知覚運動性多発性神経障害では短い神経線維よりも長い神経線維でより影響が大きい。なぜなら、神経伝達速度は神経の長さに比例して遅くなるからである。この症候群では、知覚の減少および反射運動の喪失が最初に各足の足指で起き、次に上方に広がっていく。それは、通常、しびれのグローブ・ストッキング分布、感覚の喪失、知覚異常および夜間の痛みとして説明される。その痛みは、焼けるような感覚、刺すような感覚、疼痛または鈍い痛みのように感じる可能性がある。ピンや針で刺されたような感覚が共通する。固有感覚、つまり肢が空間中のどこに存在するかの感覚の喪失が早くに影響を受ける。これらの患者は破片のような異物の上を歩いているとき、または、合わない靴を履いて胼胝ができているときに、感じるができない。結果として、患者は足と脚に潰瘍と感染症を起こす危険性があり、それらの切断に至る可能性がある。同様に、これらの患者は膝頭、踵または足の多発骨折を起こす可能性がある、そして、シャルコー関節症になる可能性がある。運動性機能の喪失は、背屈、足指の拘縮、骨間筋機能の喪失をもたらし、指の収縮、いわゆる槌状足指に至る。これらの拘縮は足だけでなく手でも起こり、筋系の喪失が手を痩せ衰えて骨ばっているように見せる。筋機能の喪失は進行性である。

10

20

【0256】

自律神経障害は心臓、胃腸系および泌尿生殖系に機能する自律神経系に影響を与える。糖尿病患者において最も一般に認識される自律機能不全は、立ちあがったときの起立性低血圧または起立性失神である。糖尿病性自律神経障害の場合、それは、血液を絶えず間なく十分に脳に流し続けるために心臓と血管が心拍数と血管緊張を適切に調節することに失敗したことに起因する。この症状には正常な呼吸と共に見られる心拍数の通常の変化の喪失がたいてい付随する。これらの2つの所見は自律神経障害を示唆する。

30

【0257】

胃腸系の症状には、胃排出遅延、胃不全麻痺、吐き気、腹部膨満および下痢が含まれる。多くの糖尿病患者が糖尿病のために経口薬を摂取するため、これらの医薬の吸収は胃排出遅延によって大いに影響を受ける。血糖が正常である、または、既に低血糖であるときに経口糖尿病薬が食前に摂られ、数時間後まで、または、時には数日後まで吸収されない場合、これは低血糖症に至る可能性がある。小腸のゆっくりとした動きが細菌の過剰増殖の原因となる可能性があり、高血糖によってそれが悪化する。これによって腹部膨満、ガス発生および下痢になる。

【0258】

泌尿生殖系の症状には、頻尿、尿意切迫、尿失禁および尿閉が含まれる。尿閉により膀胱憩室、膀胱結石、逆流性腎症および頻繁な尿路感染になる可能性がある。したがって、これらの方法のいずれにおいても用語「患者」は自律神経障害の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。

40

【0259】

したがって、いくつかの実施形態において、用語「患者」は糖尿病性神経障害の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。これらの方法のどれかの別の態様において、患者は腓腹神経での知覚神経伝達速度（SCV）の低下（調和のとれた正常な個人での身長補正基準値 - 1.5 SD 未満）を特徴とする「既成の末梢神経障害」を有している。ある実施形態において、用語「患者」は初発性神経障害の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。

50

## 【0260】

したがって、ある実施形態において、本発明は、対象の、または、患者の身長調節知覚神経伝達速度または運動神経伝達速度の低下を治療する、または、防御する方法を包含する。この方法の1つの態様において、運動神経伝達速度は初期神経伝達速度である。別の実施形態において、運動神経伝達速度はピーク神経伝達速度である。

## 【0261】

ある実施形態において、前記対象は糖尿病の患者である。ある実施形態において、前記対象は少なくとも1つの糖尿病の長期合併症を有する。1つの態様において、患者は、類似の伸長の調和のとれた対象グループについての平均ピーク神経伝達速度から少なくとも約2標準偏差であるピーク神経伝達速度を示す。1つの態様において、患者は35 m / 秒よりも速いピーク神経伝達速度を有する。本請求の方法のどれかの1つの態様において、患者は40 m / 秒よりも速いピーク神経伝達速度を有する。1つの態様において、患者は45 m / 秒よりも速いピーク神経伝達速度を有する。1つの態様において、患者は50 m / 秒よりも速いピーク神経伝達速度を有する。

## 【0262】

本請求の方法のどれかの1つの態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約1.5 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約2.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約2.5 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約3.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約3.5 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約4.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約4.5 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約5.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約5.5 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約6.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約7.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約8.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約9.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約10.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約15.0 m / 秒に改善することになる。これらの方法の別の態様において、治療により神経伝達速度が少なくとも約20.0 m / 秒に改善することになる。

## 【0263】

これらの方法のどれかのある実施形態において、PEG化C-ペプチド治療法の開始前のピーク神経伝達速度と比較して、治療によりピーク神経伝達速度が少なくとも10%改善することになる。これらの方法のどれかのある実施形態において、PEG化C-ペプチド治療法の開始前のピーク神経伝達速度と比較して、治療によりピーク神経伝達速度が少なくとも15%改善することになる。これらの方法のどれかのある実施形態において、PEG化C-ペプチド治療法の開始前のピーク神経伝達速度と比較して、治療によりピーク神経伝達速度が少なくとも20%改善することになる。これらの方法のどれかのある実施形態において、PEG化C-ペプチド治療法の開始前のピーク神経伝達速度と比較して、治療によりピーク神経伝達速度が少なくとも25%改善することになる。これらの方法のどれかのある実施形態において、PEG化C-ペプチド治療法の開始前のピーク神経伝達速度と比較して、治療によりピーク神経伝達速度が少なくとも30%改善することになる。これらの方法のどれかのある実施形態において、PEG化C-ペプチド治療法の開始前のピーク神経伝達速度と比較して、治療によりピーク神経伝達速度が少なくとも40%改

善することになる。これらの方法のどれかのある実施形態において、PEG化C-ペプチド治療法の開始前のピーク神経伝達速度と比較して、治療によりピーク神経伝達速度が少なくとも50%改善することになる。

【0264】

糖尿病性腎症は腎臓系球体中の毛細血管の血管傷害により引き起こされる進行性腎臓疾患である。それはネフローゼ症候群とびまん性系球体硬化症を特徴とする。それは長期の糖尿病に起因し、そして、多くの西洋諸国ではそれは透析の第1原因である。

【0265】

慢性糖尿病（発症後15年以上）の患者に糖尿病性腎症の症状を見ることができる。その疾患は進行性であり、男性においてより頻繁に見られる。糖尿病性腎症はアメリカ合衆国での慢性腎不全と終末期腎臓病の最も一般的な原因である。1型と2型の糖尿病を有する両方の人々にリスクがある。血中グルコースレベルの管理が不十分である場合、そのリスクはより高い。さらに、いったん、腎症になると、その血圧の管理が不十分である患者で最も速い進行速度が見られる。その血中のコレステロールレベルが高い人々もその他の人々よりもずっと高いリスクを有する。

10

【0266】

糖尿病性腎症の経過において最も早い段階に検出できる変化は系球体濾過障壁の異常である。この段階で、腎臓は尿中に正常よりも多くの血清アルブミンの混入を許し始め（アルブミン尿）、そして、鋭敏なアルブミンの医学的検査によりこれを検出することができる。この段階は「微量アルブミン尿」と呼ばれる。糖尿病性腎症が進行すると、結節性系球体硬化症によって破壊される系球体が増える。尿中に排泄されるアルブミンの量が増えると、通常の尿分析技術によってそれを検出することができる。この段階では、腎生検は明確に糖尿病性腎症を示す。

20

【0267】

系球体硬化症によって引き起こされる腎不全により体液濾過欠損および腎臓機能のその他の疾患になる。血圧が増加し（高血圧）、そして、身体中の体液貯留と血漿膠質浸透圧の低下が浮腫の原因となる。その他の合併症は腎動脈の動脈硬化症とタンパク質尿症である可能性がある。

【0268】

その初期経過を通じて糖尿病性腎症は症状が無い。それらは後期に発生し、そして、それらは尿中へ多量のタンパク質を排泄した結果である、または、腎不全に起因する可能性がある。症状には浮腫、たいていは午前中に眼の周りに現れる腫脹、後には脚の浮腫みなどの全身的な浮腫みが生じる可能性がある腫脹、（タンパク質尿が原因の）泡のある、または、過剰に泡立つ尿、（体液の蓄積による）意図していない体重の増加、食欲減退（食欲不振）、吐き気および嘔吐、不調（一般的な不快感）、疲労感、頭痛、頻繁な吃逆および掻痒が含まれる。

30

【0269】

したがって、いくつかの実施形態において、用語「患者」は糖尿病性腎症の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。

【0270】

拡張機能障害と最終的には心不全に至る心臓への損傷である糖尿病性心筋症（DCM）。糖尿病では非常に一般的である大血管疾患および加速化アテローム硬化症は別として、DCMは、糖尿病冠動脈アテローム硬化症と高血圧が無い糖尿病の患者に心室機能不全が発病するときに診断される臨床状態である。DCMは心室拡張、筋肥大、顕著な間質性線維症、および拡張機能不全の存在下で低下する、または、維持される収縮機能を機能的な特徴とする可能性がある。

40

【0271】

DCMの1つの特性は長期の潜伏段階であり、その間にその疾患が進行するが完全に症状が無い。大半の場合、DCMは同時に起こる高血圧または冠動脈疾患と共に発見される。最初期の徴候の1つは心室充満にはほとんど影響が無い穏やかな左心室拡張機能不全で

50

ある。また、糖尿病の患者は左心室コンプライアンスまたは左心室肥大または両者の組合せに関連するDCMの微妙な徴候を示す可能性がある。頸静脈波の中で顕著な「a」波は特筆に値し、そして、心収縮を通して心尖拍動が過剰活動性または持続性である可能性がある。心収縮機能不全、左心室拡張および徴候的な心臓麻痺の発症の後に頸静脈圧が上昇する可能性があり、そして、心尖拍動が下方左に移されるであろう。これらの場合、収縮期の僧房弁雑音はまれである。構造的な心臓病を持たない患者の60%ではこれらの変化はDCMと関連する可能性がある様々な心電図上の変化に付随する。しかし、たいていは初期の無症状段階ではそうではない。後に症状が進行して、QT間隔の延長により線維症が示される可能性がある。DCMの定義が同時に起こるアテローム硬化症と高血圧を排除しているため、肥大と線維症が非常に明白となるこの疾患の非常に後期の段階まで、灌流には、または、心房ナトリウム利尿性ペプチドのレベルには変化が無い。

10

**【0272】**

ある実施形態において、用語「患者」は糖尿病性心筋症の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。

**【0273】**

糖尿病の巨大血管性障害には扁桃炎または心筋梗塞（心臓発作）に至る冠動脈疾患、卒中（主に虚血性）、間欠性跛行（身体運動関連足脚痛）の一因となる末梢血管傷害ならびに糖尿病性足病変および糖尿病性筋壊死が含まれる。

**【0274】**

ある実施形態において、用語「患者」は糖尿病の巨大血管性障害の症状のより多くのうちの1つを有する個人を意味する。

20

**【0275】****低血糖症の予防法**

ある実施形態において、本発明は、インスリンの投与を追加的に含む処方計画においてヒトのインスリン依存性糖尿病の患者で低血糖症のリスクを低減させるために開示されるPEG化C-ペプチドのどれかを使用することを包含し、その計画は、a) 前記患者にインスリンを投与すること、b) 治療用量のPEG化C-ペプチドを前記患者のインスリン投与に用いられたのとは別の部位に投与すること、c) 前記治療用量のPEG化C-ペプチドの結果変化した前記患者のインスリン要求性に基づいて投与されるインスリンの投薬量、投薬タイプまたは投薬頻度を調節することを含む。

30

**【0276】**

別の態様において、本発明は、ヒトのインスリン依存性の患者におけるインスリン利用を低減させる方法を包含し、その方法は以下の段階を含む；a) 前記患者にインスリンを投与する段階、b) 開示されるPEG化C-ペプチドのどれかの治療用量を前記患者のインスリン投与に用いられたのとは別の部位に皮下投与する段階、c) 前記治療用量のPEG化C-ペプチドの結果変化した前記患者のインスリン要求性のモニターに基づき投与されるインスリンの投薬量、投薬タイプまたは投薬頻度を調節する段階であって、前記の調節されたインスリン用量では高血糖症は誘起されず、前記の調節されたインスリン用量はPEG化C-ペプチド治療の開始前の前記患者のインスリン用量よりも少なくとも10%少ない段階。（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,855,177号を参照のこと。）

40

**【0277】**

これらの方法のいずれにおいても用語「低血糖症」または「低血糖事象」は、患者を危険にさらす可能性がある異常に低い血漿中グルコース濃度の全てのエピソードに当てはまる。米国糖尿病協会のワークグループは、インスリン依存性糖尿病の人に70mg/dL（3.9mmol/L）未満の血漿中グルコース濃度の低血糖症を発病する可能性について関心を持つように提言した。したがって、本請求の方法のどれかの1つの態様において、用語「低血糖症」または「低血糖事象」は、患者の血漿中グルコース濃度が約70mg/dL（3.9mmol/L）未満まで低下する状況に当てはまる。

**【0278】**

50

低血糖症は糖尿病の治療における重大な医学的合併症であり、そして、1型糖尿病を有する大半の人と進行した2型糖尿病を有する多くの人で病的状態の再発の原因となり、そして、時には致命的である。さらに、低血糖症は後の血漿中グルコース濃度の低下に対する生理学的な、および、行動上の防御機構を損ない、したがって、再発性低血糖症の悪循環を引き起こす。したがって、低血糖症の予防は糖尿病の治療ならびに糖尿病の長期合併症の治療において非常に重要である。

#### 【0279】

不運なことに、低血糖症は1型糖尿病の大半の人にとり人生の現実である(Cryer PE et al.: Diabetes 57: 3169-3176, (2008年))。平均的な患者は無数の無症候性低血糖症のエピソードを有し、そして、週に2つの症候性低血糖症のエピソードに苦しみ、糖尿病の存続期間では数千のそのようなエピソードを有する。彼または彼女は、1年に1つ以上、しばしば癲癇の発作または昏睡状態を伴う重篤で一時的に身体機能を麻痺させる低血糖症のエピソードを経験する。

10

#### 【0280】

全体的にみれば、2型糖尿病では低血糖症は低頻度である。しかしながら、低血糖症のリスクは2型糖尿病の経過の後期になるほど徐々に頻度が高くなり、そして、血糖管理にとって制限的に成る。Donnellyらの予期的な集団ベースのデータ(Diabetes Med. 22: 749-755, (2005年))は、インスリン治療を受けた2型糖尿病での低血糖症の全体的な発生率は1型糖尿病での発生率のおよそ3分の1であることを示している。全ての低血糖症の発生率、および、重篤な低血糖症の発生率は、それぞれ1型糖尿病では100人年あたり4,300エピソードと115エピソードであり、それぞれ2型糖尿病では100人年あたり1600エピソードと35エピソードであった。

20

#### 【0281】

低血糖事象の重症度に基づいて低血糖症を分類することができる。例えば、米国糖尿病協会のワークグループは、次の糖尿病における低血糖症の分類を提案している：1)重篤な低血糖症(すなわち、他人の介護を必要とする低血糖症性昏睡)、2)文書化される症候性低血糖症(症状があり血漿中グルコース濃度が70mg/dL未満である)、3)無症候性低血糖症(血漿中グルコース濃度が70mg/dL未満であり症状が無い)、4)おそらく症候性低血糖症(低血糖症に起因する症状を持つが血漿中グルコース測定値が無い)、および5)相対的低血糖症(70mg/dLより高い血漿中グルコース濃度を有するがそのレベルに向かってグルコース濃度が低下する)。

30

#### 【0282】

したがって、本明細書に開示される方法のどれかの別の態様において、用語「低血糖症」は重篤な低血糖症および/または低血糖症性昏睡に当てはまる。これらの方法のどれかの別の態様において、用語「低血糖症」は症候性低血糖症に当てはまる。これらの方法のどれかの別の態様において、用語「低血糖症」はおそらく症候性低血糖症に当てはまる。これらの方法のどれかの別の態様において、用語「低血糖症」は無症候性低血糖症に当てはまる。これらの方法のどれかの別の態様において、用語「低血糖症」は相対的低血糖症に当てはまる。

40

#### 【0283】

##### インスリンの種類と投与形態

様々な長さの活性(活性プロファイル)を提供するように開発されてきた、180を超える世界中で入手可能な個々のインスリン製剤が存在する。これらのうちおよそ25%が可溶性インスリン(非修飾型)であり、約35%が長期または中期作用型基底インスリンであり(NPH[中間型プロタミンハーゲドルン]インスリンまたはレンテインスリン[インスリン亜鉛懸濁液]または等電点が上昇するように修飾された形態[インスリングルルギン]またはアシル化されるように修飾された形態[インスリンデテミル]と混合された基底インスリン。これらの形態は低い可溶性、遅い皮下吸収速度、可溶性インスリンに対して長い作用期間を有する。)であり、約2%が急速作用型インスリン(例えば、アミノ酸交換により操作され、自己会合性が減少し皮下吸収が上昇したインスリン)であり、

50

そして、約 38% がプレミックス型インスリン（例えば、短期作用型インスリン、中期作用型インスリンおよび長期作用型インスリンの混合物。これらの製剤には 1 日の注射回数を減らす利点がある。）である。

#### 【0284】

米国で市販されている短期作用型インスリン製剤にはレギュラーインスリンと急速作用型インスリンが含まれる。レギュラーインスリンは 30 ~ 60 分の作用開始時間、1.5 ~ 2 時間の効果のピーク時間および 5 ~ 12 時間の活性期間を有する。アスパルト（ノボラピッド）、リスプロ（ヒューマログ）およびグルリジン（アピドラ）などの急速作用型インスリンは 10 ~ 30 分の作用開始時間、約 30 分間の効果のピーク時間および 3 ~ 5 時間の活性期間を有する。

10

#### 【0285】

NPH インスリンおよびレンテインスリンなどの中期作用型インスリンは 1 ~ 2 時間の作用開始時間、4 ~ 8 時間の効果のピーク時間および 10 ~ 20 時間の活性期間を有する。

#### 【0286】

ウルトラレンテインスリンなどの長期作用型インスリンは 2 ~ 4 時間の作用開始時間、8 ~ 20 時間の効果のピーク時間および 16 ~ 24 時間の活性期間を有する。長期作用型インスリンのその他の例には、グラルギンおよびデテミルが含まれる。グラルギンインスリンは 1 ~ 2 時間の作用開始時間および 24 時間の作用期間を有するがピーク効果は無い。

20

#### 【0287】

多くの場合、糖尿病の管理にインスリンを用いる処方計画は長期作用型インスリンと短期作用型インスリンを組み合わせる。例えば、Aventis Pharmaceuticals Inc. のランタスは、長期作用型非経口血中グルコース低下剤である組換えヒトインスリン類似体であり、その比較的長い作用期間（24 時間まで）はその比較的遅い吸収速度に直接関係する。ランタスは 1 日 1 回、好ましくは就寝時に皮下投与され、正常な膵臓により供給されるインスリンのゆっくりとして安定した（基底の）分泌に類似して、持続的にインスリンを提供するといわれている。そのような長期作用型インスリン活性により、顕著なピークが無い 24 時間にわたって比較的に一定した濃度 / 時間プロファイルが生ずる結果となり、したがって、それが患者の基底インスリンとして長期作用型インスリンが 1 日に 1 回投与されることを可能にする。そのような長期作用型インスリンは、投与されると、インスリンへの付加物の力によるというよりもむしろ化学組成物の力による長期作用性効果を有する。

30

#### 【0288】

OMNIPOD（商標）インスリン管理システム（Insulet Corporation, Bedford, マサチューセッツ州）の商標で販売されているシステムなどのインスリン連続点滴のための自動化無線コントロールシステムがさらに最近になり開発されている。これらのシステムは、2 つの個別の部分からなるシステムによる血中グルコース監視技術を用いて連続皮下インスリン送達を提供する。このシステムは毎日のインスリン注射を不要とし、そして、チューブを介して連結される従来のインスリンポンプを必要としない。

40

#### 【0289】

OMNIPOD（商標）は点滴セットのように皮膚上に着用する小さくて軽い装置である。それは、個人用糖尿病マネージャー（PDM）から無線で伝達されるプログラム済みの指令によってインスリンを送達する。PDM は無線方式であり、カスタマイズしたインスリン送達指令で OMNIPOD（商標）インスリン管理システムをプログラムし、システムの作動をモニターし、そして、FREESTYLE（商標）の商標で販売されている血中グルコース試験ストリップを用いて血中グルコースレベルを調べるために使用する携帯式の装置である。その装置と PDM をつなぐチューブがない。服の下に OMNIPOD（商標）インスリン管理システムを着用し、PDM を別にバックパック、ブリーフケース

50

またはハンドバッグに入れて携帯することができる。現在利用可能なインスリンポンプと同様に、OMNIPOD（商標）インスリン管理システムは、複数の基底速度とボーラスオプション、ボーラス計算の示唆、安全点検および警報といった特徴と共に完全にプログラム可能な連続皮下インスリン送達を特色として備える。

【0290】

糖尿病患者のインスリン治療の目的は、典型的には、患者が1日を通して生理的範囲内の血中グルコースレベルと正常な炭水化物代謝を持つように、十分なインスリンを投与することである。糖尿病の個人の膵臓は1日を通して十分なインスリンを分泌しないので、インスリン治療法を通して糖尿病を効果的に管理するために、基底インスリンとして知られる、食物が消化されていないときに血中グルコース濃度を制御し、細胞にエネルギーを供給し続けるために必要なインスリンをゆっくりと安定して放出するための長期にわたるインスリン治療が施されなくてはならない。基底インスリンは食間の、および、終夜のグルコース産生を抑制するために必要であり、そして、24時間の期間にわたる患者の正常な膵臓基底インスリン分泌を模倣していることが好ましい。こうして、糖尿病の患者は約24時間の作用期間を有する長期作用型インスリンの単回用量を毎日皮下投与することができる。

10

【0291】

さらに、食後のグルコースレベルの上昇に対処することによりインスリン治療法を通して糖尿病を効果的に管理するために、ボーラス速効性治療もまた施されなくてはならない。一般的に皮下投与される、ボーラスインスリンは投与後およそ1時間で血漿中インスリンレベルの上昇をもたらす、それによって食事後の高血糖を制限する。このように、1日の中で食事時間などの患者の血中グルコースレベルが大変高くなる傾向がある時に、これらの追加の量の、例えば、5～6時間の作用期間を有するレギュラーインスリンを皮下投与することができる。ボーラスインスリンと組み合わせた基底インスリンの投与に代わるものとして、長期作用型基底インスリンの代わりにより低い用量のボーラスインスリンを反復的に、および、定期的に投与することができ、そして、必要に応じてボーラスインスリンを食後に投与することができる。

20

【0292】

現在では、レギュラー皮下注射型インスリンは食事時間の30～45分前に投与することを勧められている。結果として、糖尿病の患者および他のインスリン利用者は彼らの食事と彼らの食事に関係する彼らのインスリン投与について大掛かりな計画に携わらなければならない。不運なことに、インスリンの投与と食事の消化の間に起こる可能性がある介入性事象が、予想されるグルコースの行程に影響を与える可能性がある。

30

【0293】

さらに、投与されたインスリンがあまりにも長い時間にわたって治療効果をもたらす場合、例えば、食事の消化の結果として起こるグルコースレベルの上昇が既に低下した後に、低血糖症の可能性もある。実施例において概説されるように、この低血糖症のリスクは、インスリン必要性の低下のため、C-ペプチドで処置された患者で増大する。

【0294】

したがって、本明細書に開示される方法のどれかの1つの態様において、本発明は、患者に投与されるインスリンの平均1日量をPEG化C-ペプチド治療法の開始後に約5%～約50%だけ低減させることにより、患者の低血糖症を発生するリスクを低減させる方法を包含する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C-ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約5%～約45%だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C-ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約5%～約40%だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C-ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約5%～約35%だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C-ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約5%～約30%だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C

40

50



- ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 25 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 20 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 15 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 10 % だけ低減する。

【0295】

別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 2 % ~ 約 10 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 2 % ~ 約 15 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 2 % ~ 約 20 % だけ低減する。

【0296】

別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 10 % ~ 約 50 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 10 % ~ 約 45 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 10 % ~ 約 40 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 10 % ~ 約 35 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 10 % ~ 約 30 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 10 % ~ 約 25 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 10 % ~ 約 20 % だけ低減する。別の態様において、投与されるインスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、少なくとも 10 % だけ低減する。

【0297】

これらの方法のどれかの 1 つの態様において、投与される短期作用型インスリンの用量が上述のいずれかの規定範囲だけ選択的に低減する。これらの方法のどれかの別の態様において、投与される中期作用型インスリンの用量が上述のいずれかの規定範囲だけ選択的に低減する。これらの方法のどれかの 1 つの態様において、投与される長期作用型インスリンの用量が上述のいずれかの規定範囲だけ選択的に低減する。

【0298】

これらの方法のどれかの別の態様において、投与される中期および長期作用型インスリンの用量が上述のいずれかの規定範囲だけ独立して低減し、一方、短期作用型インスリンの用量は実質的に不変のままである。

【0299】

これらの方法の 1 つの態様において、投与される短期作用型インスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 50 % だけ低減する。別の実施形態において、投与される短期作用型インスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 35 % だけ低減する。別の実施形態において、投与される短期作用型インスリンの用量が、PEG化C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 10 % ~ 約 20 % だけ低減する。これらの方法の 1 つの態様において、食事のために食前に投与される短期作用型インスリンの用量が低減する。これらの方法の別の態様において、午前中または夜間に投与される短期作用型インスリンの用量が低減する。これらの方法のどれかの別の態様において

、投与される短期作用型インスリンの用量が低減し、一方、患者に投与される長期作用型および / または中期作用型インスリンの用量は実質的に不変である。

【 0 3 0 0 】

本明細書に開示される方法のどれかの別の態様において、本発明は、患者に投与される中期作用型インスリンの平均 1 日量を P E G 化 C - ペプチド治療法の開始後に約 5 % ~ 約 3 5 % だけ低減させることにより患者の低血糖症を発生するリスクを低減させる方法を包含する。これらの方法の 1 つの態様において、投与される中期作用型インスリンの用量が、P E G 化 C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 5 0 % だけ低減する。別の実施形態において、t h e d o s e o f 中期作用型インスリン投与の用量が、P E G 化 C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 3 5 % だけ低減する。別の実施形態において、投与される中期作用型インスリンの用量が、P E G 化 C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 1 0 % ~ 約 2 0 % だけ低減する。これらの方法の別の態様において、午前中または夜間に投与される中期作用型インスリンの用量が低減する。これらの方法のどれかの別の態様において、投与される中期作用型インスリンの用量が低減し、一方、患者に投与される短期作用型インスリンの用量は実質的に不変である。

10

【 0 3 0 1 】

本明細書に開示される方法のどれかの別の態様において、本発明は、患者に投与される長期作用型インスリンの平均 1 日量を P E G 化 C - ペプチド治療法の開始後に約 5 % ~ 約 5 0 % だけ低減させることにより患者の低血糖症を発生するリスクを低減させる方法を包含する。1 つの実施形態において、投与される長期作用型インスリンの用量が、P E G 化 C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 5 % ~ 約 3 5 % だけ低減する。別の実施形態において、投与される長期作用型インスリンの用量が、P E G 化 C - ペプチド治療開始前の患者のインスリン用量と比較して、約 1 0 % ~ 約 2 0 % だけ低減する。これらの方法の別の態様において、午前中または夜間に投与される長期作用型インスリンの用量が低減する。これらの方法のどれかの別の態様において、投与される長期作用型インスリンの用量が低減し、一方、患者に投与される短期作用型インスリンの用量は実質的に不変である。

20

【 0 3 0 2 】

ある好ましい実施形態において、患者は、治療前の基線レベルと比較して、P E G 化 C - ペプチドでの治療の後に低血糖症を発生するリスクの低減を経験する間にインスリン利用とインスリン感受性の改善を達成する。好ましくは、統計学的に有意な H O M A ( ホメオスタシスモデル評価 ) の減少傾向によりインスリン利用とインスリン感受性の改善が測定される (Turner et al.: Metabolism 28(11): 1086-1096, (1979年))。

30

【 0 3 0 3 】

典型的には、インスリン投与のために直近で用いられた部位と同じ部位に P E G 化 C - ペプチドは皮下投与されないであろう。すなわち、P E G 化 C - ペプチドとインスリンは異なる部位に注射されるであろう。1 つの態様において具体的には、P E G 化投与の部位は、典型的には、インスリン投与のために直近で用いられた部位から少なくとも約 1 0 c m 離れているであろう。別の態様において、P E G 化 C - ペプチド投与の部位は、典型的には、インスリン投与のために直近で用いられた部位から少なくとも約 1 5 c m 離れているであろう。別の態様において、P E G 化 C - ペプチド投与の部位は典型的には、インスリン投与のために直近で用いられた部位から少なくとも約 2 0 c m 離れているであろう。

40

【 0 3 0 4 】

異なる部位の例には、例えば、左腕および右腕への注射または左大腿および右大腿への注射または左臀部もしくは右臀部への注射または腹部の反対側への注射が含まれるがこれらに限定されない。異なる部位のその他の明確な異なる形態には、腕および大腿への注射または腕および臀部への注射または腕および腹部への注射などが含まれる。

【 0 3 0 5 】

さらに、当業者、すなわち医師または糖尿病患者は、インスリン注射の様々な注射部位

50

の選択法についての開示を提供する先行技術教示およびインスリン投与についての多数の教科書およびガイドに基づき、異なる部位のその他の組合せでPEG化C-ペプチドとインスリンを投与する方法を認識し、そして、理解するであろう。例えば、次の代表的な教科書 (Learning to live well with diabetes, Cheryl Weiler 編集, (1991年) DCI Publishing, Minneapolis, ミネソタ州、American Diabetes Association Complete Guide to Diabetes, ISBN 0-945448-64-3 (1996年))を参照のこと。

【0306】

本請求の方法のどれかの1つの態様において、PEG化C-ペプチドは、直近でインスリン投与に用いられた部位に対して腹部の反対側に、およそ15~20cm離して投与される。

10

【0307】

7. 医薬組成物

1つの態様において、本発明は、PEG化C-ペプチドおよび薬剂的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物を包含する。

【0308】

PEG化C-ペプチドの送達に適切な医薬組成物およびその製剤方法は当業者には容易に明らかとなるであろう。そして、それらは公知の担体、希釈剤または賦形剤のいずれかを含むことができる。そのような組成物とその製剤方法は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版(Mack Publishing Company, 1995年)に見つけることができる。

20

【0309】

1つの態様において、前記医薬組成物は薬剂的に有効な成分の無菌の水溶液および/または懸濁液、エアロゾル、軟膏などの形態であることができる。水溶液である製剤が最も好ましい。そのような製剤は、典型的には、PEG化C-ペプチドそれ自体、水、および安定剤として作用する1つ以上の緩衝液(例えば、リン酸含有緩衝液)、および所望により1つ以上の保存剤を含む。そのような製剤は、例えば、約1~200mg、約3~100mg、約3~80mg、約3~60mg、約3~40mg、約3~30mg、約0.3~3.3mg、約1~3.3mg、約1~2mg、約1~3.3mg、約2~3.3mgまたは本明細書において記述される範囲のいずれか、例えば、約200mg、約150mg、約120mg、約100mg、約80mg、約60mg、約50mg、約40mg、約30mg、約20mgまたは約10mgまたは約8mgまたは約6mgまたは約5mgまたは約4mgまたは約3mgまたは約2mgまたは約1mgまたは約0.5mgのPEG化C-ペプチドを含み、そして、本発明のさらなる態様を構成する。

30

【0310】

医薬組成物はPEG化C-ペプチドの薬剂的に許容可能な塩を含むことができる。適切な塩についての概説について、Stahl および Wermuthによる Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Wiley-VCH, 2002年)を参照のこと。適切な塩基性塩が非毒性塩を形成する塩基から形成される。代表例には、アルミニウム、アルギニン、ベンザチン、カルシウム、コリン、ジエチルアミン、ジオーラミン、グリシン、リシン、マグネシウム、メグルミン、オラミン、カリウム、ナトリウム、トロメタミンおよび亜鉛の塩が含まれる。酸と塩基のヘミ塩、例えば、ヘミ硫酸塩およびヘミカルシウム塩を形成することもできる。1つの実施形態において、PEG化C-ペプチドを薬剂的に許容可能な正荷電イオンと共にゲルとして調製することができる。

40

【0311】

1つの態様において、前記正荷電イオンは1価の金属イオンであることができる。1つの態様において、前記金属イオンはナトリウムおよびカリウムから選択される。

【0312】

1つの態様において、前記正荷電イオンは2価の金属イオンであることができる。1つの態様において、前記金属イオンはカルシウム、マグネシウムおよび亜鉛から選択される。

50

## 【0313】

P E G 化 C - ペプチドを1日のどの時間でも投与することができる。ヒトにとって、使用される用量は約0.1から200mg/週までのP E G 化 C - ペプチド、例えば、約0.1から0.3mg/週まで、約0.3~1.5mg/週、約1mg~約3.5mg/週、約1.5~2.25mg/週、約2.25~3.0mg/週、約3.0~6.0mg/週、約6.0~10mg/週、約10~20mg/週、約20~40mg/週、約40~60mg/週、約60~80mg/週、約80~100mg/週、約100~120mg/週、約120~140mg/週、約140~160mg/週、約160~180mg/週、および約180~約200mg/週の範囲であることができる。

## 【0314】

P E G 化 C - ペプチドの使用される総1週間量は約1mg~約3.5mg、約1mg~約20mg、約20mg~約50mg、約50mg~約100mg、約100mg~約150mgまたは約150mg~約200mgであることが好ましい。

## 【0315】

P E G 化 C - ペプチドの総1週間量は約0.1mg、約0.5mg、約1mg、約1.5mg、約2mg、約2.5mg、約3mg、約3.5mg、約4mg、約4.5mg、約5mg、約5.5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg、約10mg、約12mg、約15mg、約18mg、約21mg、約24mg、約27mg、約30mg、約33mg、約36mg、約39mg、約42mg、約45mg、約50mg、約60mg、約70mg、約80mg、約90mg、約100mg、約110mg、約120mg、約130mg、約140mg、約150mg、約160mg、約170mg、約180mg、約190mgまたは約200mgであり得る。(上で言及されるP E G 化 C - ペプチドの質量は送達システムの生物学的利用能に依存し、そして、およそ40,000Daの分子質量を有するP E G 化 C - ペプチドの使用法に基づくことが認識されるであろう。)

## 【0316】

これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドは約1mgから約45mgまでの範囲の1週間量を含む。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドは約3mgから約15mgまでの範囲の1週間量を含む。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドは約30mgから約60mgまでの範囲の1週間量を含む。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドは約60mgから約120mgまでの範囲の1週間量を含む。

## 【0317】

これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドは患者の血漿中のP E G 化 C - ペプチドの約0.2nMと約6nMの間の平均定常状態濃度( $C_{ss-ave}$ )を維持する。

## 【0318】

これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドが、3日以上投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のP E G 化 C - ペプチドの約0.2nMと約6nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドが、4日以上投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のP E G 化 C - ペプチドの約0.2nMと約6nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドが、5日以上投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のP E G 化 C - ペプチドの約0.2nMと約6nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療量のP E G 化 C - ペプチドが、少なくとも1週間の投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のP E G 化 C - ペプチドの約0.2nMと約6nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成

物のいずれかにおいて、毎日の皮下注射により治療用量を投与する。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、持続性放出製剤または装置により治療用量を投与する。

#### 【0319】

これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療用量のPEG化C-ペプチドが、3日以上 of 投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のPEG化C-ペプチドの約0.4 nMと約8 nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療用量のPEG化C-ペプチドが、4日以上 of 投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のPEG化C-ペプチドの約0.4 nMと約8 nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療用量のPEG化C-ペプチドが、5日以上 of 投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のPEG化C-ペプチドの約0.4 nMと約8 nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療用量のPEG化C-ペプチドが、7日以上 of 投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のPEG化C-ペプチドの約0.4 nMと約8 nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。

10

#### 【0320】

これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療用量のPEG化C-ペプチドが、3日以上 of 投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のPEG化C-ペプチドの約0.6 nMと約8 nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療用量のPEG化C-ペプチドが、4日以上 of 投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のPEG化C-ペプチドの約0.6 nMと約8 nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療用量のPEG化C-ペプチドが、5日以上 of 投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のPEG化C-ペプチドの約0.6 nMと約8 nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。これらの方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、治療用量のPEG化C-ペプチドが、7日以上 of 投与間隔を用いるとき、患者の血漿中のPEG化C-ペプチドの約0.6 nMと約8 nMの間の平均定常状態濃度を維持するように患者に提供される。

20

#### 【0321】

前記用量が溶液中に存在することができ、または、存在しないことができる。前記服用量が溶液に加えられる場合、前記服用量の体積は変化し得ると認識されるであろうが、典型的には、20 µL ~ 2 mLであろう。好ましくは、皮下投与の服用量は、2000 µL、1500 µL、1200 µL、1000 µL、900 µL、800 µL、700 µL、600 µL、500 µL、400 µL、300 µL、200 µL、100 µL、50 µLまたは20 µLの体積中に加えられるであろう。

30

#### 【0322】

溶液中のPEG化C-ペプチドの服用量は保存剤および/または緩衝剤を含むこともできる。例えば、保存剤であるm-クレゾールまたはフェノールを用いることができる。保存剤の典型的な濃度には、0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mLまたは5 mg/mLが含まれる。したがって、ある範囲の保存剤の濃度には、0.2 ~ 10 mg/mL、特に0.5 ~ 6 mg/mLまたは0.5 ~ 5 mg/mLが含まれる可能性がある。使用することができる緩衝剤の例には、ヒスチジン (pH 6.0)、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6 ~ 7.5) または炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 7 ~ 7.5) が含まれる。PEG化C-ペプチドの用量は、天然の、もしくは、完全なC-ペプチド、C-ペプチド断片、C-ペプチド派生物またはその他の機能的に同等なC-ペプチド異型のうちの1つ以上を含むことができると認識されるであろう。

40

#### 【0323】

##### 8. 投与方法

PEG化C-ペプチドの1回分の用量はヒトC-ペプチド (配列番号1) の全長および

50

C末端C - ペプチド断片E G S L Q (配列番号31) および/またはC - ペプチドホモログまたはC - ペプチド派生物を含むことができる。さらに、前記用量は、必要に応じて、C - ペプチドの断片、例えば、E G S L Qを含むだけであり得る。したがって、用語「C - ペプチド」は単一のC - ペプチド実体または様々な「C - ペプチド」の混合物を包含することができる。PEG化C - ペプチドの投与は、経口投与、非経口投与、局所投与または皮下投与、吸入または持続性送達装置もしくは組成物の移植を含む医療技術分野で公知の適切な方法によるものであることができる。1つの態様において、投与は皮下投与によるものである。

#### 【0324】

経口投与に適切な本発明の医薬組成物は、例えば、前記薬剤を胃での分解から保護する1つの外被または複数の外被(腸溶カプセル)により好んで被覆される無菌で精製されたストックパウダー形態のPEG化C - ペプチドを含み、それによりこれらの物質の歯肉からの吸収または小腸での吸収を可能にすることができる。前記組成物中の有効成分の全量は99.99~0.01重量%まで変化することができる。

#### 【0325】

経口投与のために、PEG化C - ペプチドを含む医薬組成物は溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉剤などの形態をとることができる。ポリビニルピロリドン、ショ糖、ゼラチンおよびアラビアゴムなどの結着剤と共に、デンプンおよび、好ましくは、ジャガイモデンプンまたはタピオカデンプンおよびある種の複合ケイ酸塩などの様々な崩壊剤に加えて、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウムなどの様々な賦形剤を含む錠剤が用いられる。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクなどの滑沢剤がしばしば成形目的に非常に有益である。同種の固形組成物を軟質および重質充填ゼラチンカプセルに充填剤として用いることもできる。この点で好ましい材料には、ラクトースまたは乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコール類が含まれる。水性懸濁液および/またはエリキシル剤が経口投与に望ましいとき、本発明の化合物を様々な甘味剤、着香剤、着色剤、乳化剤および/または懸濁剤ならびに水、エタノール、プロピレングリコールおよびその様々な同様の組合せ物などの希釈剤と組み合わせることができる。

#### 【0326】

非経口投与に適切な本発明で使用される医薬組成物は、好ましくは受容者の血液と等張にされた、薬剤的に有効な成分の無菌の水性溶液および/または懸濁液であることが典型的である。そのような組成物は、塩化ナトリウム、グリセリン、グルコース、マンニトール、ソルビトールなどのような賦形剤、塩、炭水化物および(好ましくは3から9までのpHに緩衝する)緩衝剤を一般的に含む。

#### 【0327】

いくつかの応用のために、無菌の非水性溶液として、または、無菌の発熱物質の無い水などの適切な賦形剤と合わせて使用される乾燥形態として非経口投与用の医薬組成物を適切に製剤することができる。無菌条件下での非経口製剤の調製、例えば、凍結乾燥による調製は当業者に周知の標準的製薬技術を用いて容易に成し遂げることができる。

#### 【0328】

本発明で使用されるPEG化C - ペプチドを含む医薬組成物を皮膚または粘膜に局所投与、経皮(皮内)投与または経皮投与することもできる。即放性および/または徐放性であるように局所投与用の医薬組成物を製剤することができる。徐放性製剤には、遅延性放出、持続性放出、パルス性放出、制御性放出、標的型放出およびプログラム型放出が含まれる。この目的のための典型的な製剤には、ゲル剤、ヒドロゲル剤、外用水薬、溶液、クリーム剤、軟膏、粉剤、被覆材、泡剤、フィルム剤、皮膚パッチ剤、ウェハー剤、移植剤、スポンジ剤、線維剤、包帯剤およびミクロ乳剤が含まれる。リボソームを使用することもできる。典型的な担体には、アルコール、水、鉱物油、液体ワセリン、白色ワセリン、グリセリン、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコールが含まれる。透過促進剤を組み込むことができる。例えば、Finnin and Morgan: J. Pharm. Sci. 88(10): 955-

10

20

30

40

50

958, (1999年)を参照のこと。局所投与のその他の方法には、電気穿孔法、イオントフォレーシス、フォノフォレーシス、ソノフォレーシスおよびマイクロニードルもしくはニードルフリー（例えば、POWDERJECT（商標）、BOJECT（商標））注射による送達が含まれる。

#### 【0329】

非経口投与用のPEG化C-ペプチドの医薬組成物を、血流に、筋肉に、または、内臓に直接投与することができる。非経口投与に適切な方法には、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、髄腔内投与、脳室内投与、尿道内投与、胸骨内投与、頭蓋内投与、筋肉内投与、滑膜内投与および皮下投与が含まれる。非経口投与に適切な装置には、ニードル（マイクロニードルを含む）注射器、ニードルフリー注射器および点滴技術が含まれる。

10

#### 【0330】

典型的には、直近でインスリン投与に用いられた部位と同じ部位にPEG化C-ペプチドは皮下投与されないであろう。本請求の方法と医薬組成物のどれかの1つの態様において、直近でインスリン投与に用いられた部位に対して腹部の反対側にPEG化C-ペプチドが投与される。本請求の方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、上腕にPEG化C-ペプチドが投与される。本請求の方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、腹部にPEG化C-ペプチドが投与される。本請求の方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、臀部の上部にPEG化C-ペプチドが投与される。本請求の方法と医薬組成物のどれかの別の態様において、大腿の前部にPEG化C-ペプチドが投与される。

20

#### 【0331】

非経口投与用製剤を、即放性および/または持続放出性であるように製剤することができる。持続性放出組成物には、遅延性放出、徐放性放出、パルス性放出、制御性放出、標的型放出およびプログラム型放出が含まれる。したがって、PEG化C-ペプチドを懸濁液として、または、持続性放出をもたらす移植型デポのような投与用の固形物、半固形物または揺変性液体として製剤する可能性がある。そのような製剤の例には、薬剤コーティングス TENT および薬剤コーティング半固形物、および薬剤が負荷された(DL-乳酸-グリコール酸)共重合体(PGLA)、(DL-ラクチド-グリコリド)共重合体(PLG)またはポリ乳酸(PLA)の層状小胞またはマイクロ粒子、ヒドロゲル剤(Hoffman AS: Ann. N.Y. Acad. Sci. 944: 62-73 (2001年))、Flamel Technologies Inc.により開発されたMedusaシステムなどのポリアミノ酸ナノ粒子システム、Atrix, Inc.により開発されたAtrigelおよびDurect Corporationにより開発されたSABER(ショ糖酢酸イソ酪酸エステル長期放出)などの非水性ゲルシステム、およびSkyePharmaにより開発されたDepoFoamなどの脂質ベースシステムを含む懸濁液が含まれるがこれらに限定されない。

30

#### 【0332】

所望の用量のPEG化C-ペプチドを長期にわたって送達することができる持続性放出装置は当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,034,229号、第5,557,318号、第5,110,596号、第5,728,396号、第5,985,305号、第6,113,938号、第6,156,331号、第6,375,978号、および第6,395,292号は、溶液または懸濁液などの活性剤製剤を所望の速度で長期にわたって(すなわち、1週間より長く1年以上までの範囲の期間)送達することができる浸透圧駆動性装置を教示する。その他の持続性放出装置の例には、例えば、OmniPod(商標)インスリン管理システム(Insulet Corporation、Codman, Raynham, マサチューセッツ州、Medtronic, Minneapolis, ミネソタ州、Intarcia Therapeutics, Hayward, カリフォルニア州、およびTricumed Medinzintehnik GmbH, ドイツ)から入手可能であり、有益作用剤製剤の一定流量、調節可能流量またはプログラム可能流量をもたらす調節器タイプのポンプが含まれる。さらなる装置の例は米国特許第6,283,949号、第5,976,109号、第5,836,935号、および第5,511,355に記載される。

40

50

## 【0333】

治療レベルの所望の活性剤を長期にわたって送達するように設計されているので、医療提供者を頻繁に訪れることなく、または、自己投薬を繰り返すことなく、移植可能な送達システムにより所望の活性剤の長期治療投与が、好都合なことに、もたらされ得る。したがって、移植可能送達装置は、患者の服薬コンプライアンスを向上し、投与部位でのかぶれを低減し、医療提供者の職業事故を少なくし、廃棄危険物を低減し、そして、投薬管理の向上を通じた治療効力が上昇するように機能することができる。

## 【0334】

移植した送達装置から生体分子物質を長期にわたって送達しようと努めるとき、様々な問題の中でも、2つの問題が処理されなければならない。第1に、前記生体分子物質は、その装置の作動寿命にわたって上昇した温度（すなわち、37 以上）でその物質の安定性を実質的に維持する製剤内に含まれていなければならない。第2に、長期にわたって移植された装置から所望の作動環境に前記生体分子物質を送達することを可能にするように、その生体分子物質が製剤されなければならない。前記生体分子物質が、低流速（すなわち、100  $\mu$ L / 日）で長期にわたって装置から送達される流動性組成物に含まれる場合、この2番目の問題は特に困難であることが判明している。

10

## 【0335】

脱アミド、酸化、加水分解およびラセミ化を含むいくつかの異なる機構のうちの1つ以上を介してC - ペプチドのようなペプチド薬剤が分解する可能性がある。意義深いことには、関連のある分解経路の多くで水は反応物質である。さらに、水は可塑剤として作用し、生体分子物質の構造変性と不可逆的な凝集を促進する。生体分子物質の水性製剤により作られた安定性の問題を克服するために、公知の凍結乾燥技術、スプレー乾燥技術または脱水技術によるような公知の造粒プロセスを用いて生体分子物質の乾燥粉末製剤が作られている。生体分子物質の乾燥粉末製剤が適切な安定性という特徴をもたらしことが示されているが、長期にわたって安定なだけでなく、流動可能であり、移植可能な送達装置から容易に送達可能でもある製剤を提供することが望ましいであろう。

20

## 【0336】

したがって、本請求の方法と医薬組成物のどれかの1つの態様において、非水性薬剤製剤中にPEG化C - ペプチドが提供され、持続性放出型移植可能装置からPEG化C - ペプチドが送達され、その装置において、PEG化C - ペプチドは37 で少なくとも2か月間の間は安定である。

30

## 【0337】

PEG化C - ペプチド用の代表的な非水性製剤には、ポリマー、溶剤および界面活性剤のうちの少なくとも2つを使用して製剤される非水性賦形剤について記載する国際公開第WO00/45790号において開示されるものが含まれる。

## 【0338】

国際公開第WO98/27962号は、ポリマー、そのポリマーを溶解して粘性があるゲルを形成することができる溶剤、有益薬剤、および乳化剤を含み、粘性があるゲル中に分散する液滴相の形態である注射可能デボゲル組成物を開示する。

40

## 【0339】

国際公開第WO04089335号は、ポリマーと溶剤の組合せを用いて形成される水混和性の賦形剤になる非水性賦形剤を開示する。本明細書において使用されるように、用語「水混和性の」は、溶剤由来のポリマーが相分離することなく、選択した作動環境に典型的な温度範囲で水と全ての比で、非常に粘性があるポリマー相が形成されるように混合され得る賦形剤に当てはまる。本発明の目的にとって、「非常に粘性があるポリマー相」は、賦形剤が水と混合される前の賦形剤の粘性よりも高い粘性を示す組成物を含むポリマーに当てはまる。

## 【0340】

したがって、本請求の方法のどれかの別の態様において、少なくとも1つの薬剤送達口を有する貯留槽および安定な非水性薬物製剤を含む持続性放出装置中にPEG化C - ペ

50



チドが提供される。これらの方法と医薬組成物の１つの態様において、その製剤は少なくともPEG化C-ペプチド、および少なくとも１つのポリマーと少なくとも１つの溶剤を含む非水性単一相賦形剤であって水混和性の賦形剤をふくみ、その中で前記薬剤が１つ以上の賦形剤成分に不溶性であり、PEG化C-ペプチド製剤が37で少なくとも２か月間安定である。１つの態様において、前記溶剤は、グリコフルール、ベンジルアルコール、テトラグリコール、n-メチルピロリドン、グリセロールホルマル、プロピレングリコールおよびその組合せからなる群より選択される。

#### 【0341】

特に、２か月の期間製剤を37に維持した後にPEG化C-ペプチドのわずかに約35%が酸化、脱アミド化および加水分解などの化学的経路により分解される場合、非水性製剤は化学的に安定であると考えられ、同じ条件で製剤中に含まれるC-ペプチドのわずかに約15%が凝集を通して劣化する場合、その製剤は物理的に安定であると考えられる。37で約２か月経った後にPEG化C-ペプチドの少なくとも約65%が物理的に、そして、化学的に安定なままでいる場合、本発明によれば薬物製剤は安定である。

#### 【0342】

PEG化C-ペプチドを鼻腔内に、または、吸入により、典型的には、乾燥粉末の形態で（単体で、例えば、ラクトースとの乾燥混合物の形態の混合物として、または、例えば、ホスファチジルコリンなどのリン脂質と混合された混合成分粒子としてのどれかで）乾燥粉末吸入器から、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタンまたは1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-ヘプタフルオロプロパンなどの適切な噴霧剤を使用して、または、使用せずにエアロゾルスプレーとして加圧コンテナ、ポンプ、スプレー、噴霧器（好ましくは、細かい霧を作成する電気流体力学を用いる噴霧器）またはネブライザーから、または、点鼻剤として投与することができる。鼻腔内使用のために、前記粉末は、例えば、キトサンまたはシクロデキストリンのような生体付着剤を含むことができる。加圧コンテナ、ポンプ、スプレー、噴霧器またはネブライザーは、例えば、エタノール、水性エタノールまたは活性成分の分散、可溶化または長期放出に適切なその他の薬剤、溶剤としての噴出剤およびソルビタントリオレート、オレイン酸またはオリゴ乳酸などの任意の界面活性剤を含む本発明の化合物の溶液または懸濁液を含有する。

#### 【0343】

乾燥粉末製剤または懸濁液製剤での使用の前に、前記薬剤製品は吸入による送達に適切なサイズ（典型的には5 μm未満）に微粒子化される。スパイラルジェット製粉、流動層製粉、ナノ粒子形成用超臨界流体プロセス、高圧均質化または噴霧乾燥などの任意の適切な方法によりこれを達成することができる。

#### 【0344】

吸入装置により送達される製剤における本発明のPEG化C-ペプチドの粒子サイズは、C-ペプチドが肺、そして好ましくは、下気道または肺胞に入り込む能力にとって重要である。送達されたPEG化C-ペプチドの少なくとも約10%が肺に沈着し、好ましくは約10%～約20%が、または、それ以上が肺に沈着するように本発明のPEG化C-ペプチドを製剤することが好ましい。サイズが約2 μm～約3 μmの粒子で口呼吸するヒトの肺への沈着の最大効率が得られることが知られている。粒子のサイズが5 μmを超えると、肺への沈着は実質的に減少する。サイズが約1 μmより小さい粒子は肺への沈着が減少する原因となり、そして、治療上有効であるのに十分な量の粒子を送達することが困難になる。したがって、吸入により送達されるPEG化C-ペプチドの粒子は約10 μm未満の粒子サイズを有することが好ましく、約1 μm～約5 μmの範囲にあることがより好ましい。選択した吸入装置における所望の粒子サイズをもたらすようにPEG化C-ペプチドの製剤を選択する。

#### 【0345】

乾燥粉末としての投与に好都合なことに、本発明のPEG化C-ペプチドは約10 μm未満の、好ましくは約1～5 μmの粒子サイズの特定の形態に調製される。好ましい粒子サイズは患者の肺の肺胞への送達に有効である。乾燥粉末が主として、粒子の大部分のサ

10

20

30

40

50

イズが所望の範囲にあるように製造された粒子からなることが好ましい。好都合なことに、乾燥粉末の少なくとも約50%が約10 $\mu$ m未満の直径を有する粒子からなる。噴霧乾燥、製粉または本発明のPEG化C-ペプチドおよびその他の所望の成分を含有する溶液の臨界点濃縮により、そのような製剤を達成することができる。本発明において有用な粒子の作製にも適切なその他の方法は当技術分野において公知である。

#### 【0346】

前記粒子は通常、コンテナ中の乾燥粉末製剤と分離しており、その後、キャリア気流により患者の肺に輸送される。典型的には、現在の乾燥粉末吸入器では、固形物を粉砕する力は患者の吸入のみによってもたらされる。別のタイプの吸入器では、患者の吸入により作られた気流が粒子の塊を壊す羽根車モーターを活性化する。

10

#### 【0347】

吸入器または注入器で用いられる(例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースから作られる)カプセル、プリスターおよびカートリッジは、本発明の化合物、ラクトースまたはデンプンなどの適切な粉体ベース、および1-ロイシン、マンニトールまたはステアリン酸マグネシウムなどの性能調整剤の混合粉末を含むように製剤されることができる。ラクトースは無水または1水和物の形態であることができ、後者が好ましい。その他の適切な賦形剤には、デキストラン、グルコース、マルトース、ソルビトール、キシリトール、フルクトース、ショ糖およびトレハロースが含まれる。

#### 【0348】

細かい霧を作成するために電気流体力学を用いる噴霧器に適切な溶液製剤は1回の作動につき100 $\mu$ gから200mgまでのPEG化C-ペプチドを含有することができ、作動体積は1 $\mu$ Lから100 $\mu$ Lまで変化することができる。典型的な製剤はPEG化C-ペプチドプロピレングリコール、滅菌水、エタノールおよび塩化ナトリウムを含むことができる。プロピレングリコールの代わりに用いることができるその他の溶剤には、グリセロールおよびポリエチレングリコールが含まれる。メントールおよびレボメントールなどの適切な香料またはサッカリンもしくはサッカリンナトリウムなどの適切な甘味料を吸入投与/鼻腔内投与向けの本発明のそれらの製剤に添加することができる。吸入投与/鼻腔内投与用の製剤は即放性および/または徐放性であるように、例えば、PGLAを用いて製剤され得る。徐放性製剤には、遅延性放出、持続性放出、パルス性放出、制御性放出、標的型放出およびプログラム型放出が含まれる。

20

30

#### 【0349】

乾燥粉末吸入器とエアロゾル剤の場合、定量を送達するバルブを用いて投薬量を判定する。本発明による単位は、典型的には、1mgから200mgまでのPEG化C-ペプチドを含む定用量または「ひと吹き」を投与するように整えられている。総1日量は典型的には、単回投与で投与することができ、または、より一般には分割投与として1日を通して投与することができる1mg~200mgの範囲にあるであろう。

#### 【0350】

本発明の実施に適切な市販されている吸入装置の例は、TURBHALER(商標)(Astra)、ROTAHALER(登録商標)(Glaxo)、DISKUS(登録商標)、SPIROS(商標)吸入器(Dura)、AERX(商標)(Aradigm)の商標の下Inhale Therapeuticsにより市場に出されている装置、およびULTRAVENT(登録商標)噴霧器(Mallinckrodt)、ACORN II(登録商標)噴霧器(Marquest Medical Products)、VENTOLIN(登録商標)計量投与吸入器(Glaxo)およびSPINHALER(登録商標)粉末吸入器(Fisons)などの商標のもと市販されている。

40

#### 【0351】

キットもまた本発明に考慮される。典型的なキットは、薬剂的に許容可能な製剤にPEG化C-ペプチドを含むPEG化C-ペプチド製剤用の容器、好ましくはバイアル、および説明書および/または製品パンフレットもしくは製品ラベルを含むであろう。1つの態様において、低血糖症のリスク、発生または重症度を低減するために、説明書にはインス

50

リン依存性患者に前記 PEG 化 C - ペプチドを投与するための投与計画が含まれる。1つの態様において、キットには、PEG 化 C - ペプチド治療法を開始するとき、インスリンの投与を約 5 % ~ 約 35 % だけ低減させるための説明書が含まれている。別の態様において、説明書には、PEG 化 C - ペプチド治療法を開始するとき、血中グルコースレベルを綿密にモニターするようにとの患者への指示が含まれている。別の態様において、説明書には、PEG 化 C - ペプチド治療法を開始するとき、患者が低血糖症になりやすくするような状況または環境を避けるようにとの患者への指示が含まれている。

#### 【実施例】

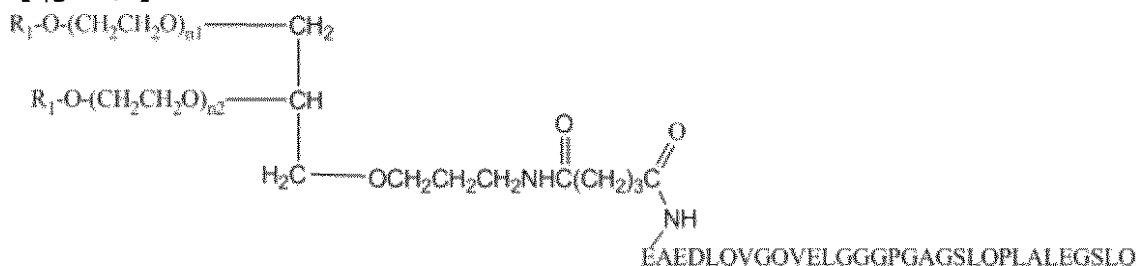
#### 【0352】

略語 次の略語が 明細および実施例で用いられている。: ACN はアセトニトリルであり、Bzl と Bn はベンジルであり、DIEA は N, N - ジイソプロピルエチルアミンであり、DMF は N, N - ジメチルホルムアミドであり、tBu は tert - ブチルであり、TSTU は O - (N - スクシンイミジル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボラートであり、THF はテトラヒドロフランであり、EtOAc は酢酸エチルであり、DIPEA と DIEA はジイソプロピルエチルアミンであり、HOAt は 1 - ヒドロキシ - 7 - アザベンゾトリアゾールであり、NMP は N - メチルピロリジン - 2 - オンであり、TEA はトリエチルアミンであり、SA はシナピン酸であり、Su は 1 - スクシンイミジル = 2, 5 - ジオキソ - ピロリジン - 1 - イルであり、TFA はトリフルオロ酢酸であり、DCM はジクロロメタンであり、DMSO はジメチルスルホキシドであり、RT は室温である。一般的方法: 次の実施例と一般的方法が明細中に特定される中間化合物と最終産物に当てはまる。あるいは、本明細書に開示される、または、そうでなければ従来のその他の反応を本発明の対応する化合物の調製に応用することが可能であろう。全ての調製方法において、全ての出発物質が公知であるか、公知の出発物質から容易に調製することが可能である。別に示されない限り、全ての温度が摂氏温度 ( ) で表され、収率について言及するとき、全ての部とパーセンテージが重量基準 (すなわち、重量 / 重量) であり、溶剤および溶出液について言及するとき、全ての部は体積基準 (すなわち、体積 / 体積) である。

#### 【0353】

実施例 1 : 分枝鎖 PEG 化 C - ペプチドの調製

#### 【化 25】



R<sub>1</sub> はメチル基であり、n<sub>1</sub> と n<sub>2</sub> は約 450 ~ 約 520 である。

1 g のヒト C - ペプチド (配列番号 1) (0.33 mM) を 25 mL の DMF / 水 (20 mL / 5 mL) に溶解した。pH を N - メチルモルホリン (NMM) で 7.8 に調整した。およそその分子量が 40,000 Da である SUNBRIGHT GL2 - 400 GS2 (NOF Corporation) (1.85 g の活性化 PEG (0.04 mM) の DMF / 水 / ACN (25 mL / 5 mL / 10 mL) 中の溶液を次に加え、反応物を室温で一晩攪拌した。

#### 【0354】

前記溶液を精製水で 700 mL に希釈した。DMF の濃度は 6 % (体積 / 体積) である。pH を酢酸で 4 ~ 4.5 に調整し、濾過した。YMC - ODS カラム (2.5 x 30 cm) と 0.5 % 酢酸 (移動相 A) / 100 mM 酢酸ナトリウム (移動相 B) / ACN (移動相 C) 濃度勾配を用いる HPLC により前記溶液を精製した。3 カラム体積の 90 % A / 10 % C でカラムを平衡化することにより分離を完了した。PEG 化 C - ペプチドが 9

【 0 3 5 5 】

【 0 3 5 6 】

10

【 0 3 5 7 】

20

【 0 3 5 8 】

実施例 1 に記載されているのと同様の反応条件および SUNBRIGHT GL 2 - 400 GS 2 の代わりに次の試薬を用いて、分子量が 10 kDa ~ 80 kDa の次の PEG 化 C - ペプチドを容易に調製することが可能である。

【 0 3 5 9 】

SUNBRIGHT GL 2 - 400 TS を用いて、R<sub>1</sub> がメチル基である

【化 2 6】



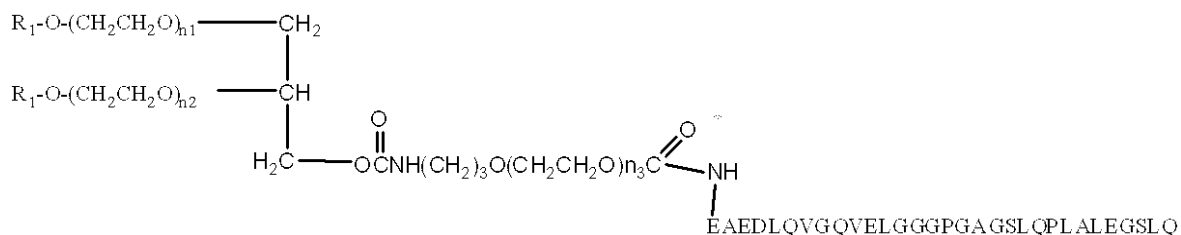
が産出される。

【 0 3 6 0 】

SUNBRIGHT GL3-400TS100Uを用いて、R<sub>1</sub>がメチル基である

40

【化 2 7】

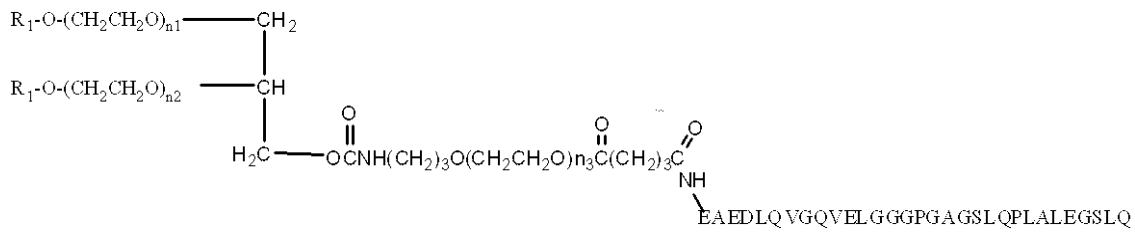


が産出される。

【 0 3 6 1 】

SUNBRIGHT GL3-400GS100Uを用いて、 $R_1$  がメチル基である

【化28】

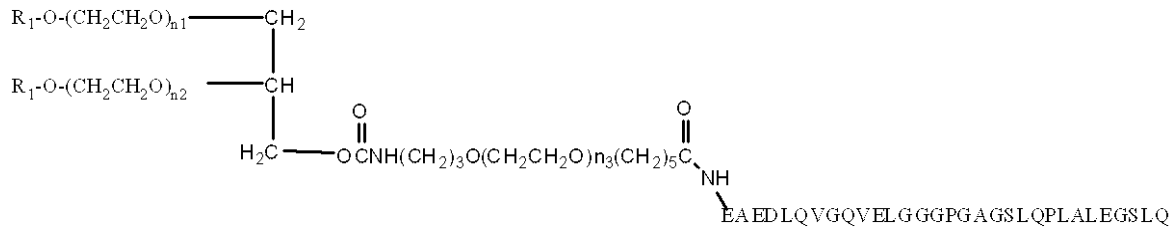


が産出される。

【0362】

SUNBRIGHT GL3-400HS100Uを用いて、 $R_1$  がメチル基である

【化29】

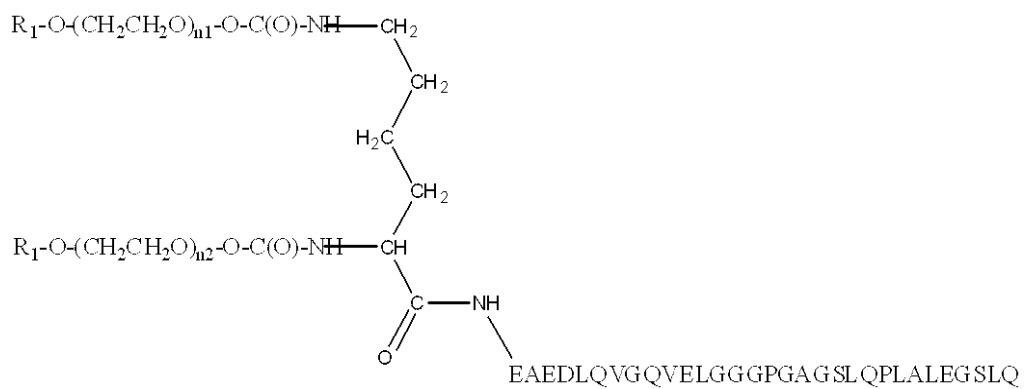


が産出される。

【0363】

SUNBRIGHT LY-400NSを用いて、 $R_1$  がメチル基である

【化30】

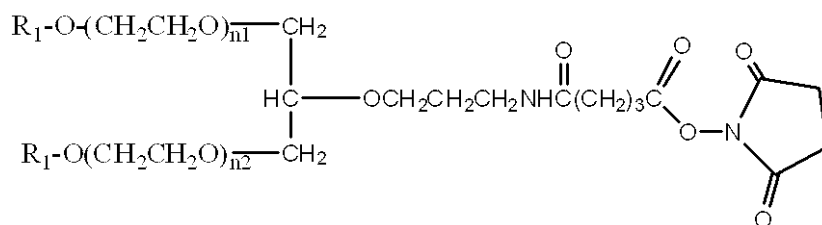


が産出される。

【0364】

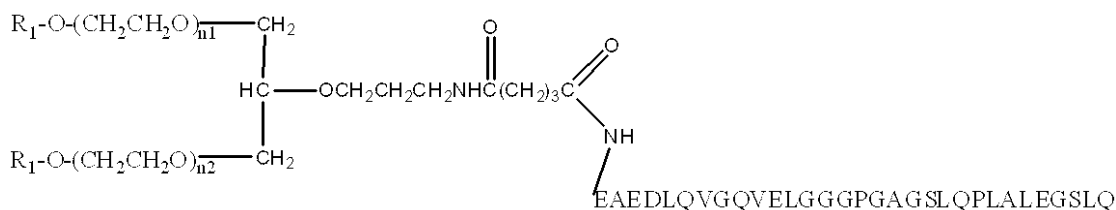
活性中間体

【化31】



を用いて、 $R_1$  がメチル基である

## 【化 3 2】



が産出される。

## 【0365】

10

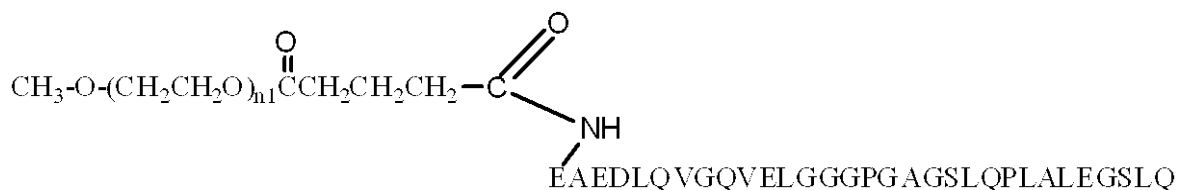
実施例 3：直鎖 PEG 化 C - ペプチドの調製

実施例 1 に記載されているのと同様の反応条件および SUNBRIGHT GL 2 - 400GS 2 の代わりに次の試薬を用いて、分子量が 5 kDa ~ 80 kDa の次の PEG 化 C - ペプチドを容易に調製することが可能である。

## 【0366】

SUNBRIGHT ME - 200GS

## 【化 3 3】



20

## 【0367】

精製の後に回収された画分を逆相 HPLC およびサイズ排除 HPLC によって分析した。Waters UPLC BEH C18 17  $\mu$ M カラムおよび ACN と 0.1% TFA の移動相を用いる逆相 HPLC を行い、0.25 mL / 分の流速、40 のカラム温度および 5 mg / mL の試料濃度で 3 分間にわたる 24% ~ 40% ACN とそれに続く 1 分間の 40% ~ 90% ACN の二成分直線濃度勾配を用いて逆相 HPLC を行った。図 3 に代表的なクロマトグラムが示されている。

30

## 【0368】

Superdex 75, 10 / 300 GL カラムおよび 2.7 mM KCl と 0.137 M NaCl を含む pH 7.4 の 0.1 M リン酸緩衝液の移動相による 0.5 mL / 分の流速での均一濃度溶出を用いてサイズ排除クロマトグラフィーを行った。図 4 に代表的なクロマトグラムが示されている。

## 【0369】

実施例 4：その他の直鎖 PEG 化 C - ペプチドの調製

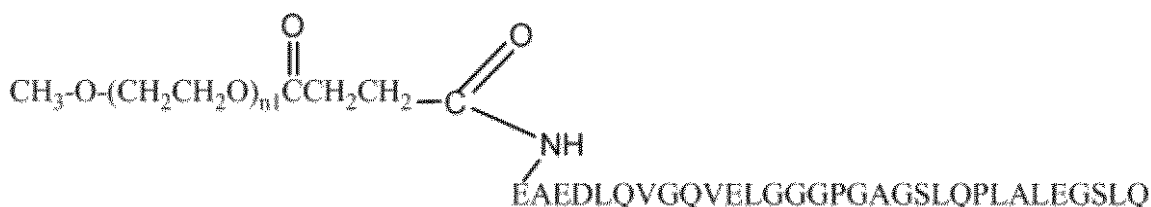
実施例 1 に記載されているのと同様の反応条件および SUNBRIGHT GL 2 - 400GS 2 の代わりに次の試薬を用いて、分子量が 5 kDa ~ 80 kDa の次の線状 PEG 化 C - ペプチドを容易に調製することが可能である。

40

## 【0370】

SUNBRIGHT ME - 200CS を用いて、

## 【化 3 4】



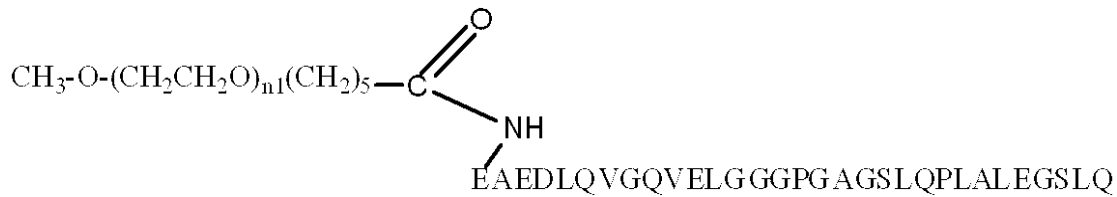
が産出される。

50

【0371】

SUNBRIGHT ME-200HSを用いて、

【化35】



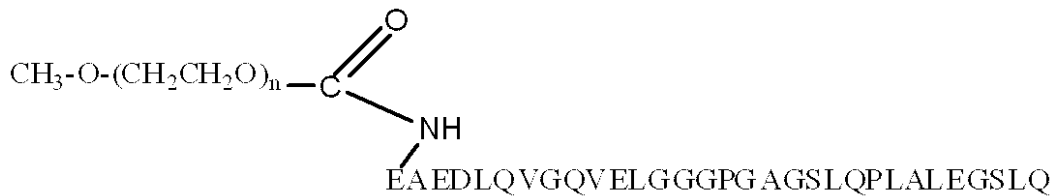
が産出される。

10

【0372】

SUNBRIGHT ME-200TSを用いて、

【化36】



が産出される。

20

【0373】

SUNBIO P1PAL-30を用いて、

【化37】

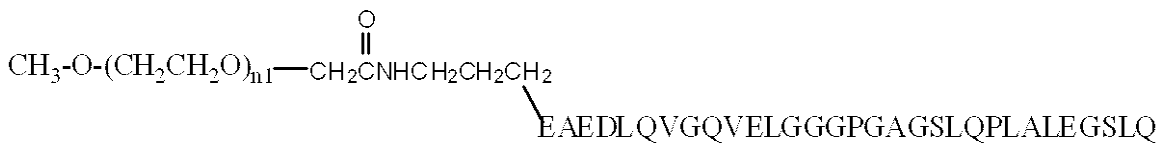


が産出される。

【0374】

SUNBIO P1APAL-30を用いて、

【化38】



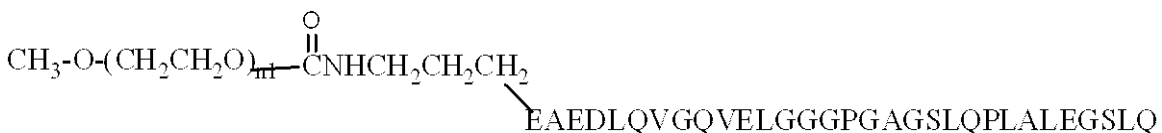
が産出される。

30

【0375】

SUNBIO P1TPAL-5を用いて、

【化39】



が産出される。

40

【0376】

SUNBIO P1BAL-30を用いて、

【化40】



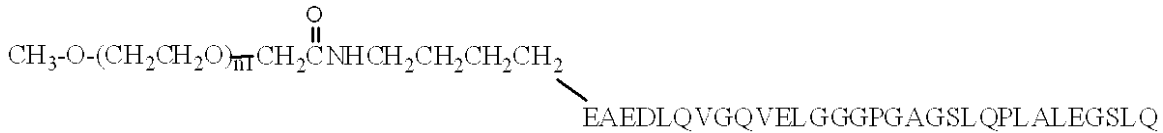
が産出される。

50

【0377】

SUNBIO P1ABAL-30を用いて、

【化41】

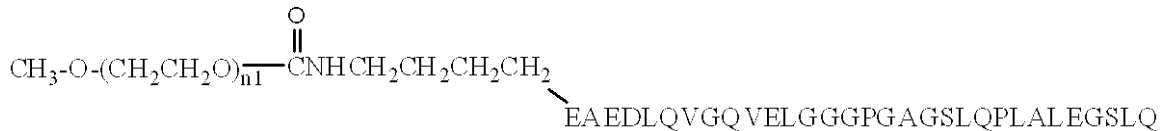


が産出される。

【0378】

SUNBIO P1TBAL-5を用いて、

【化42】



が産出される。

【0379】

実施例5：イヌにおける薬物動態特性の測定

薬物動態(PK)試験を、非修飾型C-ペプチドを用いるビーグル犬でのC-ペプチドPKプロファイルを決定するために行った。

【0380】

方法：2匹の雄イヌと1匹の雌イヌがリン酸緩衝生理食塩水中に製剤された非修飾型合成ヒトC-ペプチド(20mg/mL)を皮下に受容した(0.5mg/kg、0.025mL/kg)。静脈穿刺によりイヌから採血し、14日にわたる既定の時点で血液試料を採取した。血液の遠心分離(3,000rpm、10分間)の後に血漿試料を得て、それを分析まで-80℃で貯蔵した。優良試験所基準(GLP)能力を有する臨床試験受託機関(CRO)(Micro Constants, Inc., San Diego, カリフォルニア州)が生物分析試験を実施した。ヒトC-ペプチド測定用の市販のキット(Mercodia、カタログ番号10-1136-01)に基づく酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)技術を製造業者の説明書を用いて行うことによりC-ペプチドの血漿中レベルを測定した。結果をC-ペプチド濃度として表した。PK分析のために、定量限界未満レベル(BQL)を0として取扱い、名目上の時点を含めた全ての計算に用いた。WinNonlin Professional 5.2.1(Pharsight Corp., Mountain View, カリフォルニア州)のモデル200を用いて各動物についての個々の血漿中濃度時間データに基づき標準的なモデル独立方法によりPKパラメータを決定した。

【0381】

結果：全ての動物が試験期間を乗り切って生き残った。臨床的異常の欠如に基づく、各処置は忍容性が高かった。下記の表E1に、イヌに非修飾型C-ペプチドを皮下投与した後のC-ペプチドの最大濃度(C<sub>max</sub>)と曲線下面積(AUC<sub>(0-t)</sub>)の値の平均値±標準偏差(SD)が示されている。投与後1日後と投与後12日間後の対応する線形目盛での血漿中C-ペプチド濃度の平均値±SD-時間プロファイルがそれぞれ図5Aと図5Bに示されている。非修飾型C-ペプチドの単回投与により、ピークが急速に蓄積することとなり、次にイヌの血流循環からC-ペプチドが急速に喪失されることになった。非修飾型C-ペプチドの使用により、半日以内にC-ペプチドの循環レベルがBQLとなった。

10

20

30

40



【表 5】

表 E 1 非修飾型水溶性 C ペプチド (C P - A Q) の単回皮下投与後のイヌにおける C ペ プチドの平均薬物動態パラメーター				
	$C_{max}$ (n g / m L)		$AUC_{(0-t)}$ (n g ・ 日 / m L) a	
	平均値	S D	平均値	S D
C P - A Q	7 5 7	1 9 2	7 7 . 4	6 . 8 2
a $AUC_{(0-t)}$ は、投与直後から測定可能な最後の試料採取時間までの血漿中濃 度時間曲線の下面積であり、線形台形公式によって算出される。				

10

## 【 0 3 8 2 】

2 番目の P K 試験を、異なる分子量の 2 つの代表的な P E G 化 C - ペプチド ( 2 0 k D a の線状 P E G ( 実施例 3 ) および 4 0 k D a の分枝状 P E G ( 実施例 1 ) ) を用いるビーグル犬での C - ペプチド P K プロファイルを決断するために行った。結果を非修飾型 C - ペプチドの結果と比較した。

## 【 0 3 8 3 】

方法：3 匹の雄イヌがリン酸緩衝生理食塩水中に製剤された 2 0 k D a の P E G 化合成ヒト C - ペプチド ( 5 0 . 8 m g / m L の P E G 化 C - ペプチド ) を皮下に受容し ( 0 . 5 m g / k g の C - ペプチド当量、0 . 0 9 m L / k g )、そして、3 匹の雄イヌがリン酸緩衝生理食塩水中に製剤された 4 0 k D a の P E G 化合成ヒト C - ペプチド ( 8 2 . 5 m g / m L の P E G 化 C - ペプチド ) を皮下に受容した ( 0 . 5 m g / k g の C - ペプチド当量、0 . 0 1 2 m L / k g )。静脈穿刺によりイヌから採血し、2 1 日にわたる既定の時点で血液試料を採取した。血液の遠心分離 ( 3 , 0 0 0 r p m、1 0 分間 ) の後に血漿試料を得て、それを分析まで - 8 0 で貯蔵した。G L P 能力を有する C R O ( M i c r o C o n s t a n t s , I n c . , S a n D i e g o , カリフォルニア州 ) が生物分析試験を実施した。ヒト C - ペプチド測定用の市販のキット ( M e r c o d i a、カタログ番号 1 0 - 1 1 3 6 - 0 1 ) に基づく E L I S A 技術を P E G 化 C - ペプチドの品質管理用標準品を用いて行うことにより C - ペプチドの血漿中レベルを測定した。結果を C - ペプチド濃度として表した。P K 分析のために、B Q L を 0 として取扱い、名目上の時点を全ての計算に用いた。W i n N o n l i n P r o f e s s i o n a l 5 . 2 . 1 ( P h a r s i g h t C o r p . , M o u n t a i n V i e w , カリフォルニア州 ) のモデル 2 0 0 を用いて各動物についての個々の血漿中濃度 時間データに基づき標準的なモデル独立方法により P K パラメーターを決断した。

20

30

## 【 0 3 8 4 】

結果：全ての動物が試験期間を乗り切って生き残った。臨床的異常の欠如に基づく、各処置は忍容性が高かった。非修飾型 C - ペプチドに対して比較すると、P E G 化 C - ペプチドの使用によりイヌでの C - ペプチドの曝露が 2 0 k D a の線状 P E G 化 C - ペプチドで投与後少なくとも 4 日に、そして、4 0 k D a の分枝鎖 P E G 化 C - ペプチドで投与後少なくとも 1 5 日に延長された。

40

## 【 0 3 8 5 】

下記の表 E 2 にイヌに 2 0 k D a の線状 P E G 化 C - ペプチドと 4 0 k D a の分枝鎖 P E G 化 C - ペプチドを皮下投与した後の C - ペプチドの最大濃度 (  $C_{max}$  )、曲線下面積 (  $AUC_{(0-t)}$  ) および半減期 (  $T_{1/2}$  ) の値の平均値  $\pm$  S D が示されている。線形目盛と片対数目盛での対応する血漿中 C - ペプチド濃度の平均値  $\pm$  S D - 時間プロファイルがそれぞれ図 6 と図 7 に示されている。

【表 6】

表 E 2 20 kDa と 40 kDa の PEG 化 C - ペプチド (CP) の単回皮下投与後のイヌにおける C - ペプチドの平均薬物動態パラメーター					
	PEG 化 (20 kDa) CP		PEG 化 (40 kDa) CP		PEG 化 (20 kDa) CP に対する PEG 化 (40 kDa) CP の割合
	平均値	SD	平均値	SD	
$C_{max}$ (ng/mL)	1,800	400	5,790	642	2.26
$AUC_{(0-t)}$ (ng・日/mL) <sup>a</sup>	4,060	588	38,600	8,200	6.67
$T_{1/2}$ <sup>b</sup> (日)	1.39	0.197	2.02	0.217	1.45
<sup>a</sup> $AUC_{(0-t)}$ は、投与直後から測定可能な最後の試料採取時間までの血漿中濃度時間曲線の下で面積であり、線形台形公式によって算出される。 <sup>b</sup> $T_{1/2}$ は、 $\lambda$ が終末相の対数 - 線形部分についての消失速度を表すとき、 $\ln(2) / \lambda$ によって計算される終末半減期である。					

10

20

## 【0386】

驚くことに、40 kDa の PEG 化 C - ペプチドの皮下投与後の  $C_{max}$  と  $AUC_{(0-t)}$  の値はそれぞれ 20 kDa の PEG 化 C - ペプチドの対応する値よりも 2.26 倍および 6.67 倍高かった。したがって、40 kDa の分枝鎖 PEG 化 C - ペプチドは、20 kDa の PEG 化 C - ペプチドと比較して、または、非修飾型 C - ペプチドと比較して、かなり向上した PK 特質を提供する。3 番目の PK 試験を、リン酸緩衝生理食塩水中に製剤されたより低い用量の 40 kDa の分枝鎖 PEG 化 C - ペプチド (0.006、0.025 および 0.1 mg/kg、PEG 化合成ヒト C - ペプチド (SUNBRIGHT GL2-400GS2) により作製された 40 kDa の PEG、実施例 1) の単回皮下注射による) を用いてビーグル犬で行った。

30

## 【0387】

方法：C - ペプチドの血漿中レベルを 14 日にわたって測定した。非臨床 CRO (Bio-Quant, Inc., San Diego, カリフォルニア州) が試験の動物部分を行った。投薬日 (第 0 日) では 9 匹の雄イヌと雌イヌはそれぞれ 7 ~ 12 kg および 6 ~ 8 kg の体重であった。試験中に動物に食物を与え、第 0 日、第 1 日および第 2 日に摂食量を判定した。第 7 日および第 14 日にも体重を測定した。第 0 日の 2 日前に各動物の背中への注射する領域を毛刈りして清浄にした。3 群のイヌ ( $n = 2$  匹のオスおよび 1 匹のメス/群) が存在した。

40

## 【0388】

グループ 1 は、(0.005 mg/kg の C - ペプチド当量を含む) 0.05 mL/kg の用量で 2 mg/mL の PEG 化 C - ペプチドを 25 G のニードルでの単回皮下注射により受容した。

## 【0389】

グループ 2 は、(0.0125 mg/kg の C - ペプチド当量を含む) 0.0125 mL/kg の用量で 2 mg/mL の PEG 化 C - ペプチドを 25 G のニードルでの単回皮下注射により受容した。

## 【0390】

50

グループ 3 は、( 0 . 0 0 0 3 m g / k g の C - ペプチド当量を含有する ) 0 . 0 1 5 m L / k g の用量で 0 . 4 m g / m L の P E G 化 C - ペプチドを 2 5 G のニードルでの単回皮下注射により受容した。

#### 【 0 3 9 1 】

静脈穿刺によりイヌから採血し、第 0 日 ( 投与前、3 0 分、1 時間、3 時間および 6 時間 ) ならびに第 1 日、第 2 日、第 3 日、第 4 日、第 7 日、第 1 0 日および第 1 4 日に血液試料を採取した。血液の遠心分離 ( 3 , 0 0 0 r p m、1 0 分間 ) の後に血漿試料を得て、それを分析まで - 8 0 で貯蔵した。G L P 能力を有する C R O ( M i c r o C o n s t a n t s , I n c . , S a n D i e g o , カリフォルニア州 ) が生物分析試験を実施した。ヒト C - ペプチド測定用の市販のキット ( M e r c o d i a、カタログ番号 1 0 - 1 1 3 6 - 0 1 ) に基づく E L I S A 技術を P E G 化 C - ペプチドの品質管理用標準品を用いて行うことにより C - ペプチドの血漿中レベルを測定した。結果を C - ペプチド濃度として表した。P K 分析のために、B Q L を 0 として取扱い、名目上の時点を含めての計算に用いた。W i n N o n l i n P r o f e s s i o n a l 5 . 2 . 1 ( P h a r s i g h t C o r p . , M o u n t a i n V i e w , カリフォルニア州 ) のモデル 2 0 0 を用いて各動物についての個々の血漿中濃度 時間データに基づき標準的なモデル独立方法により P K パラメーターを決定した。

10

#### 【 0 3 9 2 】

結果：全ての動物が試験期間を乗り切って生き残った。臨床的異常の欠如に基づく、各処置は忍容性が高かった。下記の表 E 3 に、イヌに P E G 化 C - ペプチドを単回皮下投与した後の C - ペプチドの最大濃度 (  $C_{max}$  )、曲線下面積 (  $AUC_{(0-t)}$  ) および半減期 (  $T_{1/2}$  ) の値の平均値  $\pm$  S D が示されている。線形目盛と片対数目盛での対応する血漿中 C - ペプチド濃度の平均値  $\pm$  S D - 時間プロファイルがそれぞれ図 8 A と図 8 B に示されている。C - ペプチドの最大濃度 (  $C_{max}$  ) および曲線下面積 (  $AUC_{(0-t)}$  ) の値の平均値  $\pm$  S D がそれぞれ図 9 A と図 9 B に示されている。

20

#### 【表 7】

表 E 3 P E G 化 C - ペプチド ( 4 0 k D a の P E G ) の単回皮下投与後のイヌにおける C - ペプチドの薬物動態パラメーター						
	P E G 化 C - ペプチド投与量 ( m g / k g の C - ペプチド当量 )					
	0 . 0 0 5		0 . 0 0 1 2 5		0 . 0 0 0 3	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
$C_{max}$ ( n g / m L )	7 3 . 2	2 . 2 3	1 9 . 0	4 . 0 0	1 . 7 4	1 . 5 3
$AUC_{(0-t)}$ ( n g · 日 / m L )	4 7 0	8 4 . 3	9 1 . 9	8 . 8 6	4 . 1 7	3 . 9 4
$T_{1/2}$ ( 日 )	2 . 4 4	0 . 5 9	1 . 9 3	0 . 5 3	1 . 7 6	N D
a : $AUC_{(0-t)}$ は、投与直後から測定可能な最後の試料採取時間までの血漿中濃度時間曲線の下面積であり、線形台形公式によって算出される。 b : $T_{1/2}$ は、 $\lambda$ が終末相の対数 - 線形部分についての消失速度を表すとき、 $\ln(2) / \lambda$ によって計算される終末半減期である。 c : 試験数 = 1 であり S D は N D ( 決定せず ) である。						

30

40

#### 【 0 3 9 3 】

要約すると、イヌで 4 0 k D a の P E G 化 C - ペプチドを増加して単回皮下投与した後に C - ペプチドの曝露が非常に増加した。2 番目と 3 番目のイヌでの P K 試験の結果により、4 0 k D a の分枝鎖 P E G 化 C - ペプチドが、2 0 k D a の P E G 化 C - ペプチドと比較して、または、非修飾型 C - ペプチドと比較して ( イヌでの 1 番目の P K 試験 )、非常に向上した P K 特質の準備をすることが確かめられた。さらに、4 0 k D a の分枝鎖 P E G 化は試験した用量では意味のある悪性の副作用を示さなかった。

#### 【 0 3 9 4 】

実施例 7 : 単回皮下投与後の S p r a g u e D a w l e y ラットでの薬物動態

50

0.0413、0.167および0.664 mg/kgの用量での単回皮下投与の後に40 kDaのPEG化C-ペプチド（実施例12）のPKをSprague Dawleyラット（2匹/性/群）で評価した。投与前と投与後14日間、血液試料を回収した。イヌを用いる試験で上述したように、ELISA法を用いてPEG化C-ペプチドについて血漿試料を分析した。「ノンコンパートメント」法を用いて個々のPKパラメーターを推定した。図10に単回皮下投与後の平均（±SD）血漿中濃度-時間プロファイルが図示され、対応するPKパラメーターが表E4に概説されている。

【表8】

表 E 4 単回用量皮下投与後の Sprague Dawley ラットにおける PEG 化 C-ペ プチドの薬物動態						
薬物動態パラメータ ー <sup>a</sup>	C B X 1 2 9 8 0 1 投与量, m g / k g					
	0.0413		0.167		0.664	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
$T_{1/2}$ , (日)	1.35	0.186	1.27	0.109	1.27	0.175
$T_{max}$ , (日)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
$C_{max}$ , (nM)	3.38	0.869	12.3	2.61	34.1	10.4
$AUC_{(0-7)}$ , (nM・日)	8.13	1.45	33.0	7.27	101	18.7
$AUC_{(0-7)}$ , (ng・日/mL)	374	66.6	1,520	334	4,660	862
$AUC_{(0-t)}$ , (nM・日)	8.13	1.45	33.9	8.31	107	19.6
$AUC_{(0-t)}$ , (ng・日/mL)	374	66.6	1,560	382	4,920	900
$AUC_{(0-inf)}$ , (nM・日)	8.48	1.43	34.6	7.88	108	19.4
$AUC_{(0-inf)}$ , (ng・日/mL)	390	65.7	1,590	362	4,950	893
$CL/F$ , (mL/日/kg)	109	20.5	109	25.5	138	25.5
$Vd/F$ , (mL/kg)	214	62.0	201	50.6	250	42.9
<sup>a</sup> 用語の定義について略語表（表A）を参照のこと。						

## 【0395】

実施例8：単回皮下投与後のカニクイザルでの薬物動態

0.0827 mg/kgの用量での単回皮下投与の後に40 kDaのPEG化C-ペプチド（実施例12）のPKをカニクイザル（2匹/性）で評価した。投与前と投与後14日間、血液試料を回収した。イヌを用いる試験で上述したように、ELISA法を用いてCBX129801について血漿試料を分析した。「ノンコンパートメント」法を用いて個々のPKパラメーターを推定した。図11に単回皮下投与後の平均（±SD）血漿中濃度-時間プロファイルが図示され、対応するPKパラメーターが表E5に概説されている。

。

【表 9】

表 E 5 0.0827 mg/kg の用量での PEG 化 C-ペプチドのカニクイザルにおける薬物動態パラメーター		
薬物動態パラメーター	平均値	S D
$T_{max}$ , (日)	2.00	0.816
$T_{1/2}$ , (日)	5.44	2.05
$C_{max}$ , (nM)	13.2	1.32
$AUC_{(0-7)}$ , (nM・日)	67.5	7.01
$AUC_{(0-7)}$ , (ng・日/mL)	3,110	323
$AUC_{(0-14)}$ , (nM・日)	95.7	16.9
$AUC_{(0-14)}$ , (ng・日/mL)	4,400	770
$AUC_{(0-inf)}$ , (nM・日)	121	37.0
$AUC_{(0-inf)}$ , (ng・日/mL)	5,560	1,710
$CL/F$ , (mL/日/kg)	16.0	4.90
$Vd/F$ , (mL/kg)	115	10.0
<sup>a</sup> 用語の定義について略語表(表A)を参照のこと。		

10

20

## 【0396】

ピーク濃度は2日以内に生じ、 $T_{1/2}$ は約5.4日であることをこれらの結果は示している。前記のサルは絶食していなかったため、そして、検出抗体がサルのC-ペプチドと交差反応するため、40kDaのPEG化C-ペプチド(実施例12)についての結果は内在性C-ペプチドレベルを含む。したがって、測定されるPEG化C-ペプチドレベルがより低い後半の時点(すなわち、第10日および第14日)では、内在性のサルC-ペプチドの寄与が結果を混乱させる可能性があるだろう。第14日の時点进行分析から取り除くと、 $T_{1/2}$ は3.7日である。要約すると、これらの単回投与PK試験について、皮下投与後にPEG化C-ペプチドの血漿中濃度のピークは通常1~5日以内に生じる。用量の増加と共にAUCと $C_{max}$ が上昇し、そして、それらは一般に用量と比例関係にある。

30

## 【0397】

## 実施例9：非修飾型C-ペプチドを用いる反復投与薬物動態試験

ラットで4週間までの、および、カニクイザルで13週間までの非PEG化C-ペプチドを用いて行われた5回のGLP毒物学試験において、移植した浸透圧ポンプを介してC-ペプチドを連続的に皮下注入した。試験を通じてC-ペプチドの血漿中濃度を定期的に測定し、そして、表E6に示すように各試験について曝露期間中の定常状態濃度( $C_{ss}$ )を決定した。

40

【表 10】

表 E 6 無影響量での反復投与毒性試験における非修飾型 C - ペプチド濃度の概要			
種	経過期間	無影響量	C - ペプチドの C <sub>ss</sub> <sup>a</sup> (nM)
Sprague Dawley ラット	14 日	2 mg / kg / 日	27 <sup>b</sup>
Sprague Dawley ラット	14 日	2 mg / kg / 日	16 <sup>b</sup>
Sprague Dawley ラット	4 週間	0.5 mg / kg / 日	4.2 <sup>c</sup>
カニクイザル	14 日	2 mg / kg / 日	84 <sup>b</sup>
カニクイザル	13 週間	3.6 mg / kg / 日	40 <sup>d</sup>
<sup>a</sup> 連続皮下注入により送達された試験物 <sup>b</sup> 第 2 日、第 10 日および第 14 日での血漿中 C - ペプチドレベルから推定される平均 C <sub>ss</sub> <sup>c</sup> 第 2 日、第 14 日および第 28 日での血漿中 C - ペプチドレベルから推定される平均 C <sub>ss</sub> <sup>d</sup> 第 2 日、第 28 日目、第 37 / 38 日、第 56 日および第 91 日での血漿中 C - ペプチドレベルから推定される平均 C <sub>ss</sub>			

10

20

## 【0398】

結論すると、これらの毒物試験では投与期間を通じて C - ペプチドレベルが持続した。

## 【0399】

実施例 10：反復投与薬物動態試験

ラットとサルで複数回投与した後に 40 kDa の PEG 化 C - ペプチド（実施例 12）の PK を評価した。これらの試験は下記に要約される。

30

## 【0400】

（毎週の）反復皮下投与後の Sprague Dawley ラットの 28 日間の薬物動態

方法：5 回の投薬について 2.74、8.22 および 27.4 mg / kg / 週の用量での複数回皮下投与の後に Sprague Dawley ラット（各時点あたり 3 匹 / 性 / 群）で 40 kDa の PEG 化 C - ペプチド（実施例 12）の PK を評価した。1 回目の投薬の前、および 1 回目の投薬後 7 日間、血液試料を回収した。2 回目の投薬の後から 4 回目の投薬までにトラフ血液試料を回収した。最後の投薬（5 回目の投薬）の後に、血液試料を 28 日間回収した。以前に説明したように、ELISA 法を用いて PEG 化 C - ペプチドについて血漿試料を分析した。「ノンコンパートメント」法、および性別を基準とした各用量についての平均濃度 時間プロファイルを用いて PK パラメーターを推定した。

40

## 【0401】

結果：性別を基準とした複数回皮下投与による平均（±SD）血漿中濃度 - 時間プロファイルが図 12 に図示され、対応する PK パラメーターが表 E 7 に概説される。用量と 1 次の間の関係

【表 11 - 1】

表 E 7 28 日間にわたる（週一回の）反復用量皮下投与後の Sprague Dawley ラットにおける薬物動態特徴の概要						
性	オス			メス		
用量, (mg/kg/週)	2.74	8.22	27.4	2.74	8.22	27.4
第 1 回投与のパラメーター <sup>a</sup>						
$C_{max}$ , (nM)	156	440	1,540	412	564	2,210
$T_{max}$ , (日) <sup>b</sup>	1.00	1.00	2.00	3.00	1.00	1.00
$T_{1/2}$ , (日)	1.52	1.49	1.62	1.47	1.26	1.46
$AUC_{tau}$ , (nM・日)	507	1,580	4,580	1,020	2,110	7,590
$AUC_{inf}$ , (nM・日)	539	1,690	4,950	1,060	2,190	8,050
$CL/F$ , (mL/日/kg)	108	103	118	55.1	79.7	72.5
$V_d/F$ , (mL/kg)	237	222	275	117	145	153
$C_{max}$ のオス/メス比	0.379	0.780	0.697	—	—	—
$AUC_{inf}$ のオス/メス比	0.508	0.772	0.615	—	—	—
$CL/F$ のオス/メス比	1.96	1.30	1.63	—	—	—
$V_d/F$ のオス/メス比	2.03	1.53	1.80	—	—	—

10

20

【表 11 - 2】

反復投与のパラメーター <sup>a</sup>						
$C_{max}$ , (nM)	147	438	1,070	311	846	2,660
$T_{max}$ , (日) <sup>b</sup>	2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00
$T_{1/2}$ , (日)	1.43	1.51	1.66	1.65	1.35	1.84
$AUC_{tau}$ , (nM・日)	524	1,710	4,150	1,090	3,000	9,590
$CL_{ss}/F$ , (mL/日/kg)	111	102	141	53.6	58.3	60.9
$V_{dss}/F$ , (mL/kg)	230	223	337	128	114	161
$C_{max}$ のオス/メス比	0.473	0.518	0.402	—	—	—
$AUC_{tau}$ のオス/メス比	0.481	0.570	0.433	—	—	—
$CL_{ss}/F$ のオス/メス比	2.07	1.75	2.32	—	—	—
$V_{dss}/F$ のオス/メス比	1.80	1.96	2.09	—	—	—
$C_{max}$ の反復投与/第 1 回投与間の比	0.942	0.995	0.695	0.755	1.50	1.20
$AUC_{tau}$ の反復投与/第 1 回投与間の比	1.03	1.08	0.906	1.07	1.42	1.26
<sup>a</sup> 用語の定義について略語表（表 A）を参照のこと。； <sup>b</sup> 中央値として表される。						

30

40

全体としては、第 14 日～第 21 日までに定常状態に達することをこれらの結果は示している。用量の増加と共に曝露が増加し、血漿中濃度のピークが第 1 日と第 3 日の間に生じる。1 回目と最後の投薬の後の AUC と  $C_{max}$  は、評価した範囲にわたって用量と比例関係にあるようであり、定常状態の AUC は 1 回目の投薬後の AUC に類似しているようである（1 回目の投薬に対する定常状態の AUC の比が 0.7 から 1.5 までの範囲にある）。 $T_{1/2}$  は 3 回の投薬にまたがって、そして、1 回目の投薬と最後の投薬の後では類似しているようである（約 1.5 日）。メスでの全身性曝露はオスよりも約 2 倍高い。投薬の中止後の 28 日間の回復期において、全ての用量について検出可能な薬剤レベルがおおよそ 2 週間持続したが、1 匹のオス（2.74 mg/kg/週）と 1 匹のメス（8.22 mg/kg/週）を除いて回復期の最後では薬剤が検出できなかった。抗薬剤抗体（ADA）アッセイの最初の技術的困難のため、抗 PEG 化 C - ペプチド抗体について結果が利用できない。高曝露、一般的に用量に比例する結果、および 1 回目と最後の PEG 化 C - ペプチドの投与の間の一貫したクリアランスが、どんな抗体形成も少しも曝露に影響しないようであるという主張を支持する。

10

#### 【0403】

（毎週の）反復皮下投与後のカニクイザルの 28 日間の薬物動態

方法：5 回の投薬について 1.33、4.0 および 13.3 mg/kg/週の用量での複数回皮下投与によりカニクイザル（5 匹/性/群）で 40 kDa の PEG 化 C - ペプチド（実施例 12）の PK を評価した。1 回目の投薬の前、および 1 回目の投薬後 7 日間、血液試料を回収した。2 回目の投薬の後から 4 回目の投薬までにトラフ血液試料を回収した。最後の投薬（5 回目の投薬）の後に、血液試料を 28 日までの間回収した。以前に説明したように、ELISA 法を用いて PEG 化 C - ペプチドについて血漿試料を分析した。「ノンコンパートメント」法を用いて PK パラメーターを推定した。

20

#### 【0404】

結果：性別を基準とした複数回皮下投与による平均血漿中濃度 - 時間プロファイルが図 14 に図示され、対応する PK パラメーターが表 E 8 に概説される。用量と曝露の 1 次パラメーター（AUC および  $C_{max}$ ）の間の関係が図 15 に示されている。



【表 12 - 1】

表 E 8 28 日間にわたる（週一回の）反復用量皮下投与後のカニクイザルにおける薬物動態特徴の概要									
	オス			メス			性別をまとめたもの		
用量, (mg/kg)	1. 33	4. 0	13. 3	1. 33	4. 0	13. 3	1. 33	4. 0	13. .3
第 1 回投与のパラメーター <sup>a</sup>									
$C_{max}$ , (nM)	25 0	88 1	2, 7 80	25 2	87 7	2, 4 00	25 1	87 9	2, 59 0
$T_{max}$ , (日) <sup>b</sup>	2. 00	1. 00	2, 0 0	2. 00	2. 00	2, 0 0	2. 00	1. 50	2, 00
$T_{1/2}$ , (日)	4. 67	3. 30	2, 8 5	3. 33	3. 53	2, 6 3	4. 00	3. 42	2, 74
$AUC_{tau}$ , (nM・日)	1, 18 0	4, 21 0	13, 200	1, 28 0	3, 92 0	11, 200	1, 23 0	4, 06 0	12 , 2 00
$AUC_{inf}$ , (nM・日)	1, 92 0	5, 77 0	17, 700	1, 80 0	5, 41 0	14, 400	1, 86 0	5, 59 0	16 , 0 00
$CL/F$ , (mL/日/kg)	15 .3	15 .5	16. 9	16 .1	16 .5	21. 0	15 .7	16 .0	19 .0
$V_d/F$ , (mL/kg)	10 1	72 .7	68. 0	77 .4	81 .7	79. 8	89 .0	77 .2	73 .9
$C_{max}$ のオス/ メス比	0, 92 2	1. 00	1, 1 6	—	—	—	—	—	—
$AUC_{tau}$ のオ ス/メス比	0, 92 2	1. 07	1, 1 8	—	—	—	—	—	—

10

20

30

【表 12 - 2】

反復投与のパラメーター <sup>a</sup>									
$C_{max}$ , (nM)	30 8	1, 25 0	3, 7 80	37 1	1, 35 0	4, 9 00	34 0	1, 30 0	4, 3 40
$T_{max}$ , (日) <sup>b</sup>	2. 00	1. 00	2. 0 0	2. 00	1. 00	2. 0 0	2. 00	1. 00	2. 0 0
$T_{1/2}$ , day	4. 78	2. 93	3. 9 1	4. 62	3. 34	3. 0 7	4. 70	3. 17	3. 4 9
$AUC_{tau}$ , (nM・日)	1, 65 0	5, 61 0	18, 600	1, 86 0	6, 00 0	21, 400	1, 75 0	5, 81 0	20, 000
$AUC_{inf}$ , (nM・日)	2, 74 0	7, 33 0	28, 300	2, 91 0	8, 24 0	28, 300	2, 82 0	7, 79 0	28, 300
$CL_{ss}/F$ , (mL/日/kg)	18 . 3	15 . 7	15. 8	15 . 9	14 . 7	13. 6	17 . 1	15 . 2	14. 7
$V_{dss}/F$ , (mL/kg)	12 1	67 . 8	86. 0	11 0	71 . 4	61. 0	11 6	69 . 6	73. 5
$C_{max}$ のオス/メス比	0. 83 0	0. 92 6	0. 7 71	—	—	—	—	—	—
$AUC_{tau}$ のオス/メス比	0. 88 7	0. 93 5	0. 8 69	—	—	—	—	—	—
$C_{max}$ の反復投与/第1回投与間の比	1. 23	1. 42	1. 3 6	1. 47	1. 54	2. 0 4	1. 35	1. 48	1. 6 8
$AUC_{tau}$ の反復投与/第1回投与間の比	1. 40	1. 33	1. 4 1	1. 45	1. 53	1. 9 1	1. 42	1. 43	1. 6 4
<sup>a</sup> 用語の定義について略語表(表A)を参照のこと。; <sup>b</sup> 中央値として表される。									

10

20

30

## 【0405】

全体としては、およそ第14日までに定常状態に達することをこれらの結果は示している。用量の増加と共に曝露が増加し、血漿中濃度のピークが第1日と第2日の間に生じる。1回目と最後の投薬の後の $AUC$ と $C_{max}$ は、評価した範囲にわたって用量と比例関係にあるようであり、定常状態の $AUC_{tau}$ は1回目の投薬後に観察された $AUC$ よりもおよそ30%~90%高いようである。 $T_{1/2}$ は3回の投薬にまたがって、そして、1回目の投薬と最後の投薬の後では類似しているようである(約3日)。メスでの全身性曝露はオスで観察されたものと類似している。投薬の中止後に検出可能な薬剤のレベルは両方の回復期用量(4.0および13.3mg/kg/週)で持続した。しかしながら、全ての用量について時間経過と共にPEG化C-ペプチドの血漿中濃度が顕著に減少し、回復期の最後までに実質的により低いものとなった(定量の下限のおよそ2~3倍)。回復期の最後では、低い方の2つの用量で中程度のADA反応が、そして、高い用量で強い反応があった。しかしながら、投薬を通じて、そして、投薬の完了後もかなりのレベルの薬剤が存在するので、抗体の存在はサルにPEG化C-ペプチドへの曝露に意味があるほど影響を与えなかった。

40

## 【0406】

実施例11: STZ誘導糖尿病ラットにおける神経伝達速度(NCV)への効果

50

糖尿病ラットにおけるPEG化C-ペプチドの神経伝達速度への効果を評価するために、STZ誘導糖尿病ラットに40kDaの分枝状PEG（実施例12）を8週間投与した。結果を非修飾型ヒトC-ペプチドの結果と比較することとした。実施例1において記載されたものと同じ40kDaの分枝状PEGに連結するPEG化ラットC-ペプチドおよび非修飾型ラットC-ペプチド。

#### 【0407】

プロトコルおよび方法：ストレプトゾトシン（STZ）を、50mg/mLの標準STZ溶液の1mLを注射することにより50mg/kgの用量で静脈内投与した。オスのSprague DawleyラットをHarlanより入手した。ラットの平均体重は約400gであり、ラットに標準食（TD2014）を与え、トウモロコシの穂軸の床敷を有する標準的な高さ8インチの孔なしプラスチックに個体ごとにラットを収容した。試験期間中に12時間明期、12時間暗期の明暗周期、 $72 \pm 8^{\circ}\text{F}$ の平均温度、および30%～70%の相対的湿度を用いて動物を収容した。8週間の期間に、表E9に記載される投薬計画に従って、動物に投薬した。

#### 【表13】

表E9 投与プロトコルの概要								
グループ	化合物	STZ投与量	投与量	投与容量	経路	頻度	動物の数	動物の番号
		50mg/kg	mg/kg	ml/kg				
1	賦形剤	無し	0	1	皮下	週1回**	5	1～5
2	賦形剤	有り	0	1	皮下	週1回**	10	6～15
3	PEG化ヒトC-ペプチド	有り	1	1	皮下	週1回**	10	16～25
4	PEG化ヒトC-ペプチド	有り	3	1	皮下	週1回**	10	26～35
5	非修飾型ヒトC-ペプチド	有り	1.5*	ポンプ	ポンプ	2回	10	36～45
6	非修飾型ラットC-ペプチド	有り	0.3*	ポンプ	ポンプ	2回	10	46～55
7	PEG化C-ペプチド	有り	0.3	1	皮下	週1回**	10	56～65
							動物の総数	65
* 24時間毎；**投与第1週では週2回								

#### 【0408】

直近の体重に基づいて各動物に投与する各薬剤の必要用量を計算した。賦形剤として無

菌リン酸緩衝生理食塩水を用いた。

【0409】

前治療相試験の実行：どんな異常、痛みまたは苦痛のサインをも確認するために処理開始前に動物を観察し、そして、それらが観察されたとき、どんな記録された所見をも臨床獣医と議論した。処理群のランダム化のためにS T Z処理（第1日）の前に体重を測定し、第7日および第11日、その後は週ごとに体重を測定した。処理群のランダム化で、S T Z処理前（第1日）に食物量を測定し、第7日および第11日、その後は週ごとに食物量を測定した。C - ペプチド（ $< 0.4 \text{ nM}$ ）、全血中グルコース値（ $400 - 600 \text{ mg/dL}$ ）および体重値に基づいて動物を処理層のためにランダム化した（表E5を参照のこと）。B . R . A . T .（ブロックランダム化割り当てツール）を用いてランダム化を達成した。皮下移植ポンプ（A l z e t ポンプモデル2 M L 4）を第10日と第39日に外科的に移植した。

【0410】

治療相試験の実行：ランダム化のために第3日に尾部出血による採血を行い、グルコースおよび/またはC - ペプチドのために第7日および第11日、その後は週ごとに採血を行った。S T Z注射前に6時間、毎グルコース評価前に3時間動物を絶食させ、試験のその他の時間では動物に任意に餌を与えた。（表E10を参照のこと。）

【表 1 4 - 1】

表 E 1 0 実験スケジュール		
曜日	日	仕事
月曜日	～ 7	動物の到着
月曜日	1	6時間の絶食、体重と食事の計量、S T Z（ザノサル）の静脈内投与。
水曜日	3	採血前の3時間の絶食（午前6：00）。体重と食事の計量。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量評価とE D T A血漿中C－ペプチド分析のための尾採血（午前9：00）。
日曜日	7	採血前の3時間の絶食（午前6：00）。体重と食事の計量。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量評価とE D T A血漿中C－ペプチド分析のための尾採血（午前9：00）。
月曜日	8	処理群に対する無作為化（午前）。基線N C Vの測定（午後）。
火曜日	9	基線N C Vの測定
水曜日	1 0	ポンプの移植と週2回の皮下投与（午前8：00）の開始。
木曜日	1 1	採血前の3時間の絶食（午前6：00）。体重と食事の計量。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量評価とE D T A血漿中C－ペプチド分析のための尾採血（午前9：00）。（グループ3、4および7。投与24時間後に最初の5匹の動物から採血が行われ、第12日の投与48時間後に2番目の5匹の動物から採血が行われる。）
金曜日	1 2	E D T A血漿分析のためのグループ3、4および7の2番目の5匹の動物からの採血－投与48時間後採血。
土曜日	1 3	皮下投与（午前8：00）
水曜日	1 7	採血前の3時間の絶食（午前6：00）。体重と食事の計量。皮下投与（午前8：00）。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量評価とE D T A血漿中C－ペプチド分析のための尾採血（午前9：00）。
水曜日	2 4	採血前の3時間の絶食（午前6：00）。体重と食事の計量。皮下投与（午前8：00）。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量評価とE D T A血漿中C－ペプチド分析のための尾採血（午前9：00）。（グループ3、4および7。投与24時間後に最初の5匹の動物から採血が行われ、第12日の投与48時間後に2番目の5匹の動物から採血が行われる。）

10

20

30

40

【表 1 4 - 2】

木曜日	2 5	E D T A 血漿分析のためのグループ 3、4 および 7 の最初の 5 匹の動物からの採血—投与 2 4 時間後採血。
金曜日	2 6	E D T A 血漿分析のためのグループ 3、4 および 7 の 2 番目の 5 匹の動物からの採血—投与 4 8 時間後採血。
土曜日	2 7	皮下投与（午前 8：00）
水曜日	3 1	採血前の 3 時間の絶食（午前 6：00）。体重と食事の計量。皮下投与（午前 8：00）。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量の評価のための尾採血（午前 9：00）。
土曜日	3 4	皮下投与（午前 8：00）
月曜日	3 6	採血前の 3 時間の絶食（午前 6：00）。体重と食事の計量。皮下投与（午前 8：00）。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量評価と E D T A 血漿中 C - ペプチド分析のための尾採血（午前 9：00）。
火曜日	3 7	N C V 測定。
水曜日	3 8	皮下投与（午前 8：00）， N C V 測定。
木曜日	3 9	古いポンプの除去と新しいポンプの移植。
土曜日	4 1	皮下投与（午前 8：00）
水曜日	4 5	採血前の 3 時間の絶食（午前 6：00）。体重と食事の計量。皮下投与（午前 8：00）。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量の評価のための尾採血（午前 9：00）。
土曜日	4 8	皮下投与（午前 8：00）
水曜日	5 2	採血前の 3 時間の絶食（午前 6：00）。体重と食事の計量。皮下投与（午前 8：00）。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量の評価のための尾採血（午前 9：00）。
土曜日	5 5	皮下投与（午前 8：00）
水曜日	5 9	採血前の 3 時間の絶食（午前 6：00）。体重と食事の計量。皮下投与（午前 8：00）。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量の評価のための尾採血（午前 9：00）。
土曜日	6 2	皮下投与（午前 8：00）
月曜日	6 4	N C V 測定。
火曜日	6 5	N C V 測定。
水曜日	6 6	採血前の 3 時間の絶食（午前 6：00）。体重と食事の計量。皮下投与（午前 8：00）。グルコメーターを用いる二つ組の全血中グルコース量評価と E D T A 血漿中 C - ペプチド分析のための尾採血（午前 9：00）。午後に腎臓剖検。

10

20

30

40

## 【 0 4 1 1 】

電気生理的エンドポイント：踵、外果の後ろに位置する活動記録電極および後足の第 2 指の付け根にある刺激陰極を用いて指神経活動電位を記録した。刺激陰極と活動電極の間の距離を初期脱分極性電流の立ち上がりまでの絶対潜時で除算することにより速度を計算した。

## 【 0 4 1 2 】

50

(視覚的に決定する)尾の毛の生え際より10mm下に位置する活動記録電極と60~70mmさらに遠位に位置する刺激陰極を用いて尾部神経活動電位を記録した。刺激陰極と活動電極の間の距離を初期脱分極性電流の立ち上がりまでの絶対潜時で除算することにより速度を計算した。

【0413】

後足の内在筋に位置する活動電極と踵の近く、外果の後ろに位置する刺激陰極を用いて脛骨運動神経伝達を記録した。

【0414】

動物の準備:全ての記録期間中、イソフランで動物を麻酔し、動物を腹臥位に置いた。電気生理的記録法の実行中、呼吸と温度をモニターした。

10

【0415】

電極:活動電極、基準電極および接地電極の設置を各様相に適合させ、そして、それらは各対象における骨標識点に対して配置される。全てのPNS記録のために1,000Hzでおよそ50kΩのインピーダンスを有するプラチナニードル電極(Grass-Telefactor, Co.)を活動リード線と基準リード線の両方に用いた。

【0416】

温度制御:記録期間を通じて35.5と38.0の間に直腸温度を維持した。

【0417】

データ処理:ユニティーゲインブリアンプを用いて神経電気シグナルをインピーダンス整合し、多極フィルターを用いて神経電気シグナルを帯域通過させ、0.5~50Kのゲイン係数を用いて神経電気シグナルを作動増幅した。各様相についてフィルター設定を調整した。各記録シリーズについて60Hz干渉を最小化し、シグナルノイズ比を適切化するために共通モード拒絶レベルとゲイン係数を調整した。増幅されたシグナルは誘起刺激に時間的関連をつけられ、選択されたチャンネルに多重送信され、標本抽出された最も高い頻度の5倍よりも高い比率でデジタル化される。アーティファクトについて(既定の拒絶レベル、デジタル化されたウインドウの80%を用いて)データを精査し、試験中の様相に適切なエポックについてデータをデジタルで平均化した。シグナルノイズ比を最適化し、そして、立ち上がりまでの潜時の測定値とピーク振幅の測定値の両方の正確な評価を容易にするために各平均に含まれるスイープの数を各測定値について調整した。

20

【0418】

データのスコア化:全ての電気生理的データをシグナルの最適化の後にスコア化した。立ち上がりまでの潜時を0.01ミリ秒単位で刺激アーティファクトから最短脱分極の開始まで測定した。振幅を感覚反応については0.01μV単位で、そして、運動反応については0.01mV単位で基線から脱分極のピークまで測定した。デジタルトレースをたどる内部コンピューターカーソルを用いて全ての測定を行った。全ての波形がデジタル的に記録装置に記憶され、さらなるオフライン解析のために利用可能であった。

30

【0419】

較正:電気生理的記録の日毎に現場で増幅器とフィルターを較正した。

【0420】

終末相試験の実行:CO<sub>2</sub>吸入により動物を麻酔し、引き続いて特定の時点で心臓穿刺を行った。

40

【0421】

結果:神経伝達速度(NCV)の基線測定

【0422】

STZの投与後8~9日、および、グループ2~4のラットの各々で高血糖症の存在が確認された後に最初のNCV評価が行われた(上記の表E4を参照のこと)。賦形剤またはPEG化ヒトC-ペプチドのどんな投与の前でもある(すなわち、基線)その時点で、STZ誘発末梢多発性神経障害の明確で有意な証拠が存在した。基線評価で、年齢が一致する対照群における所見と比較して、STZ処理群の各々において最大尾部NCVは10m/秒よりわずかに大きい値(およそ18%)だけ減少した(図16A)。その時点で、最

50

大指NCVは3～4 m / 秒だけ減少し(図17A)、そして、脛骨遠位潜時がおおよそ10%の値だけ延長された(遅くなった速度と整合する)。第4週での神経伝達速度(NCV)の測定。

#### 【0423】

図16Bと17Bは、賦形剤のみの投与、または、1.0か3.0 mg / kg / 週のどちらか用量のPEG化C-ペプチドの投与のどちらかの(基線から)4週間の期間後の4群の各々における尾部NCVと指NCVを図示する。この4週間の期間中に、グループ2の1匹のラットとグループ3の5匹のラットおよびグループ4の1匹のラットが死亡した。同じ部分集団の対象にまたがって比較し続けるために、これらの失われたラットに由来するデータが図16Aと17Aの基線値より省略されている。

10

#### 【0424】

試験した4週間の期間にわたって尾部と指の神経の両方について対照群のNCVが相対的に一定のままでいた(図18)。しかしながら、予想されたように、STZのみの群で尾部と指の神経の両方の速度が減少し続けた。純粋な遠位指感覚神経にとって、最初の4週間の処理期間にわたっておよそ3 m / 秒(10%)の追加の速度減少があった(図18)。NCVの継続的な速度減少は、高血糖と内在性C-ペプチド欠乏に至り、最終的には経膜電流の変化、神経節における微小環境の変化、軸索委縮に至り、究極的にはワーラー変性に至るSTZ誘発性膵臓細胞破壊に起因する遠位神経の進行性損傷と一致する。

#### 【0425】

脛骨運動反応の絶対潜時は、継続する動物の成長を反映して、第4週での評価時では全ての群においてわずかにより長かったが、しかしながら、試験の最初の4週間の経過にわたってこの測定値とほとんど、または、全くグループ間で差がなかった(データを示さず)。

20

#### 【0426】

基線から4週間の期間にわたってPEG化ヒトC-ペプチドで共処理した群の各々の生き残ったラットについてNCVがSTZのみの群での所見と比較して遅い速度で減少した(図18)。しかしながら、第4週の時点での効果は小さかった。

#### 【0427】

第8週での神経伝達速度(NCV)の測定

#### 【0428】

図16Cと17Cは、第8週の時点での4群の各々における尾部NCVと指NCVを図示する。試験期間にわたって、対照群における混合尾部神経のNCVが基線値よりおよそ4 m / 秒(7%)増加した(図19)。この変化は、詳細に記録されているミエリンおよび軸索の断面径の出生後の継続性増大と整合する。どのグループにおいても基線評価後の第4週と第8週の間さらに動物が死ぬことはなかった。

30

#### 【0429】

対照群では、8週間の期間にわたって指神経についてNCVに基線から相対的にほとんど変化がなかった(図18および19)。対照的に、STZのみの群(グループ2)でのNCVはこの期間にわたって減少し続けた。この低下の進行は高血糖と内在性C-ペプチドの産生の喪失により誘導される継続的損傷と整合する。第8週までに、STZのみの群における指NCVが基線から>4 m / 秒(14%)だけ減少し、年齢が一致する対照群における値から20%より多い値だけ減少した。対照的に、8週間の試験期間にわたってPEG化ヒトC-ペプチドで共処理された群では指神経NCVは安定であった(グループ3)、または、実際には向上した(グループ4)(図18)。

40

#### 【0430】

表E11とE12はそれぞれ基線から第8週の評価時点までの指NCVと尾部NCVにおけるパーセント変化を概説する。



【表 1 5】

表 E 1 1 指 N C V のパーセント変化				
指神経 N C V (m / 秒)				
	基線	第 4 週	第 8 週	基線から第 8 週までの変化
対照 (S T Z 無し)	3 4 . 4	3 4 . 0	3 2 . 9	- 4 . 4 %
賦形剤対照 (P E G 化 C - ペプチド無し)	3 0 . 5	2 7 . 3	2 6 . 2	- 1 4 . 1 %
P E G 化 ヒト C - ペプチド (1 m g / k g / 週)	2 9 . 7	2 8 . 8	2 9 . 8	+ 0 . 3 %
P E G 化 ヒト C - ペプチド (3 m g / k g / 週)	2 8 . 6	2 7 . 8	3 0 . 1	+ 5 . 2 %

10

20

【表 1 6】

表 E 1 2 尾部 N C V のパーセント変化				
尾部神経 N C V (m / 秒)				
	基線	第 4 週	第 8 週	基線から第 8 週までの変化
対照 (S T Z 無し)	5 3 . 0	5 2 . 9	5 6 . 8	+ 7 . 2
賦形剤対照 (P E G 化 C - ペプチド無し)	4 1 . 1	4 0 . 3	4 2 . 1	+ 2 . 4
P E G 化 ヒト C - ペプチド (1 m g / k g / 週)	4 2 . 1	4 3 . 2	4 6 . 1	+ 9 . 5
P E G 化 ヒト C - ペプチド (3 m g / k g / 週)	4 3 . 8	4 4 . 3	4 6 . 1	+ 5 . 3

30

40

## 【 0 4 3 1 】

結論：年齢が一致する対照群（グループ 1）と比較して S T Z で処理された群（グループ 2 ~ 4）において指 N C V と尾部 N C V の両方の実質的な速度低下があった。これらの効果は S T Z の投与後 8 ~ 9 日である基線で明らかであったが、P E G 化 C - ペプチドの共投与前であった。

## 【 0 4 3 2 】

S T Z のみで処理した群における 8 週間の試験期間中の指神経について、N C V の進行

50

性速度低下が記載された。1.0 か 3.0 mg / kg / 週のどちらかの用量での PEG 化 C - ペプチドの共投与がこの継続的低下を防いだ。3.0 mg / kg / 週の用量の PEG 化 C - ペプチドで共処理された群では、STZ 誘発神経障害の後の 8 週間の期間に指神経 NC V がわずかに改善されることさえあった。

【0433】

試験した期間にわたって、STZ のみにより誘導される神経障害に対して PEG 化 C - ペプチドでの共処理が神経保護を提供したことをこの試験の結果は示唆する。純粋な指感覚神経について、この効果は特に明らかである。部分的には対象の実験初期での喪失のため、この試験は投与量に関連する PEG 化 C - ペプチドの利益の違いについて初めての洞察だけを提供するが、指のデータに高用量グループでわずかに大きい利益を裏付ける様子がある。

10

【0434】

尾部神経のデータは、グループ 2 ~ 4 の基線に明白に現れた STZ 処理の実質的な負の影響を示した。8 週間の試験期間中に尾部 NC V における速度低下のさらなる証拠は存在しなかった。しかしながら、PEG 化 C - ペプチドで共処理された 2 つの群に対照群での傾向 (表 E 1 2) に近似する速度の改善があった。STZ のみの群で観察された改善よりもグループ 3 および 4 における改善が大きかった。第 4 週でそうであったように、グループ間で脛骨運動反応にほとんど変化がない (データを示さず)。

【0435】

天然 C - ペプチドが PEG 化されているとき、そのペプチドの生物学的活性が維持され、そのペプチドが PEG 化されていることがその循環半減期を延長し、それにより置換投与の頻度を減らすことをこれらの結果は示している。PEG 化ヒト C - ペプチドの低用量群および高用量群ならびに PEG 化ラット C - ペプチド群における第 3 週の投薬 2 日後に評価された平均最大血漿中濃度はそれぞれおよそ 129 nM、431 nM および 12 nM であった (データを示さず)。試験の終末における平均細小血漿中濃度は、PEG 化ヒト C - ペプチドの低用量群および高用量群ならびに PEG 化ラット C - ペプチド群においてそれぞれ、およそ 22 nM、94 nM および 2 nM であった。PEG 化ヒト C - ペプチドが非修飾型 C - ペプチドの有益な生物学的特質を保持し、糖尿病の長期合併症の治療と予防の両方に有効であることが結論される。特に、本実験は、ヒト PEG 化 C - ペプチドが糖尿病に関連する神経障害の治療に有効であることを立証する。

20

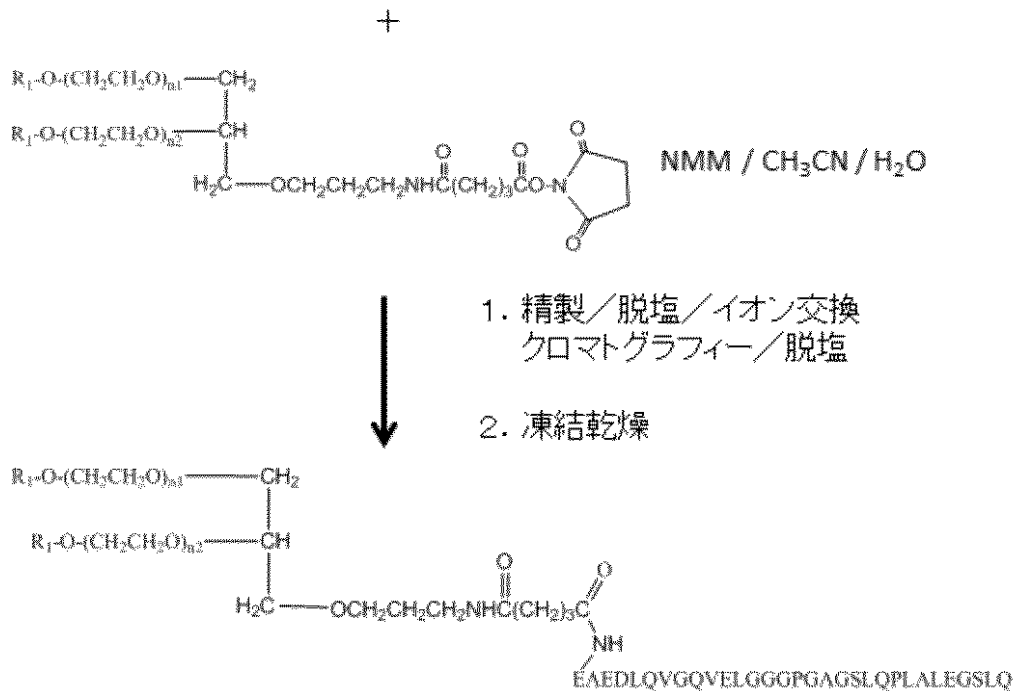
30

【0436】

実施例 12 : PEG 化 C - ペプチドの優良製造規範 (GMP) バッチの調製  
大要

## 【化 4 3】

ヒトC-ペプチド( EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ) (配列番号1)



10

1. 精製／脱塩／イオン交換  
クロマトグラフィー／脱塩
2. 凍結乾燥

20

PEG化：N-メチルモルホリンの存在下でヒトC-ペプチド（ナトリウム塩）のN末端をおよそ40 kDaの分枝状NHSエステルPEG誘導体（SUNBRIGHT GL2-400GS2（NOF Corporation））とカップリングすることにより1工程でヒトPEG化C-ペプチドの合成を行った。

## 【0437】

SUNBRIGHT GL2-400GS2（115 g）を最初に600 mLのアセトニトリル／水（50／50）溶液に溶解する。結果生じる溶液を攪拌し、そして、175 mLのアセトニトリル／水溶液にヒトC-ペプチド（7.9 g）を含む別の溶液を添加し、引き続いて1.2 mLのN-メチルモルホリン（NMM）を加えた。NMMの添加を約1時間の間隔で数回繰り返し、各添加の前にHPLCにより反応の進行をモニターした。この過程を約8～10回繰り返し、次に反応物を約8～12時間、一晚攪拌した。HPLC分析により完了したと一度反応が確かめられると、結果生じる反応混合物を精製段階に続けて進めた。このプロセスの間にいくつかのサブロットが調製され、以下に記載するように精製のために次に混合されることが典型的である。

30

## 【0438】

分取逆相クロマトグラフィーによる粗PEG化C-ペプチドの精製

粗PEG化C-ペプチド溶液を6倍体積の0.1% TFA／水で希釈した。pHを3のpHに調整し、そして、逆相シリカ（Diaso gel C-18, 15 μm, 300 Å, 4.6 mm ID, 150 mm L）を用いる分取HPLCにより精製した。希釈TFA水溶液中のアセトニトリルの濃度勾配（緩衝液Aは0.1% TFAであり、緩衝液Bは100% ACNである：5分間に0～25% Bの勾配、次に100分間に25%～50% Bの勾配、そして次に産物が溶出するまでこのままだいる。）を適用することにより吸着したPEG化C-ペプチドをカラムから溶出した。230 nmの紫外線により溶出液をモニターした。90%の純度、>6.0%のNSIを有する画分をプールする。>70%の純度を有する画分を再生利用することが可能である。

40

## 【0439】

分取逆相クロマトグラフィーによるPEG化C-ペプチドの脱塩と精製

逆相シリカを用いる分取HPLCにより前工程から得られた混合純粋画分を脱塩し、そ

50

して、精製した。希釈 T F A 水溶液によりカラムを洗浄し、引き続いて酢酸アンモニウム水溶液で洗浄した。次に希釈酢酸水溶液中のアセトニトリルの濃度勾配（緩衝液 A は 2 % 酢酸であり、緩衝液 B は 1 0 0 % A C N である：5 分間に 0 ~ 2 5 % B の勾配、次に 7 5 分間に 2 5 % ~ 5 0 % B の勾配、そして次に産物が溶出するまでこのままでいる。）を適用してカラムから P E G 化 C - ペプチドを溶出した。2 3 0 n m の紫外線により溶出液をモニターした。クロマトグラフィーから得られた純粋画分（9 5 % の純度、> 3 . 0 % の N S I ）をプールし、そして、凍結乾燥した。> 8 0 % の純度を有する画分をさらなる精製のために再生利用することが可能である。

#### 【0 4 4 0】

分取 H P L C による P E G 化 C - ペプチドのイオン交換精製

10

上記の工程由来の粗凍結乾燥 P E G 化ヒト C - ペプチド（~ 1 8 0 g ）を 5 % アセトニトリル / 水溶液に溶解し、イオン交換カラム（D E A E 5 2 セルロース）にアプライした。次にカラムを約 5 0 L の水で洗浄し、そして、約 4 0 L の塩化ナトリウム（1 M）/ 酢酸アンモニウム（1 M）水溶液でカラムから産物を溶出した。2 3 0 n m の紫外線により溶出液をモニターした。クロマトグラフィーから得られた純粋画分（9 2 % の純度、> 4 % の単一でない不純物（N S I ））をプールし、そして、脱塩 / 精製を続けて行った。> 8 0 % の純度を有する画分を再生利用することが可能である。

#### 【0 4 4 1】

逆相クロマトグラフィーによる C B X 1 2 9 8 0 1 の脱塩と精製

20

イオン交換クロマトグラフィー工程由来の純粋画分を等量の水で希釈し、そして、分取 H P L C カラム（シリカ）にアプライした。次にカラムを 2 % 希酢酸（1 カラム体積）で洗浄し、そして、希酢酸中のアセトニトリルの溶液（緩衝液 A は 2 % 酢酸であり、緩衝液 B は 1 0 0 % A C N である：5 分間に 0 ~ 2 5 % B の勾配、次に 5 0 分間に 2 5 % ~ 5 0 % B の勾配、そして次に産物が溶出するまでこのままでいる。）を用いて産物を溶出した。2 3 0 n m の紫外線により溶出液をモニターした。クロマトグラフィーから得られた純粋画分（9 5 % の純度、> 3 . 0 % の N S I ）をプールし、そして、凍結乾燥した。> 8 0 % の純度を有する画分を再生利用することが可能である。

#### 【0 4 4 2】

P E G 化 C - ペプチドの凍結乾燥

30

前精製由来の産物を約 1 5 ~ 2 0 g / L の濃度で 2 % 酢酸水溶液中に再構成し、当稀有乾燥して純粋 P E G 化 C - ペプチド原薬がその遊離酸として生じた。

#### 【0 4 4 3】

実施例 1 3 : P E G 化 C - ペプチドの生物物理学的特徴

上記の実施例 1 2 において記載されたように調製された、紫外線検出を用いる R P - H P L C により判定された 9 9 . 5 % の純度を有する P E G 化 C - ペプチドのバッチを、別に記さない限り、下記の分析調査に用いた。実行された構造研究は表 E 1 3 に記載される。全ての解析が前記原薬の化学構造を確認する。

【表 17】

表 E 1 3 構造試験の実施	
試験	分析技術
分子質量	MALDI-TOF MS
同定	FT-IR
個々のアミノ酸の同定と割合	DS についてのアミノ酸分析
個々のアミノ酸の同定とキラリティー	キラルアミノ酸分析
(F I 段階で行われる) 分子質量とアミノ酸の配列	CID-MS/MS
(PEG 化ペプチドの配列を確認するための) ペプチドマッピング	キモトリプシン消化と消化断片の HPLC および MS/MS 解析
カウンターイオンの不在	イオンクロマトグラフィー、RP-HPLC、ICP-MS

10

## 【0444】

上に記載される構造解明試験に加えて、上記の実施例 12 に記載される PEG 化 C - ペプチドに対して追加の特性試験が実行された。これらの追加の試験は表 E 14 に記載されている。

20

## 【0445】

マスマススペクトロメトリー (MS) による分子質量：前記原薬の分子質量を確かめるためにマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) を用いた。前記試料は、およそ  $m/z$  45743 を中心として観察された広範囲の 1 荷の擬分子イオンクラスターを有する MALDI-TOF マスマスペクトルを陽イオンに与えた。

## 【0446】

フーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR)：TGS 検出器と 1 回反射型セレン化亜鉛結晶装着 ATR アクセサリーを装備した Jasco 4200 FT-IR 分光光度計で C - ペプチド、PEG 試薬および PEG 化 C - ペプチドの FT-IR スペクトルを収集した。テフロン性の棒を用いて固形試料をセレン化亜鉛結晶に押し付けた。残留水分のピークをスペクトルから差し引いた。図 20 と図 21 (拡大領域) に結果が示されている。PEG 化 C - ペプチドのスペクトルは PEG 試薬のスペクトルに非常に類似している。PEG に対するペプチドの質量比を考えると、これは驚くべきことではない。

30

## 【0447】

しかしながら、図 21 に示されるように、アミド I 領域にわずかな差がある。具体的には、PEG 化 C - ペプチドのアミド I のバンドは  $1627\text{ cm}^{-1}$  と  $1653\text{ cm}^{-1}$  に 2 つのピークを示すが、一方、遊離 C - ペプチドのスペクトルは  $1634\text{ cm}^{-1}$  に 1 つの幅広いアミド I のバンドピークを示すのみである。 $1630\text{ cm}^{-1}$  近傍のアミド I バンドは、普通は、シート構造またはターンと関連しており、一方、 $1650\text{ cm}^{-1}$  近傍のアミド I バンドは、普通は、ヘリックスの不規則またはランダムコイル構造に割り当てられる。 $1653\text{ cm}^{-1}$  での吸光度の出現は、C - ペプチドと比較して、よりランダムな前記 PEG 化ペプチドの構造と整合する。

40

## 【0448】

アミド I 領域の差異はアミド基と溶剤の水の水素結合に起因するのか調べるために、図 22 と図 23 に示されているように、FT-IR スペクトルを重水中で収集した。重水のスペクトルの収集のために、重水中の試料を  $6\text{ }\mu\text{m}$  のスパーサーを有する 2 枚のフッ化カルシウムのウインドウの間に配置した。

## 【0449】

重水中の PEG 化 C - ペプチドの FT-IR スペクトルは ( $1566\text{ cm}^{-1}$  で) 最小強度のアミド I I バンドを示し、これは全てのアミノ基が H-D 交換を経ることを示して

50

いる。H - D 交換すると、アミド I I バンドは  $1566\text{ cm}^{-1}$  から  $1465\text{ cm}^{-1}$  にシフトする（アミド I I' バンドになる）。重水中に高濃度（約  $25\text{ mg/mL}$ ）と低濃度（約  $12.5\text{ mg/mL}$ ）の両方の遊離 C - ペプチドに対応する強度のアミド I I' が残っており、このことは、未変換のアミド基がいくらか存在することを示している。未変換のアミド基は ターン内の分子内水素結合または高濃度でペプチドオリゴマー（凝集体）間形成された分子間水素結合により保護されているようである。重水中の PEG 化 C - ペプチドにとって、有効な C - ペプチド濃度は  $40\text{ kDa}$  の PEG に対する C - ペプチドの低い質量比のためずっと低い。

#### 【0450】

しかしながら、（図 23 に示される）第 2 の派生的な FT - IR スペクトルから見るように、高濃度の C - ペプチド試料（約  $25\text{ mg/mL}$ ）に対応するアミド I' バンドは  $1639\text{ cm}^{-1}$  に主なピークであって  $1645\text{ cm}^{-1}$  に肩を有するピークを示し、一方、低濃度の試料（約  $12.5\text{ mg/mL}$ ）は  $1639\text{ cm}^{-1}$  と  $1645\text{ cm}^{-1}$  の両方で主なピークを示す。このことは、アミド I' 領域の差異は濃度に関連する可能性があることをしめしている。PEG 化 C - ペプチドのスペクトルと対照的に、遊離 C - ペプチドのスペクトルは  $1635 \sim 1640\text{ cm}^{-1}$  の近傍でより高い強度を示し、このことは、遊離 C - ペプチドにより多くの ターンが存在することを示している。低濃度の試料の評価を不可能にする C - ペプチド試料のより希釈された試料ではノイズに対するシグナルが貧弱であることに留意すべきである。

#### 【0451】

アミノ酸分析による個々のアミノ酸の特定と比率：アミノ酸成分のアイデンティティおよび正しい比率を確かめるために、実施例 12 で調製された PEG 化 C - ペプチドについてアミノ酸分析を実行した。強酸でのペプチドの加水分解、イオン交換カラムでのアミノ酸の分離、そして最後に、ニンヒドリン誘導体化後の溶出物の検出がこの方法に含まれる。表 E 14 にその試験の結果が示されている。アミノ酸分析からの結果により、実験誤差内の PEG 化 C - ペプチド中のアミノ酸のアイデンティティと理論的相対出現率が確認される。

#### 【表 18】

表 E 14 アミノ酸分析の結果		
アミノ酸	相対出現率の理論値	相対出現率の観察値
アスパラギン酸	1	1.1
プロリン	2	2.1
セリン	2	2.2
Glx*	8	6.9
グリシン	7	7.3
アラニン	3	3.0
バリン	2	2.0
ロイシン	6	6.5
注釈：*Glx はグルタミンとグルタミン酸の結果である。		

#### 【0452】

ガスクロマトグラフィー（GC）による個々のアミノ酸の特定とキラリティー：実施例 12 のキラルアミノ酸分析を、アミノ酸残基成分のキラリティーを調べるために、実行した。前記ペプチドを重水化溶剤（ $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ ）中で加水分解し、N（O, S）-フルオロアセチルアミノ酸エステルとして誘導体化し、そして、GC - MS を用いて分析して各アミノ酸エナンチオマーを決定する。Chirasil - Val コート非活性化ガラスキャピラリーを用いて GC を行った。キャリアーガスは水素であった。表 E 15 に結果が示されている。得られた値により、実施例 12 の PEG 化 C - ペプチドの構造を構成するアミノ酸に予想されるキラリティーが確認される。

【表 19】

表 E 1 5 キラルアミノ酸分析の結果	
アミノ酸	L-アミノ酸の含有率 (%)
アスパラギン酸	> 99.9
プロリン	99.86
セリン	99.51
Glx	> 99.9
アラニン	99.9
バリン	> 99.9
ロイシン	99.89

10

## 【0453】

MS/MSによるアミノ酸配列：PEGの大きいサイズと多分散性を考えて、最終中間産物段階でMS/MSによりシーケンシングを実行する。その過程により作られた産物イオンスペクトルから構造情報を得ることを意図して完全な試料分子を故意に断片化する技術であるCID（衝突誘起解離）を用いるMS/MSを実行することにより、実施例12のPEG化C-ペプチドのアミノ酸配列を調べた。

## 【0454】

MS/MSスペクトルで観察される断片イオンのタイプは、1次配列、内部エネルギーの量、そのエネルギーが導入された様式、荷電状態などを含む多くの因子に依存する。受容されている断片イオンの命名法はRoepstorffおよびFohlmanにより最初に提唱され[Biochemical Spectrometry, 1984年, 11(11): 601]、その後Johnsonら[Annals of Chemistry, 1987年, 59(21): 2621-2625]により改変されている。

20

## 【0455】

断片は、それらが少なくとも1つの電荷を有する場合、検出されるだけであろう。この電荷がN末端断片に保持される場合、そのイオンはa、bまたはcのどれかとして分類される。その電荷がC末端に保持される場合、そのイオンのタイプはx、yまたはzのどれかである。下付き文字は断片における残基の数を示す。

30

## 【0456】

電荷を有するプロトンに加えて、cイオンとyイオンが前駆体ペプチドからさらなるプロトンを抽出する。したがって、6つの1荷の配列イオンがあり得る。これらの構造は1荷電性プロトンを含有することに留意すること。エレクトロスプレーイオン化において、ペプチドは一般的に2つまたは3つの電荷を有するので、断片イオンが1つよりも多いプロトンを有する可能性がある。

## 【0457】

Crockerら[Journal of Biomolecular Techniques, 2000年, 11巻, 3号, 135-141]によって開発されたコンピュータープログラムを用いて予想される複数荷電bイオンおよびyイオンおよび断片イオンを計算した。表E16およびE17に結果が示されている。断片化とMS/MSおよびMS/MS/MSによる配列分析により、実施例12の最終中間産物のPEG化C-ペプチドの示唆される一次配列が確認された。

40

【表 20 - 1】

表 E 1 6 MS 断片と配列分析の概要							
配列	N 末端イオンシリーズ						
実施例 1 2	位置	予測 b <sup>1</sup> +	観察 m/ z	予測 b <sup>2</sup> +	観察 m/ z	予測 b <sup>3</sup> +	観察 m / z
グルタミン酸	b 1	1 3 0. 1	—	6 5. 5	—	4 4	—
アラニン	b 2	2 0 1. 1	2 0 1. 1	1 0 1. 1	—	6 7. 7	—
グルタミン酸	b 3	3 3 0. 1	3 3 0. 1	1 6 5. 6	—	1 1 0. 7	—
アスパラギン酸	b 4	4 4 5. 2	4 4 5. 1	2 2 3. 1	—	1 4 9. 1	—
ロイシン	b 5	5 5 8. 2	5 5 8. 2	2 7 9. 6	—	1 8 6. 8	—
グルタミン	b 6	6 8 6. 3	6 8 6. 2	3 4 3. 7	—	2 2 9. 4	—
バリン	b 7	7 8 5. 4	7 8 5. 3	3 9 3. 2	—	2 6 2. 5	—
グリシン	b 8	8 4 2. 4	8 4 2. 3	4 2 1. 7	—	2 8 1. 5	—
グルタミン	b 9	9 7 0. 5	9 7 0. 4	4 8 5. 7	—	3 2 4. 2	—
バリン	b 1 0	1 0 6 9. 5	1 0 6 9 . 5	5 3 5. 3	—	3 5 7. 2	—
グルタミン酸	b 1 1	1 1 9 8. 6	1 1 9 8 . 4	5 9 9. 8	—	4 0 0. 1 9	—
ロイシン	b 1 2	1 3 1 1. 6	1 3 1 1 . 6	6 5 6. 3	—	4 3 7. 9	—
グリシン	b 1 3	1 3 6 8. 7	1 3 6 8 . 6	6 8 4. 8	6 8 4. 8	4 5 6. 9	—
グリシン	b 1 4	1 4 2 5. 7	1 4 2 5 . 6	7 1 3. 4	7 1 3. 3	4 7 5. 9	—
グリシン	b 1 5	1 4 8 2. 7	1 4 8 2 . 6	7 4 1. 9	7 4 1. 8	4 9 4. 9	—
プロリン	b 1 6	1 5 7 9. 8		7 9 0. 4	—	5 2 7. 3	—
グリシン	b 1 7	1 6 3 6. 8	1 6 3 6 . 8	8 1 8. 9	8 1 8. 8	5 4 6. 3	—
アラニン	b 1 8	1 7 0 7. 8	1 7 0 7 . 8	8 5 4. 4	8 5 4. 3	5 6 9. 9	—

10

20

30

40



【表 20 - 2】

グリシン	b 1 9	1 7 6 4 . 8	1 7 6 4 . 9	8 8 2 . 9	8 8 2 . 8	5 8 9	—
セリン	b 2 0	1 8 5 1 . 9	1 8 5 1 . 8	9 2 6 . 4	9 2 6 . 4	6 1 8	—
ロイシン	b 2 1	1 9 6 5	1 9 6 4 . 9	9 8 3	9 8 2 . 9	6 5 5 . 7	—
グルタミ ン	b 2 2	2 0 9 3	—	1 0 4 7	1 0 4 6 . 9	6 9 8 . 3	—
プロリン	b 2 3	2 1 9 0 . 1	—	1 0 9 5 . 5	—	7 3 0 . 7	—
ロイシン	b 2 4	2 3 0 3 . 2	—	1 1 5 2 . 1	1 1 5 1	7 6 8 . 4	—
アラニン	b 2 5	2 3 7 4 . 2	—	1 1 8 7 . 6	1 1 8 7 . 5	7 9 2 . 1	—
ロイシン	b 2 6	2 4 8 7 . 3	—	1 2 4 4 . 1	1 2 4 4 . 1	8 2 9 . 8	—
グルタミ ン酸	b 2 7	2 6 1 6 . 3	—	1 3 0 8 . 7	1 3 0 8 . 6	8 7 2 . 8	—
グリシン	b 2 8	2 6 7 3 . 3	—	1 3 3 7 . 2	1 3 3 7 . 1	8 9 1 . 8	—
セリン	b 2 9	2 7 6 0 . 4	—	1 3 8 0 . 7	1 3 8 0 . 6	9 2 0 . 8	—
ロイシン	b 3 0	2 8 7 3 . 5	—	1 4 3 7 . 2	1 4 3 7 . 1	9 5 8 . 5	9 5 8 . 3
グルタミ ン	b 3 1	3 0 0 1 . 5	—	1 5 0 1 . 3	1 5 0 1 . 2	1 0 0 1 . 2	—
ヒドロキ シル基	—	—	—	—	—	—	—

10

20

30

【表 2 1 - 1】

表 E 1 7 MS 断片と配列分析の概要							
配列	C 末端イオンシリーズ						
実施例 1 2	位置	予測 y <sup>1</sup> +	観察 m / z	予測 y <sup>2</sup> +	観察 m / z	予測 y <sup>3</sup> +	観察 m / z
グルタ ミン酸	y 3 1	3 0 1 9 . 5	—	1 5 1 0 . 3	1 5 1 0 . 3	1 0 0 7 . 2	1 0 0 7 . 2
アラニ ン	y 3 0	2 8 9 0 . 5	—	1 4 4 5 . 7	—	9 6 4 . 2	—
グルタ ミン酸	y 2 9	2 8 1 9 . 4	—	1 4 1 0 . 2	—	9 4 0 . 5	—
アスパ ラギン 酸	y 2 8	2 6 9 0 . 4	—	1 3 4 5 . 7	1 3 4 5 . 5	8 9 7 . 5	—
ロイシ ン	y 2 7	2 5 7 5 . 4	—	1 2 8 8 . 2	1 2 8 8 . 1	8 5 9 . 1	—
グルタ ミン	y 2 6	2 4 6 2 . 3	—	1 2 3 1 . 7	1 2 3 1 . 5	8 2 1 . 4	—
バリン	y 2 5	2 3 3 4 . 2	—	1 1 6 7 . 6	1 1 6 7 . 5	7 7 8 . 8	—
グリシ ン	y 2 4	2 2 3 5 . 2	—	1 1 1 8 . 1	1 1 1 7 . 9	7 4 5 . 7	—
グルタ ミン	y 2 3	2 1 7 8 . 1	—	1 0 8 9 . 6	1 0 8 9 . 4	7 2 6 . 7	—
バリン	y 2 2	2 0 5 0 . 1	—	1 0 2 5 . 5	—	6 8 4	—
グルタ ミン酸	y 2 1	1 9 5 1	1 9 5 1	9 7 6	9 7 5 . 9	6 5 1	—
ロイシ ン	y 2 0	1 8 2 2	1 8 2 1 . 9	9 1 1 . 5	9 1 1 . 4	9 0 8	—
グリシ ン	y 1 9	1 7 0 8 . 9	1 7 0 8 . 8	8 5 5	—	5 7 0 . 3	—
グリシ ン	y 1 8	1 6 5 1 . 9	1 6 5 1 . 9	8 2 6 . 4	8 2 6 . 4	5 5 1 . 3	—
グリシ ン	y 1 7	1 5 9 4 . 8	1 5 9 4 . 9	7 9 7 . 9	7 9 7 . 8	5 3 2 . 3	—
プロリ ン	y 1 6	1 5 3 7 . 8	1 5 3 7 . 8	7 6 9 . 4	7 6 9 . 3	5 1 3 . 3	—
グリシ ン	y 1 5	1 4 4 0 . 8	—	7 2 0 . 9	—	4 8 0 . 9	—
アラニ ン	y 1 4	1 3 8 3 . 8	1 3 8 3 . 7	6 9 2 . 4	—	4 6 1 . 9	—
グリシ ン	y 1 3	1 3 1 2 . 7	1 3 1 2 . 6	6 5 6 . 9	—	4 3 8 . 2	—

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

セリン	y 1 2	1 2 5 5 . 7	1 2 5 5 . 6	9 2 8 . 4	—	4 1 9 . 2	—
ロイシ ン	y 1 1	1 1 6 8 . 7	1 1 6 8 . 6	5 8 4 . 8	—	3 9 0 . 2	—
グルタ ミン	y 1 0	1 0 5 5 . 6	1 0 5 5 . 5	5 2 8 . 3	—	3 5 2 . 5	—
プロリ ン	y 9	9 2 7 . 5	9 2 7 . 5	4 6 4 . 3	—	3 0 9 . 8	—
ロイシ ン	y 8	8 3 0 . 5	—	4 1 5 . 7	—	2 7 7 . 5	—
アラニ ン	y 7	7 1 7 . 4	7 1 7 . 3	3 5 9 . 2	—	2 3 9 . 8	—
ロイシ ン	y 6	6 4 6 . 3	6 4 6 . 3	3 2 3 . 7	—	5 1 6 . 1	—
グルタ ミン酸	y 5	5 3 3 . 3	5 3 3 . 2	2 6 7 . 1	—	1 7 8 . 4	—
グリシ ン	y 4	4 0 4 . 2	4 0 4 . 2	2 0 2 . 6	—	1 3 5 . 4	—
セリン	y 3	3 4 7 . 2	3 4 7 . 2	1 7 4 . 1	—	1 1 6 . 4	—
ロイシ ン	y 2	2 6 0 . 2	2 6 0 . 2	1 3 0 . 6	—	8 7 . 4	—
グルタ ミン	y 1	1 4 7 . 1	—	—	—	4 9 . 7	—
ヒドロ キシル 基	—	—	—	—	—	—	—

10

20

30

## 【 0 4 5 8 】

ペプチドマッピング：ペプチドマップはタンパク質のタンパク質分解酵素を用いる消化により作成される断片化パターンである。ペプチド断片のパターンは特定のタンパク質で特徴的であり、そして、構造を特定するために用いることができる。C - ペプチドをマップする方法は以前に開発され、そして、4断片がマスマスペクトロメトリーにより同定された。図 2 4 の下のパネルに示されるように、4断片はアミノ酸 2 5 ~ 3 1 (断片 A と呼ぶ)、1 3 ~ 2 4 (断片 B と呼ぶ)、1 ~ 1 2 (断片 C と呼ぶ) および 1 ~ 2 4 (断片を D と呼ぶ) を含む。

## 【 0 4 5 9 】

C - ペプチド ( 1 m g / m L ) と P E G 化 C - ペプチド ( 1 0 m g / m L ) が 2 5 m M 炭酸水素アンモニウム緩衝液に溶解される並列比較が実行された。1 m L の各試料に 4 0 μ L の 0 . 2 5 m g / m L キモトリプシンを加え、その試料を 3 7 ° で 4 時間保温した。ギ酸を添加して消化を止め、試料を R P - H P L C により分析した。図 2 4 に結果が示されている。

40

## 【 0 4 6 0 】

P E G 化 C - ペプチドについて予想されたように、P E G 部分が N 末端に結合しているので、断片 C ( 1 ~ 1 2 ) と D ( 1 ~ 2 4 ) は観察されなかった。実施例 1 2 の P E G 化 C - ペプチドについて断片 2 5 ~ 3 1 および 1 3 ~ 2 4 が観察された。1 4 分でのピークが未消化の P E G 化 C - ペプチドであるかどうか調べるために、消化に関するタイムコー

50

ス試験を27時間にわたって実行した。追加的な断片は得られなかったが、これは完了しつつある消化に整合する。さらに、どのような分離も達成され得るか調べるために拡張濃度勾配を用いるRP-HPLCにより未消化PEG化C-ペプチドと消化されたPEG化C-ペプチドの50/50混合物を分析した。しかしながら、1つのピークだけが観察された。したがって、14分でのピークはPEG化1~12断片と1~24断片を含み、おそらく実施例12の完全なPEG化C-ペプチドをいくらか含むと結論される。その分子のクロマトグラフィーでの挙動が大きいPEG部分により支配されているため、これらの断片を分離することができないことは予期しないことではない。

#### 【0461】

カウンターイオンの不在：脱塩工程後にカウンターイオンがほとんど、または、全く残っていないことを確実にするためにアンモニウム含量はイオンクロマトグラフィー(IC)により、酢酸はHPLCにより、そして、ナトリウム含量はICP/MSにより測定された。

10

#### 【0462】

アンモニウム含量は0.035(重量/重量)%であると判断され、そして、ナトリウム含量は0.02%であるとわかり、それらは指定限界よりも下であった。

#### 【0463】

原薬中のカウンターイオンのレベルは低いけれども、モルベースで計算すると、最終原薬に対するアンモニア(0.9モル比)および/またはナトリウム(0.4モル比)のある関係を示している可能性がある。

20

#### 【0464】

分析超遠心分離による沈降速度：PEG化C-ペプチド中の任意の凝集体の均一性と分布状態を評価するために、分析超遠心分離において沈降速度を測定した。この技術を用いて、凝集体をその異なる沈降係数に基づいて検出することができる。沈降速度は物理学的原理に基づく絶対的な方法である。その較正は長さと時間の基本単位に基づき、基準として標準分子を必要としない。沈降係数は分子の形ならびに分子質量に依存し、したがって、モノマーの沈降係数が既知のときでさえ、オリゴマーの沈降係数を予測することができない。

#### 【0465】

図25にPEG化C-ペプチドのロット1008-134の(約0.6mg/mLの濃度での)PBS緩衝液中での正規化沈降係数分布が示されている。0.802Sでの主なピークは98.1%であり、このことは試料が均一であることを示している。(非PEG化)C-ペプチドの沈降係数は約0.4~0.5Sの範囲にあると以前には判断された。この範囲でシグナルは検出されなかったが、このことは、遊離C-ペプチドが存在しないことを示している。さらに、沈降係数は40kDaの分枝状PEG(0.82S)と一致する。

30

#### 【0466】

C-ペプチドとPEG化C-ペプチドの円偏光二色性分析：C-ペプチドとPEG化C-ペプチドについて遠近紫外光円偏光二色性(CD)分析を実行した。試料を、4.7%ソルビトールを含む20mMリン酸緩衝液(pH6.0)に、C-ペプチドについては1mg/mLの濃度で、および、PEG化C-ペプチドについては(0.69mg/mLのC-ペプチドと同等である)約10.4mg/mLの濃度で溶解した。ペプチド濃度(1または0.69mg/mL)、平均残基重量(97.4)およびセルの経路長(吸光度測定には1cmまたはCDには0.02cm)を用いて溶剤分を差し引いたスペクトルを平均残基楕円率に変換した。Jasco J-715分光偏光計で測定を実行した。

40

#### 【0467】

図26に示されるように、芳香族基とジスルフィド結合が存在しない(図26の上のパネルに示されている)ので、近紫外光領域におけるC-ペプチド(上の線)とPEG化C-ペプチド(下の線)の平均残基楕円率は両方の試料について基本的に0である。

#### 【0468】

50

C - ペプチドとPEG化C - ペプチドの遠紫外光CDスペクトルは、二次構造が大部分は乱されていることを示している。ヘリックスに典型的な220および208 nmでの二重極小値が無く、そして、逆平行シートに典型的な217 nmでの谷が無い。

#### 【0469】

濃度について補正するとき、CD分析は、C - ペプチドとPEG化C - ペプチドについてほぼ同一なスペクトル形状を示す(図26の下のパネル)(試料の重量は水または塩/溶剤について補正していなかったため、濃度の推定値にはいくらか誤差が存在することに留意すること)。したがって、PEG化は前記ペプチドの2次構造を変えないことが結論付けられ得る。

#### 【0470】

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC): 図27に示されるように、実施例12のPEG化C - ペプチドの(20 mMリン酸緩衝液, 4.7%ソルビトール, pH 6.0中に100 µgの)試料をサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。

#### 【0471】

SEC方法の適格性評価の部分として、20 kDaのPEG化ペプチドを独立的に合成し、そして、SECにより分析してその方法がサイズに基づいて関連する化合物を区別することができることを示した。図28に実施例12のPEG化C - ペプチドと20 kDaのPEG化C - ペプチドの(同じ緩衝液系で両方の試料を100 µg 負荷した)クロマトグラムを重ね合わせたものが示されている。図28に見ることができるよう、低い分子量のピークほど後でSECカラムから溶出される。主なピークの前にピークが無いことにより、より大きい分子量の分子種が実施例12のPEG化C - ペプチドに認識できるレベルで存在しないことが示される。同様に、主なピークの後にピークが無いことにより、より小さい分子量の分子種が認識できるレベルで存在しないことが示される。

#### 【0472】

SDS - PAGE: ゲル電気泳動を、4~12%のトリス - グリシンゲルを用いて行った。図29において示されるように、分子量標準品(InvitrogenのBlue Plus 2 プレステイン標準品を参照のこと)をレーン2および10にアプライした。レーン4、6および8に2 µg から10 µg までの範囲の異なる量のPEG化C - ペプチドをアプライした。クマシー染色により64~98 kDaの間に1本の染まり方が強いバンドが視覚化された。PEGの流体力学的半径はタンパク質マーカの分子量に基づいて予想されるサイズよりも大きいことが知られている。したがって、この結果は予期しないことではない。SDS - PAGEの結果はまた、他のより高分子量の夾雑物が存在しないことも示している。

#### 【0473】

活性プロファイリング: PEG化C - ペプチドの試料を標準の非標識C - ペプチドと比較して、そのPEG化産物が非標識ペプチドの活性を保持することを確認した。

#### 【0474】

方法: ヒト腎臓(HK2)細胞を(非コート)96穴(b1/c1)プレートに20,000細胞/穴の密度で蒔き、そして、48時間培養した。実験当日、HK2細胞を洗浄し、そして、0.5%BSA含有DMEM中で1時間飢餓状態に置いた。細胞を1 nM(最終濃度)で5分間処理し、10回これを繰り返した。C - ペプチドPEG GMP(ロット番号1 - FIN - 0988)、C - ペプチドPEG Tox(1007 - 119)、C - ペプチドPEG Tox(1008 - 090)、非修飾型C - ペプチド(209400 - 3)およびC - ペプチドPEG基準物質(1008 - 134)を等量ずつ加えた。プレートを1000 rpmで5分間遠心分離にかけた。総処理時間は7~10分であった。処理後すぐに細胞を2%(最終濃度)パラホルムアルデヒドで固定化し、そして、氷冷メタノールを用いて透過処理した。次に標準的なプロトコルに従って、細胞を抗pERK抗体で処理し、そして、チラミド増幅付きの蛍光抗体法を用いてプレートを処理した。

#### 【0475】

結果: PEG化C - ペプチドが非PEG化産物の活性を保持しており、そして、この活

10

20

30

40

50

性がいくつかの異なるロットの C - ペプチドにまたがって一致することを図 30 に示される結果が示す。

【0476】

実施例 14：医薬開発

P E G 化 C - ペプチド（実施例 1）が水性溶液として製剤されるので、製剤の実施に影響する可能性がある重要な生理化学的特質は原薬の溶解性、p H、イオン強度および浸透圧である。これらの因子の全てが P E G 化 C - ペプチドの P E G 部分の安定性に影響する可能性があり、そして、この実施例で評価される。

【0477】

20 m g / m L の濃度の原薬は製剤緩衝液中での溶解限度（100 m g / m L まで）よりずっと低い。以下に記述するように製品の安定性を最適化するために原薬と両立できる賦形剤が選択されている。薬剤製品に使用される賦形剤は（1 塩基性および 2 塩基性）リン酸ナトリウム、ソルビトール、水酸化ナトリウムおよび注射用蒸留水である。すべての賦形剤が公定書に準じ、米国薬局方（U S P）に概説される基準に合致する。賦形剤の選択とそれらのレベルは本実施例に記載される。

10

【0478】

緩衝液の選択：医薬調製物に一般に用いられており、生理的 p H で良い緩衝能を有するため、最初の評価にリン酸緩衝液を選択した。様々な p H（6.0、6.5、7.0 および 7.5）の 10 m M ナトリウムリン酸緩衝液中に約 1 m g / m L の P E G 化 C - ペプチド（実施例 12）を溶解することにより p H 選別試験を行った。試料を 40 で 9 日間貯蔵し、次に R P - H P L C により分析した。すべての試料がかなり分解されたが（約 40 % 以上）、これはペプチド - P E G 複合体の P E G 成分の分解と一致する。さらに、全ての製剤の p H が 0.7 ~ 1.0 p H 単位だけ下方にシフトしたが、このことは、緩衝能が不十分であることを示している。それにもかかわらず、低い方の p H で安定性が上昇する明らかな傾向を観察することができた。すなわち、p H 6.0 で始まる製剤がそれぞれ p H 6.5、7.0 および 7.5 よりも好ましかった。したがって、6.0 の標的 p H が選択された。

20

【0479】

等張化剤：等張化剤（生理食塩水またはソルビトール）を選択するために 2 番目の製剤試験を行った。等張の薬剤製品溶液を作製するために生理食塩水（0.9 %）またはソルビトール（4.7 %）の濃度を選択した。生理食塩水（0.9 %）かソルビトール（4.7 %）のどちらかを含み 20 m M ナトリウムリン酸緩衝液に P E G 化 C - ペプチド（実施例 1）（1 m g / m L）を溶解した。p H を 6.0 に調整した。試料を 5 および 40 で貯蔵した。等張化剤の添加によりこれらの製剤の安定性は大いに改善した（データを示さず）。40 で 4 週間後に両方の等張剤が約 2 ~ 3 % の面積 純度 % の下落を有する同等の結果をもたらした。40 で 12 週間後にソルビトール含有製剤が明らかに優れており、約 72 % の面積 純度 % の下落を示す生理食塩水含有製剤と比較してソルビトール含有製剤は面積 純度 % の下落が約 7 % であった（P E G の分解に対応する）。5 では、12 週間後にどちらの製剤でも分解がほとんどまったく観察されなかった。安定性の促進の結果に基づいて、ソルビトールを等張剤として選択した。

30

40

【0480】

イオン強度：イオン強度の製剤の安定性への影響を評価するために第 3 の製剤試験を行った。4.7 % ソルビトールを含み p H 6.0 に調整された 10 m M、20 m M および 50 m M の濃度のリン酸緩衝液に P E G 化 C - ペプチド（実施例 12）の溶液を約 20 m g / m L の濃度で調製した。試料を 5 および 40 で貯蔵した。表 E 18 に結果が要約されている。

【表 2 2】

表 E 1 8 PEG 化 C-ペプチド（実施例 1 2）の緩衝液濃度の関数としての安定性									
	初期			5℃で3か月			40℃で3か月		
緩衝液濃度	含有率 (MG/ ML)	純度 (%)	PH	含有率 (MG/ ML)	純度 (%)	PH	含有率 (MG/ ML)	純度 (%)	PH
10MM	22.3	99.4	5.9	21.4	99.3	6.0	8.1	40.3	4.1
20MM	21.4	99.8	6.0	21.3	99.4	6.1	4.0	22.3	4.0
50MM	22.1	99.9	6.1	21.1	99.6	6.2	4.2	21.8	4.9

10

## 【0481】

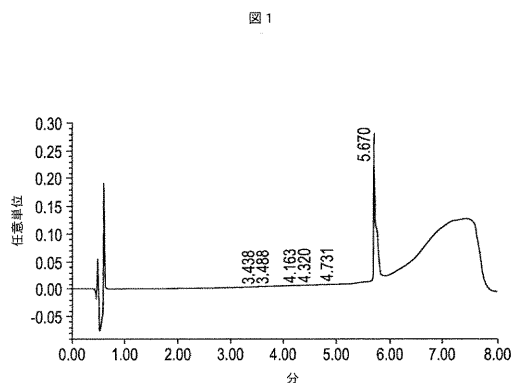
5 では3か月後に全ての製剤が同様に見えた。pHの内容または面積 純度%に認識可能な変化はなかった。40 では全ての製剤についてpH, 純度および含量が減少した。最も良い結果が10mMのリン酸濃度で得られたが、これは高イオン強度が安定性に負の影響を与える可能性があることを示している。したがって、10mMのリン酸が緩衝液の濃度として選択された。

## 【0482】

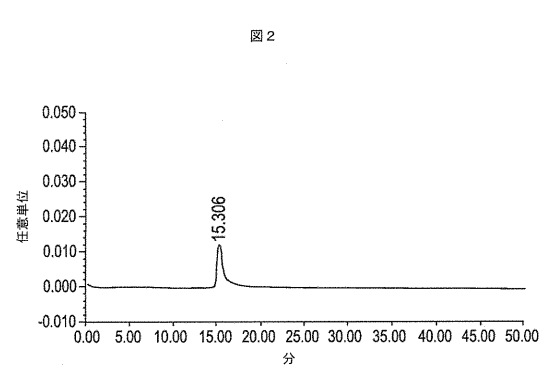
前述の記述から、当業者は本発明の基本的特徴を容易に確認することができ、そして、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、本発明に様々な変更と修正を行って様々な利用法と条件に本発明を適合させることができる。

20

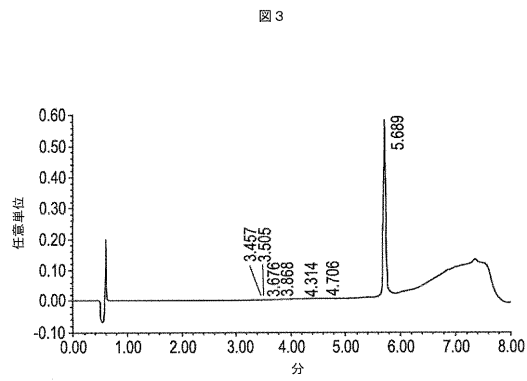
【図 1】



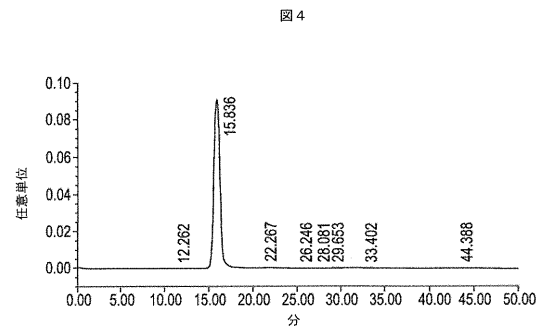
【図 2】



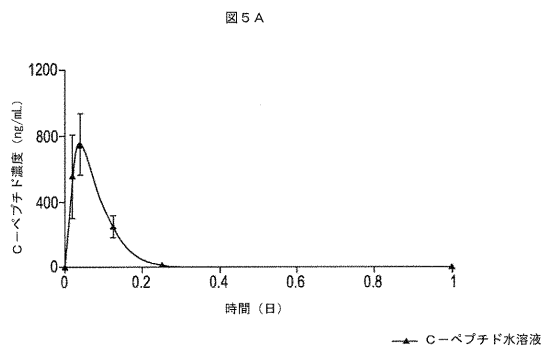
【 図 3 】



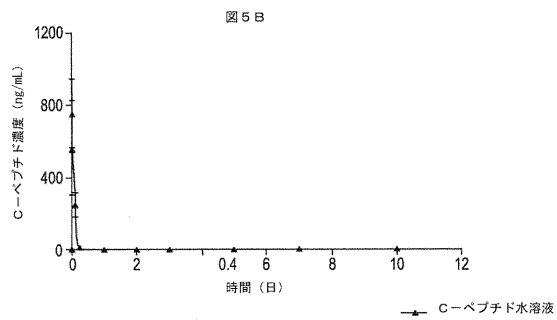
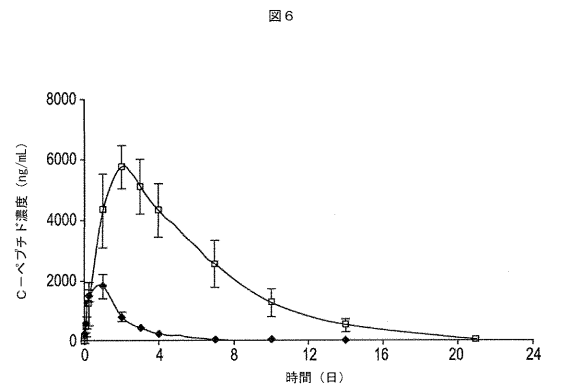
【 図 4 】



【 図 5 】

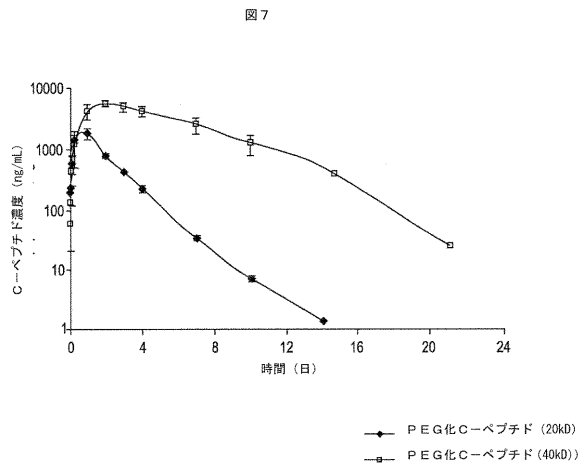


【 図 6 】

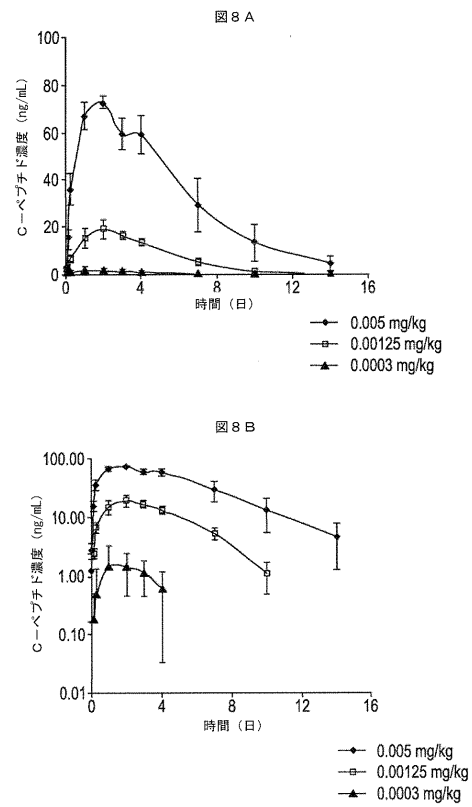




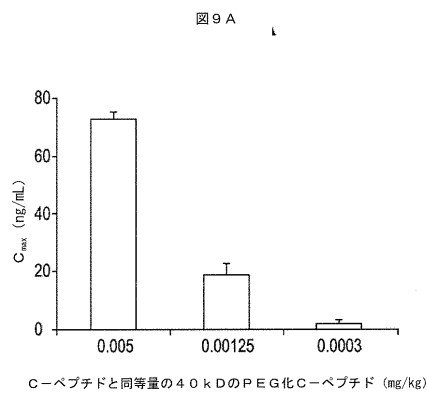
【図 7】



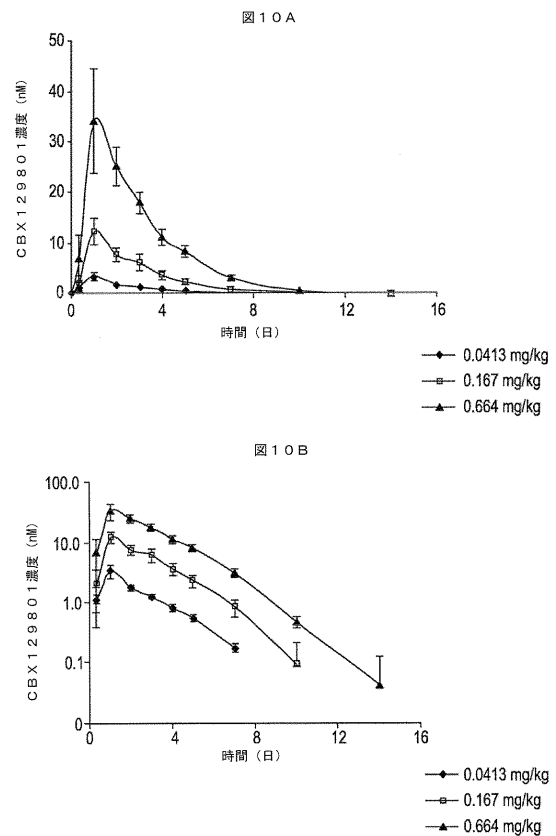
【図 8】



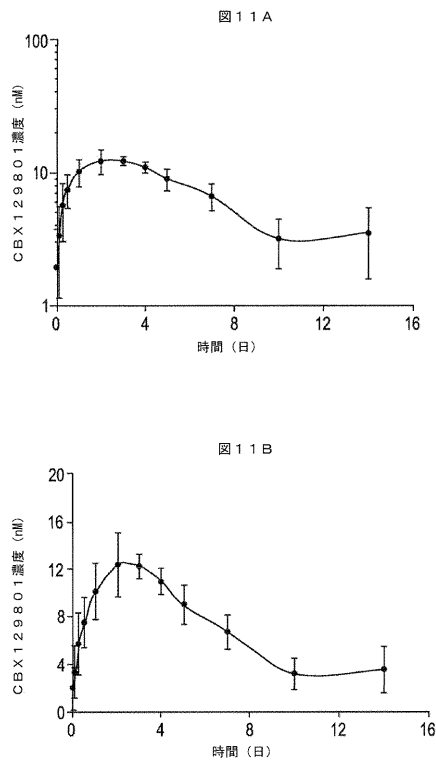
【図 9】



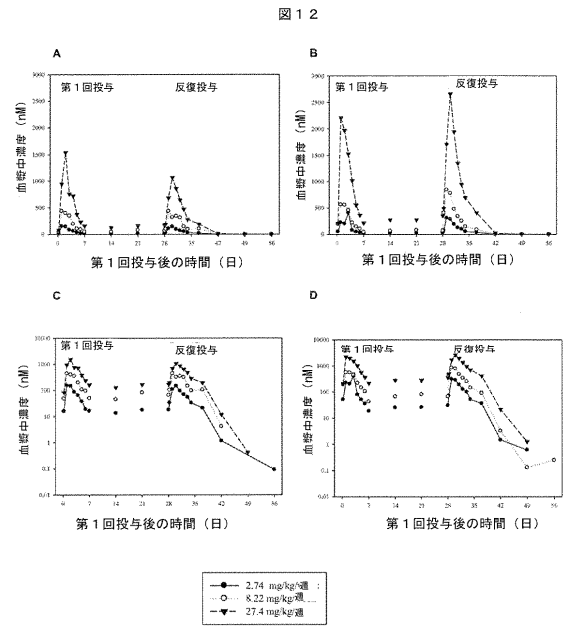
【図 10】



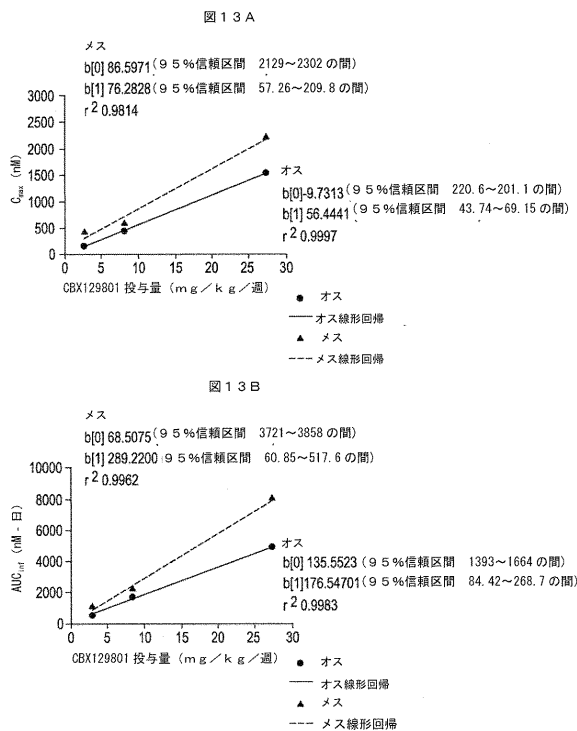
【図 1 1】



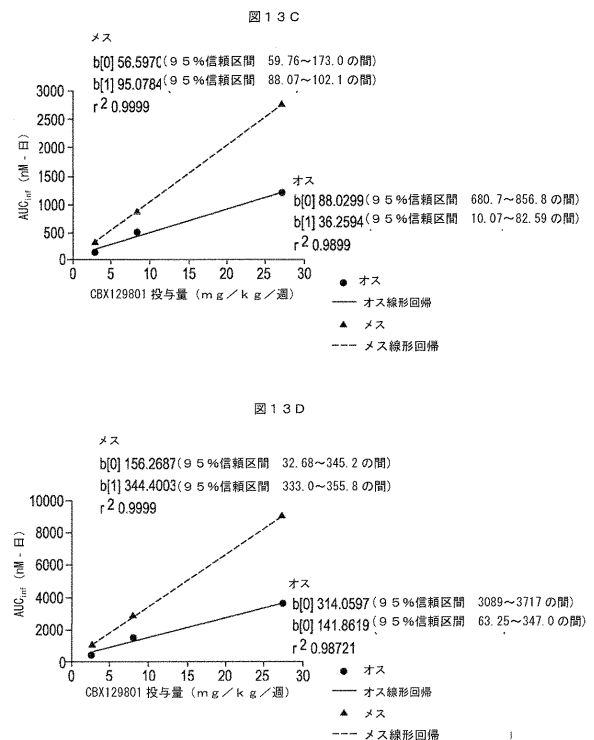
【図 1 2】



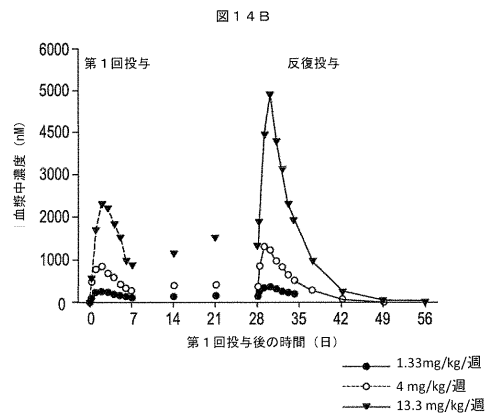
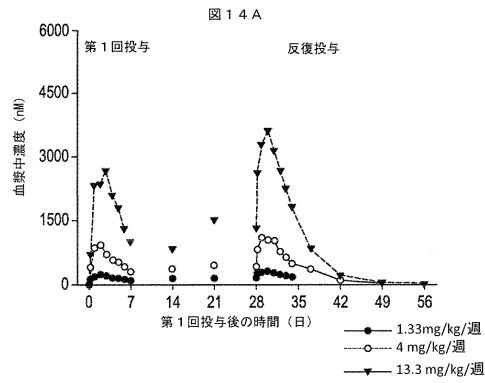
【図 1 3 - 1】



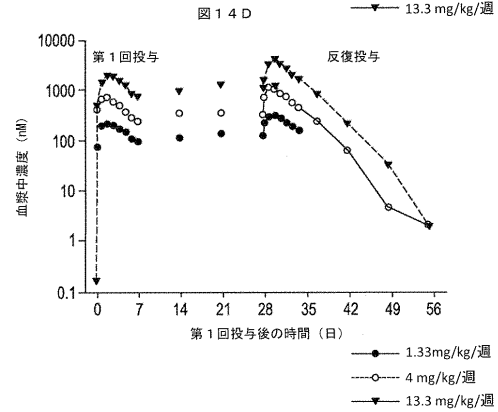
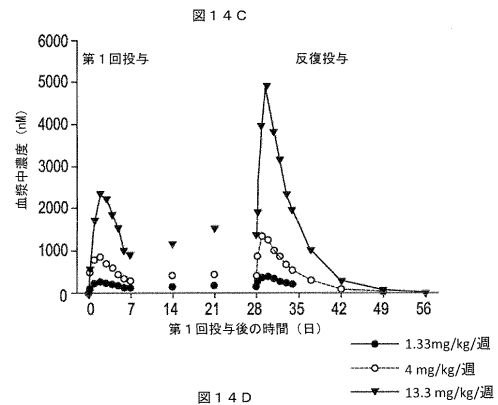
【図 1 3 - 2】



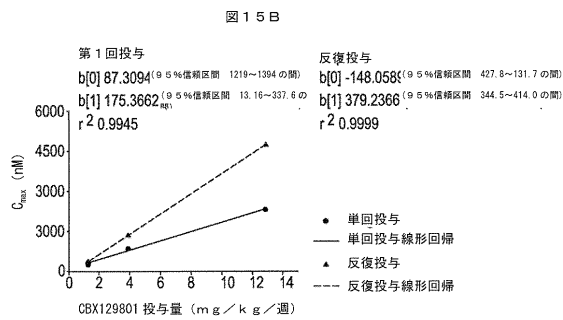
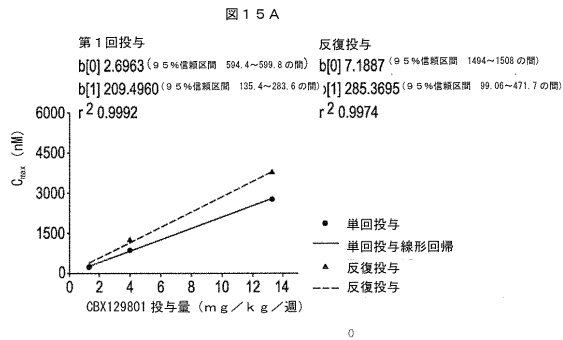
【図 14 - 1】



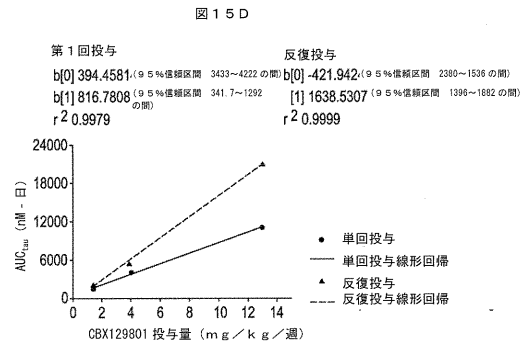
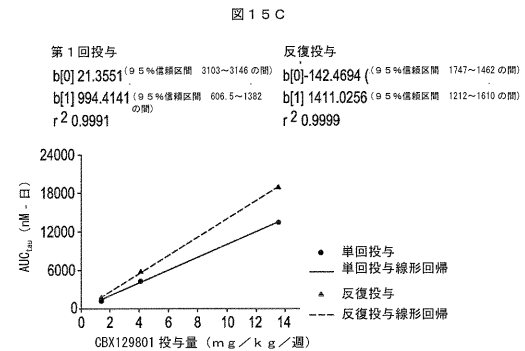
【図 14 - 2】



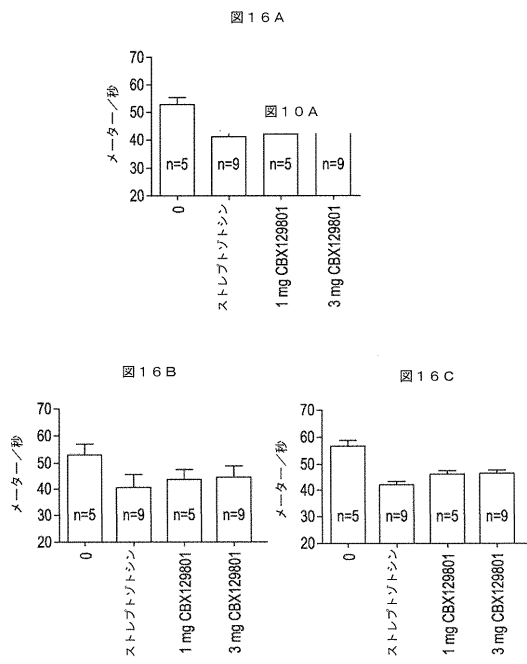
【図 15 - 1】



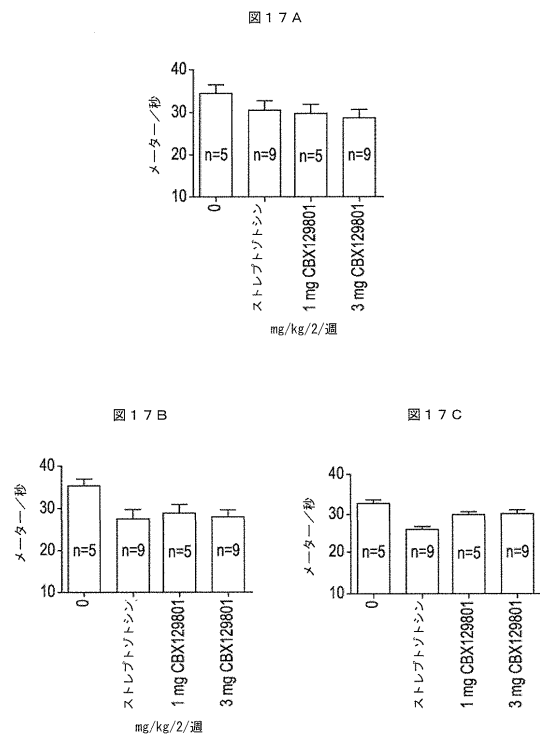
【図 15 - 2】



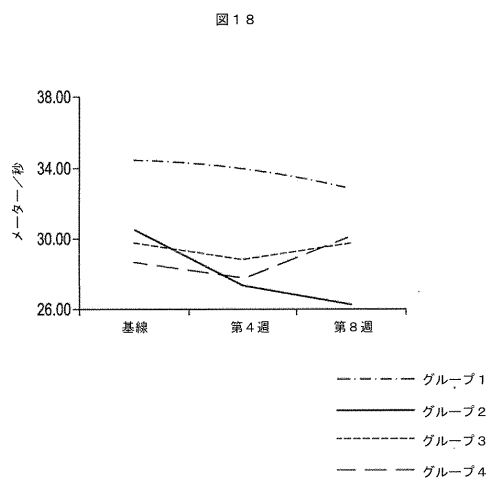
【図 16】



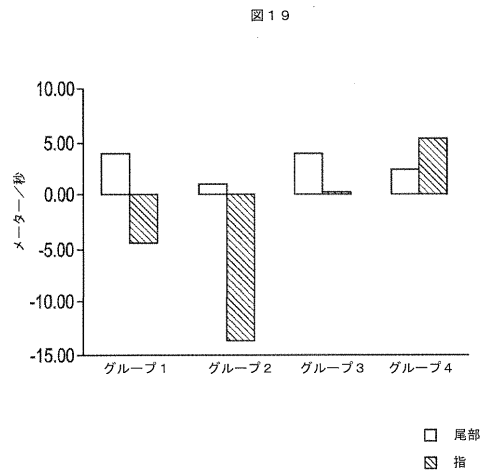
【図 17】



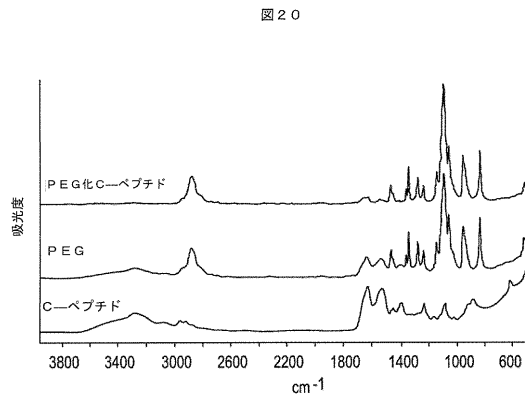
【図 18】



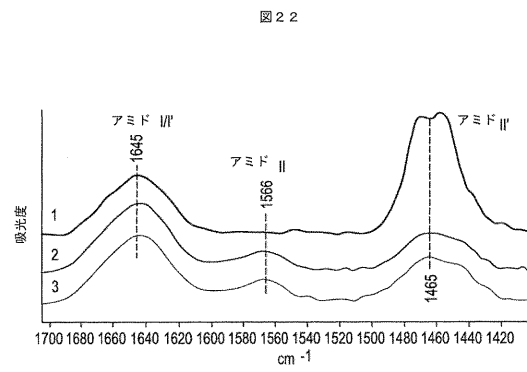
【図 19】



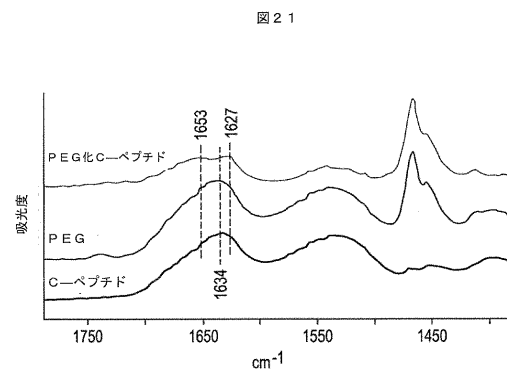
【図 20】



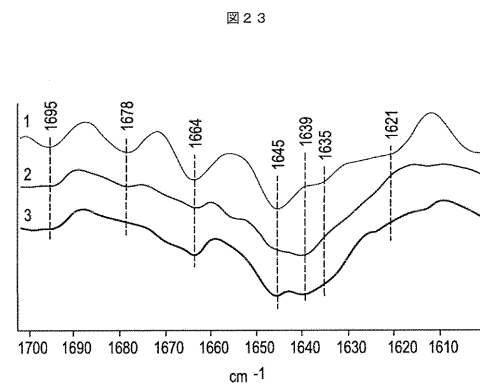
【図 22】



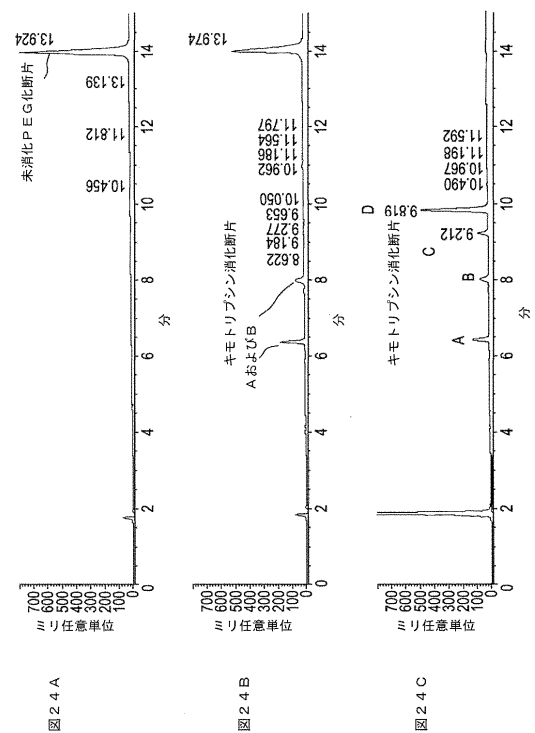
【図 21】



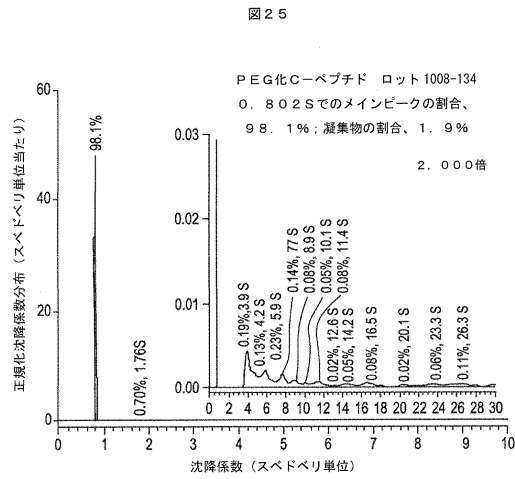
【図 23】



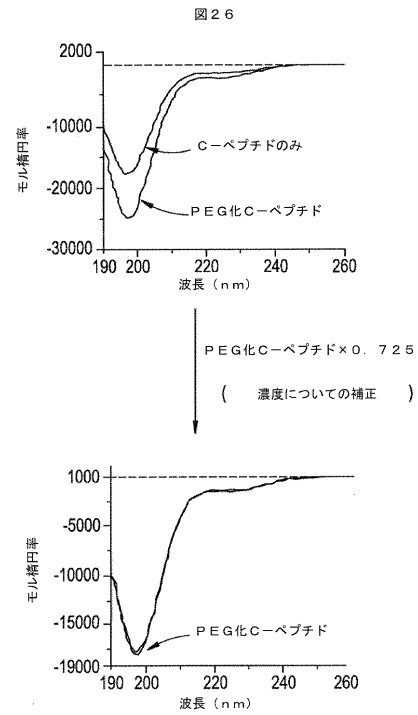
【図 24】



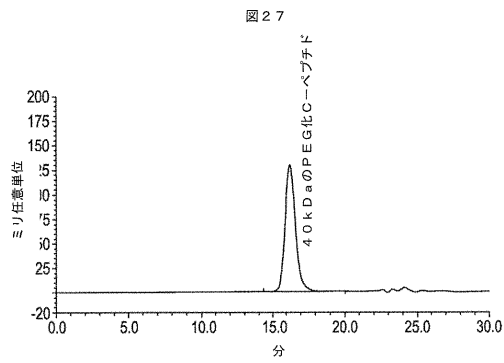
【図 25】



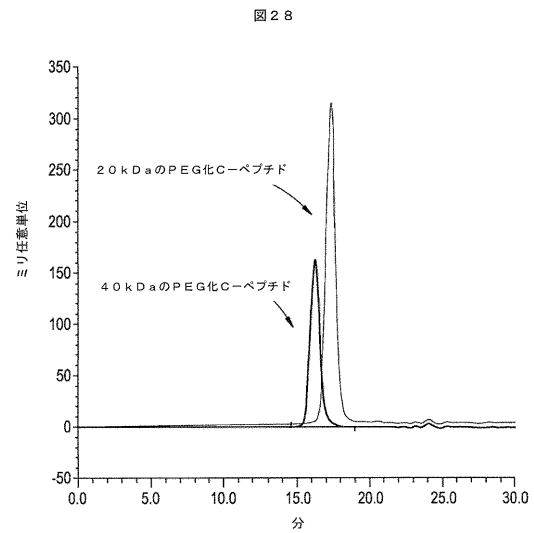
【図 26】



【図 27】

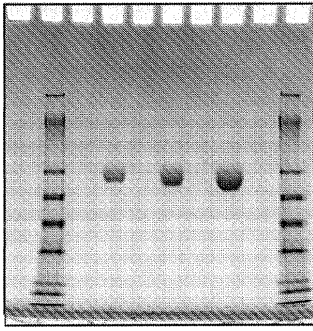


【図 28】



## 【 図 2 9 】

図 2 9



## 【 図 3 0 】

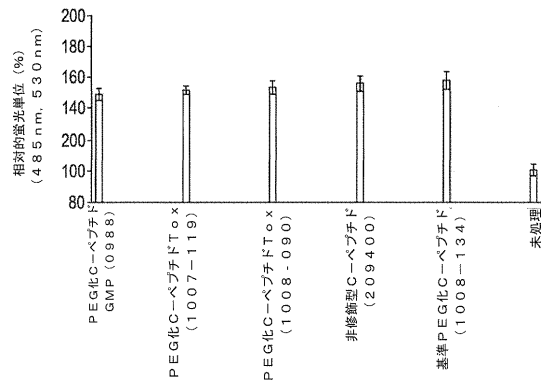


FIG. 4

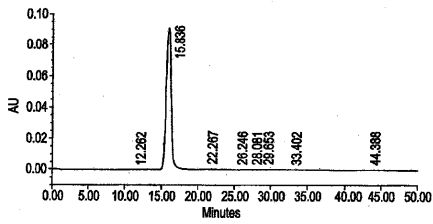


FIG. 5A

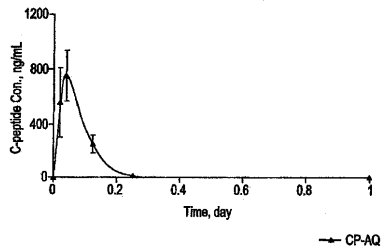


FIG. 5B

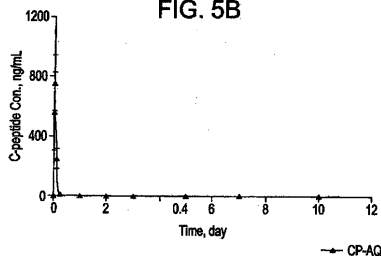


FIG. 1

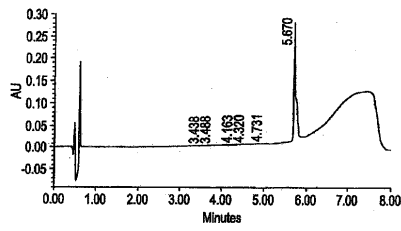


FIG. 2

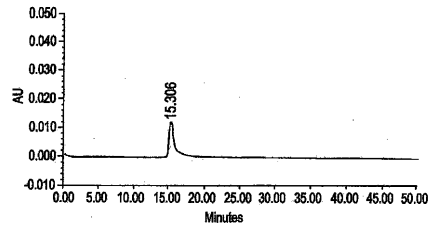


FIG. 3

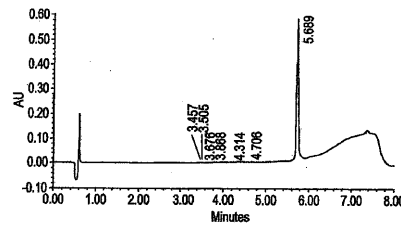


FIG. 6

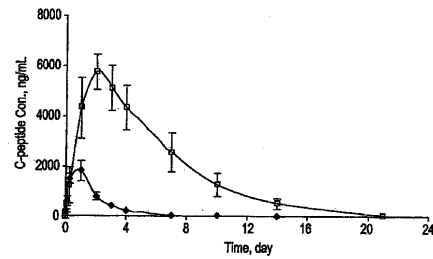
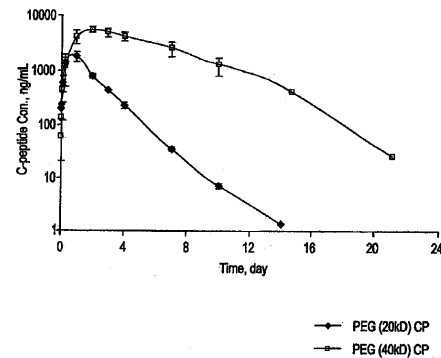
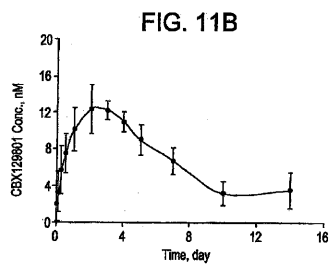
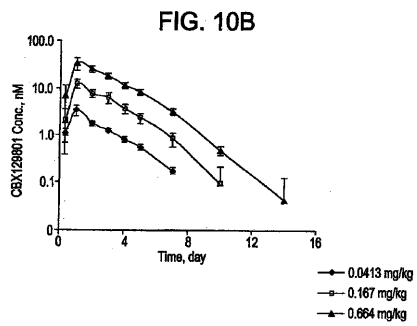
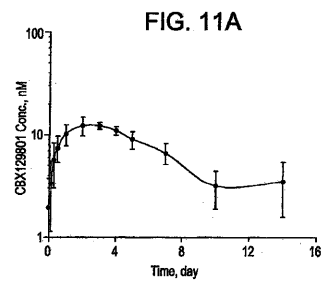
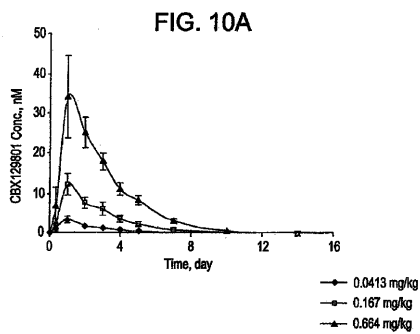
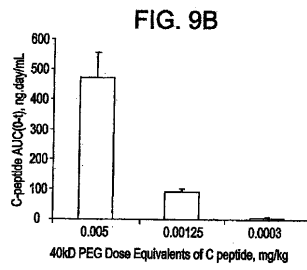
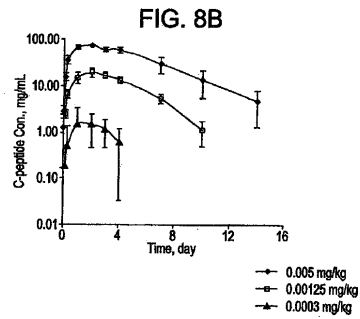
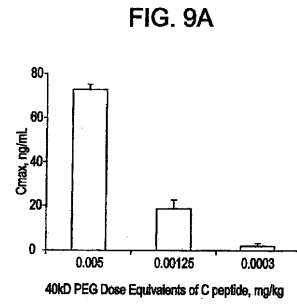
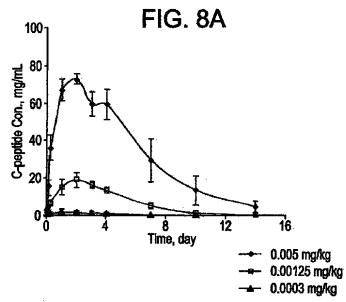
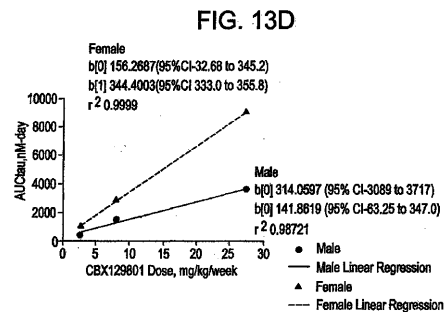
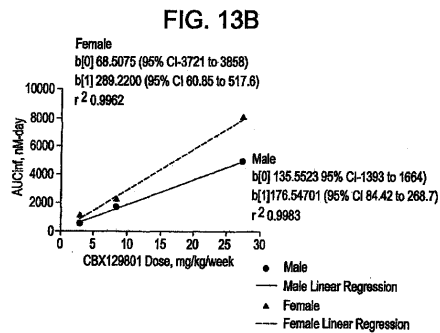
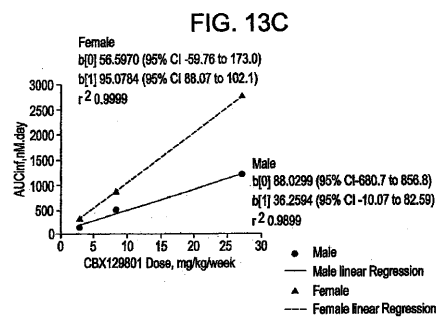
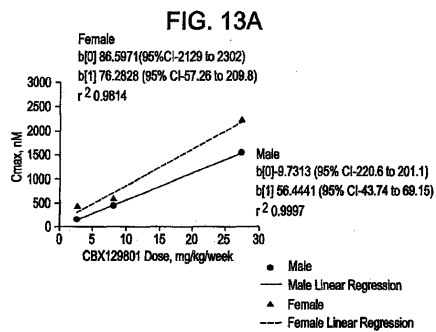
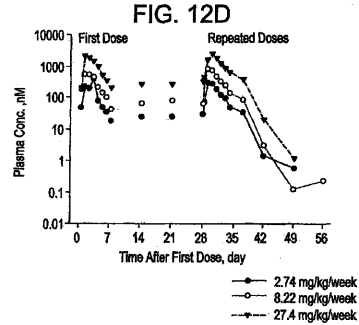
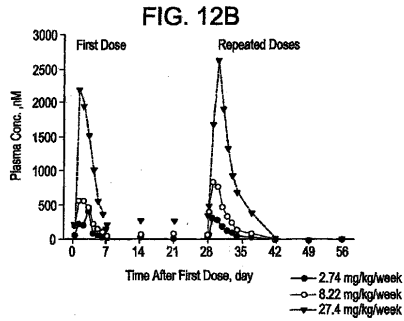
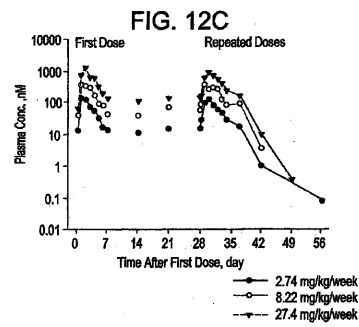
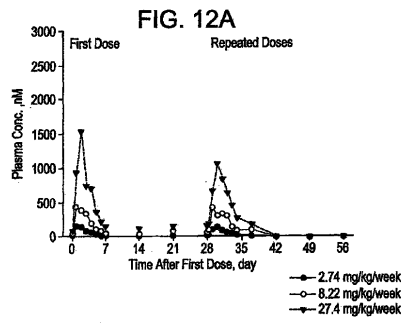


FIG. 7









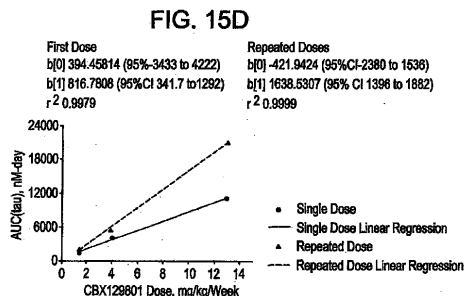
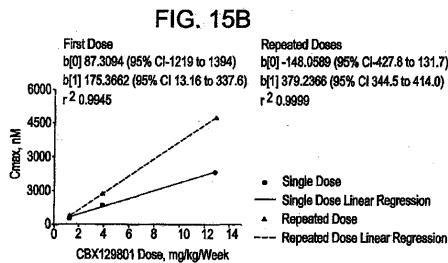
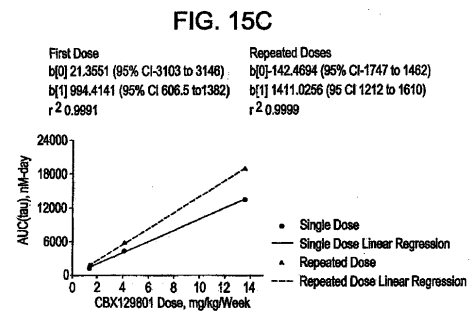
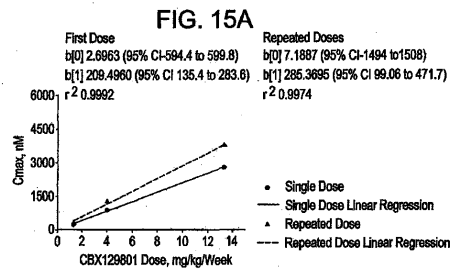
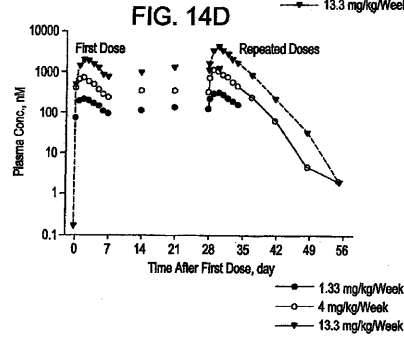
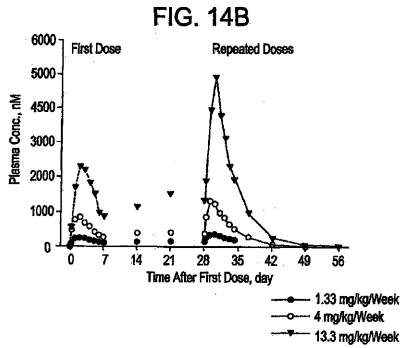
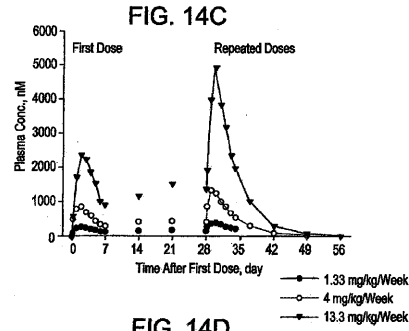
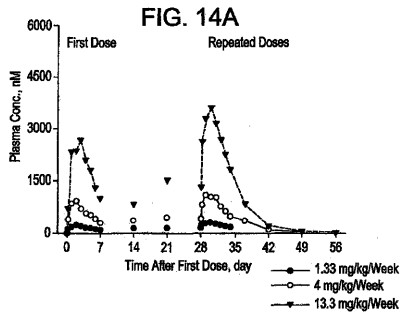


FIG. 16A

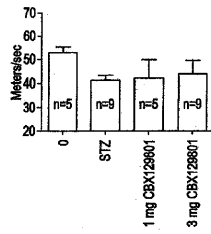


FIG. 17A

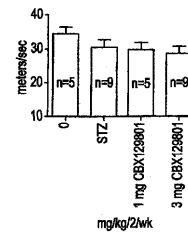


FIG. 16B

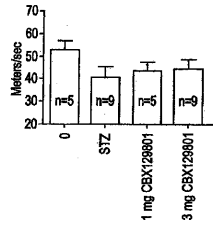


FIG. 16C

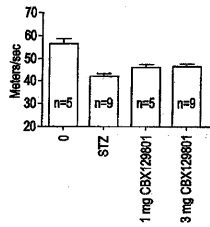


FIG. 17B

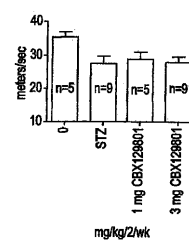


FIG. 17C

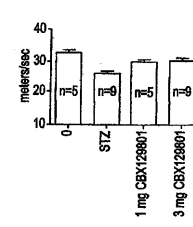


FIG. 18

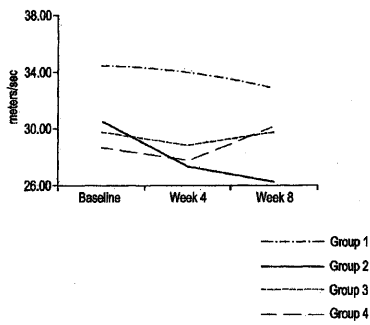


FIG. 20

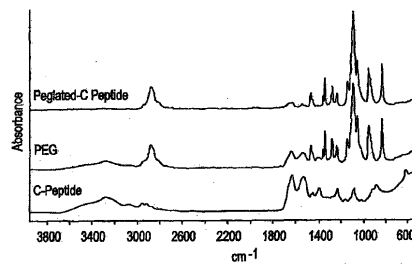


FIG. 21

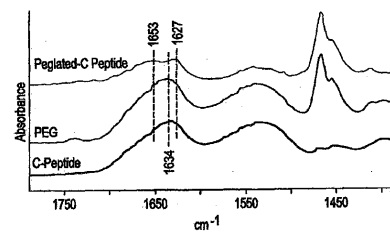


FIG. 19

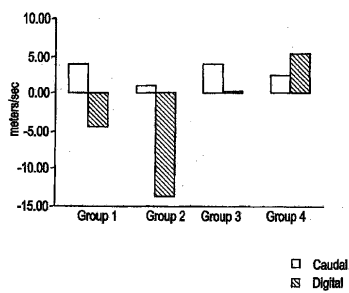


FIG. 22

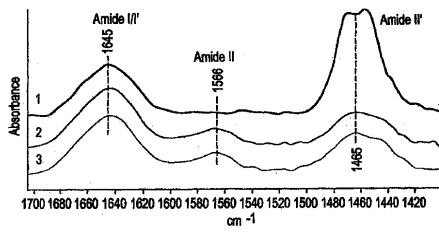


FIG. 23

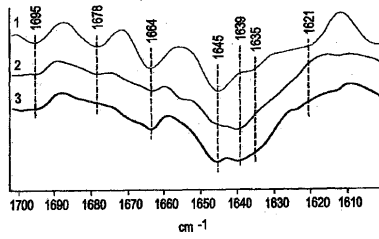


FIG. 25

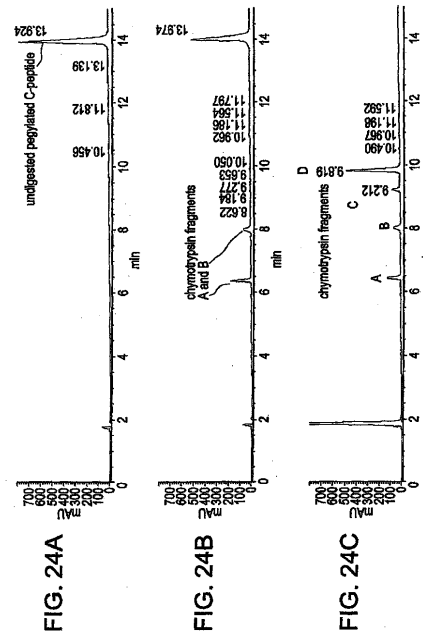
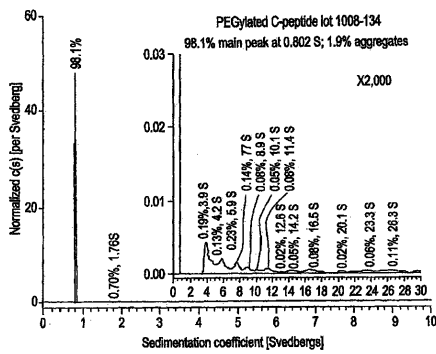


FIG. 26

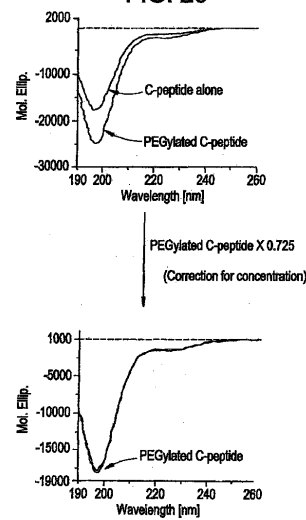


FIG. 27

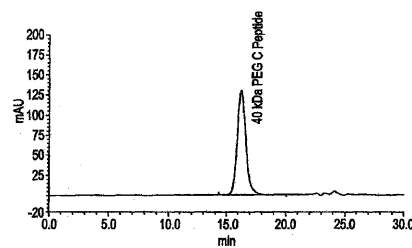


FIG. 28

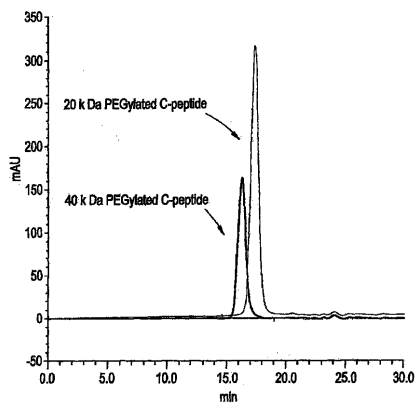


FIG. 29

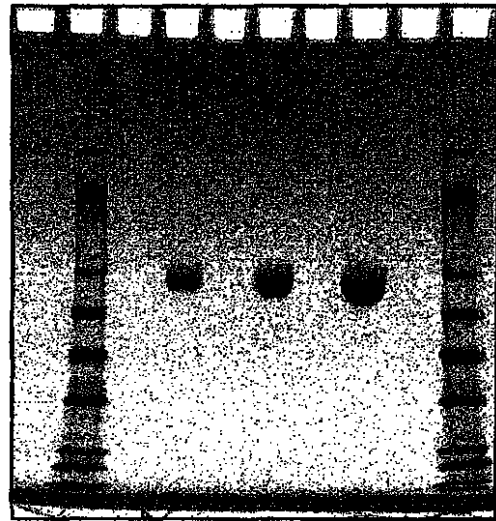
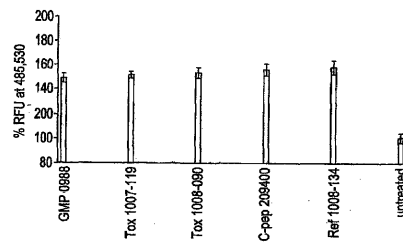




FIG. 30



【配列表】

2013533217000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2011/036858</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C07K 14/575(2006.01); C07K 17/08(2006.01); A61K 38/22(2006.01); A61K 47/30(2006.01); A61K 47/48(2006.01); A61P 3/10(2006.01)</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/575; A61K 31/765; A61K 38/00; A61K 38/28; A61K 38/23; A61K 31/785; A61K 47/48; C07K 14/62; C12P 21/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: C-peptide, connecting-peptide, PEGylation, linker		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010-033204 A2 (NEKTAR THERAPEUTICS) 25 March 2010 See Abstract, Table 1, 3, Claims 2, 3, 10, 11.	1-27
X	WO 2010-033207 A1 (NEKTAR THERAPEUTICS) 25 March 2010 See Abstract, Table 1, Pages 395-398(Examples)	1-27
X A	US 2003-0228275 A1 (NNOCHIRI N. EKWURIBE et al.) 11 December 2003 See Abstract, Paragraph 18, Claim 1	1,5,6 2-4,7-27
A	US 2003-0228652 A1 (BALASINGAM RADHAKRISHNAN et al.) 11 December 2003 See Abstract, Claims 1, 15, 135	1-27
A	US 2005-0112088 A1 (XUAN ZHAO et al.) 26 May 2005 See Abstract, Paragraphs 16, 175, Claims 1, 13	1-27
A	US 2003-0069170 A1 (RICHARD SOLTERO et al.) 10 April 2003 See Abstract, Paragraphs 152, 200-201, 389, Claims 1, 6, 19	1-27
A	WO 2006-097521 A1 (NOVO NORDISK A/S) 21 September 2006 See Abstract, Claim 1	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "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 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 16 JANUARY 2012 (16.01.2012)		Date of mailing of the international search report <b>17 JANUARY 2012 (17.01.2012)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer PARK, Yeong-Gwan Telephone No. 82-42-481-8407 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2011/036858**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Joseph Tam et al., 'Dual-action peptides: a new strategy in the treatment of diabetes-associated neuropathy', Drug Discovery Today, Vol. 11, pp. 254-260(March 2006). See Abstract, Page 257, column 1 paragraph 1, Table 1.	1-27

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/036858

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 33-49 and 68  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 33-49 and 68 pertain to methods for treatment or diagnosis of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 35-38, 52, 55-57, 59-61, 63 and 65  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Since claims 35-38, 52, 55-57, 59-61, 63 and 65 directly or indirectly refer to claims 34, 51, 54, 58, 62 or 64 which are not drafted in accordance with the second and/or third sentence of Rule 6.4(a), this international search report of the claims has not been established.
3. ☒ Claims Nos.: 28-34, 39-51, 53, 54, 58, 62, 64 and 66-68  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/036858**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010-033204 A2	25.03.2010	EP 2334338 A2 US 2011-0165112 A1 WO 2010-033204 A3	22.06.2011 07.07.2011 03.06.2010
WO 2010-033207 A1	25.03.2010	AU 2009-292643 A1 CA 2737040 A1 EP 2334336 A1 EP 2334337 A1 EP 2341942 A1 EP 2350118 A2 US 2011-0166063 A1 US 2011-0171165 A1 US 2011-0171166 A1 US 2011-0171716 A1 WO 2010-033218 A1 WO 2010-033223 A1 WO 2010-033240 A2 WO 2010-033240 A3	25.03.2010 25.03.2010 22.06.2011 22.06.2011 13.07.2011 03.08.2011 07.07.2011 14.07.2011 14.07.2011 14.07.2011 25.03.2010 25.03.2010 25.03.2010 17.06.2010
US 2003-0228275 A1	11.12.2003	BR 0106401 A EP 1404355 A1 JP 2003-104913 A US 2005-0136032 A1 US 2006-0153801 A1 US 2008-312135 A1 US 6858580 B2 WO 02-098446 A1	11.02.2003 07.04.2004 09.04.2003 23.06.2005 13.07.2006 18.12.2008 22.02.2005 12.12.2002
US 2003-0228652 A1	11.12.2003	AU 2002-329989 A8 EP 1430082 A2 EP 1430082 A4 EP 1430082 B1 EP 1613343 A2 EP 1613343 A4 JP 04-318546 B2 JP 04-602968 B2 JP 2005-502353 A JP 2006-520384 A US 2003-0087808 A1 US 2003-0229009 A1 US 2005-0080001 A1 US 2005-0277580 A1 US 6913903 B2 US 7166571 B2 US 7312192 B2 US 7368260 B2 US 7611864 B2 WO 03-022996 A2 WO 2004-083234 A2	24.03.2003 23.06.2004 24.11.2004 28.10.2009 11.01.2006 05.03.2008 05.06.2009 08.10.2010 27.01.2005 07.09.2006 08.05.2003 11.12.2003 14.04.2005 15.12.2005 05.07.2005 23.01.2007 25.12.2007 06.05.2008 03.11.2009 20.03.2003 30.09.2004

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/036858**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005-0112088 A1	26.05.2005	AU 2004-274489 A1	31.03.2005
		AU 2004-274489 B2	09.06.2011
		AU 2011-202402 A1	09.06.2011
		CA 2537336 A1	31.03.2005
		CN 1852740 A	25.10.2006
		CN 1852740 B	11.05.2011
		CN 1852740 C0	25.10.2006
		EP 1675622 A2	05.07.2006
		JP 2007-505928 A	15.03.2007
		JP 2011-213727 A	27.10.2011
		KR 10-2006-0090705 A	14.08.2006
		US 2008-0194612 A1	14.08.2008
		US 2010-0152414 A1	17.06.2010
		US 2010-0190933 A1	29.07.2010
		US 7744861 B2	29.06.2010
		WO 2005-028539 A2	31.03.2005
		WO 2005-028539 A3	24.11.2005
US 2003-0069170 A1	10.04.2003	AU 2002-244020 B2	16.08.2007
		CA 2437940 A1	29.08.2002
		EP 1409006 A2	21.04.2004
		EP 1409006 A4	19.01.2005
		EP 1409006 B1	30.03.2011
		EP 1463321 A2	29.09.2004
		EP 1463321 A3	16.03.2005
		JP 04-113778 B2	09.07.2008
		JP 2004-527487 A	09.09.2004
		KR 10-0896945 B1	14.05.2009
		US 2003-0050228 A1	13.03.2003
		US 2003-0083232 A1	01.05.2003
		US 2004-0017387 A1	29.01.2004
		US 2004-0038866 A1	26.02.2004
		US 2004-0038867 A1	26.02.2004
		US 2004-0046780 A1	11.03.2004
		US 2006-0100137 A1	11.05.2006
		US 2006-0293219 A1	28.12.2006
		US 6770625 B2	03.08.2004
		US 6867183 B2	15.03.2005
		US 7030082 B2	18.04.2006
		US 7060675 B2	13.06.2006
		US 7196059 B2	27.03.2007
		US 7381702 B2	03.06.2008
		US 7423014 B2	09.09.2008
		US 7601688 B2	13.10.2009
		WO 02-065985 A2	29.08.2002
WO 2006-097521 A1	21.09.2006	EP 1863840 A1	12.12.2007
		JP 2008-533100 A	21.08.2008
		US 2010-0216690 A1	26.08.2010

## 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 K 47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 P 25/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 25/02	1 0 3
		A 6 1 P 13/12	

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. テフロン

(72)発明者 シェリ・バラック  
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州ラホーヤ、プロスペクト・ストリート 1 2 9 8 番、スウィート 2 エイ

(72)発明者 ジェイムズ・キャラウェイ  
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州ラホーヤ、プロスペクト・ストリート 1 2 9 8 番、スウィート 2 エイ

(72)発明者 ミッシェル・マツオーニ  
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州ラホーヤ、プロスペクト・ストリート 1 2 9 8 番、スウィート 2 エイ

F ターム(参考) 4C076 AA11 BB16 CC29 CC41 EE59Q FF31  
4C084 AA02 AA07 BA37 BA44 BA50 DB34 MA02 MA66 NA06 ZA011  
ZA201 ZA331 ZA811 ZC351 ZC352  
4H045 AA10 AA30 BA57 CA40 EA20 HA07